

Thèse de Doctorat

Judith LORANT

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur d'Oniris - École Nationale Vétérinaire Agroalimentaire et de
l'Alimentation Nantes-Atlantique
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : *Biologie-Santé*

Discipline : *Biologie, médecine et santé*

Spécialité : *Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie*

Unité de recherche : *UMR 703 PAnTher INRA/Oniris*

Soutenue le *16 Décembre 2016*

Cellules souches adultes MuStem : phénotype, myogénicité, immunomodulation et contexte immunologique d'administration *in vivo*

JURY

Rapporteurs : **Karine TARTE**, PUPH, UMR 917 INSERM, Faculté de médecine de Rennes
Farida DJOUAD, CR, UMR 1183 INSERM, IRMB, Montpellier

Examineurs : **Anne BONNIEU**, DR, UMR 866 INRA, Université de Montpellier
Anne FERNANDEZ, DR, UPR 1142 CNRS, IGH, Montpellier

Directeur de Thèse : **Marie-Anne COLLE**, PR, UMR 703 INRA/Oniris, AGT, Nantes

Co-encadrants de Thèse : **Karl ROUGER**, CR, UMR 703 INRA/Oniris, AGT, Nantes
Oumeya ADJALI, CR, UMR 1089 INSERM, AGT, Nantes

Remerciements

Le devenir d'une cellule souche, cellule immature, est largement lié à sa niche, c'est-à-dire à l'environnement au sein duquel elle va évoluer et rencontrer éventuellement des signaux qui vont l'aider à se différencier, à devenir une cellule spécialisée. Ainsi en est-il du petit doctorant qui, au début de sa thèse, est parfaitement immature et se spécialise durant ces trois années. Je voudrais donc remercier ma niche, mon environnement qui a tant compté pour moi depuis ces cinq années.

Mes remerciements vont tout d'abord aux membres de mon jury de soutenance pour avoir accepté d'évaluer ce travail. Merci infiniment à Mesdames Karine Tarte, Farida Djouad, Anne Bonnieu et Anne Fernandez.

Un grand merci également à Marie-Anne Colle pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et apporté des conseils avisés. Un merci tout particulier à Karl Rouger pour notre aventure commune, commencée en 2011. La cellule immature que j'étais a rencontré une cytokine, passionnée par son travail et transmettant cette passion à son environnement. Si j'en suis arrivée à me différencier "efficacement", c'est grandement grâce à toi. Petit Padawan, je t'ai suivi sur le chemin de la Force, découvrant les joies des réunions jusqu'à 22h30, les coups de fils survoltés lorsque j'avais des résultats prometteurs ou une idée, et la grande disponibilité dont tu n'as cessé de faire preuve à toute heure du jour ou de la nuit. J'ai découvert l'heure fatidique de 21h pendant que tu découvrais que même avec un plan, mon sens de l'orientation resterait désespérément médiocre. Cette thèse a été parsemée de moments de doute mais pas si nombreux que ça au final, et je te remercie très sincèrement pour ton soutien qui, jamais ne m'a fait défaut. J'ai trouvé un mentor, un guide exceptionnel. Au passage, un grand merci à Valérie pour sa patience et sa bonne humeur.

Je voudrais aussi remercier du fond du cœur Blandine Lieubeau, bien plus qu'une collaboratrice, pour ta patience (mes plans de plaque te surprendront toujours, n'est-ce pas ?). Et que dire du nombre impressionnant de conseils et de bonnes idées, de ta bonne humeur constante, jamais prise en défaut, même lorsque je te descendais 60 tubes à passer au FACS !

Merci à Oumeya Adjali, co-encadrante de thèse ; à Nicolas Jaulin pour m'avoir aidée sur les manips de co-cultures, et pour sa bonne humeur.

A l'équipe lilloise, Bruno Delorme, Sabrina Viau, Lucie Chabrand et Sandy Eap, pour votre gentillesse, les échanges fructueux que nous avons eus, l'aide que vous avez apportée à ce projet ! L'équipe parisienne, composée de Vincent Mouly, Gillian Butler-Browne, Elisa Négroni et Ludovic Arandel, grâce à qui les manips souris ont pu se faire, mérite aussi toute ma reconnaissance.

Merci à Elodie Bacou et Anne Mouré pour votre aide sur les manips macrophages et votre bonne humeur ; Delphine Coulais et Anne-Claire Branchu de la plate-forme DTC pour avoir fourni les lymphos et les mono et surtout pour vous être coordonnées afin de me permettre de faire l'aller-retour, école véto-centre ville ; Emmanuelle Moreau et Nathalie Delacotte pour avoir fourni les globules rouges de mouton.

Je tiens également à remercier Candice Babarit et Cindy Schleder, mes petites poulettes. Le GPS restera dans ma mémoire et, malheureusement, nous en ferons toujours partie ! Les fous rires, la culture cellulaire et la BM, les soirées Pikachu, le cheval... et tout le reste ! Ce n'est qu'un début : quoi qu'il advienne, c'est promis, nous continuerons à nous voir !

Mes remerciements vont évidemment à Laetitia Guével qui m'a orientée vers le laboratoire il y a de ça déjà cinq ans et avec qui j'ai passé de bons moments en congrès, à Helsinki et à La Haye ! Et je ne saurais oublier Thibaut Larcher, mon coach diététique personnel, qui a tout tenté pour me remettre sur la voie d'une alimentation équilibrée. Pas plus que Laurence Dubreil pour l'aide précieuse en microscopie et ses conseils toujours excellents et bienvenus. Ni Mireille Ledevin pour la quantité phénoménale de lames de muscle réalisées de souris et de chien.

Je remercie Isabelle Leroux, pour la bonne humeur en salle de culture et pour ce screen mémorable de muscles de chiens et le mal de mer qui s'en est suivi ; Lydie Guigand, pour sa patience concernant les commandes (je dois avoir le record d'erreur de remplissage du tableau de commande haut la main) ; Johan Deniaud, pour les échanges notamment à

la cafét ou en salle d'immuno ; Hélicia Goubin, pour avoir croisé ta route, peut-être un jour nous reverrons-nous au Hellfest ?

Merci encore à Lydie Lagalice, doctorante, pour les soirées partagées, trop rares mais toujours très sympas ainsi que pour ces échanges autour de ces satanées MuStem ; à Charlotte Saury, collègue de thèse, pour avoir partagé ces deux années avec moi (courage, tu es presque au bout !) ; à Florence Robriquet, collègue de thèse.

Merci encore à la team neuro, présente et passée, Karim Bey et Juliette Hordeaux, doctorants neuro ; à Dorothee pour les problèmes administratifs réglés souvent à la dernière minute ; aux résidents ana-path, Nicolas Gaide, mon chorégraphe officiel, Cynthia Robveille, Elie Dagher. Et à Laetitia Dorso pour ces moments détente dans notre bureau ou parfois coup de gueule qui font du bien ! Mes remerciements vont encore aux membres du LHA pour la bonne humeur dans la cafet, Florence, Bernard et spécialement Sophie Lancien et Cécile Barré ; aux nouveaux venus, Ioannis, Prathap, Claire, Clémence, Virginie, même si nous n'avons pas eu suffisamment d'occasions de nous croiser, avec une mention toute spéciale pour Kévin, barman en chef pourvu d'un don incroyable ! Et parce qu'il ne faut pas oublier les morveux en culotte courte, merci aussi à Julien !

Enfin, je souhaiterais remercier tous les étudiants que j'ai encadrés, spécialement Rachel Ramchurn et Marine Charrier. Vous êtes les meilleurs souvenirs de mes années d'encadrement et je vous souhaite sincèrement le meilleur pour la suite, vous le méritez bien. (Marine, maman sera toujours dans le coin pour te filer un coup de main)

Et comment ne pas remercier tous mes proches, sans qui je n'aurai pas pu mener ce projet à bien : Audrey, mon amie depuis bientôt 15 ans ; Roland, ami fidèle que je n'ai pourtant vu que deux fois. A Nanou, la tata d'amérique par ailleurs professeur de renom. A Abdou pour les tours en vélo qui resteront toujours dans ma mémoire. A Oumi, pour tous nos souvenirs d'enfance, notamment celui d'avoir sauté sur son dos quand elle faisait ses prières. Merci à Marie, Babou et Sab, Nelly et Gabriel, ma belle-famille qui m'a si bien accueillie !

Et, comme on finit toujours par le meilleur, merci à mes parents. Pour tout, depuis le début. Pour m'avoir toujours soutenu dans mes choix, quels qu'ils aient été. Pour cet accompagnement indéfectible qui m'a porté depuis mes premiers pas : c'est grâce à vous que j'en suis là aujourd'hui.

Enfin, merci à mon mari, Pierrick. Mon équilibre. Mon ami et compagnon. Bientôt 10 ans et tout est comme au premier jour. C'est même mieux !

Liste des abréviations

7-AAD	7-amino actinomycin D	GRMD	Golden Retriever Muscular Dystrophy
AAV	Adeno-Associated Virus	GvHD	Graft versus Host Disease
AD	Autosomale Dominante	HAC	Human Artificial Chromosome
ADN	Acide Désoxyribonucléique	HDAC	Histone De-acetylase
ALDH	Aldehyde dehydrogenase	HES	Hemalun-Eosine-Safran
ALP	Alcaline Phosphatase	HFMD	Hypertrophic Feline Muscular Dystrophy
ANOVA	Analysis of Variance	HGF	Hepatocyte Growth Factor
AO	Antisens oligonucleotide	HLA	Human Leukocyte Antigen
ARN	Acide Ribo-Nucléique	HMGB	High Mobility Group Box
ARNm	Acide Ribo-Nucléique messenger	HO-1	Heme Oxygenase-1
ASC	Adipose Stem Cells	ICAM	InterCellular Adhesion Molecule
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor	IDO	Indoleamin-2,3-déoxycgénase
Bcrp1	Breast cancer resistance protein 1	IFN	Interferon
BMD	Becker Muscular Dystrophy	Ig	Immunoglobuline
BMP	Bone Morphogenetic Protein	IGF	Insulin Growth Factor
BM-MSC	Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell	IKK	Inhibitor of κ B kinase
Ca ²⁺	Ion Calcique	IL	Interleukin
CD	Cluster of Differentiation	IM	IntraMusculaire
CFSE	Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester	iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase
c-GMP	Cyclic-Guanin Mono-Phosphate	iPSC	induced Pluripotent Stem Cell
CK	Créatine kinase	IS	ImmunoSuppression
c-kit	Cellular kitten	IV	IntraVeineux
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité	KDA	KiloDalton
CMV	CytoMégaloVirus	Klf	Kruppel-like factor
c-myc	Cellular Myelocytomatosis	LB	Lymphocytes B
ConA	Concanavaline A	LFA	Lymphocyte Function Antigen
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats	LGMD	Limb girdle muscular dystrophy
CSA	Cyclosporin A	LIF	Leukemia Inhibitory Factor
CSH	Cellules Souches Hématopoïétiques	lin	lineage
CSM	Cellules Souches Mésochymateuses	LT	Lymphocytes T
CXCR	CXC chemokine Receptor	MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases
CXMD _J	Canine X-linked Muscular Dystrophy in Japan	MBP-1	Major Basic Protein
DAPC	Dystrophin Associated Protein Complex	MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole	MDAC	Myosphere-derived Adherent Cells
DMD	Dystrophie musculaire de Duchenne	MDPC	Myosphere-derived Progenitor Cells
DRP	Dystrophin-Related Protein	MDSC	Muscle-derived Stem Cells
DYS	Dystrophine	<i>mdx</i>	X-linked muscular dystrophy
EGF	Epidermal Growth Factor	MEM	Minimal Essential Medium
ESC	Embryonic Stem Cell	MHC	Myosin Heavy Chain
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting	miRNA	micro RiboNucleic Acid
FDA	Food and Drug Administration	MLR	Mixed Lymphocyte Reaction
Flk	Fetal liver kinase	MMP	Matrix Metallo-Protease
FPS	Fluoro-phosphorothioate	MRF	Myogenic Regulatory Factors
FSHD	Fascio-Scapulo-Humeral Dystrophy	MuSC	Muscle Stem Cells
G-CSF	Granulocyte-Colonies Stimulating Factor	Myf5	Myogenic factor-5
GFP	Green Fluorescent Protein	MyoD	Myogenic Differentiation-1
GMP	Good Medical Practice	NA	Norépinéphrine
		Nanog	Nanog homeobox
		NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule

NF-κB	Nuclear Factor-κ-light-chain-enhancer of activated B cells	TRPC	Transient Receptor Potential Canonical
NG	Neuro-Glial proteoglycan	TSG	TNF Stimulating Gene
NK	Natural Killer	ULA	Ultra-Low Attachment
NO	Nitric Oxide	VBS	Veronal Buffer Saline
nNOS	neuronal Nitric Oxide Synthase	VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
Oct	Octamer-binding transcription factor	VEGF	Vascular-Endothelial Growth Factor
OMP	O-méthyl-phosphorothioate	ZFN	Zinc Finger Nucléases
OPMD	Oculo-Pharyngeal Muscular Dystrophy		
Pax	Paired-box transcription factor		
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells		
PBS	Phosphate-Buffered Saline		
PCR	Polymerase Chain Reaction		
PD	Population Doubling		
PDE	Phosphodiesterase		
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor		
PDGFR	PDGF Receptor		
PDL	Population Doubling Level		
PFA	Paraformaldéhyde		
PGC	PPAR Gamma Coactivator		
PGE	Prostaglandin E		
PICs	PW1+/Pax7- Interstitial Cells		
PLA2	Phospholipase A2		
PMA	Phorbol12-myristate13-acetate		
PMO	Phosphorodiamidate morpholino oligomer		
PSGL	P-Selectin Glycoprotein Ligand		
Rag	Recombination-activating genes		
ROS	Reactive Oxygen Species		
RS	Reticulum sarcoplasmique		
RT-PCR	Reverse Transcriptase PCR		
SC	Satellite Cells		
Sca	Stem cell antigen		
SCID	Severe combined immunodeficiency		
SDF	Stromal-Derived Factor		
SG	Sarcoglycanes		
siRNA	Small interferent RiboNucleic Acid		
SMALD	Skeletal Muscle ALDH cells		
SM-MSC	Synovial-membrane Mesenchymal Stem Cells		
snRNA	Small nuclear RiboNucleic Acid		
Sox	Sex determining region Y-box 2		
SP	Side Population		
SRBC	Sheep Red Blood Cells		
SSEA	Stage-Specific Embryonic Antigen		
SVF	Sérum de Veau Foetal		
TA	<i>Tibialis Anterior</i>		
TAE	Tris, Acétate, EDTA		
TALEN	Transcription activator-like effector nuclease		
TGF	Transforming Growth Factor		
Th	T Helper		
TLR	Toll-like Receptor		
TNF	Tumor Necrosis Factor		

Liste des figures

Figure 1. Comparaison des thérapies autologue et allogénique.....	6
Figure 2. Distribution des muscles atteints dans différents types de dystrophies musculaires....	14
Figure 3. Représentation des transcrits produits chez une personne saine et un patient DMD....	15
Figure 4. Types de mutations du gène de la dystrophine chez les patients DMD.....	16
Figure 5. Représentation des différents types de dystrophine et des protéines associées.....	17
Figure 6. Complexe dystrophine-glycoprotéines.....	20
Figure 7. Modèle physiopathologique du « cercle vicieux » dans la DMD.....	23
Figure 8. Intervention des macrophages aux différents stades de régénération du muscle dystrophique.....	24
Figure 9. Signes cliniques d'un patient DMD.....	26
Figure 10. Evolution de la pathologie dystrophique chez la souris.....	27
Figure 11. Localisation des mutations identifiées sur le gène de la dystrophine chez les principaux modèles murins et canins.....	28
Figure 12. Comparaison des caractéristiques histologiques entre un chien sain et un chien GRMD.....	31
Figure 13. Evolution de la posture de chiens GRMD selon les différents phénotypes.....	32
Figure 14. Inhibition des voies de signalisation de l'atrophie par activation de l'hypertrophie.....	41
Figure 15. Principe du saut d'exon dans la DMD.....	48
Figure 16. Origine des cellules souches adultes utilisées pour la régénération musculaire.....	56
Figure 17. Capacité de différenciation des cellules souches.....	58
Figure 18. Divisions asymétriques des cellules souches.....	58
Figure 19. Localisation de la cellule satellite.....	60
Figure 20. Activation, différenciation et fusion des cellules satellites.....	62
Figure 21. Equilibre entre division symétrique et asymétrique dans un muscle DMD et un muscle sain.....	64
Figure 22. Régulation de l'activation des cellules satellites.....	65
Figure 23. Différenciation des CSH dans les lignées lymphoïde et myéloïde.....	68
Figure 24. Mécanismes d'immunomodulation des CSM.....	71
Figure 25. Isolement des cellules SP à partir de leur capacité à exclure le colorant Hoechst 33342.....	77
Figure 26. Expression de PW1 dans les cellules souches du muscle.....	80
Figure 27. Origine possible des mésoangioblastes.....	82
Figure 28. Profil des différentes fractions isolées par préplating.....	85
Figure 29. Stratégie de thérapie cellulaire basée sur l'administration d'iPS.....	89

Figure 30. Bilan des études pré-clinique et clinique concernant les principaux candidats cellulaires à la thérapie de la DMD.....	92
Figure 31. Comportement <i>in vivo</i> des cellules cMuStem après administration systémique.....	94

Liste des tableaux

Tableau I. Comparaison des thérapies autologue et allogénique.....	9
Tableau II. Anomalies génétiques et protéines altérées dans les principales dystrophies musculaires.....	13
Tableau III. Modèles de souris doubles mutantes.....	29
Tableau IV. Comparaison des différents modèles animaux de la DMD.....	35
Tableau V. Principaux marqueurs des cellules satellites.....	61
Tableau VI. Principaux marqueurs des CSH.....	67
Tableau VII. Phénotype des CSM humaines.....	70
Tableau VIII. Principaux facteurs immunomodulateurs sécrétés par les CSM.....	72
Tableau IX. Marqueurs exprimés par les cellules SP.....	78
Tableau X. Avantages et limites des différents candidats cellulaires à la thérapie des dystrophies musculaires.....	91

Sommaire

Avant-Propos	1
Revue bibliographique	4
Chapitre 1. Stratégies de thérapie cellulaire	5
I. Historique et principe général	5
II. Modalités d'application	6
1. Transplantation autologue	6
2. Transplantation allogénique	8
Chapitre 2. Dystrophies musculaires	11
I. Définition	11
II. Classification des dystrophies musculaires	11
1. Anomalie génétique	11
2. Mode de transmission	11
3. Groupes musculaires atteints	13
III. Dystrophie musculaire de Duchenne	14
1. Généralités	14
a. Gène et transmission	14
b. Dystrophine et complexe protéique associé	16
2. Physiopathologie	21
a. Conséquence de l'absence de dystrophine	21
b. Manifestations cliniques	25
3. Modèles animaux	26
a. Modèles rongeurs	26
i. Souris mdx	26
ii. Souris doubles mutantes	28
iii	29
iii. Rat DMD ^{mdx}	30
b. Modèles canins	30
i. Chien GRMD	30
ii. Chien CXMD _J	33
c. Autres modèles	33
4. Traitements pharmacologique et génique	36
a. Traitements pharmacologiques	36
i. Traitements anti-inflammatoires	36
ii. Traitements anti-oxydants	38
iii. Augmentation de la masse musculaire	40
iv. Surexpression d'utrophine	43
v. Translecture du codon stop	45
b. Traitements par thérapie génique	47
i. Saut d'exon	47
ii. Expression de mini- et micro-dystrophine	51
iii. Utilisation des méganucléases, zinc finger nucléases et CRISPR	53
Chapitre 3. Candidats cellulaires à la mise en place d'une thérapie pour les dystrophies musculaires	55
I. Caractéristiques générales attendues pour un candidat cellulaire	55
II. Définition et classification des cellules souches	55
1. Définition	55
2. Classification des cellules souches	57
III. Précurseurs myogéniques	59
i. Isolement et caractérisation	59
ii. Potentiel thérapeutique des myoblastes	65
IV. Progéniteurs d'origine non musculaire	67
1. Cellules souches hématopoïétiques	67
i. Isolement et caractérisation	67

ii. Potentiel thérapeutique	68
2. Cellules souches mésenchymateuses.....	69
i. Isolement et caractérisation	69
ii. Potentiel thérapeutique	73
V. Autres progéniteurs à potentiel myogénique.....	75
1. Cellules AC133	75
i. Isolement et caractérisation	75
ii. Potentiel thérapeutique	76
2. Cellules de la Side Population.....	77
i. Isolement et caractérisation	77
ii. Potentiel thérapeutique	78
3. Cellules PICs.....	79
i. Isolement et caractérisation	79
ii. Potentiel thérapeutique	80
4. Cellules ALDH.....	81
i. Isolement et caractérisation	81
ii. Potentiel thérapeutique	81
5. Cellules souches associées aux vaisseaux sanguins.....	82
a. Mésoangioblastes/Péricytes	82
i. Isolement et caractérisation	82
ii. Potentiel thérapeutique	82
b. Cellules myo-endothéliales.....	84
i. Isolement et caractérisation	84
ii. Potentiel thérapeutique	84
6. MDSC.....	85
i. Isolement et caractérisation	85
ii. Potentiel thérapeutique	86
VI. Cellules iPS	87
i. Isolement et caractérisation	87
ii. Potentiel thérapeutique	88
VII. Synthèse sur l'exploration des cellules souches.....	90
Chapitre 4. Positionnement du travail de thèse	93
I. Contexte scientifique	93
II. Objectifs du travail de thèse.....	94
Résultats expérimentaux.....	95
Chapitre 1. Exploration des caractéristiques phénotypiques et du comportement myogénique de la population MuStem humaine.....	95
I. Positionnement	95
II. Résumé de la démarche expérimentale.....	95
III. Résumé des résultats obtenus	96
IV. Article	97
Chapitre 2. Etude des propriétés immunomodulatrices de la population MuStem humaine	137
I. Positionnement.....	137
II. Résumé de la démarche expérimentale.....	137
III. Résumé des résultats obtenus	138
IV. Article	139
Chapitre 3. Impact des modalités d'immunosuppression requises pour la transplantation allogénique de la population MuStem	167
I. Positionnement.....	167
II. Résumé de la démarche expérimentale.....	167
III. Résumé des résultats obtenus	168
IV. Article	169
Discussion	200
I. Nature de l'agent cellulaire	200

1. Origine tissulaire.....	200
2. Phénotype	200
II. Mécanismes d'action des cellules MuStem.....	202
1. Impact sur la régénération musculaire.....	203
2. Impact sur la régulation du système immunitaire.....	206
III. Contexte d'administration.....	210
Annexe.....	213
Chapitre 1. Impact de l'apport nutritif sur le phénotype et le comportement <i>in vitro</i> des CSM	213
I. Positionnement.....	213
II. Matériel et méthodes	213
III. Résumé des résultats obtenus.....	213
IV. Article	214
Chapitre 2. Valorisation scientifique	239
I. Publications	239
II. Communications orales.....	239
III. Communications affichées	240
Références bibliographiques	241

Avant-Propos

“La chance ne sourit qu'aux esprits bien préparés.”

Louis Pasteur

Il faut remonter à l'Antiquité pour voir apparaître le concept de cellule avec le postulat d'Aristote selon lequel les animaux et les plantes sont formés d'éléments minuscules qui se répètent. Ce n'est que des siècles plus tard, en 1665, que Robert Hooke découvrit la cellule avec l'invention de la lentille puis du microscope. Ce savant anglais observa les cavités constituant le liège et délimitées par des parois de cellulose. Il nomma ces cavités « cellules », en référence aux cellules des moines et les présenta comme plus petite unité du vivant. Cette théorie selon laquelle tout être vivant est constitué de cellules, allait être formalisée de façon plus approfondie par Matthias Schleiden et Theodor Schwann au XIX^{ème} siècle. En 1931, la première transplantation de cellules fut réalisée par Paul Niehans avec l'administration à un patient des glandes parathyroïdes d'une brebis. Sur cette base, deux concepts ont émergé, d'une part la transplantation autologue qui consiste à implanter les propres cellules du patient après manipulations *ex-vivo* et d'autre part, la transplantation allogénique qui consiste à administrer au patient des cellules d'un donneur. Si les deux stratégies possèdent leurs points forts et leurs limites, la transplantation allogénique a montré dans différents contextes une meilleure efficacité ainsi qu'une facilité de mise en place d'un point de vue clinique. Cependant, elle se voit régulièrement limitée eu égard à la contrainte immunologique.

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une pathologie génétique récessive liée au chromosome X touchant l'ensemble de la musculature. Elle est liée à une mutation sur le gène de la dystrophine, énorme protéine de la membrane des fibres musculaires, qui se traduit par l'absence complète de celle-ci conduisant à la nécrose des fibres. Il s'agit de la plus fréquente des dystrophies musculaires avec un garçon nouveau-né sur 3500 à 5000 concerné. Aujourd'hui, il n'existe pas de traitement curatif pour cette pathologie qui conduit au décès des patients entre 20 et 30 ans et ce, malgré le développement de différents axes expérimentaux au cours des trente dernières années. Parmi ceux-là, les thérapies génique et cellulaire visent à amener la protéine manquante dans les cellules du patient soit par un transfert de gène à l'aide d'un transporteur viral soit par injection de cellules saines ou malades corrigées *ex-vivo* exprimant la protéine.

La première cellule utilisée dans le cadre de la thérapie cellulaire a été le myoblaste, descendant du précurseur endogène du tissu musculaire que représente la cellule satellite. Malgré la démonstration dans différents modèles animaux d'une restauration

de dystrophine consécutivement à son administration intramusculaire, les essais cliniques qui en ont découlé se sont néanmoins soldés par un échec, avec un apport de dystrophine très limité et une absence de bénéfice clinique. Une mortalité particulièrement importante des cellules injectées dans les heures qui suivent la greffe en est une cause principale. A l'aube des années 2000, la découverte de l'existence de populations marginales de cellules souches au sein de tissus post-nataux a provoqué un fort engouement dans la communauté scientifique et ouvert la voie à de nouvelles propositions thérapeutiques pour les maladies neuromusculaires parmi lesquelles la DMD.

Ainsi, des candidats cellulaires d'origine médullaire, sanguine ou musculaire ont été isolés puis caractérisés de façon plus ou moins approfondie dans des espèces modèles et/ou chez l'Homme. Ces dernières années, des preuves de concept de l'efficacité de leur administration ont été apportées dans des modèles animaux de lésions musculaires et/ou de dystrophies musculaires. La multiplication des travaux menés sur ces populations a cependant révélé un certain degré de complexité dans l'analyse de leurs propriétés, faisant apparaître un caractère hétérogène des cellules au sein des populations d'intérêt, des spécificités entre les populations ou encore des propriétés distinctes pour une même population selon l'espèce considérée.

Dans ce contexte, l'objectif de mon travail de thèse a consisté d'une part à isoler et caractériser une population de cellules souches dérivées du muscle humain, les cellules hMuStem, en terme de signature phénotypique, de propriétés immunomodulatrices et de potentiel de régénération musculaire et d'autre part, d'aborder les modalités de sa transplantation en contexte allogénique sous l'angle de la contrainte immunologique.

Le présent manuscrit qui récapitule ce travail expérimental se compose de trois parties à savoir une revue bibliographique suivie d'une partie expérimentale puis d'une discussion générale.

La revue bibliographique est organisée en quatre chapitres : le premier porte sur les deux stratégies de thérapie cellulaire développées et a pour objectif d'en décrire les principaux avantages et limites. Le second chapitre est dédié au domaine des dystrophies musculaires et en particulier la DMD avec une description de la physiopathologie, des modèles animaux et des stratégies pharmacologique et génique déployées. Le troisième chapitre évoque les différents candidats à la thérapie cellulaire de la DMD avec un intérêt particulier pour leur nature, rôles et effets thérapeutiques. Le

dernier chapitre récapitule les résultats majeurs obtenus par l'UMR703 INRA/Oniris et positionne mon travail.

Les résultats expérimentaux s'organisent en trois chapitres : (i) Caractérisation phénotypique et comportementale de la population MuStem humaine à la fois *in vitro* et *in vivo*; (ii) Evaluation des propriétés immunomodulatrices de la population MuStem notamment à travers l'étude *in vitro* de son impact sur l'immunité innée et adaptative; et (iii) Définition des modalités de couverture immunosuppressive dans le contexte d'une transplantation allogénique avec la mise en place d'un protocole dans le modèle gros animal de la DMD.

En conclusion de ce travail qui participe à une meilleure compréhension de l'identité et des modalités d'action de la population MuStem, une discussion générale mettant en perspective les résultats obtenus est présentée.

Revue bibliographique

L'homme animé par l'esprit scientifique désire sans doute savoir,
mais c'est aussitôt pour mieux interroger.

Gaston Bachelard

Chapitre 1. Stratégies de thérapie cellulaire

I. Historique et principe général

Dès le XVI^{ème} siècle, le physicien Paracelse avait énoncé : « le cœur guérit le cœur, le poumon guérit le poumon, la rate guérit la rate, le semblable soigne le semblable ». Ainsi, le concept de thérapie cellulaire repose sur le principe selon lequel des cellules saines d'un organe issu d'un animal ou d'un autre être humain peuvent servir à guérir le même organe chez une personne malade (Villa Médica, 2016).

Le premier traitement de thérapie cellulaire a été administré en 1931 par le Dr Paul Niehans, physicien suisse. Appelé par un confrère chirurgien ayant accidentellement retiré les glandes parathyroïdes d'un patient, Niehans préleva ces mêmes glandes chez une brebis, les dilacéra en petits fragments avant de les injecter en solution saline au patient. Les résultats furent rapides et l'amélioration clinique du patient spectaculaire avec par ailleurs une absence d'effet secondaire. A ce titre, le Dr Niehans devint le père de la thérapie cellulaire.

La thérapie cellulaire possède des intérêts non négligeables en médecine régénérative en proposant de nouvelles stratégies thérapeutiques pour des pathologies qui restent sans traitement. Il est ainsi envisagé d'obtenir à partir de cellules souches des neurones fonctionnels afin de développer un traitement pour les maladies de Parkinson ou d'Alzheimer ou encore de parvenir à faire se différencier des cellules souches en cellules sanguines afin de pallier aux besoins en sang pour les transfusions (Daadi *et al.*, 2012; Young and Goldstein, 2012). D'un point de vue technique, la thérapie cellulaire fait appel à une procédure d'administration relativement simple et induit une morbidité ainsi qu'un temps de récupération réduits pour le patient comparé à une transplantation d'organe (Koch *et al.*, 2009). Cependant, on dénombre aujourd'hui un seul produit de thérapie cellulaire ayant obtenu une autorisation de mise sur le marché en Europe, appelé Holoclar. Celui-ci repose sur le prélèvement de cellules souches de la cornée chez le patient atteint de brûlures de cette dernière et leur différenciation *ex vivo* en cellules épithéliales de la cornée destinées à être ré-implantées (Eurostem cell, 2015). Une suspension de cellules souches allogéniques amplifiées dérivées de tissus adipeux (eASC), appelée Cx601, a également fait l'objet début 2016 d'une demande d'autorisation de mise sur le marché, dans le cadre de la maladie de Crohn (TiGenix, 2016). Ce faible nombre de succès eu égard aux centaines d'essais cliniques engagés ces

dernières années (Andrades *et al.*, 2014) illustre bien le niveau de complexité de l'identification d'un nouveau traitement efficace avec des difficultés notamment dans la confection du produit de thérapie cellulaire, la compréhension des mécanismes d'action, la définition du protocole d'administration optimum et la mise en place d'un modèle économique viable rendant ces thérapies attractives pour les industriels. L'ingénierie tissulaire a récemment émergé et constitue la seconde génération de thérapie régénérative basée sur la cellule en incorporant des composés 3D biodégradables, mimant la matrice extra-cellulaire (Haraguchi *et al.*, 2012).

II. Modalités d'application

La thérapie cellulaire peut s'appliquer selon deux modalités basées sur l'origine du produit administré : une modalité autologue lors de laquelle le patient est son propre donneur et celle allogénique avec l'utilisation de cellules issues d'un donneur différent du receveur (Figure 1).

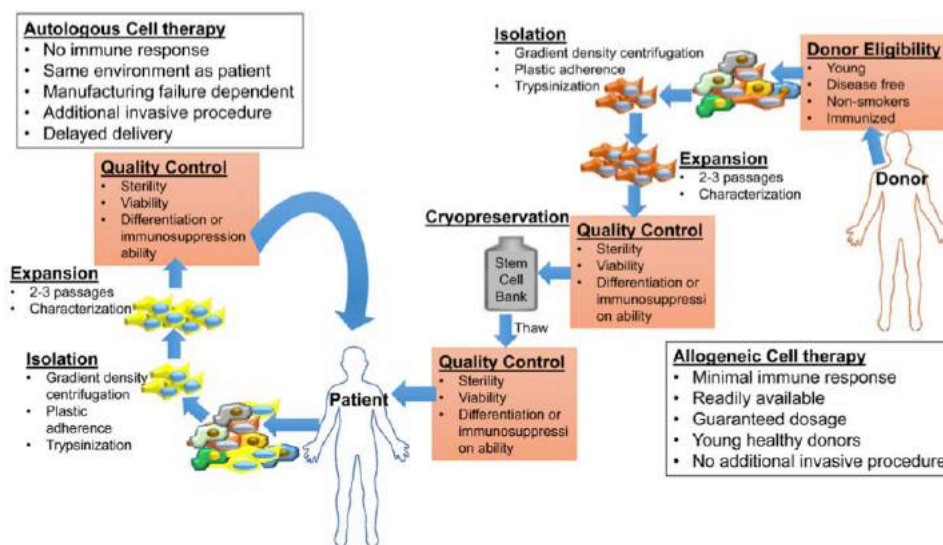


Figure 1. Comparaison des thérapies autologue et allogénique (Karantalis *et al.*, 2014). La transplantation allogénique offre de nombreux avantages en comparaison de la thérapie autologue. Les cellules sont isolées de donneurs sains, éliminant toute co-morbidité associée avec une quelconque pathologie. Les cellules allogéniques sont amplifiées et conservées dans une biobanque de façon à être disponibles sous un court délai.

1. Transplantation autologue

L'administration autologue fait appel à un patient qui est à la fois le donneur et le receveur des cellules transplantées. Les avantages de ce type de traitement sont nombreux (Mason and Dunnill, 2009). Parmi ceux-ci, l'absence de rejet immunitaire lié à la transplantation de cellules faisant partie du « soi » est un gain majeur en terme de

sécurité. Une inflammation locale liée à l'injection peut être observée mais présente peu de risque. De plus, les effets secondaires indésirables liés aux traitements immunosuppresseurs tels que cancers et problèmes cardiaques, sont évités (Mason and Dunnill, 2009). Ainsi, la transplantation autologue de cellules souches hématopoïétiques (CSH) associée à de la chimiothérapie chez des patients atteints de leucémie aigue s'avère efficace avec une rémission complète et une mortalité faible, inférieure à 4% (Cioch *et al.*, 2016). Une étude réalisée sur des patients atteints de fractures mandibulaires ayant reçu une injection locale de CSM dérivées de tissu adipeux a démontré 12 semaines post-injection une ossification supérieure de 36% chez les patients traités (Castillo-Cardiel *et al.*, 2016).

La biocompatibilité et la biosécurité limitent les frais pour la mise en place de lignées cellulaires autologues. Dans certains cas, la source de tissu permet d'obtenir des quantités importantes de cellules ce qui limite les procédés d'expansion *in vitro* avant administration et ainsi réduit les risques d'anormalités cellulaires apparaissant lorsque les cellules se répliquent trop *in vitro*. Il existe également une possibilité de personnaliser le traitement au cas par cas, l'état du patient déterminant la taille de la biopsie prélevable ainsi que le type de tissu à cibler pour cette dernière. D'autre part, des traitements pharmacologiques complémentaires peuvent être administrés en fonction de la pathologie du patient. Enfin, ce modèle est parfaitement orienté vers le service hospitalier. Les cliniciens n'ont en effet pas besoin d'attendre des produits cellulaires commercialisés et dans certains cas, peuvent réaliser le prélèvement de cellules et la transplantation eux-mêmes (Mason and Dunnill, 2009).

Malgré ces points forts, un certain nombre de limites a été révélé. La principale limite réside dans la variabilité du matériel source. En effet, les lots cellulaires présentent des propriétés plus ou moins altérées en fonction des pathologies et du vécu présentés par les patients. Dans le cadre des transplantations autologues, il a été noté une difficulté à générer un nombre important de cellules issues de sources somatiques. Ceci peut être expliqué par un épuisement dans certaines pathologies des cellules du patient qui peinent à proliférer *in vitro* et ne permettent pas une administration ultérieure (Mason and Dunnill, 2009; Morgan and Zammit, 2010). Le peu de réactivité face aux urgences est également fortement dommageable. En effet, le temps nécessaire à l'obtention des cellules, à leur éventuelle amplification puis leur administration semble trop long en cas de réelle urgence médicale mettant en jeu la vie du patient. Ceci entraîne également un

nombre de patients traités relativement faible ainsi qu'une difficulté de s'adresser à un grand nombre de patients à un coût raisonnable, chaque procédure d'isolement cellulaire, d'amplification et d'administration devant être ajustée à chaque nouveau patient. Ainsi, tout échec de la procédure entraînera des délais majeurs dans le traitement. Il est également à noter que la réalisation de la biopsie suivie de la procédure d'administration n'est pas un acte anodin et présente un risque pour le patient qui est bien souvent limité dans certaines fonctions (Mason and Dunnill, 2009). Enfin, dans le cas de patients atteints de maladies génétiques ou présentant des prédispositions, la transplantation autologue peut s'avérer délicate dans la mesure où une réaction immunitaire est susceptible de se mettre en place contre le transgène et ce, consécutivement à la correction *ex vivo*. A titre d'exemple, une réponse adaptative dirigée contre le transgène après correction de cellules AC133⁺ autologues par saut d'exon et injection intra-artérielle chez le chien dystrophinopathe Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) a été récemment démontrée (Sitzia *et al.*, 2016).

2. Transplantation allogénique

L'administration allogénique fait appel à un donneur sain de cellules qui vont être amplifiées par un établissement de production accrédité et possiblement ensuite stockées dans une banque. Les aliquots de cellules seront ensuite pris en charge pour la confection d'un lot injectable qui sera acheminé jusqu'au patient. Les avantages de ce type de traitement sont nombreux. En comparaison de cellules autologues, il a été démontré une plus grande efficacité dans la production de cellules, permettant à partir d'un nombre restreint de cellules prélevées d'obtenir un lot de taille plus conséquente (Mason and Dunnill, 2009). De plus, la disponibilité du produit cellulaire est immédiate, ce qui prend tout son sens dans les cas d'urgences médicales nécessitant un traitement rapide. L'absence de besoin d'effectuer une biopsie sur le patient permet de lui épargner ainsi un acte chirurgical invasif et possiblement lourd de conséquence sur son état général. Il est également à noter que l'administration de cellules souches allogéniques s'accompagne d'un bénéfice tissulaire similaire voire supérieur à celui observé avec des cellules autologues comme cela a notamment été montré dans le cœur avec des effets secondaires observés chez 53% de patients atteints de dysfonction ventriculaire et injectés avec des CSM autologues contre 33% des patients traités avec des CSM allogéniques. Aucune arythmie ventriculaire n'est observée chez ces derniers tandis que

27% des patients du groupe autologue en présentent (Hare *et al.*, 2012; Westerdahl *et al.*, 2016). Enfin, cette stratégie allogénique faisant appel à des donneurs sains permet une standardisation des procédés de production et de contrôle qualité, limitant les variabilités pouvant être observées entre lots cellulaires.

Cependant, un certain nombre de limites peut être évoqué. En premier lieu, le rejet immunitaire constitue une limite sérieuse à la transplantation allogénique, malgré d'une part l'arsenal de molécules immunosuppressives actuellement disponible et d'autre part l'existence de propriétés immunomodulatrices démontrées pour certaines cellules de l'organisme (Karantalis, 2015). Il est cependant intéressant de souligner qu'il est estimé qu'environ 150 donneurs sélectionnés au hasard ou 10 « super-donneurs », c'est-à-dire homozygotes pour les types communs du HLA, permettent de remplir les conditions de compatibilité de 38% des patients (Mason and Dunnill, 2009).



Les deux stratégies thérapeutiques décrites ci-dessus présentent donc des avantages majeurs mais également des limites qui sont récapitulées dans le tableau ci-dessous (Tableau I). On peut ainsi voir clairement le bénéfice que pourrait apporter la thérapie allogénique, sous réserve de pallier au rejet de greffe, principal challenge de ce type d'approche. C'est ce type de stratégie qui a été privilégiée dans le contexte de mon travail de thèse.

Tableau I. Comparaison des thérapies autologue et allogénique (Smith, 2012). Les cases vertes symbolisent un avantage avéré tandis que les rouges représentent l'absence d'avantage ou un risque élevé.

	Thérapie autologue	Thérapie allogénique
Capacité d'entretenir le stock de produits de thérapie		
Adaptabilité industrielle		
Délai entre l'obtention et le traitement		
Nombre de procédures requises		
Immunogénicité		
Potentiel d'intégration au long terme des cellules		
Répétabilité du protocole d'administration		
Risque d'échec du protocole de production		
Capacité du patient à fournir des cellules donneuses viables		

Chapitre 2. Dystrophies musculaires

I. Définition

Les dystrophies musculaires regroupent un ensemble de pathologies musculaires héréditaires caractérisées par une dégénérescence du tissu musculaire ainsi qu'une faiblesse clinique de sévérité et distribution variables sans origine neurogénique (Emery, 1998; 2002). Une caractéristique commune à l'ensemble des dystrophies musculaires concerne l'analyse histologique des muscles atteints qui présentent des variations dans la taille des fibres musculaires, des zones de nécrose musculaire ainsi qu'une augmentation de la proportion du tissu graisseux et conjonctif. Dans la plupart des cas, le taux sérique de créatine kinase (CK), enzyme présente dans le tissu musculaire, est fortement élevé, révélant une rupture de la membrane des cellules musculaires (Emery, 1998; 2002).

II. Classification des dystrophies musculaires

Différentes classifications ont été établies, basées sur trois principaux critères, à savoir le type d'anomalie génétique à l'origine de la pathologie, le mode de transmission et enfin le type de muscles atteints.

1. Anomalie génétique

On peut classer les dystrophies musculaires en fonction du chromosome touché ainsi que du type d'anomalie (Emery, 1998; 2002). On distingue les dystrophies liées à des mutations sur les gonosomes, comme les dystrophies musculaires de Duchenne (DMD) et de Becker (BMD) et celles touchant les autosomes, bien plus nombreuses, de l'ordre d'une dizaine. Ainsi des mutations sur les chromosomes 4 ou 14 conduisent respectivement à l'apparition d'une dystrophie musculaire fascioscapulohumérale (FSHD) ou oculopharyngée (OPMD) (Özsarlak *et al.*, 2001). Le type d'anomalie génétique rencontré est également variable. Il peut s'agir de délétions (DMD, BMD), duplications (OPMD) ou encore de micro-délétions et substitutions (Yang *et al.*, 2013).

2. Mode de transmission

Il y a principalement trois types de transmission possibles pour les dystrophies musculaires (Emery, 1998, 2002) (Tableau II) :

- Autosomique dominant (OPMD, FSHD et 10% des cas de dystrophies des ceintures ou LGMD pour Limb-Girdle Muscular Dystrophy), ce qui signifie qu'une personne peut être atteinte avec seulement un allèle du gène muté sur les deux, ce dernier étant porté par un chromosome non sexuel.
- Autosomique récessif (dystrophie musculaire congénitale et 90% des cas de LGMD). Dans ce cas, une personne ne peut être atteinte que si elle possède les deux allèles du gène muté sur une paire de chromosomes non sexuels.
- Liée à l'X récessif (DMD et BMD). Ce type de transmission touche principalement les garçons qui ne possèdent qu'une seule copie du chromosome X. Il peut toucher également les femmes mais la prévalence est bien moins importante, les deux chromosomes X devant alors être porteurs du gène muté.

Tableau II. Mutations génétiques et protéines altérées dans les principales dystrophies musculaires (Emery, 2002). AR, autosomale récessive ; AD, autosomale dominant ; XR, lié à l’X récessif ; SG, sarcoglycanes

Dystrophie musculaire	Locus du gène muté	Protéine déficiente
Congénitale (AR)	6q	Laminine $\alpha 2$ (mérosine)
	12q	Recepteur laminine ($\alpha 7$ -intégrine)
	9q	« Fukutine »
Duchenne et Becker (XR)	Xp21	Dystrophine
Emery-Dreifuss		
XR	Xq28	Emerine
AD/AR	1q	Lamine A/C
Distale		
AD	14q, 2q, 2p	?
AR	2p	Dysferline
Facioscapulohumérale (AD)	4q	?
Oculopharyngée (AD)	14q	Poly(A)-binding protein 2 (PAB2)
Ceintures		
AD		
1A	5q	Myotiline
1B	1q	Lamine A/C
1C	3p	Cavéoline 3
1D	6q	?
1E	7q	?
1F	2q	?
AR		
2A	15q	Calpaïne 3
2B	2p	Dysferline
2C	13q	γ SG
2D	17q	α SG (adhaline)
2E	4q	β SG
2F	5q	δ SG
2G	17q	Téléthonine
2H	9q	?
2I	19q	?

3. Groupes musculaires atteints

Une des classifications les plus couramment utilisée s’appuie sur le type de muscle atteint par la pathologie considérée. On distingue ainsi les pathologies touchant l’ensemble du système musculaire que sont la DMD et la BMD et celles plus spécifiques d’un groupe musculaire : LGMD et dystrophie musculaire d’Emery-Dreifuss ou DMED (muscles de la ceinture scapulaire et pelvienne), FSHD (muscles faciaux, scapulothoraciques, tibial antérieur et pelviens), distale (exclusivement les muscles distaux des membres supérieurs et inférieurs) et OPMD (muscles distaux et du crâne) (Figure 2).

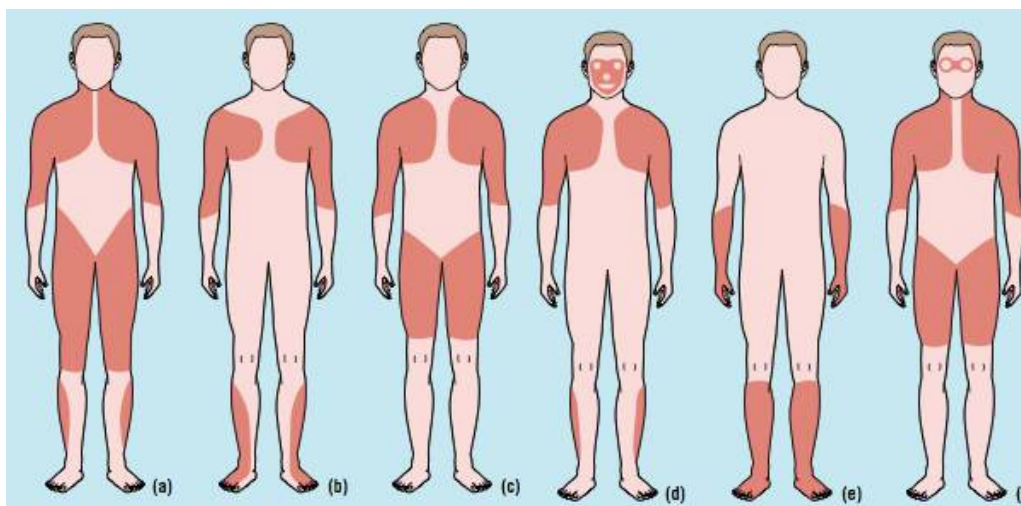


Figure 2. Distribution des muscles atteints dans différents types de dystrophies musculaires (Emery, 1998). (a) DMD et BMD, (b) DMED, (c) LGMD, (d) FSHD, (e) distale et (f) OPMD.

III. Dystrophie musculaire de Duchenne

1. Généralités

a. Gène et transmission

La DMD est la plus fréquente et sévère des dystrophies musculaires, avec une incidence d'un garçon nouveau-né sur 3500 à 5500 naissances (Emery, 1991; Koenig *et al.*, 1989; Moat *et al.*, 2013). Elle doit son nom au médecin Guillaume Duchenne de Boulogne qui en fit la description en 1858. Cette pathologie est liée à une mutation sur le gène de la dystrophine, présent sur le bras court du chromosome X, au locus Xp21. Il s'agit du plus long gène connu chez l'Homme, occupant 1,5% de la séquence du chromosome porteur et 0,1% du génome humain entier (Leturcq and Tuffery-Giraud, 2015). Il représente environ 2500 kilobases et est transcrit en un ARN messager de 14 kilobases qui contient 79 exons constituant moins d'un pourcent de la séquence du gène (Dent *et al.*, 2005; Leturcq and Tuffery-Giraud, 2015; Prior and Bridgeman, 2005; Roberts *et al.*, 1993) (Figure 3).

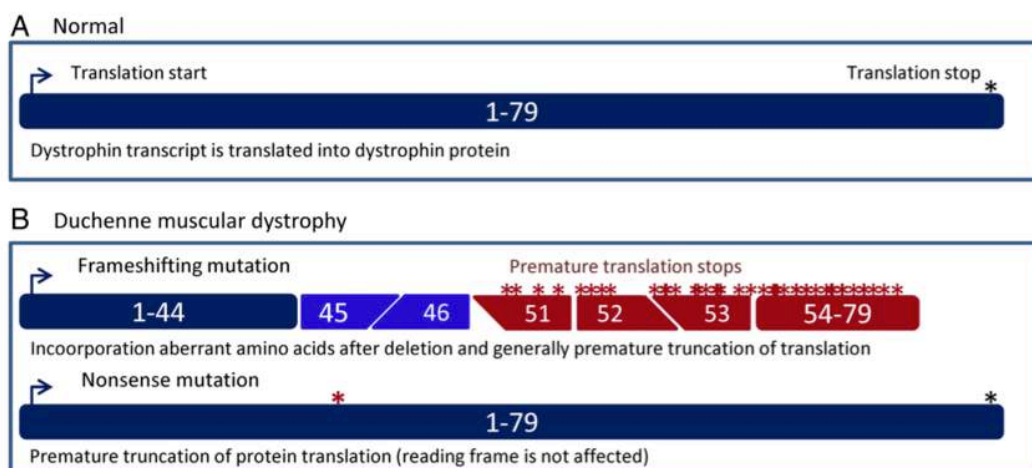


Figure 3. Représentation des transcrits produits chez une personne saine et un patient DMD (Aartsma-rus *et al.*, 2016). (A) En condition normale, l'ARNm de la dystrophine contient 79 exons qui sont traduits pour produire la dystrophine. (B) Chez un patient DMD, la traduction de la protéine est stoppée prématurément. Ceci peut-être liée à une rupture du cadre de lecture (comme ici représentée une délétion des exons 47 à 50, en haut) qui conduit à un arrêt de la traduction. Ceci peut-être également lié à une mutation non-sens faisant apparaître un codon stop en lieu et place d'un codon produisant un acide aminé (en bas). Ce nouveau codon stop sera lu à la place de celui placé à la fin du transcrit.

Cette structure et cette longueur expliquent en grande partie le taux particulièrement élevé de mutations. Le gène est sous la dépendance de sept promoteurs tissu-spécifiques. Trois d'entre eux contrôlent l'expression d'isoformes de longueur complète : l'isoforme cérébral, musculaire et spécifique des cellules de Purkinje (Leturcq and Tuffery-Giraud, 2015). Quatre autres promoteurs internes situés dans les introns 29, 44, 55 et 62, contrôlent l'expression d'isoformes plus courts. Dans le cadre de la DMD, des délétions intragéniques modifiant le cadre de lecture après l'épissage des introns peuvent faire apparaître un codon stop prématuré et ainsi tronquer sévèrement la protéine produite (Monaco *et al.*, 1988).

Soixante à 70% des patients présentent une délétion d'une partie du gène DMD (Koenig *et al.*, 1987; Wulff *et al.*, 1989; Yang *et al.*, 2013), majoritairement retrouvée autour des exons 2 à 20 (15% des délétions) et des exons 45 à 55 (74% des délétions) (Leturcq and Tuffery-Giraud, 2015; Prior and Bridgeman, 2005; Yang *et al.*, 2013). Des duplications sont retrouvées dans 5 à 10% des cas (Bushby, 1992; Yang *et al.*, 2013), plus fréquemment en début de gène. Concernant les mutations ponctuelles, elles se répartissent tout le long de la séquence codante et la majorité sont des mutations non-sens (48%) (Figure 4).

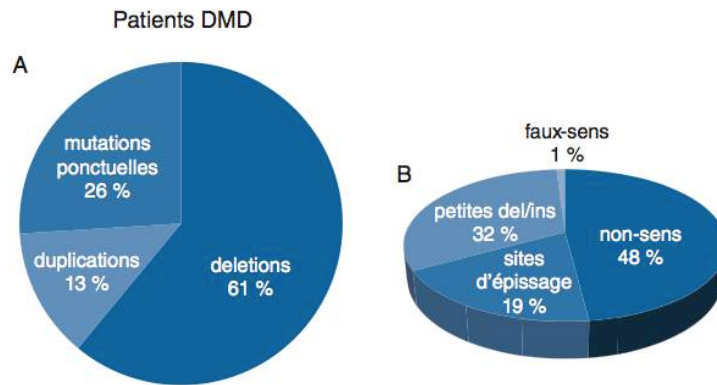


Figure 4. Types de mutations du gène de la dystrophine chez les patients DMD (Leturcq and Tuffery-Giraud, 2015). (A) Fréquence des différents types de mutations. (B) Fréquence des différents types de mutations ponctuelles.

L'existence de mutations qui maintiennent le cadre de lecture et aboutissent à un phénotype moins sévère, la BMD, est rapportée (Koenig *et al.*, 1989). Il existe une corrélation directe entre les données moléculaires et l'altération du cadre de lecture valable dans 96% des cas de DMD. Ce modèle dit du cadre de lecture a été proposé en 1988 par Monaco (Monaco *et al.*, 1988). Il stipule que les mutations altérant le cadre de lecture aboutissent à un phénotype sévère de type DMD tandis que celles préservant le cadre conduisent à un phénotype modéré de type BMD. Cependant, il existe des exceptions. La délétion des exons 3 à 7 ne semble pas avoir d'effet clinique, ceci étant dû à des phénomènes d'épissage alternatifs restaurant le cadre de lecture (Bushby, 1992), tandis que des délétions dans le reste des premiers exons ou des délétions très importantes (30 exons ou plus) sont associées à l'apparition de la DMD (Koenig *et al.*, 1989). De plus, un tiers des cas DMD est lié à des mutations *de novo* (Wulff *et al.*, 1989). L'apparition d'une cardiomyopathie chez les patients DMD a été corrélée à la présence de mutations dans les exons 12, 14 à 17 et 31 à 42 (Jefferies *et al.*, 2005).

b. Dystrophine et complexe protéique associé

La dystrophine est une protéine d'approximativement 427 kDa contenant 3685 acides aminés séparés en quatre domaines et représentant 0,002% de la quantité protéique totale du muscle strié (Hoffman *et al.*, 1987; Koenig *et al.*, 1988) (Figure 5). Les quatre domaines sont : (i) un domaine N-terminal constitué de 240 acides aminés, fortement conservé, permettant la liaison à l'actine; (ii) un domaine similaire à la spectrine en triple hélice formé d'une succession de 25 segments, responsable de la forme en

bâtonnet et conférant à la protéine sa flexibilité; (iii) un domaine constitué d'un premier domaine WW, motif en feuillet β , permettant la liaison au β -dystroglycan et d'un autre enrichi en cystéine, formé de 150 acides aminés, et composé d'un site de fixation au zinc ZZ ainsi que de deux motifs EF de fixation au calcium et (iv) un domaine C-terminal constitué de 420 acides aminés se liant aux syntrophines, à la dystrobrevine ou encore au β -dystroglycan (Ahn and Kunkel, 1993; Koenig *et al.*, 1988; Le Rumeur *et al.*, 2010).

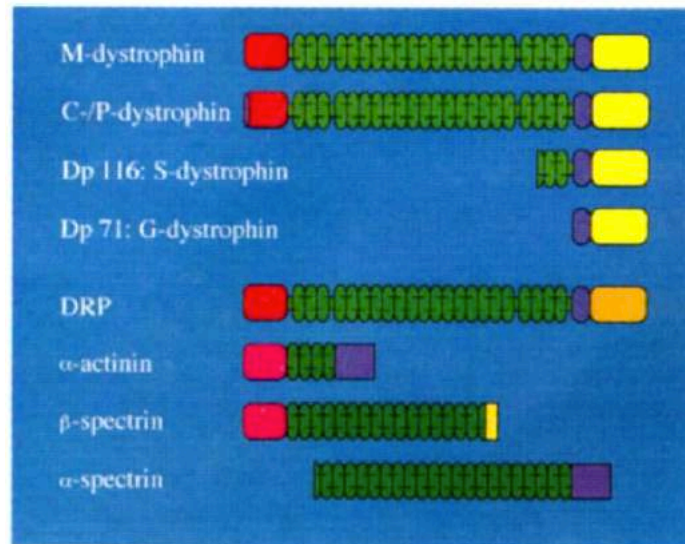


Figure 5. Représentation des différents types de dystrophine et des protéines associées (Ahn and Kunkel, 1993). Le domaine de liaison à l'actine (rouge) est partagé par un large nombre de protéine du cytosquelette. La longue région interne (vert) consiste en 24 régions homologues répétées de 109 acides aminés. La région riche en cystéine (violet) est homologue à la région de liaison au calcium de l' α -actinine. La région C-terminale (jaune) est homologue seulement à l'utrophine (ou Dystrophin Related Protein, DRP) et participe à l'association de la dystrophine à la membrane.

La dystrophine est également détectée à la surface membranaire des fibres musculaires lisses dans les viscères, le système bronchique, urétral et dans la tunique media des vaisseaux sanguins ainsi que dans le tissu musculaire cardiaque (Hoffman *et al.*, 1987; Miyatake *et al.*, 1989; Klietsch *et al.*, 1993). La dystrophine possède trois rôles majeurs : (i) de stabilité de la membrane cellulaire durant les cycles répétés de contraction/relaxation musculaire; (ii) de transducteur de la force musculaire en établissant un lien entre le domaine intracellulaire et l'environnement extracellulaire et (iii) d'organisation de la spécialisation membranaire, notamment dans les tissus non contractiles où elle peut maintenir la concentration locale de composants membranaires (Ahn and Kunkel, 1993).

La dystrophine est en association étroite avec un complexe de glycoprotéines (Dystrophin Glycoprotein Complexe ou DGC) contenant à la fois des glycoprotéines (Dystrophin Associated Glycoproteins ou DAG) et des protéines (Dystrophin Associated Protein ou DAP) (Figure 6). On distingue :

(i) Les protéines de la famille des dystrophines : dystrophine, utrophine (ou dystrophin-related protein, DRP), α - et β -dystrobrévines et DRP2

L'utrophine est une protéine homologue à la dystrophine qui se lie également au cytosquelette d'actine. Contrairement à la dystrophine, l'utrophine est largement distribuée dans l'ensemble des tissus, y compris le sarcolemme des patients DMD (Shim and Kim, 2003). Une des hypothèses évoquées dans la littérature propose un phénomène de compensation chez ces patients par l'expression plus abondante d'utrophine. Cependant, il s'avère que l'utrophine est davantage une conséquence de la régénération musculaire. En effet, cette protéine est exprimée transitoirement dans les phases précoces de régénération et disparaît des fibres matures (Shim and Kim, 2003; Le Rumeur *et al.*, 2010). Le domaine C-terminal de la dystrophine interagit avec les dystrobrévines et les syntrophines. Les premières présentent une homologie avec la région C-terminale de la dystrophine, de taille comprise entre 59 et 78 kDa. Deux isoformes ont été identifiés chez les Mammifères (α et β) mais seul l' α -dystrobrévine-2 est exprimée dans le sarcolemme du muscle squelettique et particulièrement concentrée au niveau de la jonction neuromusculaire (Ehmsen *et al.*, 2002). Les dystrobrévines se lient à la dystrophine mais également au complexe sarcoglycane/sarcospan (Rando, 2001). Enfin, la dystrophine est la cible de nombreuses kinases comme la protéine kinase II calmoduline-dépendante, via sa région C-terminale riche en domaines de phosphorylation. Les deux partenaires cruciaux de la dystrophine sont l'actine-F et le β -dystroglycane (Le Rumeur *et al.*, 2010).

(ii) Les dystroglycane

Dans le muscle squelettique, les formes matures glycosylées des α - et β -dystroglycane (156 kDa et 43 kDa respectivement) forment un complexe fortement associé à la dystrophine (Ehmsen *et al.*, 2002; Ervasti, 2007). Le β -dystroglycane traverse la membrane tandis que l' α -dystroglycane se lie à la portion extracellulaire du β -dystroglycane et joue le rôle de récepteur à la laminine-2 à travers le sarcolemme (Ehmsen *et al.*, 2002). La région C-terminale du β -dystroglycane se lie au domaine enrichi en cystéine de la dystrophine ou de l'utrophine. Les dystroglycane sont

également associés aux sarcoglycanes. La rupture de liaison entre les dystroglycanes et la dystrophine est l'origine d'un phénotype Duchenne-like (Ehmsen *et al.*, 2002).

(iii) Les sarcoglycanes

Il existe quatre sarcoglycanes exprimées dans le muscle squelettique (α de 50 kDa aussi appelée adhaline, β de 43 kDa, γ de 35 kDa et δ de 35 kDa). Une cinquième, ϵ de 50 kDa, est retrouvée dans le muscle lisse entre autres tissus (Ehmsen *et al.*, 2002; Ervasti, 2007). Les β , γ et δ -sarcoglycanes sont les plus fortement associées et constituent le noyau fonctionnel du complexe tandis que l' α -sarcoglycane est physiquement séparée des autres sarcoglycanes (Ehmsen *et al.*, 2002). Une liaison directe des composants du complexe sarcoglycane à la dystrophine a été rapportée (Vainzof *et al.*, 1999). Le complexe sarcoglycane stabiliserait l'ensemble du DGC en général et l'interaction entre dystrophine et dystroglycane en particulier (Ervasti, 2007). La mutation aboutissant à l'absence d'expression d'une seule sarcoglycane provoque la perte des autres au niveau du sarcolemme et est responsable de la LGMD (Ehmsen *et al.*, 2002).

(iv) Les syntrophines

Les trois isoformes de syntrophines identifiés ($\alpha 1$, $\beta 1$ et $\beta 2$) sont des protéines de 58 kDa. Les isoformes $\alpha 1$ et $\beta 1$ sont présents à des niveaux très élevés dans le sarcolemme du muscle squelettique tandis que le dernier est exprimé dans des tissus aussi divers que le rein, le cœur ou le pancréas (Ehmsen *et al.*, 2002). Les syntrophines interagissent avec de nombreux membres de la famille des dystrophines, incluant la dystrophine, l'utrophine et les dystrobrevines (Ervasti, 2007). L'interaction entre la dystrophine et la syntrophine est régulée par la calmoduline et par la phosphorylation ou déphosphorylation de la dystrophine (Rando, 2001). Il n'a pas été mise en évidence de corrélation entre les mutations des syntrophines et la genèse de pathologie musculaire humaine (Ehmsen *et al.*, 2002).

(v) Le sarcospan

Il s'agit d'une protéine de 25 kDa qui est associée au DGC par sa liaison avec le complexe des sarcoglycanes. Le sarcospan n'est pas phosphorylé (Rando, 2001) et aucune pathologie humaine n'a été associée à l'absence de sarcospan. Les souris présentant des mutations du sarcospan (sarcospan-null) maintiennent l'expression de toutes les sarcoglycanes au sarcolemme et ne développent pas de dystrophie musculaire (Ehmsen *et al.*, 2002).

En parallèle de ces composants intrinsèques, le DGC est associé à d'autres protéines impliquées dans diverses voies de signalisation. On peut en citer quatre majeures : la calmoduline, Grb2, nNOS et la cavéoline 3. La calmoduline se lie à la dystrophine et aux syntrophines. La liaison avec la calmoduline peut moduler l'interaction entre la dystrophine ou l'utrophine et l'actine (Rando, 2001). Grb2 est une protéine de 25 kDa qui participe à la transduction du signal impliquant le récepteur aux tyrosines kinases et Ras. Grb2 s'associe notamment à la β -dystroglycane (Rando, 2001). L'enzyme nNOS produit du NO qui module de nombreuses voies de signalisation intracellulaire (Brenman *et al.*, 1995; Rando, 2001) et notamment augmente le flux sanguin localement afin de répondre aux besoins métaboliques des muscles durant l'exercice (Ehmsen *et al.*, 2002; Le Rumeur *et al.*, 2010). L'interaction entre nNOS et l' α 1-syntrophine est perdue dans nombre de dystrophies musculaires, notamment la DMD, ce qui est corrélée à une constriction anormale des vaisseaux sanguins chez les patients DMD (Brenman *et al.*, 1995; Ehmsen *et al.*, 2002; Le Rumeur *et al.*, 2010). Le NO produit agit directement sur l'activation des cellules souches résidentes, les cellules satellites, en activant l'hypertrophie morphologique et diminuant leur adhésion au complexe membranaire (Anderson, 2000). Les cavéolines sont des protéines associées aux membranes constituant les invaginations membranaires que l'on retrouve dans différents types cellulaires. Dans le muscle squelettique, l'isoforme retrouvé est la cavéoline-3 (Ehmsen *et al.*, 2002) dont il a été montré une forte association avec la dystrophine, les dystroglycanes et les sarcoglycanes (Rando, 2001; Ehmsen *et al.*, 2002).

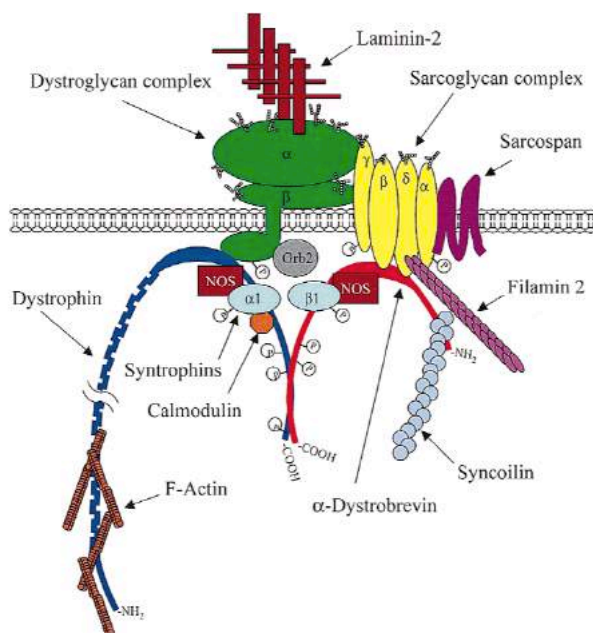


Figure 6. Complexe dystrophine-glycoprotéines (Rando, 2001). Cette représentation du complexe associé à la dystrophine montre les éléments majeurs du complexe (dystrophine, dystroglycanes, sarcoglycanes, dystrobrevine, syntrophines et sarcospan), le ligand extracellulaire (laminine-2), les partenaires de liaison intracellulaires (F-actine, syncoiline et filamine-2) ainsi que les molécules de signalisation associées (calmoduline, Grb2, nNOS). Les dystroglycanes et sarcoglycanes sont représentés glycosylés.

Il est à présent bien établi que le complexe associé à la dystrophine joue un rôle prépondérant dans la physiopathologie musculaire en liant le cytosquelette d'actine avec les composants extracellulaires du muscle squelettique (Ervasti and Campbell, 1991). Ainsi, il stabilise mécaniquement la membrane sarcolemmale lors du stress imposé par les cycles de contraction musculaire via l'interaction entre la dystrophine et les costamères, protéines du cytosquelette (Rybakova *et al.*, 2000). Les costamères transmettent la force contractile latéralement de la membrane sarcolemmale à la lame basale ce qui maintient la longueur des sarcomères uniforme entre les fibres musculaires actives et au repos des différentes unités motrices (Rybakova *et al.*, 2000). D'autre part, l'interaction entre la dystrophine et le DGC est décrit comme analogue au réseau de spectrine qui agit comme un absorbeur de chocs dans le cytosquelette des cellules sanguines (Batchelor and Winder, 2006). Le DGC est également un receveur et transducteur de signal. La perte d'un de ses composants ne perturbe pas uniquement le lien physique et le rôle protecteur que cela lui confère, mais également perturbe la fonction de signalisation.

2. Physiopathologie

a. Conséquence de l'absence de dystrophine

Plusieurs effets distincts sont répertoriés consécutivement à l'absence de dystrophine. Effet mécanique : en son absence, la membrane de la cellule musculaire est plus fragile conduisant ainsi à des ruptures de celle-ci et une augmentation de sa perméabilité (Petrof *et al.*, 1993; Allen and Whitehead, 2011). Le niveau de dommage du sarcolemme est directement corrélé à l'amplitude du stress mécanique subi plutôt qu'au nombre de contractions musculaires (Petrof *et al.*, 1993). Ceci a pour conséquence une profonde perturbation de l'homéostasie calcique. L'augmentation des niveaux de calcium intracellulaire contribue à la dégénérescence musculaire par l'activation aberrante de protéases calcium-dépendantes comme la calpaïne et l'augmentation de production d'espèces réactives de l'oxygène ou ROS (pour Reactive Oxygen Species) qui rendent les fibres musculaires plus sensibles à la nécrose (Mallouk *et al.*, 2000; Vandebrouck *et al.*, 2002; Batchelor and Winder, 2006; Lawler, 2011).

La perte de dystrophine augmenterait également l'activité des canaux mécano-sensibles ainsi que des Transient Receptor Potential Channels ou TRPC se traduisant par l'entrée massive de calcium à l'intérieur de la fibre musculaire (Vandebrouck *et al.*, 2007). Cette

augmentation du calcium intracellulaire conduit à une hyper-contraction des fibres musculaires qui, associée à un couplage mécanique latéral réduit, conduit à la rupture des fibres musculaires (Clafin and Brooks, 2008).

Effet sur la signalisation intracellulaire : Un rôle majeur du DGC a été montré dans la signalisation cellulaire, notamment dans la transduction de la voie MAPK. Chez les souris dystrophiques soumises à un exercice, de nombreuses protéines de cette voie sont fortement phosphorylées (Nakamura *et al.*, 2005). La rupture entre la laminine et les dystroglycane inhibe l'activation d'Akt aboutissant à une perte de la survie des cellules musculaires. L'augmentation de la production de ROS aboutit à une activation du facteur de transcription NF- κ B qui induit l'expression de différentes voies de signalisation, notamment de l'inflammation, de la fibrose ainsi que de l'atrophie (Allen and Whitehead, 2011; Kozakowska *et al.*, 2016). L'inhibition de ce facteur de transcription améliore le phénotype de souris dystrophique *mdx* d'un point de vue fonctionnel, biochimique et morphologique avec notamment une augmentation de la régénération musculaire et une diminution de l'inflammation (Messina *et al.*, 2006; Acharyya *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2012). L'absence de dystrophine aboutit également à une perte de nNOS à la membrane ce qui altère gravement la réponse de vasoconstriction à l'activation du récepteur α -adrénergique (Sander *et al.*, 2000; Crosbie, 2001).

Ces effets à la fois mécaniques et de signalisation conduisent à un cercle vicieux (Figure 7). En effet l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire liée à la perméabilisation de la membrane va d'abord être contrôlée par un pompage actif du calcium dans le réticulum sarcoplasmique et les mitochondries. Arrivés à saturation, ces composants cellulaires vont relarguer tout le calcium stocké, augmentant ainsi la perméabilisation membranaire, et par là même, l'entrée de calcium extracellulaire. Lorsque la membrane de la cellule musculaire n'est pas réparée à temps, il existe un point de non-retour au delà duquel il n'est plus possible pour la cellule de reprendre le contrôle du flux calcique et aboutissant à la mort de cette dernière (Gissel, 2005).

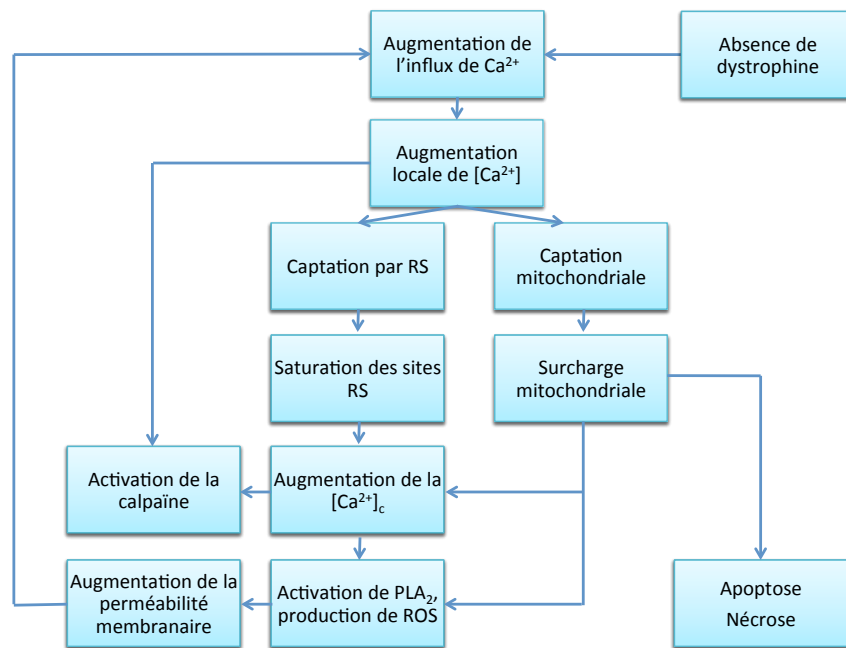


Figure 7. Modèle physiopathologique du « cercle vicieux » dans la DMD (Gissel, 2005). PLA2 : Phospholipase A2; RS : réticulum sarcoplasmique, $[Ca^{2+}]_c$: concentration en calcium cytosolique

A l'échelle tissulaire, des phénomènes d'apoptose des fibres musculaires sont observés (Tidball *et al.*, 1995). Ils seraient liés à la production de ROS qui activent les protéases comme la caspase 3 par le relargage du cytochrome C (Higuchi *et al.*, 1998) et à la forte infiltration des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques qui sécrètent la perforine (Spencer *et al.*, 1997; Cai *et al.*, 2000). La dégénérescence répétée des fibres musculaires conduit à terme au remplacement du tissu musculaire par des tissus collagénique et adipeux altérant ses propriétés contractiles. Cette fibrose serait également liée à la reprogrammation des myoblastes vers un phénotype pro-fibrotique qui sécrèteraient alors du collagène (Alexakis *et al.*, 2007; Wynn, 2008). La fibrose est corrélée à la quantité présente dans le tissu musculaire de TGFβ1 qui a été décrit comme inhibant la différenciation myogénique (Massagué *et al.*, 1986; Li *et al.*, 2004). Cette protéine majeure dans l'inflammation et la cicatrisation est sécrétée principalement par les lymphocytes et les macrophages infiltrés dans le tissu dystrophique (Bernasconi *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2004; Acharyya *et al.*, 2007). Les macrophages sont impliqués dans la sécrétion de l'enzyme protéolytique MMP-9, qui perturbe l'homéostasie tissulaire par une dégradation notamment du β-dystroglycane à l'origine d'une rupture du lien entre la matrice extra-cellulaire et la membrane plasmique (Michaluk *et al.*, 2007). Par cette action, les macrophages contribuent largement à l'aggravation du phénotype

dystrophique. L'inhibition pharmacologique ou génique de la MMP-9 chez les modèles de souris dystrophique conduit à une augmentation de la régénération musculaire, une diminution de l'inflammation et de la nécrose des fibres (Li *et al.*, 2009).

La déplétion *in vivo* des cellules CD4⁺ ou CD8⁺ ou des macrophages améliore par ailleurs le phénotype des souris *mdx* (Lawler, 2011). Chez les patients DMD, les traitements anti-inflammatoires à base de corticostéroïdes sont largement utilisés pour pallier à la progression de la pathologie (Deconinck and Dan, 2007). En outre, une interaction entre les cellules de l'immunité et les cellules musculaires, particulièrement les macrophages, a été démontrée comme jouant un rôle majeur dans les phénomènes de régénération musculaire (Villalta *et al.*, 2015) (Figure 8). Les macrophages pro-inflammatoires (ou M1) agissent pendant la phase aigüe en stimulant la lyse des fibres musculaires par la sécrétion de NO tandis que les macrophages anti-inflammatoires (M2) interviennent dans les phases ultérieures notamment par la sécrétion d'arginase qui promeut la régénération des fibres (Villalta *et al.*, 2009).

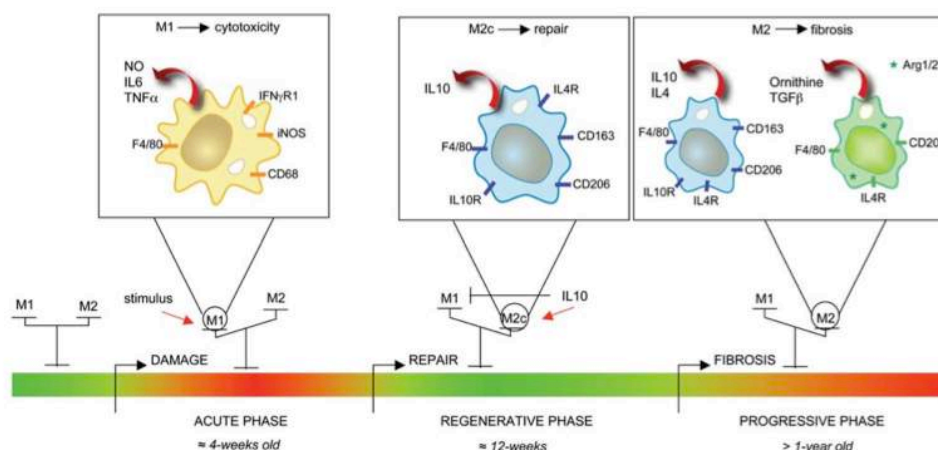


Figure 8. Intervention des macrophages aux différents stades de régénération du muscle dystrophique (Villalta *et al.*, 2011). La phase aigüe de la pathologie implique une forte inflammation musculaire avec une intervention des macrophages M1 (pro-inflammatoires) qui contribuent au stress oxydatif et à la lyse des fibres par la sécrétion de NO. Ils promeuvent la prolifération des myoblastes à travers la sécrétion de cytokines inflammatoires. Lorsque la phase de régénération commence, les forts niveaux d'IL10 font basculer les macrophages M1 vers un phénotype M2c, causant une réduction de l'expression de iNOS et atténuant les dommages musculaires. L'IL10 affecte également la différenciation des cellules myogéniques. Lorsque le processus régénératif est altéré (phase progressive), l'expression d'arginase est augmentée dans les macrophages M2 ce qui augmente la fibrose par dépôt collagénique. En vert sont représentées les phases où le tissu musculaire est en régénération, en rouge les phases inflammatoires.

Enfin, une infiltration par les éosinophiles a été démontrée conduisant à une sécrétion de MBP-1 qui augmente aussi la fibrose tissulaire. De fait, la déplétion en

éosinophiles ou en MBP-1 réduit la lyse des cellules musculaires ainsi que la fibrose du muscle squelettique et cardiaque de souris *mdx* (Wehling-henricks *et al.*, 2008).

Dans un muscle sain, les phénomènes ponctuels de nécrose sont largement compensés par la régénération de fibres musculaires. Celle-ci est liée à la présence de précurseurs myogéniques endogènes, les cellules satellites qui restent quiescentes jusqu'à la demande de régénération. Elles s'activent, prolifèrent pour donner lieu à des myoblastes qui fusionnent pour reformer une nouvelle fibre musculaire mature (Kottlors and Kirschner, 2010). Dans un muscle DMD, les cycles répétés de nécrose aboutissent à l'épuisement du stock de cellules satellites. A ce titre, les myoblastes issus de patients DMD présentent des anomalies morphologiques et une faible capacité de prolifération qui appuie cette notion d'épuisement cellulaire (Blau *et al.*, 1983; Luz *et al.*, 2002; Sacco *et al.*, 2010). Il a été montré un raccourcissement des télomères qui signe la sénescence des cellules satellites dans le muscle dystrophique, avec un raccourcissement 14 fois plus important chez les myoblastes DMD comparés à ceux de sujets sains (Decary *et al.*, 2000; Lund *et al.*, 2007). La dystrophine est naturellement produite dans les cellules musculaires activées et s'associe à la sérine-thréonine kinase Mark2 (ou Par1b), un important régulateur de la polarité cellulaire. En absence de dystrophine, l'expression de Mark2 est diminuée, aboutissant à une forte diminution de la division asymétrique des cellules et donc une baisse de la genèse de précurseurs musculaires (Dumont *et al.*, 2015).

b. Manifestations cliniques

La DMD touche principalement le système musculaire. Le premier signe d'appel est une faiblesse et une atrophie musculaires proximales observées vers l'âge de 4-5 ans qui va ensuite toucher l'ensemble des muscles du corps. L'enfant va présenter de grosses difficultés à se lever à partir de la station assise comme en témoigne le signe de Gowers où l'enfant devra prendre appui sur ses cuisses avec ses bras pour se relever (Iwańczak *et al.*, 2000) (Figure 9). Une pseudo-hypertrophie des muscles des jambes est observée ainsi que des crampes et douleurs musculaires à l'exercice (Angelini *et al.*, 1996). Vers l'âge de 10 ans, l'enfant perd progressivement la marche et a recours au fauteuil roulant. Des déformations osseuses sont observées (Tyler, 2003). La DMD atteint également les muscles cardiaque et lisses, provoquant une cardiomyopathie caractérisée par une

tachycardie sinusale suivie d'une arythmie ventriculaire et une dilatation gastrique (Towbin, 1998; Iwańczak *et al.*, 2000). Les atteintes cardiaques cliniques sont présentes chez 90% des patients DMD et sont responsables de 20% des décès (Finsterer and Stöllberger, 2003). L'atteinte du diaphragme conduit à une hypoventilation des patients ainsi qu'au développement d'infections broncho-alvéolaires. Tous ces symptômes conduisent au décès par arrêt cardiaque ou respiratoire à l'âge de 20 à 30 ans (Boyce *et al.*, 1991). Les patients DMD présentent également des atteintes du système nerveux central, révélées par un QI faible d'environ 80. Un tiers des patients DMD est considéré comme mentalement retardé (Boyce *et al.*, 1991). Une augmentation du taux sérique de CK, enzyme spécifiquement musculaire, est retrouvée, révélant la rupture des fibres musculaires et le relargage de cette enzyme cytosolique (Angelini *et al.*, 1996). Ce dosage de la CK est un des moyens de diagnostic les plus utilisés, combinés au test PCR (Anaya-Segura *et al.*, 2015; Falzarano *et al.*, 2015).

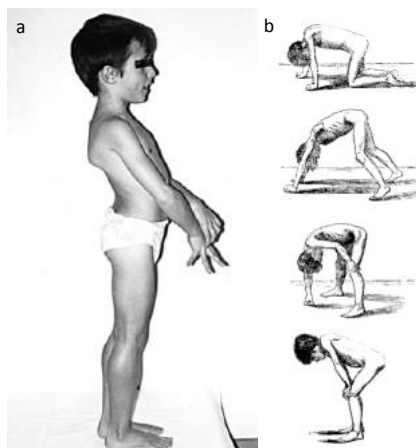


Figure 9. Signes cliniques d'un patient DMD (a) Vue latérale d'un patient DMD âgé de 8 ans (Iwańczak *et al.*, 2000) (b) Signe de Gowers. L'enfant doit s'appuyer à l'aide des mains d'abord au sol puis sur ses genoux afin de pouvoir atteindre la station debout (Tyler, 2003).

3. Modèles animaux

a. Modèles rongeurs

i. Souris *mdx*

La souris *mdx* issue d'une colonie C57BL/10 présente une mutation ponctuelle spontanée sur l'exon 23 du chromosome X qui conduit à l'apparition d'un codon stop prématuré et s'accompagne d'une absence de dystrophine (Bulfield *et al.*, 1984; DiMario *et al.*, 1991; Im *et al.*, 1996). Le tissu musculaire de la souris *mdx* apparaît normal jusqu'à 14 jours (Figure 10). A 20 jours, la destruction massive de groupes musculaires, associée à une infiltration de neutrophiles et de macrophages dans le tissu, est suivie par une régénération complète (Tanabe *et al.*, 1986; Collins and Morgan, 2003; Nakamura and Takeda, 2011). Les zones non nécrosées ne présentent aucune variation dans la taille

des fibres et aucune fibre centronucléée n'est observée. A 30 jours, on peut observer des foyers de régénération avec des fibres centronucléées et au cytoplasme basophile. La nécrose musculaire diminue à l'âge de 60 jours (Tanabe *et al.*, 1986). Ainsi le phénomène de régénération apparaît efficace. Même après des cycles répétés de nécrose et régénération, le remplacement par du tissu interstitiel fibreux et adipeux reste minimal chez ce modèle et aucune atteinte cardiaque n'est décrite (Tanabe *et al.*, 1986). Le diaphragme de la souris *mdx* est le seul muscle particulièrement touché avec une dégénérescence accompagnée d'une fibrose qui conduit à une perte d'élasticité, de la vitesse de contraction et de la longueur des fibres (Stedman *et al.*, 1991; Barbin *et al.*, 2016).

Cependant, malgré ces atteintes tissulaires, d'un point de vue clinique, aucune faiblesse musculaire n'est observée (Tanabe *et al.*, 1986; Collins and Morgan, 2003). Ce modèle met rapidement en place des phénomènes compensatoires notamment par la surexpression d'utrophine qui stabilise les fibres musculaires en rétablissant le lien entre le cytosquelette d'actine et le sarcolemme (Pons *et al.*, 1994; Rybakova *et al.*, 2000). Une réduction de l'espérance de vie de ces souris de 18% a été observée, de 27 mois pour les souris saines contre 22 mois pour les souris *mdx* (Itagaki *et al.*, 1995; Chamberlain *et al.*, 2007). Ce n'est que sur des souris *mdx* âgées de plus de 20 mois que se manifestent une faiblesse musculaire, le remplacement des fibres musculaires par du tissu conjonctif ainsi que des atteintes cardiaques, respiratoires et posturales (Lefaucheur *et al.*, 1995; Pastoret and Sebillé, 1995).

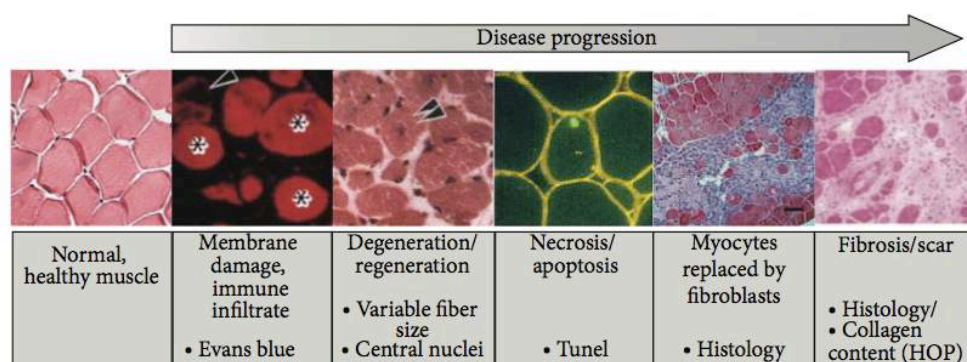


Figure 10. Evolution de la pathologie dystrophique chez la souris (Roberts *et al.*, 2015) Les clichés histologiques représentent la progression de la dystrophie musculaire chez le modèle murin.

Il est possible d'aggraver le phénotype du modèle en le soumettant à un exercice musculaire répété (Sandri *et al.*, 1997; Vilquin *et al.*, 1998) ou en induisant une forte

expression d'IL6 (Pelosi *et al.*, 2015), ce qui induit des lésions musculaires ainsi qu'un relargage de CK sérique (Vilquin *et al.*, 1998). En prenant en compte l'ensemble des caractéristiques physiopathologiques de la souris *mdx*, celle-ci représente un modèle peu pertinent.

Quatre modèles de souris dystrophique ont ensuite été générés par exposition au N-éthylnitrosurée : les souris *mdx2^{cv}*, *mdx3^{cv}* et *mdx4^{cv}* présentent une mutation supplémentaire dans la partie 3' du gène de la dystrophine tandis que la souris *mdx5^{cv}* présente des mutations dans la partie 5' (Danko *et al.*, 1992) (Figure 11). Toutes sont issues de la lignée BL6 (Li *et al.*, 2008) avec une mutation respectivement dans l'intron 42, 65, l'exon 53 et 10 (Im *et al.*, 1996; Banks and Chamberlain, 2008). Elles sont toutes déficientes en dystrophine à l'exception notable de la *mdx3^{cv}* qui présente des niveaux bas de cette protéine, de l'ordre de 5% du niveau normal (Li *et al.*, 2008). La souris *mdx5^{cv}* présente une fatigue plus sévère liée à l'exercice ainsi qu'une atteinte de la force musculaire du diaphragme (Beastrom *et al.*, 2011). Par rapport aux souris *mdx*, ces modèles présentent à 2 et 6 mois dix fois moins de fibres révertantes c'est-à-dire ayant subi une deuxième mutation restaurant le cadre de lecture et la production de dystrophine (Danko *et al.*, 1992; Im *et al.*, 1996; Wilton *et al.*, 1997). Un autre modèle a été généré par modification génétique, la souris *mdx52* qui présente une délétion sur l'exon 52 (Arakia *et al.*, 1997).

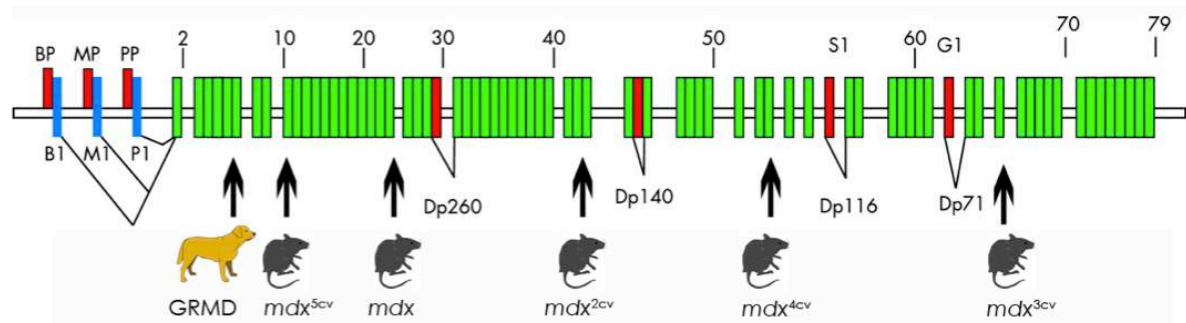


Figure 11. Localisation des mutations identifiées sur le gène de la dystrophine chez les principaux modèles murins et canins. (Larcher, 2012 d'après Cohen and Muntoni, 2004; Cox *et al.*, 1993; Im *et al.*, 1996).

ii. Souris doubles mutantes

Devant les limites majeures rencontrées avec le modèle *mdx*, de nombreux autres modèles de souris ont été générés afin de mieux modéliser le déroulement de la pathologie. Les caractéristiques des modèles les plus utilisés sont récapitulées dans le **Tableau III**.

Tableau III. Modèles de souris doubles mutantes (Megeny *et al.*, 1996, 1999; Deconinck *et al.*, 1997; Grady *et al.*, 1997, 1999; Burkin *et al.*, 2001; Connolly *et al.*, 2001; Raymackers *et al.*, 2003; Janssen *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2006; Farini *et al.*, 2007; Capote *et al.*, 2010; Sacco *et al.*, 2010; Alameddine, 2012; Isaac *et al.*, 2013; Vallese *et al.*, 2013; Shiba *et al.*, 2015).

Modèle	Protéine déficiente	Phénotype tissulaire	Phénotype clinique
<i>utr</i> ^{-/-} / <i>mdx</i>	Dystrophine et utrophine	Altération marquée des jonctions neuromusculaires Fibrose interstitielle Altération du couplage excitation-contraction des fibres musculaires Atteinte histologique cardiaque	Cyphose Perte de poids, de mobilité Force musculaire diminuée Fatiguabilité augmentée Atteinte fonctionnelle cardiaque Contractures articulaires
<i>adbn</i> ^{-/-} / <i>mdx</i>	Dystrophine et α -dystrobrevine	Altération du tissu musculaire	Réduction de l'espérance de vie Cardiomyopathie
$\alpha 7$ intégrine ^{-/-} / <i>mdx</i>	Dystrophine et $\alpha 7$ -intégrine	Fibrose endomyosiale Calcification ectopique	Perte de poids Décès prématuré (24-28 jours) Atteintes cardiaques et respiratoires
<i>mdx</i> :MyoD ^{-/-}	Dystrophine et MyoD	Réduction de la régénération musculaire Réduction de capacité de prolifération des cellules myogéniques Nécrose cardiaque Hypertrophie des myocytes	Mort prématurée (1 an) Cardiomyopathie
PVKO- <i>mdx</i>	Dystrophine et parvalbumine	Augmentation de densité des myotubes et des fibres centronucléées Fibrose sévère Fort taux de créatine kinase sérique	Pseudo-hypertrophie musculaire Diminution de la force musculaire
<i>mdx</i> / <i>Mmp9</i> ^{-/-}	Dystrophine et MMP-9	<u>Stade précoce</u> Réduction de la nécrose musculaire et de l'invasion des neutrophiles Régénération musculaire plus intense Infiltration des macrophages et sécrétion de MCP-1 Surexpression d'ostéopontine dans les muscles <u>Stade tardif</u> Altération de l'expression des MRF Augmentation du tissu fibro-adipeux	<u>Stade précoce</u> Augmentation de la force musculaire <u>Stade tardif</u> Diminution de la taille des muscles
<i>mdx</i> / <i>mTR</i>	Dystrophine et télomérase	Augmentation du taux de créatine kinase sérique Accumulation de tissu fibrotique et de dépôts calciques dans le muscle Déficit sévère de prolifération des cellules satellites	Perte importante de masse musculaire Cyphose Raccourcissement de l'espérance de vie
<i>scid</i> / <i>mdx</i>	Dystrophine et déplétion en lymphocytes T et B	Diminution de la fibrose Diminution de l'expression de TGF- $\beta 1$ dans le muscle Augmentation du nombre de fibres centronucléées Nécrose musculaire	Perte de masse musculaire Diminution de la force musculaire
<i>Rag2</i> ^{-/-} <i>IL2rb</i> ^{-/-} <i>Dmd</i> ^{-/-}	Dystrophine, gène activateur de la recombinaison 2 (<i>Rag2</i>) et gène récepteur à l'IL2. Déplétion totale en LT, LB et cellules NK	Aucune fibre révertante présente	Perte de masse musculaire Diminution de la force musculaire

iii. Rat DMD^{mdx}

Récemment, des modèles de rats dystrophinopathes ont été générés grâce à la technologie CRISPR/Cas ciblant l'exon 3 et 16 (Nakamura *et al.*, 2014) ou TALEN ciblant l'exon 23 (Larcher *et al.*, 2014). Ces derniers rats présentent une très faible expression de dystrophine, environ 5% des fibres l'expriment, ainsi qu'une désorganisation majeure du complexe DGC. A 3 mois, les muscles des membres et du diaphragme subissent des phénomènes de nécrose et de régénération. A 7 mois, ces muscles présentent une fibrose sévère et une infiltration adipeuse. Les rats montrent une réduction de leur force musculaire, une diminution de leur activité motrice ainsi qu'un poids beaucoup plus faible que celui des rats sains. De façon majeure, ils présentent une altération cardiaque avec une cardiomyopathie dilatée et un remodelage tissulaire qui aboutit à une dysfonction diastolique (Larcher *et al.*, 2014). Ce modèle récemment développé est d'importance car il pourrait permettre une meilleure appréhension de la physiopathologie de la DMD et servir à mieux évaluer les stratégies thérapeutiques.

De façon globale, les modèles rongeurs présentent une limite majeure liée à l'impossibilité d'évaluer l'efficacité de traitements dans de larges volumes musculaires.

b. Modèles canins

Des mutations spontanées du gène de la dystrophine ont été détectées dans plusieurs races de chien domestique : le Golden Retriever (Cooper *et al.*, 1988), le Rottweiler (Collins and Morgan, 2003), le Pointer (Schatzberg *et al.*, 1999) et le Beagle (Shimatsu *et al.*, 2003). La physiopathologie dans l'espèce canine est remarquablement proche de celle observée chez l'Homme. D'autre part, un chien présente une masse corporelle comparable à celle d'un patient DMD (Collins and Morgan, 2003).

i. Chien GRMD

Historiquement, le premier cas avéré de dystrophie musculaire a été découvert en 1958 par Meier chez un chiot Golden Retriever (Shelton and Engvall, 2005). Le chien Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) est le plus décrit dans la littérature et le mieux caractérisé. Il présente une mutation ponctuelle dans l'intron 6 à l'origine d'un saut de l'exon 7 et de la genèse d'un codon stop prématuré dans l'exon 8 aboutissant à une absence de dystrophine (Sharp *et al.*, 1992; Nakamura and Takeda, 2011).

D'un point de vue histologique, une nécrose des fibres musculaires est observée avec une forte phagocytose suivie d'une régénération associée à une augmentation du calcium intracytoplasmique (Valentine *et al.*, 1986, 1990) (Figure 12). Il est également rapporté la présence de fibres hyalines, hypercontractées, infiltrées de macrophages ou en régénération (Cooper *et al.*, 1988). Le diamètre moyen des fibres musculaires présente une forte augmentation et une variabilité importante (Kornegay *et al.*, 1988; Valentine *et al.*, 1990). Une fibrose périnysiale et endomysiale est déjà présente à 4 mois d'âge (Cooper *et al.*, 1988). On observe une désorganisation du cytoplasme des fibres musculaires, une internalisation des noyaux musculaires, une prolifération mitochondriale ainsi qu'une forte infiltration adipocytaire. Une dilatation du réticulum sarcoplasmique et un développement de dégénérescence subsarcolemmale focale sont également rapportés (Valentine *et al.*, 1990). Une perturbation de l'expression de la myosine est visible dès 15 jours avec une perte des fibres exprimant l'isoforme de la myosine rapide et la persistance des fibres développementales. De plus, chez le chien GRMD, une surexpression marquée de l'utrophine est présente (Lanfossi *et al.*, 1999). Chez les chiens GRMD âgés de 7 à 10 mois, la fibrose est également associée à une diminution de la densité des microvaisseaux sanguins, une augmentation de la distance inter-capillaire ainsi que de leur diamètre. Le rapport capillaires/fibres et aire vasculaire totale sont normaux (Nguyen *et al.*, 2005).

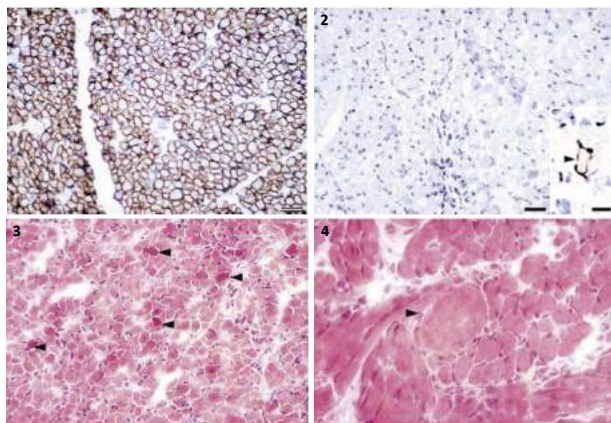


Figure 12. Comparaison des caractéristiques histologiques entre un chien sain et un chien GRMD (Nguyen *et al.*, 2002). (1) Expression de la dystrophine révélée en immunohistochimie dans le muscle diaphragmatique de chien sain d'un an. (2) Absence de dystrophine dans le muscle deltoïde d'un chien GRMD d'un an. (3) Altération du tissu musculaire chez le chien GRMD avec la présence de fibres hyalines et (4) de fibres hypertrophiques.

Les premiers signes cliniques se manifestent *in utero* avec le développement d'atteintes des muscles de la langue. Une nécrose extensive des muscles des membres, du tronc et du cou peut être identifiée dès la naissance (Nguyen *et al.*, 2002; Collins and Morgan, 2003). Elle est davantage prononcée entre le 2^{ème} et le 30^{ème} jour de vie avec un nombre de fibres nécrotiques qui diminuent ensuite avec l'âge (Cozzi *et al.*, 2001; Collins and

Morgan, 2003). Durant toute cette période, et jusqu'à 60 jours, les niveaux de TGF- β 1 retrouvés dans le muscle sont élevés et associés à la fibrose (Passerini *et al.*, 2002; Collins and Morgan, 2003). A 6 mois, une fibrose sévère et une contracture articulaire se développent (Collins and Morgan, 2003) (Figure 13). La perte musculaire qui accompagne la faiblesse musculaire est progressive et induit souvent des déformations du squelette (Shelton and Engvall, 2005; Nakamura and Takeda, 2011). La force tétanique du tarse est plus faible avec des temps de relaxation et de contraction plus importants (Kornegay *et al.*, 1999). Le taux de CK sérique est particulièrement élevé chez les chiens GRMD (Kornegay *et al.*, 1988). On observe un élargissement de la base de la langue lié à une hypertrophie des fibres musculaires, également observé chez le patient DMD. Ceci entraîne des dysfonctions pharyngées et de l'œsophage, générant des dysphagies et régurgitations (Shelton and Engvall, 2005). Le diaphragme présente une dysfonction majeure qui se traduit par une augmentation des pauses respiratoires et une composante abdominale excessive. De plus, le chien GRMD développe une cardiomyopathie progressive (Nakamura and Takeda, 2011) avec une calcification du myocarde et un développement du tissu conjonctif conduisant à des arythmies ventriculaires (Moise *et al.*, 1991). Les chiens GRMD décèdent aux alentours d'un an d'atteinte cardiaque et respiratoire (Collins and Morgan, 2003). Il a été rapporté une forte variabilité phénotypique entre les chiens GRMD avec trois phénotypes distincts en terme de sévérité (Allamand and Campbell, 2000; Ambrosio *et al.*, 2009; Barthélémy *et al.*, 2014) ainsi qu'une variabilité dans les muscles affectés, les plus atteints étant le diaphragme, la langue et les muscles fléchisseurs des membres (Kornegay *et al.*, 2003).

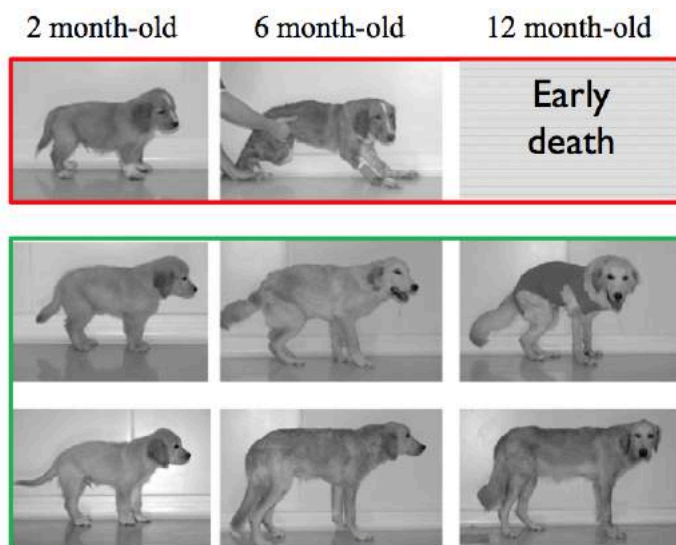


Figure 13. Evolution de la posture de chiens GRMD selon les différents phénotypes (Barthélémy *et al.*, 2014). En encadré rouge est présentée l'évolution de la forme sévère avec une perte de la marche avant 6 mois d'âge. En encadré vert est représentée l'évolution de deux formes modérées qui conservent la capacité à marcher après 6 mois.

ii. Chien CXMD_J

En raison de la taille importante du chien GRMD qui se répercute sur le coût de gestion de la colonie, le développement d'une race de taille intermédiaire a été réalisé au Japon en inséminant artificiellement des femelles Beagles avec des chiens GRMD (Shimatsu *et al.*, 2003). Ce modèle est appelé Canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMD_J). Le taux de CK est élevé dès la naissance et la mortalité durant la période néonatale s'élève à 32,3% (contre 13,3% pour une portée saine). L'altération du diaphragme apparaît très tôt après la naissance et est plus importante que celle touchant les membres. A l'âge de 2-3 mois, l'atrophie et la faiblesse musculaire des membres apparaissent, suivie à 4 mois par le développement d'une macroglossie, de dysphagie et de contractures articulaires (Nakamura and Takeda, 2011). Ce modèle présente également une cardiomyopathie mais de progression plus lente que celle décrite chez le chien GRMD (Yugeta *et al.*, 2006).

La limite majeure rencontrée avec les modèles canins concerne les aspects logistiques importants avec la nécessité de grandes infrastructures d'hébergement ce qui se traduit par des coûts d'expérimentations particulièrement élevés avec ces modèles (Collins and Morgan, 2003).

c. Autres modèles

Il existe également d'autres modèles animaux de la DMD que sont le chat (Carpenter *et al.*, 1989), le porc (Klymiuk *et al.*, 2013), le ver nématode *Caenorhabditis elegans* (Gieseler *et al.*, 2000), le zébrafish (Guyon *et al.*, 2003) et la drosophile *D. melanogaster* (Greener and Roberts, 2000).

De façon similaire à la souris *mdx*, le muscle squelettique du chat dystrophique HFMD pour Hypertrophic Feline Muscular Dystrophy (Carpenter *et al.*, 1989; Gaschen *et al.*, 1992) subit des cycles répétés de nécrose et régénération mais ne développe pas de fibrose marquée (Gaschen and Burgunder, 2001; Collins and Morgan, 2003; Shelton and Engvall, 2005). Il présente une hypertrophie marquée, notamment de la langue, du cou, des épaules, ce qui conduit à une obstruction oesophagienne et des atteintes rénales. Il présente également une calcification linguale, une salivation excessive, un mégaoesophage, une hépatosplénomégalie ainsi qu'une insuffisance rénale (Gaschen *et al.*, 1992; Shelton and Engvall, 2005; Nakamura and Takeda, 2011).

Un modèle de porc transgénique muté pour l'exon 52 présente une pathologie similaire à l'Homme. On observe une absence totale de dystrophine dans les muscles squelettiques, une augmentation du taux de CK, un remodelage tissulaire avec l'apparition de lésions nécrotiques focales, une diminution de la mobilité, une faiblesse musculaire et une espérance de vie de 3 mois liée aux atteintes respiratoires sévères (Klymiuk *et al.*, 2013; Selsby *et al.*, 2015; Fröhlich *et al.*, 2016).

Le ver nématode *C. elegans* a été le premier organisme multicellulaire dont le génome a été entièrement séquencé en 1998. Il est apparu que 65% des gènes impliqués dans différentes pathologies humaines possédaient leur équivalent chez ce ver (Baumeister and Ge, 2002). Les muscles striés du ver *C. elegans* expriment une dystrophine homologue *dys1* interagissant avec les autres composants du DGC (Gieseler *et al.*, 2000; Grisoni *et al.*, 2003). Les mutations de *dys1* s'accompagnent d'une hyperactivité et hypercontraction ainsi que d'une augmentation de la sensibilité au neurotransmetteur acétylcholine et à son inhibiteur (Collins and Morgan, 2003).

Le zébrafish est un modèle intéressant car il contient une large proportion de tissu musculaire squelettique et exprime des orthologues de la plupart des protéines du DGC avec une localisation membranaire similaire (Chambers *et al.*, 2001; Bassett and Currie, 2003). En utilisant les techniques de gene editing, un zébrafish déficient pour la dystrophine, présentant une instabilité du complexe DGC, une morphologie courbée et une faible activité, a été généré (Bassett and Currie, 2003; Collins and Morgan, 2003; Guyon *et al.*, 2003).

La drosophile a également été entièrement génotypée, ce qui a permis de montrer une expression d'un analogue à la dystrophine, associé aux composants classiques du DGC (Greener and Roberts, 2000).

Ces modèles ont l'avantage majeur de pouvoir se reproduire en large nombre à moindre coût, sont facilement manipulables génétiquement et présentent souvent une physiologie plus simple que celle des Mammifères. Leur musculature et leur pathologie diffèrent cependant largement de l'Homme. Ils sont utilisés principalement pour comprendre des modalités d'action ou élaborer des expérimentations reproductibles (Collins and Morgan, 2003).

Nous avons ainsi détaillé les différents modèles animaux disponibles présentant un phénotype proche ou similaire à celui du patient DMD. La comparaison de ces modèles est récapitulée dans le **tableau IV**. Il est à noter que les modèles murins mdx^{2Cv} , mdx^{3Cv} , mdx^{52} et le modèle canin CXMD_J sont assez peu caractérisés. Le chien GRMD constitue le modèle cliniquement pertinent de la DMD avec une affection lourdement invalidante et une espérance de vie fortement réduite. Ce modèle a été choisi au laboratoire pour évaluer de façon pertinente une approche de stratégie thérapeutique innovante.

Tableau IV. Comparaison des différents modèles animaux de la DMD (D'après Larcher, non publié). Les différences majeures qui distinguent ces modèles de la pathologie humaine sont indiquées en bleu gras.

	Souris <i>mdx</i> et variants	Chat HFMD	Cochon <i>Dmd</i>^{-/-}	Chien GRMD
Mutation génétique	Codon stop dans l'exon 23	Délétion du promoteur	Codon stop dans l'exon 52	Codon stop dans l'exon 8
Lésions musculaires	Primaires (peu ou pas de fibrose)	Primaires (hypertrophie)	Primaires et secondaires	Primaires et secondaires
Fonction musculaire	Réduction de la force Locomotion normale	Réduction de la force Locomotion altérée	Réduction de la force Locomotion altérée	Réduction de la force Locomotion altérée
Fonction cardiaque	Normale	Cardiomyopathie	Normale	Cardiomyopathie modérée
Durée de vie	Légèrement réduite	Réduite Cause : insuffisance rénale	Fortement réduite Cause : insuffisance respiratoire	Réduite Environ 1 an
Reproduction	Aisée	Modérément difficile	Difficile	Difficile
Poids adulte	25 g	4 kg	20 kg	15 kg
Principale utilisation	Physiopathologie Tests précliniques	Pas d'utilisation	Description récente Etudes court terme	Tests précliniques

4. Traitements pharmacologique et génique

Conjointement à la thérapie cellulaire qui sera décrite en détail dans le chapitre 3, deux autres types de stratégies thérapeutiques sont envisagées pour la DMD : les traitements pharmacologiques agissant sur les cascades physiopathologiques et la thérapie génique qui vise la ré-expression de la dystrophine.

a. Traitements pharmacologiques

Les traitements pharmacologiques visent à agir sur la physiopathologie en stabilisant les voies de signalisation dérégulées et l'architecture tissulaire.

i. Traitements anti-inflammatoires

L'utilisation chronique de traitements corticostéroïdes initiée au stade ambulatoire du patient est le traitement palliatif de référence de la DMD. Grâce à ce type de traitement combiné à une aide respiratoire et cardiaque, 53% des patients DMD survivent jusqu'à l'âge de 25 ans (Markham *et al.*, 2008). Les principaux corticostéroïdes utilisés sont la prednisone (0,3 mg à 1,5 mg/kg/jour; Manzur *et al.*, 2008), la prednisolone et le deflazacort (0,9 mg/kg/jour; Bonifati *et al.*, 2000) ainsi qu'un dérivé de cette dernière (Goemans and Buyse, 2014). L'administration est d'ordinaire quotidienne mais il a été démontré un impact bénéfique de la prednisone avec un traitement hebdomadaire (Escobar *et al.*, 2011). Le mécanisme d'action est encore inconnu mais il améliorerait le phénotype en possédant à la fois des propriétés anti-inflammatoires et immunomodulatrices. Les glucocorticoïdes auraient un effet anabolisant sur le tissu musculaire en agissant positivement sur la prolifération et la différenciation des myoblastes (Fisher *et al.*, 2005). Ce type de traitement inhibe la protéolyse musculaire, stimule la prolifération des myoblastes, stabilise la membrane des fibres musculaires et augmente la régénération (Manzur *et al.*, 2008; Yuko *et al.*, 2015). Il réduirait également le calcium cytosolique, augmenterait l'expression d'utrophine ainsi que des gènes de régulation des fibres musculaires (Manzur *et al.*, 2008; Tamma *et al.*, 2013). Il augmente la force musculaire pour une période supérieure à trois ans, maintient la capacité ambulatoire et permet de différer l'apparition des dysfonctions cardiaques et respiratoires (Manzur *et al.*, 2008; Goemans and Buyse, 2014). D'autre part, il a été démontré un effet protecteur des stéroïdes contre la dysfonction ventriculaire (Markham *et al.*, 2008). La prednisone et le deflazacort présentent une efficacité similaire (Bonifati *et al.*, 2000; Biggar *et al.*, 2001, 2004, 2006; McAdam *et al.*, 2012;

Griggs *et al.*, 2016). Cependant, ces molécules produisent des effets secondaires non négligeables, parmi lesquels : un gain de poids associé à une augmentation de l'appétit, des changements comportementaux, une fragilité osseuse conduisant à des fractures spontanées, une hypokaliémie. Afin de limiter ces effets néfastes, il a été proposé une administration intermittente de prednisolone avec des pauses de 10 jours tous les 10 jours (ten Dam *et al.*, 2012; Ricotti *et al.*, 2013).

Il a été également testé des administrations de Cyclosporine A, un immunomodulateur utilisé notamment dans le transfert d'organes, ou combinées à des doses intermittentes de prednisone. Cependant, ce type de traitement n'augmente pas la force musculaire de patients DMD (Kirschner *et al.*, 2010) alors qu'il permet pourtant une amélioration du score clinique, de la relaxation musculaire post-tétanique et du taux de CK sérique chez le chien GRMD (Barthélémy *et al.*, 2012).

Récemment, un nouvel anti-inflammatoire appelé le VP15 a été développé par ReveraGen BioPharma. Il s'agit d'un $\Delta 9, 11$ glucocorticoïde présentant une perte de la capacité de liaison au récepteur aux glucocorticoïdes et limitant ainsi les effets secondaires de ces derniers. Il a été démontré *in vitro* capable d'inhiber NF- κ B, d'empêcher le récepteur aux glucocorticoïdes d'être transloqué dans le noyau. Sa pharmacocinétique est similaire à celle des glucocorticoïdes non modifiés (Reeves *et al.*, 2013). Administré quotidiennement à des souris *mdx* à raison de 5, 15 ou 30 mg/kg, il diminue l'inflammation tissulaire, stabilise la membrane de la fibre musculaire, promeut la réparation de fibres musculaires lésées au laser et augmente la force (Heier *et al.*, 2013).

NF- κ B est largement impliqué dans le développement musculaire et sa régénération. Les activateurs de ce facteur de transcription, comme le TNF- α , sont surexprimés chez les patients DMD. L'inhibition pharmacologique de la I κ B kinase (IKK), un régulateur positif de NF- κ B améliore le phénotype pathologique et la fonction musculaire de souris *mdx*. Ceci a encouragé la mise en place d'un essai du pentoxifylline, un inhibiteur du TNF- α , sur des enfants DMD âgés de 4 à 9 ans (Zimmerman *et al.*, 2011). Les résultats ont montré une faible tolérance au produit mais suggèrent une stabilisation de la force musculaire chez un petit nombre de patients. Une étude plus importante lancée sur des garçons DMD de plus de 7 ans ayant été traités à la prednisone a montré qu'il n'y avait pas de bénéfice supplémentaire du pentoxifylline par rapport aux corticostéroïdes (Wagner, 2008).

Une étude récente s'est intéressée à la Galectine-1, petite protéine non-glycosylée, retrouvée dans le tissu musculaire et ayant été décrite comme agissant sur la réponse immunitaire, la réparation musculaire et l'apoptose (Camby *et al.*, 2006; Cedeno-Laurent and Dimitroff, 2012). Les niveaux de Galectine-1 sont plus élevés dans le muscle de souris et de chien dystrophiques (Cerri *et al.*, 2008). Après injection intramusculaire et intrapéritonéale de Galectine-1 recombinante chez la souris *mdx*, il a été démontré une amélioration de la fonction musculaire liée à l'augmentation de l'expression d'utrophine et $\alpha 7\beta 1$ intégrine qui stabilisent la membrane du sarcolemme (Van Ry *et al.*, 2015).

ii. Traitements anti-oxydants

La N-acétylcystéine, qui possède des propriétés anti-oxydantes, prévient l'augmentation de la perméabilisation membranaire et réduit le déficit de force de muscles isolés de souris *mdx*. Administré dans l'eau de boisson de souris *mdx*, elle réduit les concentrations de ROS dans les muscles, diminue le nombre de fibres centronuclées et également l'expression de NF- κ B. De plus, elle réduit l'expression de la cavéoline 3 et augmente l'expression sarcolemmale du β -dystroglycane ainsi que de l'utrophine (Whitehead *et al.*, 2008).

La forte réduction de l'expression et de l'activité de la nitric oxide synthase (NOS) dans les muscles déficients en dystrophine se traduit par un déficit en NO. Compte tenu du rôle anti-inflammatoire et cytoprotecteur via les propriétés anti-oxydantes du NO, cette réduction de NOS dans le muscle dystrophique exacerbe l'inflammation musculaire et les dommages aux fibres. L'expression transgénique de NOS dans le muscle de souris *mdx* prévient la majorité des dommages membranaires et diminue le taux de CK sérique. De plus, les macrophages infiltrés dans les muscles de ces souris perdent leur capacité cytolytique (Wehling *et al.*, 2001). Il est également rapporté chez la souris *mdx* une atténuation de la perte de la force musculaire suite à des contractions excentriques ou isométriques après expression de NOS transgénique dans les muscles squelettiques (Rebolledo *et al.*, 2016). Ces découvertes ont conduit à la proposition d'un traitement appelé HCT 1026, un dérivé du flurbiprofen relarguant du NO. Après un an de traitement sur deux modèles de souris, α -sarcoglycan-null et *mdx*, l'HCT 1026 a réduit l'inflammation, prévenu les dommages musculaires et préserver le nombre ainsi que la fonction des cellules satellites de façon plus importante que la prednisolone. D'autre

part, ce traitement a également amélioré le tropisme musculaire de mésoangioblastes murins injectés par voie intra-artérielle (Brunelli *et al.*, 2007).

De façon intéressante, il a été montré que la restauration de production de NO par correction génique chez la souris *mdx* s'accompagnait d'un blocage d'une histone déacétylase HDAC2 par nitrosylation. Il y aurait donc un lien entre la dystrophine, la signalisation de NO et les HDAC. Une activité plus importante des HDAC et notamment une augmentation de l'expression de HDAC2 est ainsi détectée dans le muscle de souris *mdx*. L'inhibition de HDAC à l'aide de siRNA est suffisante pour reproduire les bénéfices morphologiques et fonctionnels observés avec des molécules donneuses de NO ou inhibitrices des HDAC (Brunelli *et al.*, 2007).

Le naproxénod, une molécule combinant les propriétés anti-inflammatoires du naproxen avec des capacités de don de NO, améliore significativement la force musculaire et la résistance à la fatigue de souris *mdx*. Il réduit l'inflammation, la fibrose cardiaque et diaphragmatique, contrairement à la simple dose de naproxen, montrant bien l'impact majeur du don de NO sur le phénotype dystrophique (Miglietta *et al.*, 2015).

Les effets d'un dérivé de l'ibuprofène, le NCX 320, ont été évalués sur la souris α -sarcoglycane null. Le NCX 320 modère les lésions musculaires, réduit significativement le taux de CK sérique, le nombre de fibres nécrotiques ainsi que les infiltrats inflammatoires. De plus, il stimule la régénération musculaire en augmentant le nombre de progéniteurs musculaires ce qui aboutit à une amélioration de la fonction musculaire globale (Sciorati *et al.*, 2011). Un essai clinique de phase I a montré la bonne tolérance d'une combinaison d'ibuprofène avec un donneur de NO, l'isosorbide dinitrate, chez des patients DMD, BMD et LGMD (D'Angelo *et al.*, 2012).

Les benzoquinones possèdent la propriété d'améliorer la fonction mitochondriale et ainsi de diminuer le stress oxydatif. Le 2,3-dimethoxy-5-méthyl-6-(10-hydroxydecyl)-1,4-benzoquinone, autrement appelé Idebenone, permet de corriger les dysfonctions cardiaques et de diminuer la mortalité liée aux insuffisances cardiaques chez la souris *mdx*. Il réduit également l'inflammation et la fibrose cardiaque (Buyse *et al.*, 2009). Fort de ces résultats précliniques, un essai clinique de phase IIa chez des patients DMD a montré une bonne tolérance de l'idebenone ainsi qu'une augmentation du pic systolique du ventricule gauche. L'idebenone améliore également la fonction respiratoire des patients traités avec un effet sur le pic du flux expiratoire (Buyse *et al.*, 2011).

Enfin, un inhibiteur de phosphodiesterase PDE5A, le tadalafil, diminue l'ischémie et rétablit un flux sanguin normal dans les muscles de patients BMD et DMD en activant la voie de signalisation NO-cGMP de façon dose dépendante (Martin *et al.*, 2012; Nelson *et al.*, 2014). Le tadalafil agit également sur d'autres voies métaboliques comme celles des lipides en augmentant le métabolisme associé, la surexpression de PGC-1 α , l'augmentation de la synthèse protéique et la ré-organisation de l'actine (De Arcangelis *et al.*, 2016). L'essai clinique de phase III du tadalafil chez des patients DMD a été arrêté en juin 2016 en raison d'absence d'efficacité du traitement mais aucun résultat n'est pour l'heure communiqué (Eli Lilly & Co, 2016).

Enfin, l'administration combinée de L-arginine, un précurseur naturel du NO et de la metformine, un activateur pharmacologique de l'enzyme nNOS, chez des patients ambulatoires DMD s'accompagne d'une amélioration clinique associée au niveau du muscle à une réduction du stress oxydatif lié à la présence de ROS (Hafner *et al.*, 2016).

iii. Augmentation de la masse musculaire

L'atrophie musculaire causée par la DMD est liée à l'activation de cascades de signalisation intracellulaire, et notamment l'activation de NF- κ B par la production de TNF- α qui provoquerait l'expression d'effecteurs impliqués dans l'atrophie (Sishi and Engelbrecht, 2011) (Figure 14). Pour contrebalancer cette perte musculaire sévère, différentes équipes ont développé des approches destinées à stimuler l'hypertrophie, c'est-à-dire l'augmentation de la masse musculaire liée à l'augmentation de la taille des fibres et non pas de leur nombre. L'IGF-1 a notamment été impliqué dans ce phénomène, via l'inhibition de médiateurs de l'atrophie que sont les ubiquitines-ligases MuRF1 et MAFbx (ou Atrogin-1) (Glass, 2005).

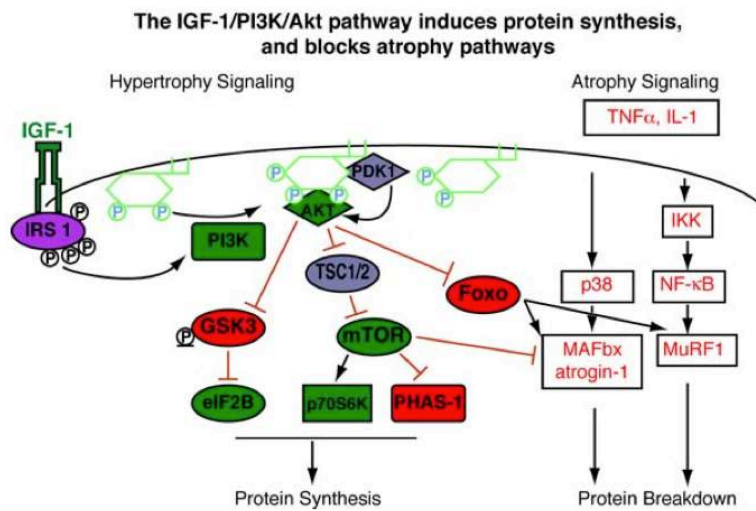


Figure 14. Inhibition des voies de signalisation de l'atrophie par activation de l'hypertrophie (Glass, 2005).

Sur la partie gauche est représentée la voie de signalisation hypertrophique de l'IGF-1. Les molécules ayant un impact négatif sur l'hypertrophie sont colorées en rouge tandis que celles induisant une activation de l'hypertrophie sont colorées en vert. Sur la partie droite est représentée la voie de signalisation de l'atrophie. Différentes perturbations

peuvent induire l'atrophie et activer NF- κ B qui entraîne une activation de l'ubiquitine-ligase E3 MuRF1. Une seconde ligase, MAFbx est également surexprimée suite à son activation par p38. L'activation d'Akt inhibe la surexpression de MAFbx et de MuRF1 via l'inhibition de FOXO et également via mTOR.

L'IGF-1 promeut la régénération en stimulant la prolifération et la différenciation des cellules progénitrices musculaires. Il favorise également la synthèse protéique tandis qu'il inhibe la dégradation des protéines en bloquant la transcription d'ubiquitine-ligases. Les souris *mdx* exprimant un transgène IGF-1 (*mdx/mIGF^{+/+}*) ont une masse musculaire augmentée, une force musculaire améliorée ainsi qu'une diminution de la fibrose, notamment au niveau du diaphragme. De plus, ces souris *mdx/mIGF^{+/+}* ont moins de susceptibilité aux dommages contractiles et une réduction de la nécrose musculaire (Barton *et al.*, 2002; Wagner, 2008). Le traitement post-natal de souris *mdx* par injection sous-cutanée d'IGF-1 provoque l'augmentation de la force musculaire et de la résistance à la fatigue dans le diaphragme (Gregorevic *et al.*, 2002; Wagner, 2008). De l'IGF-1 recombinant humain associé à l'IGF-1 binding protein 3 est actuellement en cours d'essai clinique de phase II chez des patients atteints de dystrophie myotonique (Wagner, 2008).

La myostatine est un membre de la famille du TGF- β et un régulateur négatif endogène de la croissance musculaire. La perte de fonction de la myostatine entraîne une hypertrophie massive. Les souris *mdx* déficientes en myostatine ont une masse musculaire augmentée, une force musculaire plus importante et une amélioration histologique de leur tissu musculaire avec notamment une diminution de la fibrose

(Bogdanovich *et al.*, 2002). Dans les modèles de lésions aiguës, la régénération musculaire est plus rapide et robuste en absence de myostatine. La levée de la répression de la quiescence des précurseurs musculaires est un mécanisme d'action possible. Il a notamment été démontré *in vitro* que l'inhibition de la myostatine par saut d'exon induisait une surexpression des facteurs de régulation myogénique (MRF) Myf5 et myogénine dans des cultures primaires de myoblastes humains (Kemaladewi *et al.*, 2011). La modulation directe de la prolifération des fibroblastes par la myostatine contribuerait également aux effets observés sur la fibrose (Wagner, 2008). Certains inhibiteurs de la myostatine, notamment la follistatine ont été testés avec succès sur des modèles animaux. Cependant, la follistatine agit également sur d'autres voies, en inhibant par exemple l'activine, avec un impact global sur différents tissus. Des souris transgéniques, exprimant le FS I-I, un dérivé de la follistatine, sous contrôle d'un promoteur muscle-spécifique, présentent une augmentation de la masse et de la force musculaire. Une hyperplasie ainsi qu'une hypertrophie sont également observées. Lorsqu'on croise ces souris FS I-I avec des souris *mdx*, les descendants présentent des muscles squelettiques plus gros et une diminution de l'infiltration cellulaire. La force musculaire de ces souris est également augmentée (Nakatani *et al.*, 2008). Il a été démontré que l'utilisation d'inhibiteurs des déacétylases induit l'expression de la follistatine chez les souris *mdx* et une meilleure résistance des muscles aux cycles contraction-relaxation (Minetti *et al.*, 2006). Un essai clinique de phase I/II mené chez des patients DMD, BMD et LGMD a permis de démontrer la bonne tolérance du MYO-029 ainsi que du ACE-031, deux anticorps neutralisant la myostatine (Wagner *et al.*, 2008; Campbell *et al.*, 2016). Des approches combinées chez des souris *mdx*, associant la thérapie génique pour restaurer la dystrophine et l'inhibition de la myostatine par une stratégie d'ARN interférants ont conduit à une augmentation importante de la force tétanique (Dumonceaux *et al.*, 2010; Malerba *et al.*, 2012; Rodino-Klapac *et al.*, 2013). Le TGF- β 1, un autre membre de la famille du TGF- β , inhibe également la prolifération et la différenciation des précurseurs myogéniques et stimule la fibrose (Massagué *et al.*, 1986). *In vitro*, il présente une action plus importante sur les myoblastes et fibroblastes que les molécules précédemment citées. Au contraire de la myostatine, le TGF- β 1 est surexprimé dans les phases précoces de la DMD (Wagner, 2008). Des résultats ont été apportés concernant l'efficacité d'un inhibiteur du récepteur à l'angiotensine-II de type 1, le losartan, dans des souris *mdx* (Bish *et al.*, 2011). Le losartan réduit l'expression du

TGF- β dans le cœur et le rein, réduit l'hétérogénéité de taille des fibres musculaires, diminue la fibrose et augmente la force musculaire (Cohn *et al.*, 2007). De nombreux patients DMD âgés sont sous losartan afin de prévenir les atteintes cardiaques (Wagner, 2008). L'halofuginone, un inhibiteur de la synthèse du collagène, agirait en inhibant la voie du TGF- β et ainsi inhibe la fibrose et améliore la fonction cardiaque des souris *mdx* (Turgeman *et al.*, 2008).

Enfin, l'activine A, un autre membre de la famille du TGF- β , possède un effet pléiotropique sur la fibrose et l'inflammation. L'introduction de l'activine A dans un muscle normal augmente l'inflammation et l'atrophie. La neutralisation de l'activine A par un anticorps monoclonal spécifique dans des muscles préalablement lésés à la cardiotoxine, augmente la dégradation du tissu ainsi que le nombre de cellules Pax7/MyoD1 positives ce qui indiquerait une activation des précurseurs musculaires et induit un recouvrement rapide des propriétés contractiles du muscle avec une restauration de la force maximale. L'inhibition de l'activine A dans le cadre de lésions musculaires aiguës accélérerait le nettoyage du tissu lésé et ainsi sa réparation (Yaden *et al.*, 2014).

iv. Surexpression d'utrophine

L'utrophine, comme indiqué plus haut, est une protéine paralogue à la dystrophine et transcrite de façon ubiquitaire. Cette protéine du DGC est retrouvée chez les patients DMD à des taux élevés (Khurana and Davies, 2003; Mizuno *et al.*, 1993) et il a été démontré une corrélation directe entre la quantité d'utrophine présente dans le tissu musculaire de patients DMD et l'âge de perte totale de la marche (Kleopa *et al.*, 2006). La principale différence entre l'utrophine et la dystrophine est la répartition de leur expression dans l'organisme. La dystrophine est exprimée tout le long du sarcolemme tandis que l'utrophine est confinée à la jonction myotendineuse et neuromusculaire (Miura and Jasmin, 2006). Il existe deux isoformes de l'utrophine, l'isoforme A retrouvé dans le muscle squelettique et l'isoforme B exprimé dans l'endothélium vasculaire.

L'héreguline, un facteur de croissance neuronal, a montré des capacités à stimuler la transcription de l'utrophine par l'activation des facteurs de transcription GABP α et β . L'administration d'héreguline chez la souris *mdx* augmente l'expression d'utrophine et améliore le phénotype dystrophique. Des souris âgées de 4 semaines et traitées pendant 3 mois présentent des niveaux d'utrophine trois fois supérieurs aux souris *mdx* non

traitées avec une expression sur toute la longueur du sarcolemme ce qui est d'autant plus intéressant qu'il a été montré qu'une augmentation de deux à trois fois du niveau d'utrophine présent dans la souris *mdx* était suffisante pour améliorer le phénotype dystrophique (Miura and Jasmin, 2006). L'augmentation de l'expression d'utrophine s'accompagne d'une réduction de la dégénérescence musculaire et de l'inflammation ainsi que d'une diminution à la sensibilité aux dommages induits par la contraction (Miura and Jasmin, 2006).

La voie de signalisation calcineurine-NFAT a été décrite comme ayant un rôle dans le contrôle de l'expression de l'utrophine. L'introduction d'un transgène contenant une forme activée de la calcineurine dans les muscles de souris *mdx* provoque une augmentation de l'expression d'utrophine ainsi qu'une amélioration du phénotype dystrophique, notamment une réduction des dommages des fibres musculaires, de la variabilité de taille des fibres ainsi que de la centronucléation. Ces souris présentent également une diminution de l'inflammation et une restauration de l'intégrité du sarcolemme (Miura and Jasmin, 2006). Il est important de noter que l'activation de la voie calcineurine-NFAT peut causer des effets secondaires importants. Il est notamment démontré que l'hypertrophie cardiaque est induite par cette voie de signalisation (Miura and Jasmin, 2006).

L'administration de L-arginine, un substrat de l'enzyme nNOS augmente l'expression de l'utrophine chez la souris *mdx*. Le niveau de NO semble réguler l'expression de l'utrophine dans les fibres musculaires dystrophiques et ainsi améliorer le phénotype. Les souris *mdx* traitées à la L-arginine présentent une réduction de la nécrose musculaire et des dommages induits par la contraction. De la même façon, le traitement au molsidomine, un donneur de NO, produit des effets bénéfiques similaires (Miura and Jasmin, 2006).

Le SMTC1100, une molécule agissant sur le promoteur de l'utrophine A et provoquant une surexpression d'utrophine, administrée oralement à des souris *mdx* induit un remaniement tissulaire bénéfique ainsi qu'une augmentation de la force musculaire et de la résistance à l'exercice des souris traitées (Tinsley *et al.*, 2011). Cette molécule a tout récemment fait l'objet d'un essai clinique de phase I sur 12 patients DMD. Une bonne tolérance et une absence d'effet secondaire majeur ont été rapportées (Ricotti *et al.*, 2016). Une nouvelle génération de cette molécule, le SMT022357, produit des effets

similaires avec notamment une surexpression d'utrophine dans le diaphragme et dans le cœur de souris *mdx* (Guiraud *et al.*, 2015).

Il a été démontré que l'activation de la voie de signalisation liée à p38 causait une augmentation de l'expression de l'utrophine A à l'échelle du transcrit comme de la protéine. L'héparine, molécule anti-coagulante, est capable d'activer la voie des protéines kinases liées à p38. Administrée à des souris *mdx*, elle a provoqué une augmentation significative de l'expression d'utrophine A dans le diaphragme et le *Tibialis anterior* des souris traitées ainsi qu'une meilleure intégrité du sarcolemme. Le traitement à l'héparine combiné à l'administration de 5-amino-4-imidazolecarboxamide riboside (AICAR), enzyme ciblant la protéine kinase activée par le 5' adénosine monophosphate et ainsi stimulant l'expression d'utrophine, conduit à un effet additif de ces deux molécules (Péladeau *et al.*, 2016).

v. Translecture du codon stop

Quinze pourcent des patients DMD portant une mutation ponctuelle présentent un codon stop prématuré. Un moyen thérapeutique envisagé consiste à forcer la cellule à ignorer ce codon stop afin que la transcription et la traduction se fassent correctement (Aartsma-Rus *et al.*, 2010; Pichavant *et al.*, 2011).

Historiquement, les antibiotiques de la classe des aminoglycosides ont été les premiers décrits comme provoquant une translecture du codon stop. La gentamicine notamment a démontré son efficacité *in vitro* sur cellules en culture mais également *in vivo*, que ce soit sur des modèles de souris ou des patients (Barton-Davis *et al.*, 1999). La gentamicine interagit directement avec la machinerie traductionnelle via la sous-unité 40S du ribosome lorsque ce dernier reconnaît un codon stop. Cette interaction induit l'introduction d'un acide aminé dans l'ARNm et ainsi autorise la poursuite de la traduction. Cela se produit particulièrement avec des codons stop prématurés car la séquence des nucléotides entourant une mutation non sens et celle encadrant un codon stop naturel sont différentes (Pichavant *et al.*, 2011). La qualité de la translecture du codon stop est également déterminée par la nature du codon stop (TGA, TAA ou TAG) (Aartsma-Rus *et al.*, 2010). Chez la souris *mdx* traitée à la gentamicine, on observe une expression d'environ 20% de fibres dystrophine positives. Suite à ce résultat préclinique prometteur, deux essais cliniques ont été conduits sur des patients DMD et BMD. Cependant, les résultats ont été relativement modestes avec aucune détection de

dystrophine post-administration (Wagner *et al.*, 2001; Pichavant *et al.*, 2011). Un autre essai rapporte qu'un traitement de 6 mois à la gentamicine résulte en une restauration des niveaux de dystrophine de l'ordre de 13 à 15% chez 3 des 16 patients DMD traités (Malik *et al.*, 2010). Ces résultats différents entre la souris et l'homme peuvent être liés à la présence d'isomères de la gentamicine, qui ne possèdent pas une efficacité similaire. Les lots de gentamicine correspondant à un mélange de différents isomères, certains d'entre eux peuvent présenter une efficacité moindre (Howard *et al.*, 2004; Pichavant *et al.*, 2011). De façon majeure, il a été démontré qu'un traitement chronique à la gentamicine peut conduire à une toxicité rénale et de l'oreille interne (Aartsma-Rus *et al.*, 2010; Pichavant *et al.*, 2011). Les effets variables ainsi que la toxicité potentielle de la gentamicine limitent grandement ses applications cliniques.

Récemment, un autre membre de la famille des antibiotiques aminoglycoside a été proposé comme alternative à la gentamicine, la négamycine. Cette dernière restaure également la dystrophine dans le muscle cardiaque et squelettique de souris *mdx* et est par ailleurs beaucoup moins toxique que la gentamicine (Arakawa *et al.*, 2003; Taguchi *et al.*, 2012; Hamada *et al.*, 2015).

Afin de diminuer les effets secondaires majeures de la gentamicine, un nouveau produit a été développé par PTC Therapeutics, le PTC124 appelé également Ataluren®. Il est présumé fonctionner de façon similaire à la gentamicine, à ceci près qu'il se lie à la sous-unité 60S du ribosome (Welch *et al.*, 2007; Pichavant *et al.*, 2011). L'Ataluren a été identifié sur sa capacité à augmenter la translecture du codon stop UGA (Wilton, 2007). Des études précliniques ont montré une restauration de la dystrophine sur des cellules en culture et chez la souris *mdx* avec 20% à 25% de fibres dystrophine positives chez cette dernière (Welch *et al.*, 2007; Wilton, 2007; Pichavant *et al.*, 2011). La bonne tolérance au produit a été démontrée dans le premier essai clinique de phase I suivi par trois essais de phase II sur des patients DMD. Dans l'essai de phase IIa qui s'est déroulé sur une période de 4 semaines, aucun effet sur la fonction musculaire n'a été testé mais il a été montré une augmentation de l'expression de dystrophine de 11% après 28 jours de traitement (Finkel *et al.*, 2013). Un essai clinique de phase IIb sur une durée plus longue de 48 semaines a été mis en place avec un groupe traité à haute dose de PTC124 et un groupe à faible dose. Aucune différence n'a pu être mise en évidence entre les deux groupes et le groupe placebo en ce qui concerne la fonction musculaire, évaluée grâce au test de 6 minutes de marche. Une des hypothèses avancées est que le niveau de

dystrophine n'est pas suffisant pour induire une différence significative dans la fonction musculaire (Aartsma-Rus *et al.*, 2010). L'étude de confirmation a été réalisée sur 110 patients DMD en évaluant leur réponse au test de 6 minutes de marche. Il a été rapporté une plus grande distance parcourue dans le groupe sous ataluren, qui ne devient significative que si l'on considère le sous-groupe capable de parcourir entre 300 et 400 m (Péréon, 2016, communication personnelle). Enfin, il est important de noter que seul 10% des patients DMD possèdent des mutations non sens et seraient donc éligibles pour pareil traitement (Wilton, 2007). En février 2016, la Food and Drug Administration a refusé l'autorisation de mise sur le marché de l'Ataluren (PTC Therapeutics, 2016). Récemment, un nouveau composé nommé RTC13 a été testé pour induire une translecture du codon stop avec une moindre toxicité que la gentamicine (Aartsma-Rus *et al.*, 2010). Administré en intramusculaire à des souris *mdx*, il ne présente pas d'activité majeure *in vivo*. En revanche, administré par voie générale, il permet une restauration de la dystrophine, une augmentation de la force musculaire ainsi qu'une diminution du taux de CK sérique (Kayali *et al.*, 2012).

b. Traitements par thérapie génique

La thérapie génique repose sur la modification du patrimoine génétique des patients dans le but de restaurer l'expression de dystrophine.

i. Saut d'exon

Le saut d'exon consiste à utiliser des molécules antisens qui vont interférer avec les signaux d'épissage, permettant un saut des exons mutés et ainsi conduire à une restauration du cadre de lecture (Figure 15). La dystrophine sera produite de façon tronquée mais fonctionnelle, conduisant à une évolution du phénotype DMD vers un phénotype BMD. Théoriquement, cette technique de simple et de double saut d'exon permettrait de cibler 83% des patients DMD (Aartsma-Rus *et al.*, 2009). Cependant, si on considère le saut de l'exon 51, mutation la plus courante chez les patients DMD, cette méthode ne touchera que 10% des patients (Aoki *et al.*, 2013).

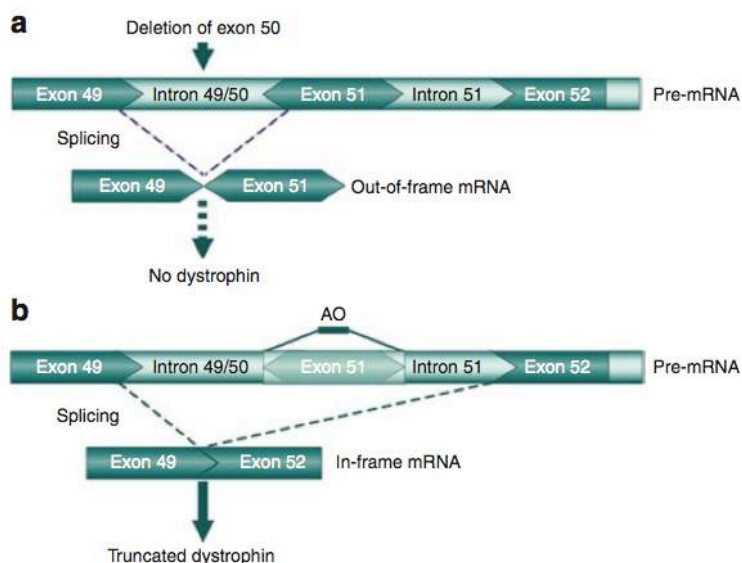


Figure 15. Principe du saut d'exon dans la DMD (Pichavant *et al.*, 2011). (a) L'absence de l'exon 50 dans le gène de la dystrophine aboutit à un décalage du cadre de lecture dans l'ARNm créant un codon stop prématuré dans l'exon 51 et un arrêt de la traduction. (b) En utilisant un oligonucléotide antisens (AO) ciblant l'exon 51, ce dernier sera sauté durant l'épissage. Ceci restaure le cadre de lecture du transcrit et permet la synthèse d'une protéine dystrophine tronquée mais fonctionnelle.

Les molécules utilisées sont de petits ARN ou ADN synthétiques modifiés appelés oligonucléotides antisens (AO) capables de se lier de façon spécifique à des sites exoniques ou introniques du pré-ARNm. On distingue deux types d'AO : 2'-O-methyl-phosphorothioate (2OMP) et phosphorodiamidate morpholino oligomer (PMO).

2'-O-methyl-phosphorothioate (2OMP)

Le 2OMP contient environ 20 nucléotides et est obtenu en modifiant la synthèse classique d'oligonucléotides, de sorte de les rendre plus résistants aux nucléases, d'augmenter leur affinité pour l'ARN, d'améliorer leurs propriétés pharmacocinétiques et de prévenir un clivage de l'hybride ARN:ARN par la RNase H (Pichavant *et al.*, 2011). Différents 2OMPs ont été testés avec succès dans des myotubes de patients DMD. En parallèle, des 2OMPs ciblant l'exon 23 ont été testés chez la souris *mdx*. L'administration IM et systémique chez ce modèle conduit à une restauration de la dystrophine dans les muscles (Bremmer-Bout *et al.*, 2004; Heemskerk *et al.*, 2010), tandis qu'un faible niveau d'expression dans le cœur est retrouvé après injection systémique. L'injection répétée de 2OMP conduit à une meilleure efficacité du produit sans augmenter sa toxicité. Les administrations sous-cutanées quant à elles, semblent conduire à une meilleure pharmacocinétique que les deux autres types d'injections (Heemskerk *et al.*, 2010; Pichavant *et al.*, 2011). Une équipe a développé le 2'-F phosphorothioate (2FPS) à partir d'un 2OMP. Si l'efficacité du 2FPS est plus importante dans les cellules humaines *in vitro*, elle est nulle après administration dans le modèle *mdx* avec en plus une augmentation de la taille de la rate ainsi qu'une perte de poids des souris traitées (Jirka *et al.*, 2015).

Après ces résultats prometteurs, un essai clinique sur 4 patients DMD a été lancé avec le produit PRO051/GSK2402968, composé de deux 20MPs ciblant l'exon 51. Les muscles injectés présentent 64 à 97% de fibres dystrophine positives. Aucun effet secondaire n'a été observé (van Deutekom *et al.*, 2007). L'essai clinique de phase I/IIa a permis de démontrer l'efficacité de l'administration sous-cutanée chez 12 patients DMD avec une expression de dystrophine dans 60 à 100% des fibres musculaires. Après 12 semaines de traitement, il a été rapporté une augmentation de 35 mètres parcourus durant le test de 6 minutes de marche chez les patients traités (Goemans *et al.*, 2011). Un essai clinique de phase II, dans lequel le même AO, appelé Drisapersen, a été administré par voie sous-cutanée, a montré une bonne tolérance chez les patients et une ré-expression de la dystrophine de façon dose dépendante. A 25 semaines de traitement, le test de 6 minutes de marche a montré une différence significative entre les groupes de patients traités et non traités avec 31,5 m de plus de parcouru par les patients sous Drisapersen. Cependant, cette différence n'est plus significative à 49 semaines (Kole and Krieg, 2015). Un essai clinique de phase III a été mené sur 186 patients DMD soumis à une dose de 6 mg/kg/semaine pendant 48 semaines. Cette étude n'a montré aucune différence significative entre les groupes traités et placebo au test du 6 minutes de marche (Kole and Krieg, 2015). Un essai clinique réalisé au long terme sur 12 patients DMD traités avec 6mg/kg/semaine a mis en évidence une amélioration des résultats obtenus au test de 6 minutes de marche avec 64 mètres de plus parcourus par les 8 patients encore ambulants après plus de 3 ans de traitement (Goemans *et al.*, 2016). Une étude récente a évalué l'effet de la dose de drisapersen sur des patients DMD non ambulatoires avec des doses comprises entre 3 et 12 mg/kg. A 3 et 6 mg/kg, des doses simples de drisapersen n'induisent pas de problème de sécurité ou de tolérance par les patients. Cependant, à 9 mg/kg, une augmentation de l'inflammation est observée (Flanigan *et al.*, 2014). Tout récemment, la FDA a refusé l'autorisation de mise sur le marché du Drisapersen (Anderson, 2016). Une nouvelle classe d'AONs composés de tricyclo-ADN a également été décrite récemment, les tcDNA-AONs. Administrés en systémique chez la souris *mdx*, ils permettent une forte restauration de dystrophine dans les muscles squelettiques, le cœur et plus modestement dans le cerveau. Un impact fonctionnel sur la sphère cardio-respiratoire est également démontré (Goyenvalle *et al.*, 2015).

Phosphorodiamidate morpholino oligomer (PMO)

Les PMOs, également appelés morpholinos, sont également obtenus en modifiant la synthèse des oligonucléotides. Leur ribose est remplacé par un anneau morpholine et l'oxygène présent dans la liaison phosphodiester est remplacé par un atome de nitrogène. Ces modifications permettent au PMO d'être biologiquement stable et d'avoir des propriétés antisens. L'exon 23 de la souris *mdx* a été la première cible testée avec ce type de produit. Une restauration de la dystrophine est observée dans les muscles traités après administration par voie intramusculaire de morpholinos et dans des nombreux muscles après administration systémique ou intrapéritonéale (Fletcher *et al.*, 2006). Une restauration partielle de la dystrophine dans le cœur de souris *mdx* est également montrée mais les doses utilisées sont 50 fois supérieures à celles choisies pour traiter le muscle squelettique. Des études long terme sur un an ont montré que l'injection systémique répétée de morpholinos à des doses de 5 à 50 mg/kg chez la souris *mdx* s'accompagnait d'une amélioration significative de la pathologie et d'une normalisation de la locomotion sans aucun signe de toxicité rénale ou hépatique (Malerba *et al.*, 2011). Un morpholino administré en IV chez le chien GRMD a permis une expression de dystrophine dans 25% des fibres musculaires avec une amélioration globale de la fonction musculaire. Aucun signe de toxicité n'a été rapporté (Yokota *et al.*, 2009; Pichavant *et al.*, 2011).

Pour améliorer l'entrée des PMO dans les cellules, ils peuvent être conjugués à des peptides ou d'autres composés. L'injection locale et systémique chez la souris *mdx* d'une solution de PMO diluée dans du fructose permet une expression de dystrophine 4,25 fois supérieure à celle observée après l'injection de PMO seul (Cao *et al.*, 2016).

L'administration d'un morpholino conjugué à une octaguanidine dendrimérique (Vivo-Morpholino) est efficace pour restaurer la dystrophine dans les muscles de souris *mdx* ou de chiens dystrophiques. Des injections répétées conduisent à une expression de dystrophine de 100% dans les fibres musculaires dans de nombreux muscles squelettiques sans détection particulière de réponse immune (Yokota *et al.*, 2012). La restauration de la dystrophine dans le cœur atteint 30% (Jearawiriyapaisarn *et al.*, 2008). Les PMOs conjugués avec des peptides riches en arginine, appelés pPMOs, provoquent une excellente restauration de la dystrophine chez la souris *mdx* ainsi que chez la double mutante utrophine^{-/-} *mdx*, avec chez cette dernière une diminution de la faiblesse musculaire, une amélioration histopathologique et une espérance de vie passant de 15 semaines à un an (Pichavant *et al.*, 2011). Un heptapeptide ciblant le

muscle (MSP) fusionné avec un peptide riche en arginine (B-peptide) et conjugué à un PMO, appelé B-MSP-PMO, a montré une efficacité en restaurant la dystrophine dans les muscles de souris *mdx*. Administré deux fois par semaine en IV à 6 mg/kg pendant douze semaines, il conduit à une expression de dystrophine de 100% dans différents muscles à l'exception notable du cœur. Si ces pPMO sont bien tolérés chez la souris *mdx* ils provoquent cependant une dégénérescence tubulaire du rein après administration une fois par semaine chez le primate non humain à une dose de 9 mg/kg pendant 4 semaines (Pichavant *et al.*, 2011).

Le morpholino, AVI-4658 ou Eteplirsén, a été administré par voie IM chez 7 patients DMD présentant une mutation dans l'exon 51. Deux patients ont été traités avec la faible dose, correspondant à 0,09 mg, et 5 avec la forte dose, 0,9 mg. Seuls les patients ayant reçu la forte dose produisent de la dystrophine alors que le phénomène de saut d'exon est observé par RT-PCR chez tous les patients. Chez les patients traités à haute dose, les muscles injectés présentent de 44 à 79% de fibres exprimant la dystrophine. Aucun signe de toxicité n'a été montré (Kinali *et al.*, 2009). Un essai de phase IIb réalisé sur 19 patients DMD traités par voie IV a montré une augmentation de l'expression de dystrophine mais une absence d'amélioration au test de 6 minutes de marche (Kole and Krieg, 2015) tandis qu'une étude long terme a mis en évidence une stabilisation de la capacité ambulatoire après 36 mois de traitement (Mendell *et al.*, 2016).

Une approche combinée, utilisant un cocktail d'oligonucléotides composés de PMO et de 2OMP réalisée chez le chien CXMD_J a révélé une restauration de l'expression de la dystrophine après administration locale et systémique (Miskew Nichols *et al.*, 2016).

ii. Expression de mini- et micro-dystrophine

Le gène dystrophine ayant une taille particulièrement importante, il n'est pas possible de transférer la totalité de la séquence codante. De fait, le transfert de portions du gène, appelé mini-dystrophine (mDYS) ou micro-dystrophine (μ Dys) est envisagé en utilisant des vecteurs viraux ou en employant l'ADN nu (Harper *et al.*, 2002; Pichavant *et al.*, 2011)

Adéno-associated virus ou AAV

Les adéno-associated virus-1 et 2 (AAV-1, 2) portant une μ Dys injectés en IM chez la souris *mdx* ont permis une expression de dystrophine dans 80% des fibres et conduit à une restauration du DGC ainsi qu'une diminution des atteintes histologiques (Fabb *et al.*,

2002; Harper *et al.*, 2002). L'administration systémique d'un AAV6 mDYS réalisée chez la souris *mdx* et la double mutante *utrn^{-/-} mdx* a aussi conduit à une expression diffuse et importante de la protéine exogène, une amélioration de la fonction du muscle squelettique ainsi qu'une augmentation de l'espérance de vie (Gregorevic *et al.*, 2004, 2006). L'utilisation des vecteurs AAV a également été testée sur des modèles gros animaux. Les AAV6 et 8 ont été administrés chez le chien GRMD mais ont généré une réponse immune contre la capsid. L'injection IM d'AAV2/8 mDys canine sous contrôle d'un promoteur muscle-spécifique conduit à une forte expression de dystrophine chez le chien CXMDj pendant 8 semaines sans aucune réponse immunitaire détectée. D'autre part, les muscles sont protégés des dommages liés à la contraction et on observe une diminution de la perméabilité des fibres et de la centronucléation (Koo *et al.*, 2011). L'injection IV d'un AAV9 mDys humaine à une concentration de $1,5 \cdot 10^{14}$ vecteur/kg chez 4 chiens GRMD a conduit à une expression de dystrophine de 15 à 100% des fibres musculaires. Cependant, une forte inflammation a été observée dans différents muscles pelviens, pouvant être liée à l'utilisation d'un promoteur CMV ubiquitaire, induisant une expression beaucoup trop importante d'une protéine xénogénique (Kornegay *et al.*, 2010). Une autre équipe a injecté en IM un AAV9 à une dose plus faible, $2,6 \cdot 10^{13}$ vecteur/muscle. Une expression robuste de dystrophine a été observée malgré une infiltration de cellules T. Les muscles traités présentaient également moins d'inflammation, de fibrose ou de calcification. Le traitement préserve par ailleurs la force musculaire (Shin *et al.*, 2013).

Il a également été rapporté une efficacité de la combinaison des techniques de saut d'exon précédemment décrites et de transfert de gène par AAV. L'AAV1 codant le petit ARN nucléaire U7 ou U1 administré chez la souris *mdx* conduit à une expression de dystrophine trois mois à un an après les injections (Pichavant *et al.*, 2011). L'administration IM d'un AAV2 portant la séquence d'un snRNA modifié U7 chez la souris *mdx* conduit à une expression de dystrophine, une restauration du DGC ainsi qu'une meilleure sensibilité des muscles traités à l'exercice (Goyenvalle *et al.*, 2004, 2009). L'efficacité de cette technique a également été démontrée chez le chien GRMD en utilisant un AAV1-U7 (Vulin *et al.*, 2012) ou un AAV8-U7 (Le Guiner *et al.*, 2014) en injection IM et/ou perfusion de membre avec l'observation d'une restauration de dystrophine, une correction partielle de la force musculaire ainsi qu'une amélioration de l'architecture musculaire.

Lentivirus

Injecté en IM chez la souris *mdx*, le lentivirus, virus à ARN simple brin enveloppé dont la capacité d'encapsulation est limitée à la taille de la mDYS, induit une expression de dystrophine dans 65% des fibres, conduisant à une augmentation de la force musculaire et à la protection contre les dommages induits par les cycles de contraction (Meregalli *et al.*, 2008). Le lentivirus est également capable de transduire les cellules satellites, car, à la différence de l'AAV, il peut pénétrer dans le noyau des cellules quiescentes (Kobinger *et al.*, 2003; Kimura *et al.*, 2010). Malgré des résultats intéressants sur les modèles petits animaux, aucune étude n'est disponible sur des modèles gros animaux. De plus, l'intégration aléatoire des vecteurs lentiviraux prédispose à la genèse de tumeurs (Pichavant *et al.*, 2011).

iii. Utilisation des méganucléases, zinc finger nucléases et CRISPR

Une alternative aux oligonucléotides pour restaurer le cadre de lecture de la dystrophine consiste à utiliser des enzymes qui vont créer une cassure du double brin d'ADN à la fin d'un exon qui précède une délétion ou au début d'un exon qui suit la délétion. Cette cassure peut être induite par des méganucléases, des zinc finger nucléases (ZFN), des TALENs ou encore des CRISPR.

Les méganucléases sont des endonucléases séquence-spécifique qui reconnaissent un site unique long (412 pb) dans les cellules vivantes. Elles peuvent induire des recombinaisons homologues. Elles ont été testées sur des myoblastes immortalisés et permettent ainsi l'expression de dystrophine (Chapdelaine *et al.*, 2010; Popplewell *et al.*, 2013; Rousseau *et al.*, 2011). Testés sur des myoblastes de patients DMD, les ZFN ont conduit à une délétion de l'exon 51 (Rousseau *et al.*, 2011). Ces myoblastes transplantés chez la souris immunodéficiente ont été capables de produire une dystrophine humaine localisée à la membrane sarcolemmale (Ousterout *et al.*, 2015).

Les nucléases effectrices activant la transcription ou TALENs présentent une plus grande flexibilité que les méganucléases. L'efficacité de cet enzyme a été testée sur des iPSCs humaines pour réaliser des knock-in de gènes rapporteurs, du knock-out et de la correction génique (Hockemeyer *et al.*, 2012; Ding *et al.*, 2013). Des myoblastes immortalisés ont également été utilisés pour restaurer la dystrophine grâce à cette technologie (Ousterout *et al.*, 2013). Ces enzymes présentent un effet off-target limité (Li *et al.*, 2015).

Les petites répétitions palindromiques en cluster régulièrement espacés ou CRISPR ainsi que le système endonucléase 9 associé au CRISPR (Cas9) sont également davantage flexible que les méganucléases. Testés *in vivo* chez la souris *mdx*, les CRISPR/Cas9 sont capables de restaurer la dystrophine dans les myofibres, les cardiomyocytes et les cellules souches musculaires, de restaurer également le DGC, de normaliser les flux calciques et d'augmenter la force musculaire des souris traités (Xu *et al.*, 2016; Tabebordbar *et al.*, 2016; Nelson *et al.*, 2016). Ces enzymes présentent un effet off-target limité (Li *et al.*, 2015).



Les résultats relativement décevants des essais utilisant le PTC124 ou la mini-dystrophine limitent grandement le développement de ces deux stratégies tandis que le saut d'exon apparaît aujourd'hui comme la technique la plus prometteuse de celles décrites ci-dessus. Cependant, son efficacité reste encore à établir de façon poussée. En revanche, les traitements pharmacologiques ont permis une amélioration de la qualité de vie ainsi que de l'espérance de vie des patients, sans toutefois apporter de solutions curatives. Il apparaît que l'impact de l'utilisation d'une seule stratégie thérapeutique semble limité ce qui conforte l'idée de combinaisons de traitements pharmacologiques, de thérapie génique et/ou cellulaire afin de prétendre à une meilleure efficacité.

Chapitre 3. Candidats cellulaires à la mise en place d'une thérapie pour les dystrophies musculaires

I. Caractéristiques générales attendues pour un candidat cellulaire

La thérapie cellulaire consiste à administrer au patient des cellules saines ou malades préalablement corrigées *ex vivo*, afin de pallier à l'anomalie génétique. Dans le but d'obtenir une efficacité thérapeutique intéressante dans le cadre de la DMD, un certain nombre de critères ont été définis auxquels le candidat cellulaire doit répondre (Meng et al., 2011a).

Il doit tout d'abord être facilement isolable et cultivable *in vitro* sans perdre ses propriétés. En effet, la quantité en général limitée de cellules souches présente dans l'organisme rend nécessaire des étapes d'amplification *in vitro* afin d'obtenir suffisamment de cellules à injecter au patient. La pathologie touchant la totalité du tissu musculaire réparti sur l'ensemble du corps, l'agent doit également être administrable de façon systémique si on considère un traitement corps entier. Cela sous-entend que l'agent est capable de survivre dans la circulation sanguine, de rejoindre le tissu cible et de s'y intégrer. Ainsi, le candidat cellulaire doit disposer d'une capacité de migration *in vivo*, de survie au sein du tissu cible et de prolifération afin de se maintenir dans le tissu. La cellule candidate doit également présenter une capacité à régénérer le tissu lésé en se différenciant en cellules musculaire afin de remplacer les fibres endommagées et à reconstituer le stock de cellules satellites pour stabiliser le tissu sur le long terme (Meng et al., 2011a). Enfin, elle doit être immuno-privilegiée de sorte de présenter un taux de survie élevé et de limiter l'usage de traitements immunosuppresseurs connus comme possédant de nombreux effets indésirables. D'autre part, elle ne doit pas présenter d'anomalies cytogénétiques consécutivement au temps passé en culture, lesquelles peuvent conduire à une tumorigénicité (Meng et al., 2011a).

II. Définition et classification des cellules souches

1. Définition

Le terme de cellule souche désigne une cellule capable de se diviser pendant une période indéfinie. Sous l'influence de signaux appropriés, elle peut générer différents types cellulaires différenciés d'un organisme.

On distingue les cellules souches embryonnaires des cellules souches adultes. Les cellules souches embryonnaires ou cellules ES sont des cellules pluripotentes dérivées de la masse interne du blastocyste. Elles peuvent être amplifiées *in vitro* dans un état indifférencié en conservant leur potentiel pluripotent (Baharvand and Matthaei, 2003). Elles ne seront pas détaillées dans ce manuscrit. Plus récemment, des cellules souches ont été obtenues par reprogrammation de cellules adultes différenciées, les fibroblastes, pour donner des cellules appelées iPSC pour cellules souches pluripotentes induites (Takahashi and Yamanaka, 2006). Les cellules souches adultes, contrairement aux cellules souches embryonnaires, sont d'origine inconnue pour la plupart, quelque soit le tissu adulte à partir duquel elles sont isolées (Kirschstein and Skirboll, 2001). On les retrouve dans un large nombre de tissus et d'organes qui sont détaillés dans les paragraphes ci-dessous (Figure 16). Elles sont pour la plupart quiescentes dans l'organisme et ne s'activent que lorsque des signaux chimiques sont libérés, comme dans le cas d'une lésion tissulaire (Jankowski *et al.*, 2002a).

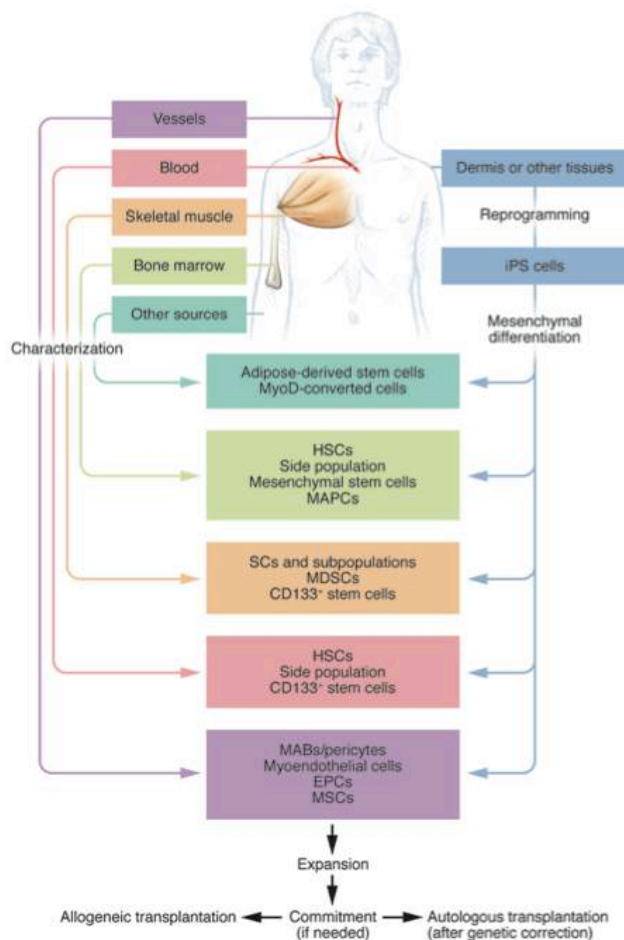


Figure 16. Origine des cellules souches adultes utilisées pour la régénération musculaire. (Tedesco *et al.*, 2010). La source des principales catégories de cellules souches adultes est indiquée ainsi que la reprogrammation éventuelle de cellules du derme en iPSC. Une fois obtenues, ces cellules peuvent être caractérisées, amplifiées, corrigées génétiquement et transplantées.

2. Classification des cellules souches

Les cellules souches sont définies par deux caractéristiques majeures qui sont la différenciation multi-lignée et l'auto-renouvellement.

Différenciation multi-lignée

La diversité des types cellulaires générés par une cellule qui définit son potentiel de différenciation permet de positionner celle-ci en cellule totipotente, pluripotente, multipotente, progénitrice ou finalement en précurseur (Figure 17).

Cellules totipotentes : il s'agit de la première cellule de l'organisme, le zygote. Ce dernier possède la capacité de se différencier en n'importe quel type cellulaire y compris les annexes embryonnaires responsables de la formation du placenta et ainsi de générer un organisme entier.

Cellules pluripotentes : à partir du stade 32 cellules, la masse interne du blastocyste est composée de cellules dites pluripotentes c'est-à-dire qu'elles peuvent donner les trois feuillets de l'embryon qui sont l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme, mais ne peuvent plus conduire à la formation d'un organisme entier car elles ont perdu la capacité de se différencier en cellules des annexes embryonnaires. Ces cellules sont caractérisées par l'expression de marqueurs spécifiques comme Nanog.

Cellules multipotentes : présentes dans les tissus adultes, elles peuvent générer plusieurs types cellulaires distincts mais sont engagées dans un programme tissulaire spécifique. Par exemple, les cellules souches hématopoïétiques vont donner les cellules du sang tandis que les cellules souches mésenchymateuses donneront les cellules cartilagineuses, adipeuses et musculaires.

Progéniteurs et précurseurs : les premiers ne peuvent donner que quelques types cellulaires différenciés d'un même tissu dont des cellules précurseurs qui, elles, ne peuvent donner qu'un type cellulaire et perdent la capacité d'auto-renouvellement (Jankowski *et al.*, 2002a).

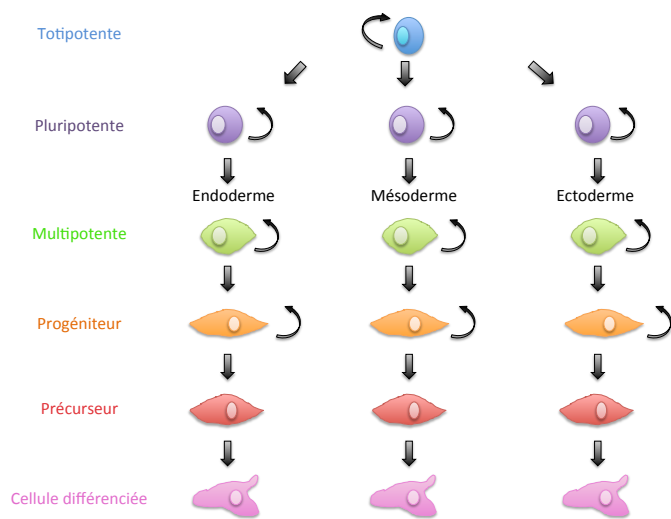


Figure 17. Capacité de différenciation des cellules souches. Les cellules totipotentes peuvent donner tous les types cellulaires d'un organisme tandis que les cellules pluripotentes se différencient dans les trois feuilletts embryonnaires. Les cellules totipotentes, pluripotentes, multipotentes et les progéniteurs sont tous capables d'auto-renouvellement, capacité perdue au stade précurseur et cellule différenciée.

Auto-renouvellement

En moyenne, la moitié des cellules filles issues de la division d'une cellule souche demeurent identique à cette dernière, ce qui permet de maintenir un stock de cellules souches stables. Cette propriété est appelée auto-renouvellement et est permise par deux modalités de division : la division symétrique et asymétrique (Figure 18).

La division symétrique aboutit à la formation de cellules filles strictement identiques à la cellule d'origine et qui peuvent ensuite se différencier grâce aux signaux de l'environnement (asymétrie environnementale). La division asymétrique génère une cellule fille identique à la cellule mère et une autre cellule fille qui hérite de facteurs la poussant dans une voie de différenciation. Grâce à cette propriété d'auto-renouvellement, les cellules souches présentent une forte capacité proliférative, propriété majeure pour des cellules à visée thérapeutique car permettant d'en obtenir suffisamment pour des traitements corps entier.

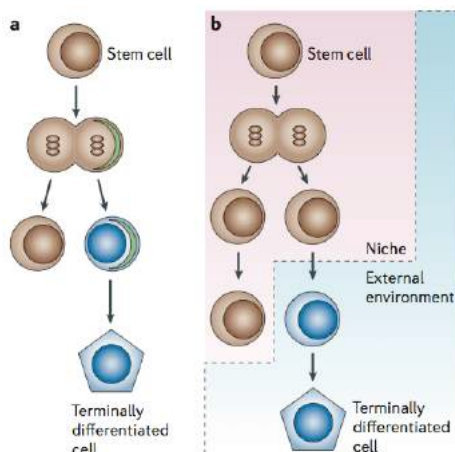


Figure 18. Divisions asymétriques des cellules souches (Wilson and Trumpp, 2006). (a) Durant une division asymétrique, les déterminants moléculaires de la différenciation cellulaire sont localisés de façon asymétrique dans une seule des deux cellules filles, ce qui aboutit à une cellule fille identique à la cellule d'origine et une cellule qui se différencie. (b) L'asymétrie environnementale agit après une division cellulaire. Une cellule fille reste dans la niche de la cellule mère initiale tandis que la deuxième sort de la niche et se différencie sous l'effet du micro-environnement.

III. Précurseurs myogéniques

i. Isolement et caractérisation

Définition

Le précurseur myogénique naturel du muscle est la cellule satellite (SC) décrite pour la première fois par Mauro en 1961 comme une cellule mononucléée présente à la périphérie des fibres musculaires et identifiée par sa position entre la lame basale et le sarcolemme de la fibre musculaire (Mauro, 1961). En 1970, les cellules satellites musculaires sont identifiées comme précurseurs myogéniques capables de proliférer et de fusionner entre elles pour former des fibres musculaires matures (Moss and Leblond, 1970).

Récemment, la notion de niche cellulaire autrement dit le micro-environnement tissulaire dans lequel la cellule souche évolue, est venue étayer cette définition. Dans le cadre des SC, la niche est délimitée par la lame basale de la fibre musculaire et la membrane plasmique. Les facteurs solubles ainsi que les contacts directs entre cellules présentent dans cette niche supportent la prolifération, la différenciation et la survie des SC (Watt and Hogan, 2000; Spradling *et al.*, 2001). Il a été montré une forte proximité anatomique entre les SC et les capillaires localisés dans le muscle. Les cellules endothéliales composant ces derniers augmentent leur prolifération *in vitro* par la sécrétion notamment de l'IGF-1, HGF, bFGF, PDGF-BB et VEGF (Christov *et al.*, 2007). De plus, les interactions entre les SC et les cellules de l'immunité, notamment les macrophages, participent pleinement à la mise en place de la régénération musculaire. Les cellules myogéniques sont ainsi capables d'attirer spécifiquement les monocytes circulants. La stimulation mutuelle qui en résulte augmente l'activité chimiotactique des deux types cellulaires. Enfin, les macrophages stimulent la croissance des cellules myogéniques par sécrétion de facteurs solubles mais également contact direct, les protégeant ainsi de l'apoptose (Chazaud *et al.*, 2007).

Origine

L'origine des SC est double. La première origine vient des somites, structures épithéliales dérivées du mésoderme paraxial (Cossu *et al.*, 1996). Suite à la libération de signaux provenant des tissus environnants, une partie des cellules somitiques migrent sous le dermomyotome et forment le myotome, première structure musculaire

squelettique. Une partie des cellules venant du dermomyotome donnera également les cellules progénitrices musculaires (De Angelis *et al.*, 1999). La seconde origine des SC est l'aorte dorsale qui est colonisée par des angioblastes d'origine somitique. Ces derniers migrent dans les membres, suivis par les cellules myogéniques, et se différencient pour former les vaisseaux sanguins mais également les SC (Seale and Rudnicki, 2000; Collins *et al.*, 2005). Les souris mutantes déficientes en précurseurs myogéniques dérivés des somites présentent un nombre significatif de SC fonctionnelles d'origine endothéliale (De Angelis *et al.*, 1999).

Localisation et morphologie

Les SC sont situées sous la lame basale de la fibre musculaire striée, contre le sarcolemme. Sur un plan morphologique, à l'état de quiescence, il s'agit d'une petite cellule fusiforme, mononucléée présentant un rapport nucléo-cytoplasmique élevé, peu d'organites, un noyau de taille petite, de l'ordre de 10 à 15 μm de long et 2 à 5 μm de large, et une chromatine condensée en interphase (Yin *et al.*, 2013) (Figure 19). Une fois activée, elle présente une augmentation de la quantité de son cytoplasme, la chromatine se décondense et l'appareil de Golgi ainsi que le réticulum endoplasmique granuleux se développent. La SC activée peut présenter un ou plusieurs prolongements cytoplasmiques et de vésicules intra-cytoplasmiques (Yin *et al.*, 2013).

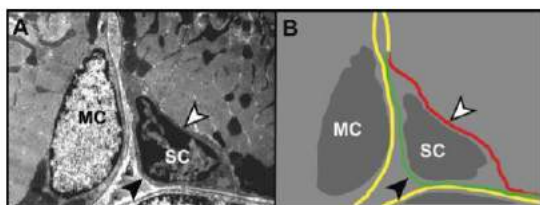


Figure 19. Localisation de la cellule satellite (Shi and Garry, 2006). (A) Micrographie électronique de muscle squelettique adulte montrant le noyau d'un myocyte (MC) et le noyau d'une cellule satellite (SC). Cette dernière est caractérisée par sa petite taille, son rapport nucléo-cytoplasmique élevé, la relative absence

d'organelles cytoplasmiques et une forte proportion en hétérochromatine nucléaire, signe d'un état quiescent. (B) Représentation schématique de A permettant de localiser la SC entre la lame basale (flèche noire et ligne verte) et le sarcolemme (flèche blanche et ligne rouge).

Phénotype

Un ensemble de marqueurs phénotypiques définit la SC et permet de la distinguer selon son état de quiescence, d'activation ou de prolifération. Il diffère également entre espèces (Tableau V).

Tableau V. Principaux marqueurs des cellules satellites (Negroni *et al.*, 2015).

	Etat de la SC			Espèce	
	Quiescente	Activée	Proliférative	Souris	Homme
<i>Facteurs de transcription</i>					
Pax7	+	+	+	✓	✓
Myf5	+	+	+	✓	?
MyoD	-	+	+	✓	✓
<i>Protéines membranaires</i>					
M-cadhérine	+	+	+	✓	✓
Cavéoline-1	+	+	+	✓	?
Syndécan 3 et 4	+	+	+	✓	?
c-met	+	+	+	✓	?
CD34	+	+	-	✓	?
CD56	+	+	+	NA	✓
CXCR4	+	?	?	✓	?
α 7-intégrine/ β 1-intégrine	+	+	?	✓	?
<i>Protéines du cytosquelette</i>					
Desmine	-	+	+	✓	✓
Nestine	+	+	?	✓	?

Les SC quiescentes comme activées expriment chez la souris le CD34, qui est également présent sur les CSH et cellules endothéliales et qui joue un rôle dans la conservation de la quiescence (Morgan and Partridge, 2003). Elles se définissent par une expression pour la M-Cadhérine. Il est en revanche établi que chez l'Homme, les SC n'expriment pas le CD34 et que la M-cadhérine n'est pas un marqueur spécifique des SC. Un des marqueurs les plus fiable entre les deux espèces est la molécule d'adhésion NCAM-1 ou CD56, qui est cependant également exprimé par les lymphocytes ayant infiltré le tissu musculaire en dégénérescence (Péault *et al.*, 2007). Récemment, il a été décrit une expression par les SC du marqueur membranaire CD82 qui d'une part permettrait une interaction avec l' α 7 β 1-intégrine ainsi que l' α -sarcoglycane et d'autre part serait impliqué dans la prolifération de ces cellules (Alexander *et al.*, 2016).

Les SC sont également définies par l'expression de divers facteurs myogéniques que représentent :

(i) les facteurs de transcription de la famille Pax qui régulent le développement et la différenciation lors de l'embryogenèse. Pax3 et Pax7 sont exprimés de façon superposée lors du développement embryonnaire chez la souris. L'expression de Pax3 est largement diminuée après la naissance chez la souris et absente chez l'Homme tandis que Pax7

reste exprimé par les SC quiescentes du tissu musculaire adulte (Mansouri and Gruss, 1998). Leurs rôles diffèrent : Pax3 est requis pour la migration des cellules somitiques dans les membres. Pax7 est nécessaire pour le maintien des SC dans le tissu musculaire, comme le démontre la réduction de leur nombre et l'altération de la régénération musculaire observées chez les souris mutantes Pax7^{-/-} au cours du développement post-natal (Oustanina et al., 2004). Pax7 est également indispensable à la prolifération et la survie des progéniteurs. Ainsi, l'expression forcée de Pax7 dans les cellules souches hématopoïétiques adultes CD45⁺ isolées de muscle squelettique, initialement incapables de se différencier, induit leur détermination myogénique (Seale et al., 2004).

(ii) les facteurs de régulation myogéniques (MRF) dénommés Myf5, MyoD, la myogénine et MRF4 qui interviennent tous séquentiellement dans le programme de différenciation myogénique. La SC quiescente exprime conjointement à Pax7 exclusivement Myf5. Une fois activée, elle commence en revanche à exprimer MyoD (Hawke and Garry, 2001; Negroni et al., 2006). Lorsque le rapport Pax7/MyoD est faible, la différenciation des SC sera induite préférentiellement tandis que quand ce dernier est fort, ces dernières restent quiescentes (Olguin et al., 2007). L'expression de Myf5 et MyoD est majeure dans l'engagement myogénique comme le démontre l'absence totale en précurseurs myogéniques chez les souris déficientes en Myf5 et MyoD (Wang and Rudnicki, 2012). Lorsque les cellules musculaires sont totalement différenciées, elles expriment alors la myogénine ainsi que MRF4 également appelé Myf6 (Figure 20).

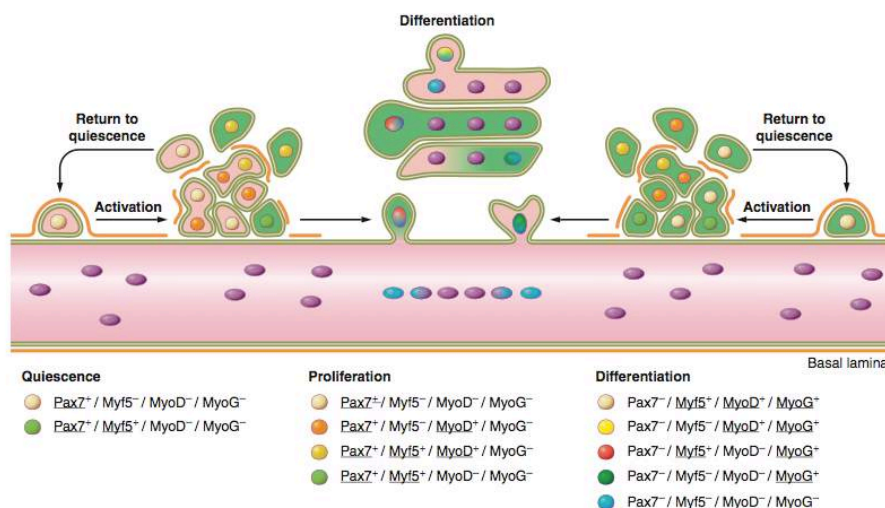


Figure 20. Activation, différenciation et fusion des cellules satellites (Yin et al., 2013). Le programme myogénique est orchestré par des facteurs de transcription clés qui dictent la progression des SC entre les états de quiescence, d'activation, de prolifération et de différenciation. Cela résulte de la transformation de SC individuelles en un syncytium de myofibres contractiles. Initialement, les SC sont quiescentes (phase G0) et résident dans la niche sous-laminaire. Elles sont

caractérisées par leur expression de Pax7 et Myf5 conjointement à leur négativité pour MyoD et myogénine. Les lésions dans le micro-environnement les entourant résultent en la détérioration de la lame basale et leur sortie de l'état de quiescence. Les SC en prolifération et leurs descendants sont souvent nommés précurseurs myogéniques (MPC) ou myoblastes adultes. Les myoblastes expriment les facteurs de transcription Myf5 et MyoD. Après la prolifération, les myoblastes commencent à se différencier en sous-exprimant Pax7. L'initiation de la différenciation terminale et de la fusion commence avec l'expression de myogénine qui, en combinaison avec MyoD, active les gènes structuraux et contractiles spécifiques du muscle. Durant la régénération, les SC activées ont la capacité de revenir à la quiescence pour maintenir leur pool. Cette capacité est cruciale pour l'intégrité au long terme du muscle.

In vivo, environ 10% des SC Pax7⁺ n'expriment pas Myf5. Cette population Pax7⁺/Myf5⁻ donne naissance à une population Pax7⁺/Myf5⁺ par division asymétrique. Cette dernière présente une différenciation précoce tandis que les cellules Pax7⁺/Myf5⁻ contribuent au réservoir des SC (Kuang *et al.*, 2007). En ce sens, les SC constituent une population hétérogène composée de cellules souches et de progéniteurs commis.

Rôle et modalités d'action

Les SC sont responsables de la croissance post-natale du muscle ainsi que de sa régénération suite à une lésion. La croissance musculaire est liée à l'augmentation de la taille des fibres musculaires ou hypertrophie causée par l'ajout de nouveaux noyaux dans leurs cytoplasmes (Kumar *et al.*, 2005). La régénération peut être liée à de nombreuses causes de dégénérescences musculaires. Elle se réalise par phases successives. Dans la première phase, une hypercontraction des fibres musculaires est observée avec une augmentation du diamètre et une acidophilie du sarcoplasme qui devient hyalin, ceci étant lié à la perte de structure des myofibrilles. Le cytoplasme se fragmente et le calcium intracellulaire est relargué (Valentine and McGavin, 2007). La seconde étape qui se déroule dans les 24 à 48 heures après la lésion consiste en une infiltration du tissu musculaire par des monocytes circulants qui vont se différencier *in situ* en macrophages et permettre la clairance des débris apoptotiques. La troisième étape correspond à l'activation des SC proprement dite en réponse aux facteurs sécrétés par les macrophages (Sonnet *et al.*, 2006). Les SC prolifèrent, perdent l'expression de Pax7 et se différencient de façon asymétrique d'une part en myoblastes qui fusionnent pour reformer une fibre mature complète, et d'autre part en cellules maintenant l'expression de Pax7 mais perdant MyoD ce qui provoque un arrêt du processus de différenciation et permet le renouvellement du pool de cellules de réserve. Certaines cellules Pax7⁺/MyoD⁺ sortent également du cycle cellulaire et retrouvent un phénotype quiescent. Bien qu'étant engagées dans la différenciation, les SC peuvent ainsi passer

d'un processus de myogenèse terminal à celui de maintien du pool de cellules résidentes (Zammit *et al.*, 2004) (Figure 20). Le cytoplasme des fibres nouvellement régénérées est basophile, ceci étant lié à l'augmentation de la densité cytoplasmique en ARN. La dernière étape est la maturation de la fibre qui augmente en diamètre, perd sa basophilie et reforme des sarcomères. Dans la DMD, une perturbation de l'équilibre entre division symétrique et asymétrique des SC est évoquée (Bulfield *et al.*, 1984; Kottlors and Kirschner, 2010; Dumont *et al.*, 2015). En effet, une augmentation du nombre de SC a été observée chez la souris *mdx* comme chez le patient DMD, laissant supposer une division symétrique favorisée, empêchant la formation de progéniteurs engagés dans la lignée myogénique et limitant ainsi la régénération des fibres musculaires (Figure 21).

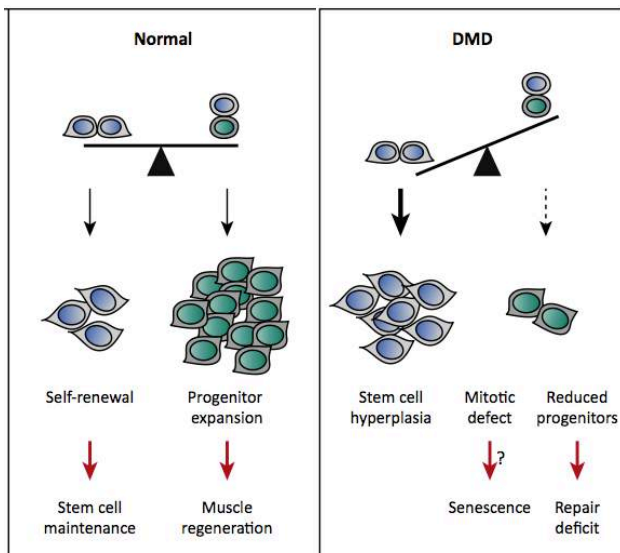


Figure 21. Equilibre entre division symétrique et asymétrique dans un muscle DMD et un muscle sain (Chang *et al.*, 2016). Lors d'une lésion dans un muscle sain, les SC générées par division symétrique maintiennent le pool de cellules résidentes tandis que la division asymétrique génère des progéniteurs myogéniques qui participent à la régénération des fibres endommagées. Dans le contexte DMD, la perte de la polarité cellulaire liée à la dystrophine induit une inhibition de la division asymétrique, ce qui aboutit à une augmentation du nombre de SC. La présence de défauts mitotiques conduit à une entrée de ces cellules dans un stade de sénescence et au long terme à une déplétion du stock de SC.

Enfin, la fonction de la SC et de son descendant, le myoblaste, est largement influencée par l'environnement dans lequel ils évoluent (Figure 22). Il a ainsi été démontré qu'une teneur en oxygène de 1% inhibe la différenciation des myoblastes en agissant sur la voie Notch (Gustafsson *et al.*, 2005). L'hypoxie favorise également la quiescence des précurseurs myogéniques ainsi que leur auto-renouvellement et augmente l'efficacité de leur transplantation notamment chez la souris *mdx* (Liu *et al.*, 2012b). La présence de ROS inhibe la différenciation myogénique en augmentant l'activité de $\text{NK-}\kappa\text{B}$ dans les myoblastes ce qui induit une diminution de l'expression de MyoD et une augmentation de la prolifération cellulaire (Guttridge *et al.*, 2000; Ardite *et al.*, 2004; Catani *et al.*, 2004; Sandiford *et al.*, 2014). Enfin, nombre de cytokines produites par les cellules de la niche agissent sur la différenciation des myoblastes. On peut citer par exemple le VEGF

(Vascular Endothelial Growth Factor) dont les récepteurs sont exprimés par les SC et qui a une action sur les myoblastes en stimulant leur migration et en inhibant l'apoptose des myoblastes en différenciation (Germani *et al.*, 2003).

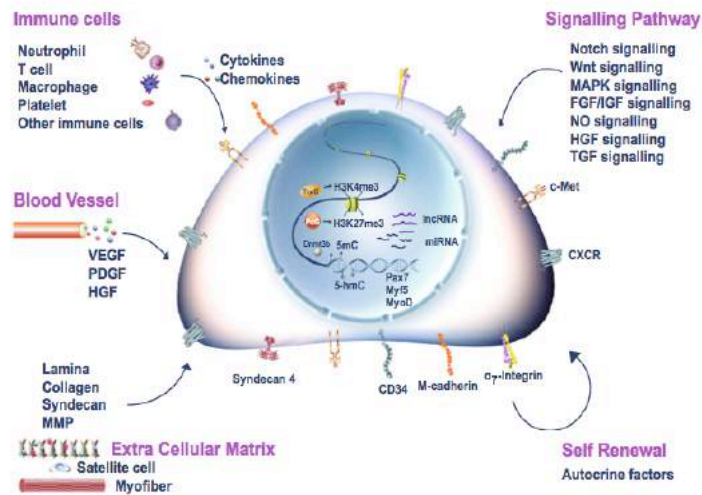


Figure 22. Régulation de l'activation des cellules satellites. (Fu *et al.*, 2015). Les marqueurs spécifiques des SC sont indiqués sur la membrane de la cellule et les facteurs de transcription impliqués dans l'activation dans le noyau. Les composants majeurs du micro-environnement ainsi que les voies de signalisation impliquées sont représentées.

ii. Potentiel thérapeutique des myoblastes

L'administration locale de myoblastes murins chez la souris dystrophique s'accompagne d'une amélioration phénotypique et tissulaire avec notamment une restauration de l'expression de dystrophine (Law *et al.*, 1988; Partridge *et al.*, 1989). Parallèlement, l'administration de myoblastes humains dans différents modèles murins immunodéficients a révélé également une capacité d'intégration dans le tissu musculaire (Karpati *et al.*, 1989; Huard *et al.*, 1994). Ces résultats prometteurs obtenus après injection intramusculaire ont conduit à une première vague d'essais cliniques chez des patients DMD dans les années 1990 (Gussoni *et al.*, 1992; Mendell *et al.*, 1995; Morandi *et al.*, 1995; Miller *et al.*, 1997) qui s'est traduite par la démonstration d'une efficacité limitée en raison de différents éléments. Une mortalité massive des cellules administrées (environ 90%) est observée dans les premières 24 heures post-transplantation (Beauchamp *et al.*, 1999). Il a été établi que l'amplification *in vitro* réduit considérablement le potentiel myogénique des cellules satellites *in vivo* (Meregalli *et al.*, 2012). Ainsi, les SC fraîchement isolées ont été montrées comme participant plus efficacement à la régénération du tissu musculaire que les myoblastes, restaurent l'expression de dystrophine et participent au maintien du pool de cellules satellites quiescentes. Injectées dans les mêmes conditions chez la souris *mdx*, les SC fraîchement isolées contribuent à 38% au stock de cellules de réserve contre 12% seulement pour

les myoblastes amplifiés par un passage (Rossi *et al.*, 2011). Par ailleurs, l'utilisation des polymères ou hydrogels dans lesquels sont placées les myoblastes a permis d'améliorer sensiblement leur survie et donc leur efficacité thérapeutique avec 149 fibres musculaires issues des myoblastes transplantés en hydrogel chez la souris nude contre 39 fibres musculaires chez les animaux transplantés avec les myoblastes seuls (Ding *et al.*, 2015). D'autre part, certains auteurs avancent l'hypothèse que l'amplification aurait également un impact direct sur le phénotype des myoblastes, les rendant davantage visible au système immunitaire de l'hôte ou moins viables pour la fusion *in vivo* (Palmieri *et al.*, 2010).

La migration très limitée des myoblastes, de l'ordre de quelques millimètres *in tissu* et restreinte aux trois premiers jours après la transplantation a été démontrée (Riederer *et al.*, 2012). Pour pallier à ces difficultés, un protocole d'administration à haute densité basé sur des centaines d'injections locales séparées de 1 mm a été proposé après une évaluation chez le primate et quelques patients. Ce type d'injection conduit à des pourcentages de myofibres hybrides exprimant la dystrophine respectivement de 28% et 34% après un et 18 mois. L'expression de dystrophine est restreinte exclusivement au site d'injection (Skuk *et al.*, 2004, 2007). De plus, une stimulation des myoblastes préalablement à leur injection intramusculaire chez la souris *mdx* par la Concanavaleine A qui est un mitogène et activateur de la collagénase, du plasminogène et des métalloprotéinases a montré une augmentation de leur migration (Ito *et al.*, 1998; El Fahime *et al.*, 2000; Morgan *et al.*, 2010).

Ces dernières années, des essais cliniques reposant sur l'administration de myoblastes ont été menés. L'un d'eux a consisté à administrer 178 millions de myoblastes autologues dans les muscles pharyngés après myotomie de 12 patients atteints d'OPMD. Un suivi à court et long terme (1 et 3 ans après transplantation) a montré une bonne tolérance au traitement chez tous les patients traités, une amélioration de la fonction du sphincter oesophagien avec une diminution du temps de déglutition nécessaire ainsi qu'une amélioration de leur qualité de vie. Aucun effet indésirable ni de dégradation de la fonction de déglutition n'a été rapporté, confirmant la possibilité d'utilisation locale des myoblastes pour des pathologies ciblant des groupes restreints de muscles (Périé *et al.*, 2014). Ces essais cliniques par administration de myoblastes autologues ciblant l'OPMD et la FSHD montrent donc des résultats prometteurs. Cependant, dans le cadre

de la DMD, les SC des patients présentent un déficit de prolifération qui limite grandement ce type de transplantation (Mouly *et al.*, 2005).

IV. Progéniteurs d'origine non musculaire

1. Cellules souches hématopoïétiques

i. Isolement et caractérisation

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont les cellules à l'origine de toutes les lignées de cellules sanguines (Abramson *et al.*, 1977). Elles sont isolées à partir de la moelle osseuse ou possiblement du sang de cordon ombilical ou sang circulant de patients traités par administration de cytokines (Verfaillie, 2002). Elles sont définies par l'expression de marqueurs membranaires spécifiques grâce auxquels elles peuvent être isolées (Tableau VI) (Visser *et al.*, 1984). Les CSH murines sont définies comme exprimant Sca-1, CD27, CD34, CD38, CD43, CD45, CD90.1 (Thy-1.1), CD117 (c-kit), CMHI et CD150. Cependant, leur définition se fait habituellement par une combinaison de ces marqueurs comme [CD117^{high}, CD90^{low}, Lin^{-/low}, Sca-1⁺], [CD90^{low}, Lin⁻, Sca-1⁺, Rhodamine123^{low}], [CD34^{-/low}, CD117⁺, Sca-1⁺, Lin⁻] ou [CD150⁺, CD48⁻, CD244⁻] (Uchida and Weissman, 1992; Domen *et al.*, 2006). Les CSH humaines expriment pour leur part le CD34, CD38, CD43, CD45, CD59, CD90, CD109, CD117, CD133, CD166 et le HLA-DR. Elles sont majoritairement sélectionnées sur la base de l'expression du CD45 et du CD34 (Domen *et al.*, 2006).

Tableau VI. Principaux marqueurs des CSH (Domen *et al.*, 2006; Kirschstein and Skirboll, 2001).

	Souris	Homme
CD27	+	ND
CD34	low/-	+
CD38	+	+/low
CD43	+	+
CD45	+	+
CD59	ND	+
CD90 (Thy1)	+/low	+
CD117 (c-kit)	+	low/-
CD133	ND	+
Sca-1	+	NA

Deux types de CSH se distinguent : celui à longue durée de vie (8 et 10% des CSH chez la souris jeune adulte) qui prolifère pendant toute la vie au rythme d'une division par jour et celui à courte durée de vie qui prolifère de façon plus limitée sur seulement quelques mois et se différencie pour produire les précurseurs lymphoïdes à l'origine des cellules

T, B et NK mais aussi les précurseurs myéloïdes à l'origine des monocytes, macrophages, neutrophiles, éosinophiles, basophiles, mégacaryocytes et érythrocytes (Kirschstein and Skirboll, 2001) (Figure 23).

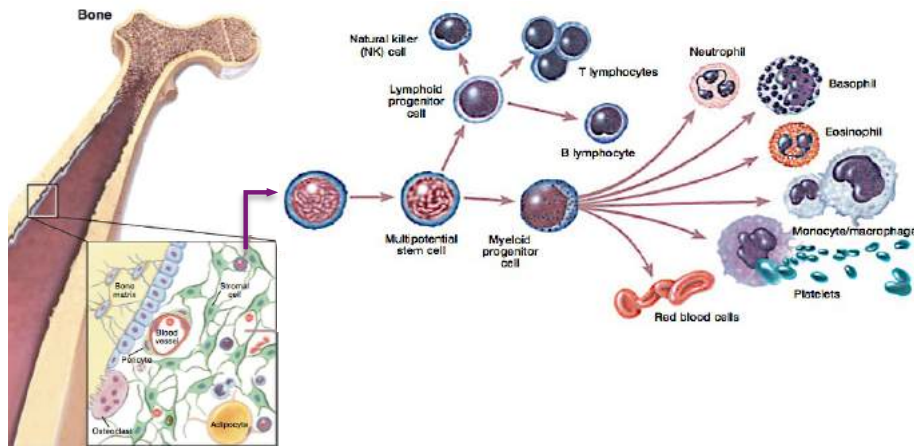


Figure 23. Différenciation des CSH dans les lignées lymphoïde et myéloïde (Domen *et al.*, 2006).

ii. Potentiel thérapeutique

La première démonstration *in vivo* de l'efficacité thérapeutique des CSH a été réalisée en 1956 avec la reconstitution du compartiment hématopoïétique consécutivement à l'injection de cellules médullaires à des souris irradiées par rayon X (Ford *et al.*, 1956; Nowell *et al.*, 1956). Ensuite, il a été démontré, selon un protocole classique d'injection IV d'une suspension de cellules médullaires à des rongeurs irradiés, une capacité de ces CSH à se différencier en cellules d'autres tissus comme le muscle, le myocarde, le système nerveux et le foie (Ferrari *et al.*, 1998; Gussoni *et al.*, 1999; Petersen, 1999; Mezey, 2000; Orlic *et al.*, 2001; Fukada *et al.*, 2002). En ce qui concerne le muscle squelettique, il a été établi une capacité des CSH à migrer sur les sites de lésions musculaires, se différencier en cellules musculaires et à participer à la régénération des fibres endommagées (Ferrari *et al.*, 1998). Une capacité à former des fibres dystrophine⁺ a également été démontrée après administration chez la souris *mdx* irradiée, avec cependant une intensité faible représentant moins de 1% à 4% des fibres musculaires (Gussoni *et al.*, 1999; Ferrari *et al.*, 2001; LaBarge and Blau, 2002). Ainsi, les CSH ont un très faible impact sur le remplacement des fibres musculaires et n'induisent aucune amélioration du phénotype des souris transplantées ce qui pourrait être lié à un faible recrutement des CSH vers le tissu dystrophique (Ferrari *et al.*, 2001; Lapidus *et al.*,

2004). Par ailleurs, aucune participation à la régénération musculaire et aucun impact fonctionnel n'ont pu être observé après transplantation de CSH chez le chien GRMD, démontrant l'inefficacité clinique de cette stratégie (Dell'Agnola *et al.*, 2004; Kuhr *et al.*, 2007).

2. Cellules souches mésenchymateuses

i. Isolement et caractérisation

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont des cellules non hématopoïétiques isolées initialement de la moelle osseuse où elles représentent 0,001 à 0,01% de la population totale de cellules mononucléées (Pittenger *et al.*, 1999). Elles sont également isolées à partir de tissu adipeux (ASCs) et musculaire, de l'endomètre, de la pulpe dentaire (IDPSC) ou de la membrane synoviale (SM-CSM) (De Bari *et al.*, 2001; Zuk *et al.*, 2002; Dezawa, 2005; Kerkis *et al.*, 2006; Cui *et al.*, 2007). Concernant leur origine, une théorie évoque qu'elles pourraient dériver d'un progéniteur commun, à savoir une cellule endothéliale primordiale qui aurait donné naissance aux CSH et au précurseur mésodermique. Ce dernier se différencierait ensuite en précurseur myogénique et en cellules stromales de la moelle osseuse (Bianco and Cossu, 1999). Il serait positif pour SSEA-1 et posséderait une capacité de prolifération supérieure à ses descendants (Anjos-Afonso and Bonnet, 2007).

Les CSM sont définies par un ensemble de marqueurs incluant les récepteurs membranaires CD44, CD90, CD73, CD29, CD105 et un marqueur spécifique stromal Stro-1 (Simmons and Torok-Storb, 1991; Kirschstein and Skirboll, 2001) (Tableau VII). Comme les CSH, elles dérivent du mésoderme embryonnaire durant le développement. Il est notamment évoqué une origine commune entre les cellules mésenchymateuses et périvasculaires, ceci étant étayé par l'expression identique de marqueurs entre les deux lignées comme le CD146, CD49b, CD90, CD44 et CD73 (Zannettino *et al.*, 2007; Crisan *et al.*, 2008; Corselli *et al.*, 2012).

Tableau VII. Phénotype des CSM humaines (De Bari *et al.*, 2001; Le Blanc *et al.*, 2003; Rodriguez *et al.*, 2005; Yoon *et al.*, 2005; Gonçalves *et al.*, 2006; Rider *et al.*, 2007; Gang *et al.*, 2007; da Silva Meirelles *et al.*, 2008).

CSM		CSM	
Molécules d'adhésion		HLA-I	+/low
α v intégrine/CD51	+	HLA-II	-
β 3 intégrine/CD61	low	Facteurs de transcription	
β 5 intégrine	+	Pax3	-
CD15	-	Sox9	+
CD29	+	Marqueurs hématopoïétiques	
CD31/PECAM1	-	CD38	-
CD44	+	CD14	-
CD49a	+	CD20	-
CD49b	+	CD34	-
CD49c	+	CD45	-
CD49d	-/+	CD117/c-kit	-
CD49e	+	Autres	
CD62P/P-sélectine	low	α -actine	+
VCAM-1/CD106	+	a-P2	-
Récepteurs		CD13	+
CD19	-	CD133	-
CD46	low	LBK-AP	+
CD56/NCAM	low	Myogénine	-
CD71	low	Ostéocalcine	-
CD73	+	Ostéonectine	+
CD90	+	Ostéopontine	-
CD105	+	PPAR γ 2	-
CD140a	+	SSEA1	-
CD140b	+	SSEA3	low
CD144	-	SSEA4	+
CD146	+	Smad-1	+
CD166	+	Smad-2	+
CXCR4	-	Smad-5	+
FGFR-1	+	Smad-7	+
FGFR-2	+	SkM-MHC	-
FGFR-3	-	Vimentine	+

Les CSM présentent une capacité d'adhérence rapide en culture, ce qui facilite leur isolement et leur séparation des CSH à partir d'extraits de moelle osseuse (Kirschstein and Skirboll, 2001). Le temps de doublement moyen des cellules de la moelle osseuse au premier passage est d'environ 40 h, celui-ci augmentant ensuite considérablement après le passage 6 pour permettre l'obtention à partir de 2 mL de moelle osseuse de 12,5 à 35,5 milliards de cellules en 3 semaines (Lu *et al.*, 2006). Les CSM présentent une capacité à se différencier dans différentes lignées adipogénique, ostéogénique, chondrogénique, nerveuse, hépatique ou musculaire faisant d'elles des cellules multipotentes (Pittenger *et al.*, 1999; Kirschstein and Skirboll, 2001). Dans la moelle

osseuse, elles jouent un rôle majeur comme cellule de soutien à la différenciation des CSH (Caplan, 1991) mais exercent également d'autres fonctions notamment dans l'activation ou l'inhibition des cellules de l'immunité selon le contexte inflammatoire. En effet, une propriété essentielle des CSM réside dans leurs capacités immunomodulatrices sur un large ensemble de cellules de l'immunité innée comme adaptative (Svobodova *et al.*, 2012; Ylöstalo *et al.*, 2012) (Figure 24). Ces effets immunomodulateurs sont largement médiés par la sécrétion de facteurs paracrines pléiotropes tels que l'IL-6, PGE-2 ou IDO (Djouad *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2012a) mais peuvent également être liés à des contacts directs entre cellules (Rosado *et al.*, 2014; Demmers *et al.*, 2015) (Tableau VIII).

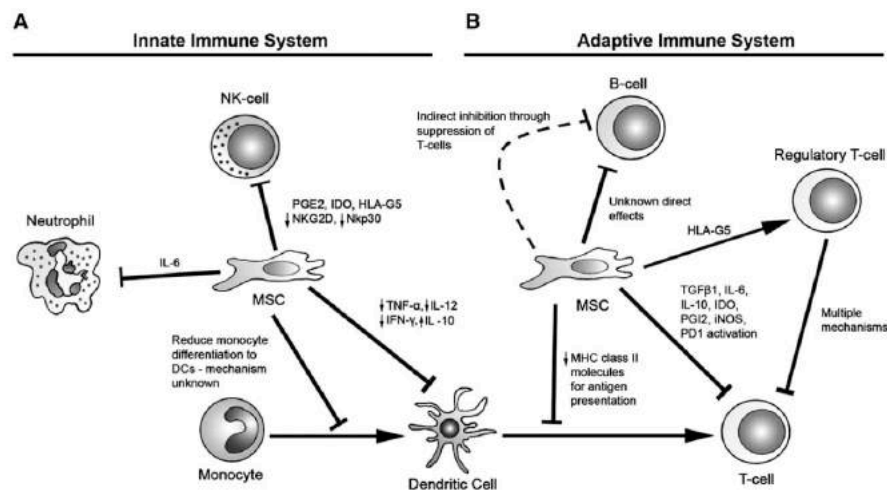


Figure 24. Mécanismes d'immunomodulation des CSM (Reddy *et al.*, 2012). Les CSM agissent à la fois sur l'immunité innée et adaptative. (A) Concernant l'immunité innée, les CSM peuvent inhiber l'activité cytotoxique des cellules NK en sous-exprimant NKG2D et Nkp30 et également en sécrétant PGE2, IDO et HLA-G5. Les CSM peuvent également agir sur les neutrophiles via la production d'IL-6. (B) En ce qui concerne l'immunité adaptative, les CSM inhibent indirectement la fonction des cellules T en diminuant la présentation antigénique des cellules dendritiques. La sécrétion de HLA-G5 par les CSM provoque une augmentation de la fraction des cellules T régulateurs CD25⁺ qui possèdent une activité suppressive. L'inhibition des lymphocytes T peut également être directe via la production de TGF- β , IL-6, IL-10, IDO et iNOS et l'activation directe de la voie PD1. Les CSM peuvent inhiber l'activation des lymphocytes B à travers des contacts directs qui sont encore à explorer. HLA, human leukocyte antigen ; IDO, indoleamin 2,3-dioxygénase ; IFN γ , interféron gamma ; iNOS, inducible nitric oxide synthase ; MHC, major histocompatibility complex ; MSC, mesenchymal stem cell ; NK, natural killer ; PD1, programmed cell death 1 ; PGE2, prostaglandin E2 ; TGF β 1, transforming growth factor beta 1 ; TNF- α , tumor necrosis factor alpha ; IL, interleukin

Tableau VIII. Principaux facteurs immunomodulateurs sécrétés par les CSM (Roubeix, 2014).

Facteurs exprimés par les CSM	Cellules cibles
CCL2	Macrophages, LTh2, Th17
CCL5	Neutrophiles, Monocytes, CD8, LTh1, Treg
IDO	Monocytes, CD8, LB, LT, Treg
IL-6	Neutrophiles, monocytes, CD8, LB, LTh2, Treg, Th17
IL-10	Macrophages, neutrophiles, CD8, LTh1, Treg
PGE2	Macrophages, monocytes, NK, CD8, LT
TGF- β	Macrophages, NK, CD8, LB, LT, Treg
VEGF	CD8, LTh1, Th17, Treg

Il est clairement défini que ces cellules ont besoin d'être éduquées afin de développer ce type de propriétés. Notamment, leur effet est potentialisé par la stimulation à l'IFN, au TNF ou à l'IL1 α et β . Le phénotype immun des CSM est en effet largement lié à leur environnement et peut basculer entre des caractéristiques pro- ou anti-inflammatoires (Waterman *et al.*, 2010).

En ce qui concerne les lymphocytes T, une inhibition de leur activation et prolifération a été établie *in vitro* et *in vivo* par la réalisation de co-culture directe avec des CSM allogéniques mais également par l'augmentation de la survie de greffe allogénique de peau chez le babouin, passant de 7 jours de survie chez le groupe greffé contrôle à 12 jours chez le groupe greffé conjointement à une injection de CSM allogéniques (Bartholomew *et al.*, 2002; Le Blanc *et al.*, 2003; Krampera *et al.*, 2006). Dans des conditions pro-inflammatoires, les CSM activées par leur TLR3 se spécialisent vers un phénotype anti-inflammatoire et sécrètent alors des cytokines comme le PGE2, IDO, TGF- β , IL-10, LIF et les galectine-1 et 3 qui sont impliqués dans l'inhibition de la prolifération lymphocytaire T (Waterman *et al.*, 2010). D'autre part, la forte sécrétion d'IL-6 et d'IL-10 diminue l'expression du CMH II, CD40 et CD86 sur les cellules dendritiques matures et réduit ainsi la prolifération lymphocytaire (Djouad *et al.*, 2007). En sécrétant du TGF- β , les CSM induisent également une différenciation des cellules T naïves en cellules T régulatrices (Svobodova *et al.*, 2012).

En ce qui concerne les lymphocytes B, les CSM inhibent leur prolifération, leur différenciation en plasmocytes ainsi que la production d'anticorps de façon indirecte via les lymphocytes T mais les mécanismes d'action sont encore mal connus (Rosado *et al.*, 2014).

Elles régulent également l'immunité innée en inhibant la différenciation macrophagique M1, décrite comme pro-inflammatoire, et en orientant les macrophages vers un phénotype M2, anti-inflammatoire (Coulson-Thomas *et al.*, 2016). Quand les CSM sont stimulées via leur TLR4, elles présentent en revanche un phénotype pro-inflammatoire, promeuvent le recrutement des neutrophiles et augmentent l'activation des cellules T (Waterman *et al.*, 2010).

ii. Potentiel thérapeutique

Aujourd'hui, ce sont principalement les propriétés immunomodulatrices des CSM qui font l'objet de nombreuses études. En effet, ce comportement immun privilégié permet aux CSM d'accroître sensiblement la prise de greffe, comme cela a notamment été montré avec le prolongement de greffe de peau suite à une administration de CSM chez le babouin (Bartholomew *et al.*, 2002). De plus, les CSM administrées chez les patients atteints de maladie du greffon contre l'hôte (GvHD) présentent une amélioration clinique persistante (Le Blanc *et al.*, 2004).

Concernant les démonstrations ciblant la DMD, les résultats sont limités. En effet, les CSM de moelle osseuse, contrairement à celles obtenues de tissu adipeux ou de la membrane synoviale, ne se différencient dans la voie myogénique *in vitro* que si elles ont été au préalable transduites avec Pax3 ou MyoD ou mises en coculture avec des myoblastes et cela avec une intensité faible (Dezawa, 2005; Gonçalves *et al.*, 2006; Di Rocco *et al.*, 2006; Vieira *et al.*, 2008a, 2012; Gang *et al.*, 2009; Zucconi *et al.*, 2011). L'administration systémique chez la souris *mdx* de CSM de moelle osseuse murines dont la voie Wnt a été préalablement activée s'accompagne d'une expression de dystrophine et du facteur MyoD plus importante qu'après injection de CSM non modifiées. Néanmoins, aucune différence n'est observée en ce qui concerne le remodelage histologique et le taux de CK circulant (Shang *et al.*, 2016). Un potentiel myogénique de CSM humaines dérivées de la membrane synoviale (hSM-CSM) avec une différenciation myogénique a été rapporté après transplantation IM dans un modèle de souris nude de régénération musculaire. Elles restaurent l'expression de dystrophine, contribuent à la constitution des myofibres et au pool de cellules satellites. Aucune fusion nucléaire hybride n'a cependant été observée, démontrant une capacité de fusion limitée des CSM transplantées (De Bari *et al.*, 2003). Un intérêt particulier est porté aux CSM du tissu

adipeux dans la mesure où transplantées en IM chez la souris *mdx* immunocompétente, les cellules humaines permettent une restauration de l'expression de dystrophine dans plus de 50% des fibres musculaires 10 jours après transplantation, participent à la régénération musculaire par fusion avec les fibres endogènes et montrent une capacité de survie dans le tissu 80 jours après transplantation (Rodriguez *et al.*, 2005). Un tropisme musculaire a été attribué à partir d'un abord systémique chez la souris *mdx* pour une population de CSM issues du tissu adipeux et sélectionnées pour leur expression du marqueur Flk-1, de même qu'une participation à la régénération musculaire et à la réexpression de dystrophine (Liu *et al.*, 2007). Ces résultats ont été également confirmés dans le modèle de souris *SJL* atteintes de dystrophie des ceintures (Vieira *et al.*, 2008b). Enfin, une stimulation de l'angiogenèse a été démontrée parallèlement à une réduction de la fibrose pour les CSM dérivées de pulpe dentaire (hDPSC) après une injection intramusculaire dans des souris SCID/*mdx* (Pisciotta *et al.*, 2015). Ces résultats ont été complétés par des travaux menés chez le chien dystrophinopathe GRMD qui ont démontré après administration intra-artérielle ou intramusculaire d'ASCs humaines sans immunosuppression la présence de fibres chimériques et une amélioration clinique des animaux sans rejet immunitaire et ce, malgré une faible expression de dystrophine humaine (Kerkis *et al.*, 2008). Aucune expression de dystrophine n'a été détectée après injection intra-artérielles de CSM issues de sang de cordon ombilical (Zucconi *et al.*, 2011). Vieira et son équipe ont montré que des ASCs humaines délivrées de façon répétée par voie systémique chez le chien GRMD sans immunosuppression étaient capables de rejoindre le muscle et de permettre une expression de la dystrophine humaine pendant plusieurs mois. Cependant, il est à noter que cette expression est faible, de 6 à 19% du niveau d'expression normal en western blot, qu'elle n'est associée à aucun bénéfice tissulaire et qu'elle est perdue un an après le protocole de transplantation (Vieira *et al.*, 2012). Une étude récente basée sur la réalisation d'injection systémique de CSM humaines dérivées du tissu adipeux chez cinq chiens GRMD en absence de traitement immunosuppresseur a permis d'établir une absence de bénéfice clinique ou tissulaire. Par ailleurs, aucun effet secondaire à l'exception notable d'un épisode convulsif chez un des chiens traités ou formation tumorale n'ont été mis en évidence (Pelatti *et al.*, 2016). De façon similaire, l'équipe de Nitahara-Kasahara a montré chez le chien CXMD_J sans immunosuppression une participation à la régénération musculaire avec une expression de la dystrophine et

la myosine développementale après administration intramusculaire de CSM médullaires CD271⁺ préalablement transduites avec MyoD. Cependant, seulement 2% de fibres contenant des cellules injectées sont dénombrées, le nombre de fibres exprimant la dystrophine étant également faible. Enfin, des infiltrats de lymphocytes cytotoxiques CD8 et de macrophages sont observés 8 semaines après transplantation autour des cellules injectées, démontrant l'existence d'une réaction immunitaire (Nitahara-Kasahara *et al.*, 2012). Les CSM possèdent également un effet thérapeutique paracrine par la sécrétion de molécules de la matrice extracellulaire ou par la réduction de l'inflammation, particulièrement dans le muscle DMD (Ichim *et al.*, 2010; Meng *et al.*, 2011a), et ont fait notamment l'objet d'essais dans le domaine cardiologique afin de pallier aux lésions d'infarctus et d'ischémie reperfusion (Chen *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2007).

V. Autres progéniteurs à potentiel myogénique

1. Cellules AC133

i. Isolement et caractérisation

Une fraction marginale de cellules mononucléées extraites du sang périphérique (0,06%) ou isolées du muscle humain (1%) a été décrite comme exprimant le marqueur CD133 aussi appelé prominine-1 (Torrente *et al.*, 2004; Benchaouir *et al.*, 2007). Les cellules AC133 expriment le CD44, LFA-1, PSGL-1, α 4-intégrine, L-sélectine et le CCR7 (Gavina *et al.*, 2006). Soixante-dix neuf pourcent des cellules AC133⁺ musculaires expriment le CD34 et CD90 tandis que 4 à 5% présentent une expression du CD45. Les AC133⁺ sanguines sont quant à elles toutes positives pour ces trois marqueurs. Les marqueurs myogéniques Pax7, Myf5, MyoD, m-cadhérine, MRF-4 et myogénine sont détectés après 24 h en culture dans les deux populations de cellules AC133⁺. Les marqueurs de pluripotence que sont c-kit et Oct4 sont progressivement perdus par les AC133 tandis que le SSEA-4 reste présent. Elles présentent également une expression du HLA-I mais sont négatives pour le HLA-DR (Pozzobon *et al.*, 2009).

In vitro, les cellules AC133⁺ dérivées du sang comme du muscle ne sont pas capables de se différencier spontanément dans la lignée myogénique et requierent pour cela d'être cocultivées avec des myoblastes primaires C2C12 (Torrente *et al.*, 2007). La principale limite des cellules AC133⁺ concerne leur faible capacité de prolifération, qui peut être

néanmoins améliorée par leur insertion dans des polymères ou nanostructures (Belicchi *et al.*, 2010).

ii. Potentiel thérapeutique

Une participation à la régénération musculaire, une production de dystrophine et une colonisation de la niche des SC ont été établies après injection intramusculaire ou systémique chez la souris *mdx* immunodéficiente. Une augmentation de la force musculaire a également été rapportée (Torrente *et al.*, 2004). Les administrations locale et systémique dans le même modèle de cellules AC133⁺ dérivées du muscle ou du sang de patients DMD et corrigées génétiquement par un lentivirus codant un oligonucléotide antisens, se sont traduites par une restauration de la dystrophine et un impact fonctionnel (Benchouir *et al.*, 2007). Il s'en est suivi un essai clinique de phase I chez des patients DMD qui a montré une absence d'effet indésirable, une augmentation de la vascularisation ainsi qu'une absence d'intégration dans les fibres musculaires après l'administration locale de cellules AC133⁺ autologues dérivées du muscle. Cette absence de bénéfice tissulaire est notamment liée à une forte mortalité des cellules 24 h post-injection (Torrente *et al.*, 2007). L'activité de régénération des cellules AC133⁺ objectivée par le nombre de fibres exprimant les protéines humaines, le nombre de cellules humaines ayant colonisé la niche satellitaire et la dispersion dans le tissu s'est avérée être supérieure à celle observée avec les myoblastes (Negroni *et al.*, 2009).

Une capacité à promouvoir la vasculogénèse par sécrétion de VEGF et à se différencier *in vivo* en cellules endothéliales ont été présentées (Shi *et al.*, 2009). Dans l'optique de valider les résultats acquis jusqu'alors, le groupe de Jennifer Morgan a montré une contribution à la régénération suite à l'administration locale des cellules AC133⁺ dans le modèle de souris immunodéficient cryolésé Rag2⁻/γ chain⁻/C5⁻ mais en revanche a révélé une absence complète de dissémination de ces cellules à partir de l'abord systémique comme précédemment présenté (Meng *et al.*, 2014).

Récemment, une étude comparée dans deux modèles de souris immunodéficientes cryolésées ou irradiées a montré une meilleure efficacité de régénération des cellules AC133 en comparaison des péricytes (Meng *et al.*, 2015).

2. Cellules de la Side Population

i. Isolement et caractérisation

Les cellules de la Side Population ou cellules SP sont des cellules rares définies par leur capacité à exclure le colorant Hoechst et l'iodure de propidium (Goodell *et al.*, 1996; Montanaro *et al.*, 2004) (Figure 25). Elles peuvent être isolées de la moelle osseuse mais aussi du tissu musculaire squelettique (Gussoni *et al.*, 1999). Une population appelée SP CD45⁻ a également été isolée à partir de la fraction vasculaire stromale du tissu adipeux (Andersen *et al.*, 2008, 2012). La capacité à exclure le colorant vital peut être réversée avec l'utilisation de verapamil, indiquant qu'elle est liée à la présence de protéine de résistance multidrogues (MDR) (Goodell *et al.*, 1996) en l'occurrence le transporteur ABCG2 aussi connu sous le nom de Bcrp1, (Zhou *et al.*, 2001). La majorité des cellules SP maintiennent une forme sphérique en culture et n'adhèrent que peu aux supports de culture (Gussoni *et al.*, 1999).

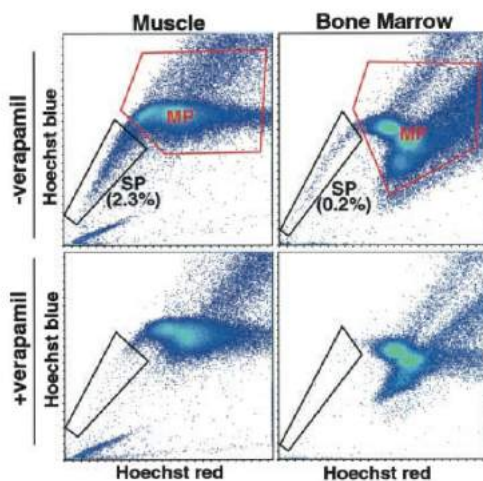


Figure 25. Isolement des cellules SP à partir de leur capacité à exclure le colorant Hoechst 33342 (Asakura *et al.*, 2002). L'isolement des cellules SP est réalisé par cytométrie en flux sur la base de leur capacité à exclure le colorant Hoechst (fenêtre SP en noir). Les cellules SP isolées de moelle osseuse ou de muscle sont sensibles au verapamil. MP, main population

Les cellules SP expriment la protéine morphogénétique osseuse 4 (BMP4) qui joue un rôle de régulateur dans la prolifération de progéniteurs myogéniques ainsi que dans la régénération musculaire *in vivo* (Frank *et al.*, 2006; Doyle *et al.*, 2011). Les cellules SP issues de la moelle osseuse expriment les marqueurs Sca-1, c-Kit, CD43 et CD45. Elles expriment faiblement les marqueurs Lin (B220, Mac-1, Gr-1, CD4, CD5 et CD8) et sont CD34⁻ (Gussoni *et al.*, 1999). Celles isolées à partir du tissu musculaire expriment également Sca-1 et sont négatives pour les marqueurs Lin. En revanche, elles se distinguent des cellules SP de la moelle osseuse car elles n'expriment pas les marqueurs c-Kit et CD45. De la même façon, plus de 90% des cellules SP du muscle sont CD43⁻ (Gussoni *et al.*, 1999) (Tableau IX).

Tableau IX. Marqueurs exprimés par les cellules SP (Gussoni *et al.*, 1999).

	CD34	Sca-1	CD43	c-kit	CD11	CD45	Gr-1	B220	CD5	CD4/ CD8
SP muscle	+/-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
SP moelle osseuse	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-

Selon le groupe de Uezumi, les cellules SP du muscle peuvent être divisées en trois sous-populations : les cellules CD31⁺CD45⁻ qui sont majoritaires, les cellules CD31⁻CD45⁺ et les cellules CD31⁻CD45⁻ (Uezumi *et al.*, 2006). Ces sous-populations sont incapables de se différencier spontanément en myocytes *in vitro*. Après co-culture avec des myoblastes ou induction forcée de MyoD, elles peuvent s'engager dans la lignée myogénique (Asakura *et al.*, 2002; Bachrach *et al.*, 2004; Andersen *et al.*, 2008). Par ailleurs, elles présentent des capacités de différenciation différentes dans les lignées myogénique, angiogénique ou hématopoïétique. La sous-population CD31⁻CD45⁻ présente ainsi un plus grand potentiel de différenciation myogénique que les autres avec également une différenciation mésenchymateuse tandis que les CD31⁺CD45⁻ et CD31⁻CD45⁺ restent respectivement engagées dans la lignée endothéliale et hématopoïétique (Uezumi *et al.*, 2006).

Les cellules SP CD45⁻ du tissu adipeux présentent un enrichissement notamment en actine du muscle lisse, c-met et CD34 ainsi que l'angiopoïétine 2, Flk-1, VE-Cadhérine et CD31, suggérant un phénotype proche des péricytes et des mésoangioblastes (Andersen *et al.*, 2008, 2012).

ii. Potentiel thérapeutique

Une contribution à la formation des lignées lymphoïde et myéloïde a été attribuée *in vivo* aux cellules SP (Goodell *et al.*, 1996). L'administration des cellules SP de la moelle osseuse comme du muscle dans des souris *mdx* irradiées, permet une expression de dystrophine qui est cependant modérée, de l'ordre de 4% de myofibres positives (Gussoni *et al.*, 1999). La participation à la régénération musculaire est également modeste, de l'ordre de 1% seulement de fibres positives pour les protéines des cellules donneuses (Bachrach *et al.*, 2004) après injection intramusculaire et de l'ordre de 5 à 8% après injection systémique (Bachrach *et al.*, 2006). De façon importante, il a été démontré une capacité des cellules SP issues du muscle (Asakura *et al.*, 2002) comme du

tissu adipeux (Andersen *et al.*, 2008) à se différencier en myocytes et en SC après injection intramusculaire chez la souris immunodéficiente. Ce potentiel est davantage marqué pour la fraction CD31⁻CD45⁻ (Uezumi *et al.*, 2006). La cotransplantation de cette fraction avec des myoblastes dans la souris *mdx* améliore la migration et la fusion de ces derniers (Motohashi *et al.*, 2008). Même si la fraction CD45⁻ présente des capacités de différenciation myogénique *in vitro* et *in vivo*, la majorité des cellules SP CD45⁻ possèdent une activité myogénique limitée (McKinney-Freeman *et al.*, 2002, 2003). Les cellules SP sont également capables de s'insérer au niveau de l'endothélium durant la régénération vasculaire (Majka *et al.*, 2003). Délivrées par voie systémique, les cellules SP autologues isolées de souris *mdx* puis corrigées afin d'exprimer la dystrophine, ont la capacité de traverser les capillaires, de rejoindre le tissu musculaire et de fusionner avec les fibres endommagées (Bachrach *et al.*, 2004, 2006). De plus, elles expriment *in situ* le facteur de transcription Pax7 ainsi que la desmine (Bachrach *et al.*, 2006). Les cellules SP obtenues du muscle et enrichies en fraction Sca-1⁺ et CD45⁺ sont capables de générer *in vitro* et *in vivo* des colonies hématopoïétiques mais, en revanche, pas de colonie myogénique *in vitro* ce qui suggère que même si ces cellules SP sont retrouvées dans le tissu musculaire, elles n'en demeurent pas moins des cellules affiliées à la lignée hématopoïétique (McKinney-Freeman *et al.*, 2002, 2003).

3. Cellules PICs

i. Isolement et caractérisation

Une population de progéniteurs musculaires localisés dans l'interstitium et caractérisés par l'expression du marqueur PW1 a été décrite (Mitchell *et al.*, 2010). Ces cellules, appelées PICs pour Cellules Interstitielles PW1⁺/Pax7⁻ sont abondantes à la naissance et déclinent dans les 2 à 3 premières semaines de vie, en maintenant un rapport de 1:1 avec les SC. Le marqueur PW1, qui les caractérise et code une protéine à doigts de zinc, est initialement exprimé dans les cellules du mésoderme pendant le développement embryonnaire et reste exprimé par les cellules musculaires différenciées et par les SC, ce qui suggère un rôle spécifique dans la lignée musculaire (Relaix *et al.*, 1996; Schwarzkopf *et al.*, 2006). Il est également retrouvé dans d'autres types de tissus, comme le système nerveux et la peau (Besson *et al.*, 2011). Les cellules PICs n'expriment aucun marqueur myogénique à l'état basal. Des études ont révélés qu'elles expriment un large nombre de gènes communs aux CSM (Pannérec *et al.*, 2013). Enfin, une population

discrète et transitoire de PICs juvéniles exprime Sca-1 mais disparaît après 3 semaines de développement post-natal (Pannérec *et al.*, 2013). Elle présente une capacité de différenciation myogénique lisse ou squelettique *in vitro* et expriment Pax3, Pax7 et MyoD durant l'engagement dans ce programme (Mitchell *et al.*, 2010). Cependant, elle ne dérive pas des cellules parentales exprimant Pax3 et est donc distincte des SC (Figure 26). Sa capacité de différenciation adipogénique a été démontrée comme étant liée à la présence d'une sous-population exprimant PDGFR α tandis que les cellules PICs présentant une capacité de différenciation myogénique ne l'expriment pas.

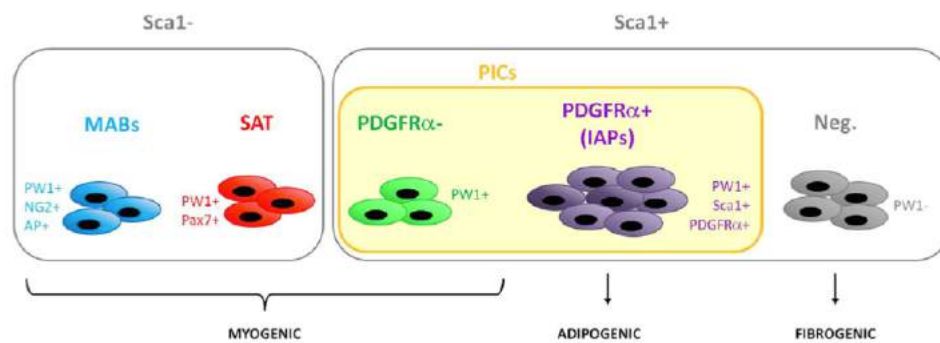


Figure 26. Expression de PW1 dans les cellules souches du muscle (Pannérec *et al.*, 2013). Ce schéma représente la hiérarchie des cellules souches sur la base de l'expression de PW1. Les cellules présentant un potentiel myogénique sont les cellules satellites (SAT), les mésoangioblastes (MABs) et une sous-population de PICs tandis que celles présentant un potentiel adipogénique sont constituées de la fraction IAPs des PICs. Les cellules qui n'expriment pas PW1 donnent naissance aux fibroblastes. IAPs, progéniteurs interstitiaux adipogéniques

ii. Potentiel thérapeutique

Les cellules PICs participent à la régénération musculaire *in vivo* à un niveau comparable à celui des SC (Mitchell *et al.*, 2010) et sont capables de générer des SC ainsi que de renouveler le stock de cellules PICs. Les souris déficientes en Pax7 présentent une augmentation du nombre de cellules PICs durant le développement post-natal, inversement proportionnelle à la diminution du nombre de SC (Mitchell *et al.*, 2010). Tandis que les SC isolées de souris mutantes déficientes en Pax7 montrent un potentiel myogénique robuste, les cellules PICs isolées de ce mutant sont incapables de participer à la myogenèse, démontrant une implication de Pax7 dans le potentiel myogénique des cellules PICs (Mitchell *et al.*, 2010).

4. Cellules ALDH

i. Isolement et caractérisation

L'aldéhyde déshydrogénase 1A1 (ALDH1A1) est une enzyme ubiquitaire détoxifiante impliquée dans le métabolisme des aldéhydes et de l'acide rétinoïque. Il existe 17 isoformes différents de cette enzyme (Douville *et al.*, 2009). Les cellules ALDH⁺ peuvent être retrouvées dans la moelle osseuse, le cordon ombilical et le sang (Storms *et al.*, 1999). Une population cellulaire présentant une forte activité ALDH (ALDH^{br}), appelée SMALD⁺ pour ALDH⁺ du muscle squelettique, a été identifiée dans l'espace endomysial de muscles squelettiques murin et humain (Vauchez *et al.*, 2009).

Les cellules ALDH⁺ représentent une petite fraction (2 à 4%) des cellules mononucléées qui se distinguent des SC, des péricytes/mésangioblastes, myoblastes, cellules myo-endothéliales et CSM par les marqueurs qu'elles expriment. Elles sont négatives pour le CD31, CD45 et CD56. Deux populations de cellules SMALD⁺ présentant un phénotype et des propriétés fonctionnelles distinctes peuvent être isolées du muscle squelettique. Tandis que les cellules SMALD⁺/CD34⁺ présentent un profil mésenchymateux, n'expriment jamais le CD56 et sont capables de se différencier en cellules adipogéniques, les cellules SMALD⁺/CD34⁻ surexpriment rapidement le CD56 *in vitro* et se différencient en myotubes (Vauchez *et al.*, 2009). Il a également été démontré que l'expression ALDH confère une meilleure résistance au stress oxydatif ainsi qu'une meilleure survie après transplantation des myoblastes (Jean *et al.*, 2011) mais également des Muscle-Derived Stem Cells ou MDSC (Vella *et al.*, 2011).

ii. Potentiel thérapeutique

Une contribution robuste à la myogenèse et à la colonisation de la niche satellitaire a été établie pour les cellules humaines ALDH⁺/CD34⁻ après injection intramusculaire dans des souris immunodéficientes irradiées et lésées à la notexine. De façon majeure, les cellules ALDH⁺/CD34⁻ présentent aussi une forte prolifération après leur injection dans un muscle immunodéficient (Vauchez *et al.*, 2009).

5. Cellules souches associées aux vaisseaux sanguins

a. Mésoangioblastes/Péricytes

i. Isolement et caractérisation

Initialement isolés à partir de l'aorte dorsale d'embryons murins (De Angelis *et al.*, 1999), les péricytes/mésoangioblastes (Mabs) ont ensuite été caractérisés chez la souris, le chien et l'Homme que ce soit dans du tissu musculaire squelettique ou cardiaque (Cossu and Bianco, 2003; Sampaolesi *et al.*, 2003, 2006; Dellavalle *et al.*, 2007; Galvez *et al.*, 2008). Ils correspondent à des progéniteurs mésodermiques qui sont définis par l'expression de l'ALP, NG2, CD44, PDGFR β , CD146, Flk1, c-Kit et de l' α -SMA et par leur négativité en CD56. Ils sont également positifs pour les marqueurs mésenchymateux (Crisan *et al.*, 2008) (Figure 27). Elles présentent une forte capacité de prolifération et se différencient spontanément en myotubes, ostéocytes, adipocytes, cellules musculaires lisses et cardiomyocytes *in vitro*.

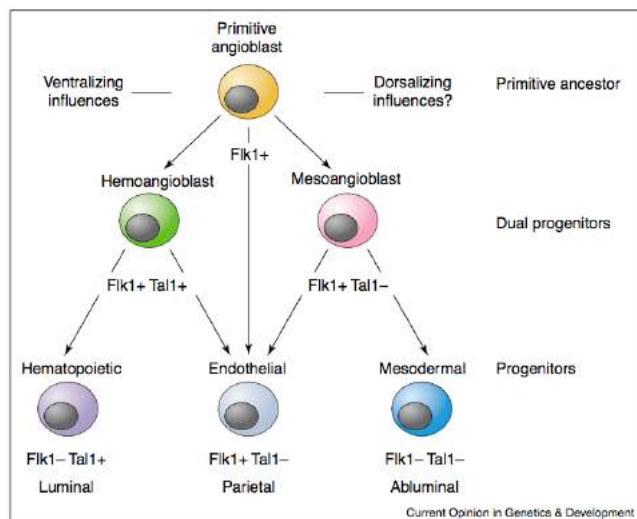


Figure 27. Origine possible des mésoangioblastes (Cossu and Bianco, 2003). Des influences environnementales impriment un potentiel hématopoïétique à des progéniteurs angio-poïétiques. Des signaux de nature encore inconnus préservent un potentiel de différenciation mésodermique à une autre fraction des progéniteurs angio-poïétiques, les mésoangioblastes.

ii. Potentiel thérapeutique

Les premières injections de Mabs issues d'aorte dorsale de souris réalisées dans des embryons de poulet ont révélé leur incorporation rapide dans les vaisseaux sanguins mais aussi leur capacité à coloniser les tissus mésodermiques comme le sang, le cartilage, les os, les muscles striés squelettiques, cardiaques ou lisses (Minasi *et al.*, 2002). Une correction morphologique et fonctionnelle du phénotype des souris α -sarcoglycane a été démontrée suite à l'administration intra-artérielle de Mabs issus de souris saines ou de souris dystrophiques et corrigés par un lentivirus codant l' α -sarcoglycane (Sampaolesi *et al.*, 2003). Un impact de l'administration intracardiaque des

Mabs a également été démontré avec une amélioration de la fonction contractile du ventricule gauche, une augmentation de la vascularisation et une meilleure survie des cardiomyocytes (Galli *et al.*, 2005). Un traitement associant le facteur stromal dérivé-1 (SDF-1), le facteur de nécrose tumorale α (TNF) et une induction d'expression de l' $\alpha 4$ intégrine augmente l'efficacité de migration des Mabs ce qui se traduit par une colonisation massive du tissu musculaire de souris α -sarcoglycane⁻ par les Mabs avec une reconstitution d'environ 80% des fibres exprimant l' α -sarcoglycane (Galvez *et al.*, 2006). Chez la souris double mutante *mdx/utrn*^{-/-}, l'administration intramusculaire de Mabs s'accompagne d'une synthèse de dystrophine et d'utrophine, d'une genèse de nouvelles fibres et d'une meilleure résistance aux lésions avec environ 50 fois moins de dommages musculaires que dans un muscle non injecté. D'autre part, les Mabs se positionnent en loge satellitaire et expriment des marqueurs de SC comme c-met (Berry *et al.*, 2007). Une amélioration du phénotype dystrophique de souris *mdx* a été montrée après transplantation de Mabs issus de souris *mdx* corrigés avec un chromosome artificiel humain épisomal codant le gène entier de la dystrophine. Ces cellules s'intègrent de façon robuste dans le tissu musculaire, donnent de nombreuses fibres dystrophine⁺ ainsi que des SC et améliorent le phénotype 8 mois post-transplantation (Tedesco *et al.*, 2011). Des péricytes humains administrés par voie systémique chez la souris *scid/mdx* sont capables de traverser la barrière endothéliale et de migrer dans le muscle dystrophique où elles participent à la régénération musculaire en restaurant la dystrophine et en colonisant la niche satellitaire (Dellavalle *et al.*, 2011, 2007). Les Mabs issus de personnes saines ou de patients DMD puis transduits avec un lentivirus codant pour une mini- ou micro-dystrophine sont capables, après injection intra-artérielle chez la souris *scid/mdx*, de rejoindre le tissu musculaire, de permettre la réexpression de dystrophine ainsi qu'une amélioration clinique (Dellavalle *et al.*, 2007). Des résultats identiques sont obtenus lors de greffes allogéniques chez le chien GRMD (Sampaolesi *et al.*, 2006). La correction des Mabs à l'aide de lentivirus contenant le site nNOS sur la séquence de la dystrophine, conduit également à une forte expression de dystrophine, une restauration du complexe DGC et une expression de nNOS (Meng *et al.*, 2016). Récemment, Noviello *et al.* ont montré une faible immunogénicité des Mabs en condition basale avec une absence de réponse des cellules T allogéniques et une résistance à la lyse médiée par les lymphocytes T. Après traitement à l'IFN ou après différenciation, les Mabs deviennent en revanche sensibles à la lyse et provoquent une réponse allogénique

(Noviello *et al.*, 2014). Le premier essai clinique de phase I/IIa a été réalisé sur cinq patients DMD avec quatre administrations intra-artérielles de doses croissantes de Mabs HLA-compatibles à 2 mois d'intervalle. Si les mesures fonctionnelles ont permis de montrer une stabilisation temporaire de 2 des 3 patients ambulatoires, aucune amélioration fonctionnelle n'a été observée. Un faible niveau d'ADN des cellules donneuses a été retrouvé de même qu'une absence de dystrophine au sein des muscles. De façon importante, l'un des patients a développé une attaque cérébrale dont la corrélation avec l'administration des cellules reste à démontrer (Cossu *et al.*, 2015).

b. Cellules myo-endothéliales

i. Isolement et caractérisation

Les progéniteurs myogéniques et endothéliaux ont été initialement identifiés dans l'espace interstitiel du muscle squelettique de souris sur la base de l'expression du CD34 (Tamaki *et al.*, 2002). Ces cellules sont Sca-1⁺ (94%) et négatives pour CD14, CD31, CD49, CD73, c-kit et Flk-1 (Tamaki *et al.*, 2002, 2003). Elles expriment le transcrit c-met mais aucun marqueur myogénique et se distinguent des SC par leur expression du Bcrp1/ABCG2 à l'échelle du transcrit. Une expression du CD56, CD34 et CD144 est présentée pour les cellules humaines (Zheng *et al.*, 2007). Après trois jours en culture, elles expriment à l'échelle du transcrit les marqueurs myogéniques Pax3, Pax7, Myf-5, MyoD, Myf-6, myogénine et m-cadhérine. Elles forment des cultures clonales *in vitro* et possèdent le potentiel de différenciation adipogénique, endothélial et myogénique (Tamaki *et al.*, 2002).

ii. Potentiel thérapeutique

Une différenciation endothéliale vasculaire et myogénique a été démontrée *in vivo* pour les cellules myo-endothéliales murines (Tamaki *et al.*, 2002, 2005). Une augmentation de la masse musculaire et de la fonction contractile a été répertoriée après injection IM chez la souris C57BL/6 lésée (Tamaki *et al.*, 2007). Ces cellules présentent également une capacité de différenciation cardiaque *in vivo* et participent à l'amélioration de la fonction cardiaque après administration locale dans un modèle de souris atteinte d'infarctus du myocarde (Tamaki *et al.*, 2008).

6. MDSC

i. Isolement et caractérisation

Les cellules souches dérivées du muscle ou MDSC ont été initialement isolées chez la souris sur la base d'un déficit d'adhérence initial. Le protocole d'isolement consiste en une digestion mécanique et enzymatique du tissu musculaire suivi d'un ensemencement de la suspension de cellules mononucléées extraites du muscle puis d'un transfert successif du surnageant de culture, de façon à obtenir une fraction marginale représentant de l'ordre de 1% des cellules totales dérivées du muscle (Qu *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2000) (Figure 28).

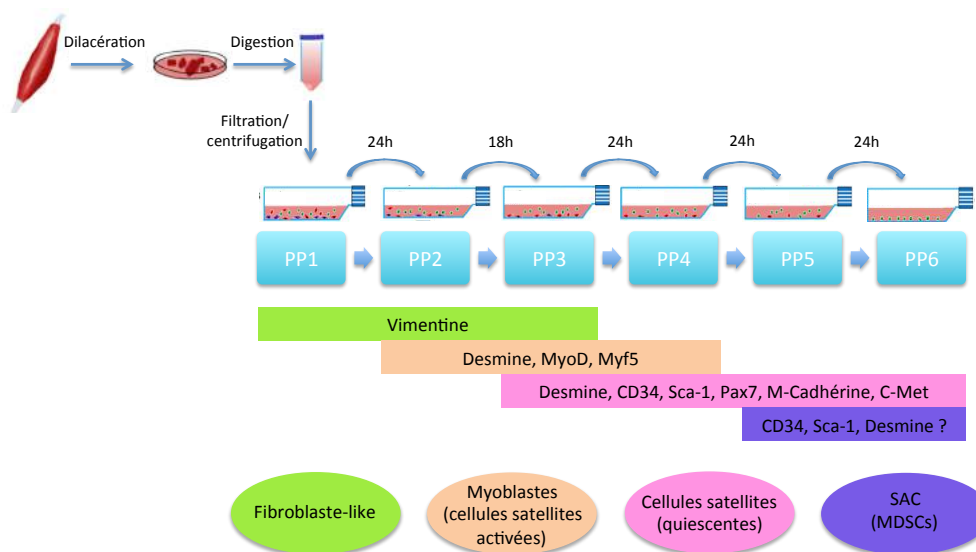


Figure 28. Profil des différentes fractions isolées par pré-plating (d'après Gharaibeh *et al.*, 2008; Lavasani *et al.*, 2013). PP1 à PP6 représentent les pré-platings 1 à 6. SAC: Slow adhering cells

Les MDSC murines sont caractérisées par une expression de Flk-1, Sca-1, desmine et sont négatives pour le CD45, m-cadhérine et CD34 (Jankowski *et al.*, 2001). Ce phénotype varie en fonction des études et des techniques d'isolement. Ainsi, les MDSC sont parfois présentées comme positives pour le CD133, la vimentine et le CD105 et négatives pour Klf-1, VE-cadhérine et Bcl2 (Alessandri *et al.*, 2004). Les MDSC humaines se définissent par l'expression de marqueurs mésenchymateux et se distinguent des myoblastes, notamment par l'expression plus faible du CD146, de la desmine et du CD56 (Chirieleison *et al.*, 2012).

Les MDSC murines sont présentées comme dotées d'une très forte capacité de prolifération étant capables d'assumer 300 doublement de populations (PDs) avec une préservation de leur phénotype pendant au moins 200 PDs. Elles conservent par ailleurs des capacités de régénération musculaire *in vivo* comparables à celles ayant subi une

amplification minimale (Deasy *et al.*, 2005). Tout comme les cellules SP, la différenciation myogénique des MDSC est largement tributaire de l'expression de Pax7. Ces cellules sont multipotentes, donnant *in vitro* et *in vivo* les lignées myogénique, adipogénique, ostéogénique, chondrogénique ainsi qu'hématopoïétique (Qu-Petersen *et al.*, 2002; Cao *et al.*, 2003). D'autre part, les MDSC présentent une résistance au stress oxydatif plus importante que les myoblastes, notamment grâce à l'expression de la superoxyde dismutase et la glutathione, enzyme dégradant les composés oxygénés et qui leur confèrent un avantage en terme de survie mais également de différenciation (Urish *et al.*, 2009).

Selon les conditions de culture employées, ces cellules possèdent des caractéristiques distinctes. Placées sur des supports à faible niveau d'adhérence ou ULA pour Ultra-Low Attachment, elles forment notamment des structures particulières appelées myosphères ou cellules progénitrices dérivées des myosphères (MDPC). Les myosphères sont des amas de cellules rondes capables de proliférer en suspension tout en conservant cette morphologie pendant plusieurs mois (Arsic *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2011). Chez la souris, ces myosphères expriment Sca-1, CD29, CD90 et CD34 mais sont négatives pour CD45, CD31 et les marqueurs myogéniques Pax7, Myf5 et MyoD (Westerman *et al.*, 2010). Chez l'Homme, elles expriment Pax7, l'ADH1, MyoD et la Desmine ainsi que les marqueurs de pluripotence Nanog, Sox2 et Oct3/4 (Wei *et al.*, 2011). De façon originale, les myosphères se différencient, sans fusion cellulaire, en fibres contractiles mononucléées, exprimant la myogénine et la chaîne lourde de la myosine. L'exposition de la myosphère à des molécules inductrices spécifiques provoque une différenciation adipogénique et ostéogénique (Sarig *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2011). Ces myosphères, placées sur des supports autorisant l'adhérence, ré-adhèrent au support et forment une monocouche de cellules MyoD⁺ (Sarig *et al.*, 2006) appelées par certains auteurs MDACs (Westerman *et al.*, 2010). Ces cellules sont assez similaires aux myoblastes, expriment les marqueurs myogéniques et se différencient aisément en myotubes multinucléés.

ii. Potentiel thérapeutique

Une capacité à traverser la barrière endothéliale, à rejoindre le tissu musculaire et à réexprimer la dystrophine a été attribuée aux MDSC murines après administration intra-artérielle chez la souris *mdx* (Torrente *et al.*, 2001). Leur administration s'accompagne de 10 fois plus de fibres dystrophine⁺ qu'après celle de myoblastes 30 jours après

transplantation (Qu-Petersen *et al.*, 2002). Une meilleure efficacité thérapeutique a été attribuée pour la fraction CD34⁺ après administration locale chez la souris *mdx* avec un index de régénération, un nombre de fibres exprimant la dystrophine et une capacité de fusion plus importants (Jankowski *et al.*, 2002b). Une expression de la L-sélectine favoriserait l'adhérence des MDSC à l'endothélium et le tropisme vers le muscle (Torrente *et al.*, 2003). Des capacités de régénération supérieures sont rapportées pour les MDSC issues de souris femelles, ce qui pourrait être dû à des facteurs hormonaux ou à la différence de réponse au stress cellulaire observée entre les cellules mâles et femelles (Deasy *et al.*, 2007). Concernant les myosphères, après inoculation intramusculaire chez la souris nude lésée, elles participent à la régénération musculaire en formant des fibres multinucléées matures (Sarig *et al.*, 2006; Westerman *et al.*, 2010). La transplantation intracardiaque de MDSC murines chez la souris *mdx* se traduit par la formation majoritaire de myocytes hybrides qui expriment la dystrophine et présentent des marqueurs phénotypiques squelettiques et cardiaques (Payne *et al.*, 2005). Malgré ces limites, il a été montré que la greffe de MDSC dans des cœurs de souris infarcis s'accompagne d'une néovascularisation, prévient le remodelage tissulaire cardiaque et permet une amélioration de la fonction cardiaque et ce de façon plus efficace que les myoblastes (Oshima *et al.*, 2005). Comparées aux myoblastes, une meilleure efficacité dans la régénération musculaire a été démontrée pour les MDSC humaines après injection intramusculaire chez la souris *scid/mdx* avec cependant un nombre de fibres dystrophine⁺ assez faible (Chirieleison *et al.*, 2012).

VI. Cellules iPS

i. Isolement et caractérisation

Les cellules iPS ou cellules pluripotentes induites ont été initialement générées par la transduction de fibroblastes murins avec quatre facteurs de pluripotence, à savoir Oct3/4, Sox2, c-Myc et Klf4 (Takahashi and Yamanaka, 2006). Ces cellules présentent une morphologie, un niveau de prolifération et un phénotype comparables aux cellules souches embryonnaire (ES). Leur administration sous-cutanée chez la souris nude s'accompagne de formations tumorales contenant différents types de tissus des trois feuillets embryonnaires. Après injection dans le blastocyste, les cellules iPS contribuent au développement embryonnaire de la souris (Takahashi and Yamanaka, 2006). Selon la

même démarche, des cellules iPS ont été générées à partir de fibroblastes de patients (Takahashi *et al.*, 2007).

ii. Potentiel thérapeutique

En 2010, des cellules iPS issues de souris *mdx* et de patients DMD ont été corrigées par incorporation de chromosome humain artificiel (HAC) contenant l'ensemble de la séquence de la dystrophine ce qui a aboutit à une expression épisomale stable du gène et permis d'éviter les mutations insertionnelles. Des souris chimériques obtenues à partir des cellules iPS murines corrigées ont présenté une expression tissu-spécifique des différents isoformes de la dystrophine et une localisation correcte de la protéine dans le tissu musculaire (Kazuki *et al.*, 2010).

De larges foyers de fibres dystrophine⁺ ainsi que d'une amélioration de la contractibilité des muscles ont été démontré chez la souris *mdx* après la transplantation d'iPS issues de fibroblastes de souris C57/BL6 exprimant de façon conditionnelle Pax7 (Darabi *et al.*, 2011).

Des fibroblastes et myoblastes isolés de patients atteints de LGMD ont été reprogrammés pour générer des cellules iPS (Tedesco *et al.*, 2012) (Figure 29) qui ont ensuite été soumis à un protocole de différenciation pour produire des mésoangioblastes. Ces derniers ont finalement été transduits avec un lentivirus pour apporter le gène de l' α -sarcoglycane et de MyoD avant d'être administrés localement dans le modèle murin immunodéficient α -sarcoglycane^{null} (Tedesco *et al.*, 2012). Par cette démarche expérimentale, une expression d' α -sarcoglycane associée à une amélioration du phénotype dystrophique a pu être démontrée ainsi qu'une contribution des cellules injectées au stock de péricytes dans l'interstitium.

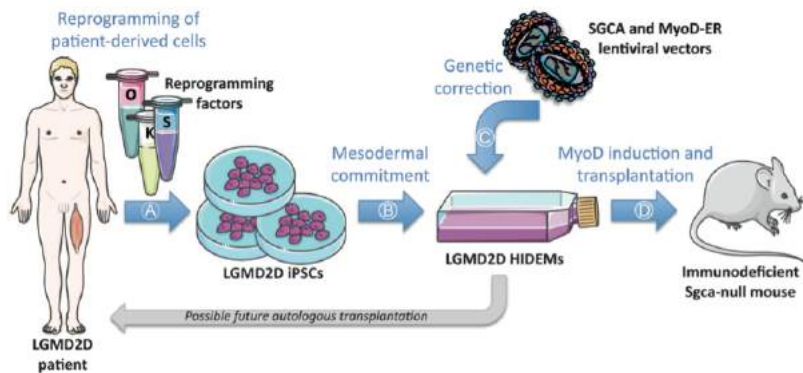


Figure 29. Stratégie de thérapie cellulaire basée sur l'administration d'iPS (Tedesco *et al.*, 2012). (A) Des fibroblastes et myoblastes sont isolés de biopsies musculaires de patients atteints de dystrophie des ceintures de type 2D et des cellules iPS générées par reprogrammation à l'aide des facteurs Oct3/4 (O), Klf4 (K) et Sox2 (S). (B) Les cellules iPS sont

différenciées dans la lignée mésodermale et plus spécifiquement en mésoangioblastes (HiDEMs). (C) Les HiDEMs sont transduits à l'aide d'un lentivirus portant le gène thérapeutique pour corriger l'anomalie ainsi qu'une version inducible de MyoD pour augmenter leur capacité de différenciation myogénique. (D) Les HiDEMs sont transplantés dans le modèle murin immunodéficient de la LGMD2D.

De façon similaire, une expression de marqueurs myogéniques, une formation de myotubes *in vitro* ainsi qu'une participation à la régénération musculaire dans le modèle immunodéficient dystrophique Rag2^{-/-}DMD^{-/-} ont été relatées à partir de cellules iPS humaines issues de fibroblastes de patients DMD transduites avec un adénovirus MyoD (Goudenege *et al.*, 2012). L'injection IM de cellules iPS exprimant Pax7 de façon conditionnelle chez la souris immunodéficiente NSG-mdx^{4Cv} s'est également accompagnée de la formation d'un large nombre de fibres exprimant la dystrophine, d'une augmentation de la force musculaire et d'une colonisation de la niche satellitaire (Darabi *et al.*, 2012).

Malgré ces résultats prometteurs, un certain nombre de limites à l'utilisation des cellules iPS en clinique peuvent être relevées. La plus importante concerne les aspects de sécurité consécutifs à la transduction des cellules. Il a en effet été démontré une capacité de ces cellules à former des tumeurs après injection sous-cutanée plus rapidement encore que les cellules ES (Gutierrez-Aranda *et al.*, 2010) ainsi qu'une expression d'oncogènes après reprogrammation cellulaire (Zhang *et al.*, 2012). Les cellules iPS doivent également être induites dans le programme myogénique, ce qui multiplie les étapes de production, rendant le protocole de reprogrammation lourd et coûteux.

VII. Synthèse sur l'exploration des cellules souches

L'identification de cellules souches au sein des tissus adultes a ouvert de nouvelles perspectives d'applications thérapeutiques pour un large nombre de pathologies parmi lesquelles les maladies neuromusculaires comme les dystrophies musculaires. Les travaux de caractérisation multiples ont conduit au cours des quinze dernières années à l'identification de caractéristiques majeures pour ces populations marginales, les positionnant comme de potentielles candidates pour la mise en place de thérapie cellulaire pour des maladies restant encore aujourd'hui sans traitement. Cependant, l'accumulation de résultats expérimentaux discordants selon l'espèce considérée pour une même population d'intérêt mais également la non reproductibilité des données entre les laboratoires de recherche ou encore la présentation de résultats négatifs en essais cliniques témoignent de l'existence d'une réelle complexité dans l'exploration de ces cellules souches et la confection d'un médicament de thérapie innovant (Tableau X, Figure 30).

Tableau X. Avantages et limites des différents candidats cellulaires à la thérapie des DM (Meng et al., 2011a).

Type cellulaire	Avantages	Limites
SC	<ul style="list-style-type: none"> - Contribution à la régénération musculaire après injection IM - Contribution au stock de SC - Isolement d'une population relativement pure 	<ul style="list-style-type: none"> - Faible nombre de cellules disponibles - Contribution à la régénération musculaire uniquement si fraîchement isolées - Ne peuvent pas être délivrées par voie systémique - Cellules humaines non testées <i>in vivo</i>
Myoblaste	<ul style="list-style-type: none"> - Facilité d'isolement et d'expansion <i>in vitro</i> - Contribution à la régénération musculaire après injection IM - Contribution au stock de SC 	<ul style="list-style-type: none"> - Efficacité dans la régénération et la contribution au stock de cellules de réserve moindre que celle des SC - Pas d'injection systémique possible
MDSC	<ul style="list-style-type: none"> - Facilité d'expansion <i>in vitro</i> - Contribution à la régénération musculaire après injection IM et IA 	<ul style="list-style-type: none"> - Origine inconnue - Pas de démonstration de reconstitution de SC
Cellule myo-endothéliale	<ul style="list-style-type: none"> - Facilité d'expansion <i>in vitro</i> - Contribution à la régénération musculaire après injection IM 	<ul style="list-style-type: none"> - Pas de démonstration de reconstitution de SC - Pas de démonstration après injection systémique - Difficultés à préparer une population pure
Mésoangioblaste/péricyte	<ul style="list-style-type: none"> - Facilité d'expansion <i>in vitro</i> - Contribution à la régénération musculaire après injection IM et IA - Reconstitution du stock de SC 	<ul style="list-style-type: none"> - Difficultés à préparer une population pure - Capacité régénérative variable en fonction des lots isolés
Cellule AC133 ⁺	<ul style="list-style-type: none"> - Contribution à la régénération musculaire après injection IM et IA - Reconstitution du stock de SC 	<ul style="list-style-type: none"> - Difficultés à préparer une population pure - Difficulté d'expansion <i>in vitro</i>
Cellule PIC	<ul style="list-style-type: none"> - Contribution à la régénération musculaire après injection IM - Reconstitution du stock de SC et de cellules PICs endogènes 	<ul style="list-style-type: none"> - Difficultés à préparer une population pure - Pas de démonstration après injection systémique - Cellules humaines non testées <i>in vivo</i>
CSH	<ul style="list-style-type: none"> - Facilité d'isolement - Bien caractérisées - Délivrables par voie systémique 	<ul style="list-style-type: none"> - Contribution à la régénération musculaire très limitée - Cellules satellites et fibres musculaires dérivées des CSH non fonctionnelles
CSM	<ul style="list-style-type: none"> - Facilité d'isolement et d'expansion <i>in vitro</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - Contribution à la régénération musculaire très limitée
ES/iPS	<ul style="list-style-type: none"> - Facilité d'expansion <i>in vitro</i> - Contribution à la régénération musculaire après injection IM 	<ul style="list-style-type: none"> - Problèmes éthiques - Nécessité d'induction préalable dans la lignée myogénique - Tumorogénèse possible - Pas de démonstration systémique

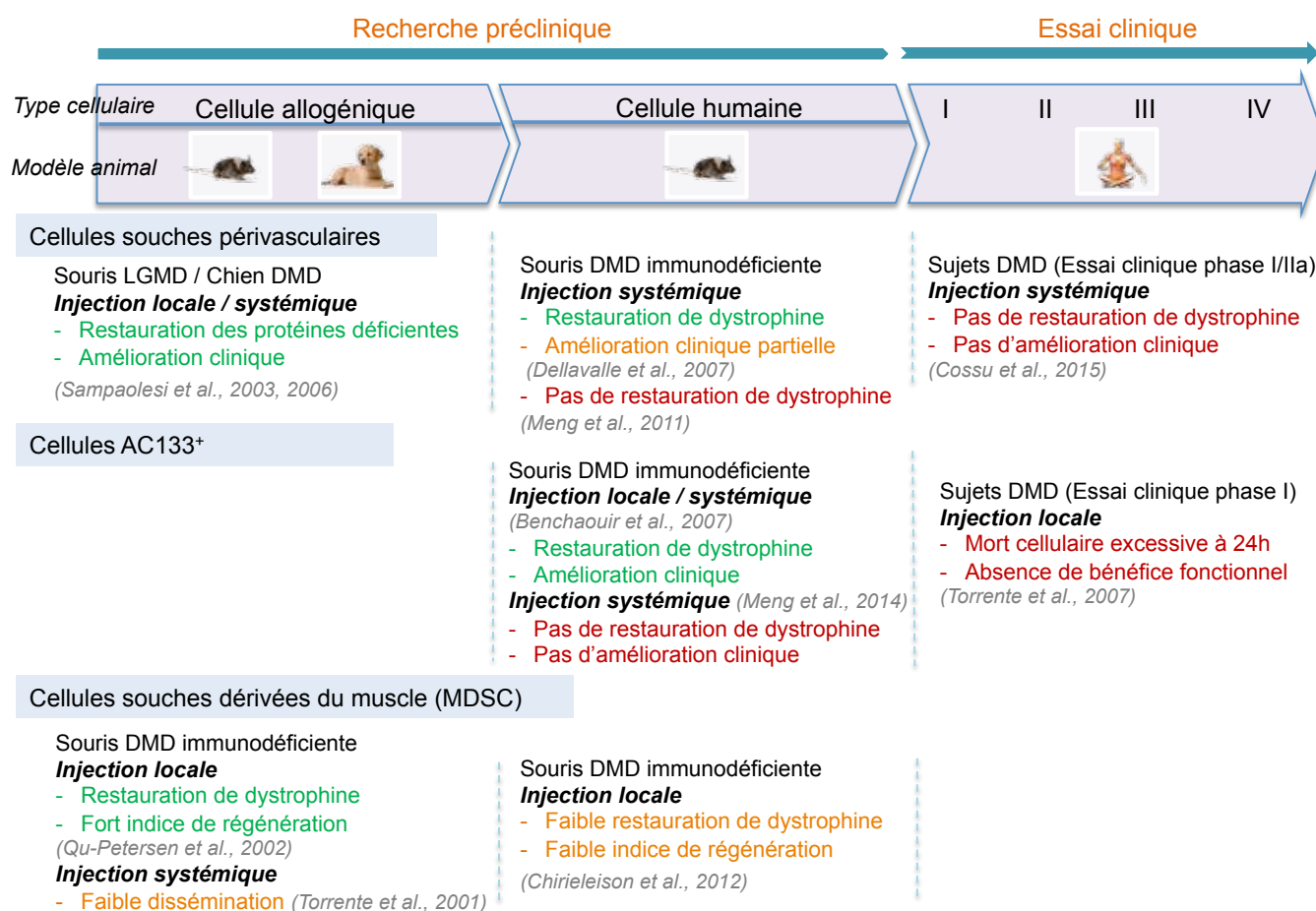


Figure 30. Bilan des études pré-cliniques et cliniques concernant les principaux candidats cellulaires à la thérapie de la DMD (Charrier, 2016, communication personnelle). Les éléments favorables à une poursuite vers un essai clinique sont indiqués en vert, les résultats nécessitant des données complémentaires en orange et les limites majeures en rouge.

Chapitre 4. Positionnement du travail de thèse

I. Contexte scientifique

A partir de 2005, l'UMR 703 INRA/Oniris a développé un programme de recherche dont l'objectif a été d'identifier un candidat cellulaire pour le traitement de la DMD. S'appuyant sur la technique de preplating initialement développé par l'équipe de Johnny Huard, l'UMR a isolé tout d'abord dans un modèle aviaire puis chez le chien, une population de cellules souches dérivées du muscle, les cellules MuStem (Rouger *et al.*, 2007, 2011). Elles se définissent comme des progéniteurs myogéniques précoces caractérisés par une capacité de prolifération importante et une oligopotence étant capables *in vitro* de se différencier en adipocytes, ostéocytes et myocytes. L'administration intramusculaire de cellules cMuStem isolées à partir de muscles de chien sain chez le chien dystrophinopathe GRMD immunosupprimé s'accompagne d'une capacité de survie supérieure comparée à celle des myoblastes ainsi que d'une participation à la régénération musculaire avec la formation de fibres dystrophine⁺ et de cellules en position satellite. De façon majeure, il a été établi la preuve de concept de leur administration systémique avec une stabilisation de l'état clinique général des chiens transplantés et un remaniement tissulaire marqué avec notamment une augmentation de l'activité de régénération et une ré-expression de dystrophine malgré une intensité faible (Figure 31).

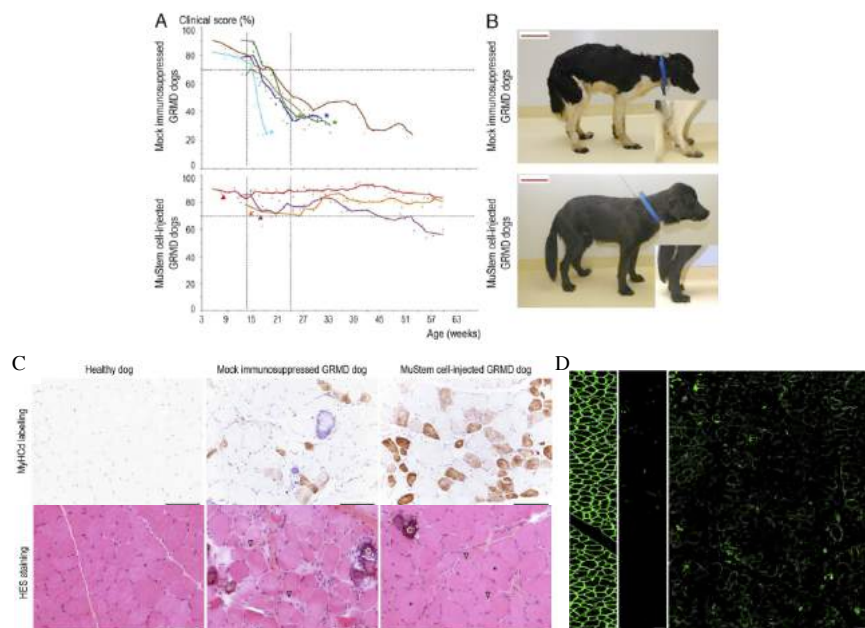


Figure 31. Comportement *in vivo* des cellules cMuStem après administration systémique (Rouger *et al.*, 2011). (A) Evaluation clinique des chiens GRMD. Le score clinique est déterminé de façon hebdomadaire et exprimé en pourcentage, 100% représentant le score d'un chien sain. (B) Vue latérale droite d'un chien GRMD mock de 36 semaines (haut) et d'un chien GRMD traité par injection de cellules MuStem (bas). Le transfert de poids sur les pattes antérieures et la plantigradie du chien non traité ainsi que la posture normale chez le chien traité sont illustrés dans l'insert (C) Activité de régénération évaluée par immunomarquage de la chaîne lourde de la myosine développementale (MyHCd) (marron) et coloration hématoxyline-éosine-safran de muscles canins. Les fibres hypertrophiques (astérisx), la fibrose (tête de flèche) et les fibres calcifiées (c) sont indiquées. (D) Expression de la dystrophine (vert) dans le muscle de chien GRMD 4 mois après le protocole d'injection des cellules cMuStem.

II. Objectifs du travail de thèse

Les résultats exposés ci-dessus ont permis d'identifier des caractéristiques intéressantes de cette population de cellules souches adultes MuStem sur le plan du potentiel régénératif musculaire, laissant envisager un possible intérêt à utiliser cet agent dans une démarche de thérapie cellulaire. Des travaux préliminaires à mon doctorat ont suggéré qu'une adaptation du protocole d'isolement permettait d'isoler une fraction de cellules à adhérence retardée à partir de prélèvements musculaires humains, ces dernières présentant un fort pouvoir prolifératif et une myogénicité *in vitro* similaires à celles précédemment décrites pour les cellules MuStem canines. Dans ce contexte, l'UMR a engagé un programme de recherche translationnelle dont l'objet a été de définir si le candidat MuStem peut être envisagé comme produit thérapeutique. Au sein de ce programme, le projet de thèse qui m'a été confié a eu pour finalité d'apporter les réponses à trois questions essentielles en lien avec la caractérisation de l'agent humain et aux modalités de transplantation de la population MuStem :

- I. Sommes-nous en capacité d'isoler les cellules MuStem humaines avec des caractéristiques phénotypiques et comportementales similaires à celles observées pour les cellules canines ?
- II. Un comportement immunomodulateur peut-il être attribué aux cellules MuStem humaines, comme précédemment décrit pour les CSM et les mésoangioblastes ?
- III. Pouvons-nous optimiser le protocole d'administration systémique de la population MuStem allogénique par une limitation du traitement immunosuppresseur connu pour générer des effets indésirables majeurs sur le long terme ?

Résultats expérimentaux

La connaissance scientifique possède en quelque sorte des propriétés fractales : nous aurons beau accroître notre savoir, le reste - si infime soit-il - sera toujours aussi infiniment complexe que l'ensemble de départ.

Isaac Asimov

Chapitre 1. Exploration des caractéristiques phénotypiques et du comportement myogénique de la population MuStem humaine

I. Positionnement

La découverte des cellules souches adultes dans les années 2000 a été à l'origine de nouvelles propositions thérapeutiques pour la DMD. Malheureusement, aucune étude clinique n'a pour le moment apporté de résultats concluants pour proposer un produit de biothérapie innovant. En 2011, l'UMR 703 PAnTher a isolé une population de cellules souches dérivées du muscle canin, la population MuStem, et fait la preuve de concept de son administration systémique en contexte allogénique chez le chien dystrophinopathe GRMD. Malgré ces résultats prometteurs, la proposition d'un candidat d'intérêt thérapeutique est conditionnée par la capacité à isoler une population similaire chez l'Homme présentant des caractéristiques phénotypiques et comportementales identiques.

La première partie de mon travail de thèse a consisté à caractériser la population MuStem humaine (hMuStem) d'une part en terme phénotypique avec l'étude d'un ensemble de marqueurs spécifiques permettant de la positionner par rapport aux autres populations cellulaires d'intérêt mais aussi dans le programme myogénique et d'autre part en terme comportemental *in vitro* et *in vivo* avec l'étude de son potentiel myogénique.

II. Résumé de la démarche expérimentale

Le détail du matériel et méthodes utilisés étant décrit dans l'article joint ci-après, je ne ferai ici qu'un résumé des principaux points méthodologiques.

L'obtention de prélèvements musculaires humains a été réalisée grâce à un partenariat mis en place avec le CHU de Nantes dans le cadre d'un dossier de biocollection enregistré auprès de la Direction de la recherche clinique. Nous avons ainsi eu accès à des déchets opératoires de muscles posturaux ou locomoteurs issus de patients âgés de 15 à 51 ans, ne présentant pas de pathologie musculaire et opérés principalement dans un contexte de scoliose malformative. La difficulté d'obtenir des muscles locomoteurs ne nous a pas permis d'acquérir suffisamment d'échantillons sur la durée de ma thèse pour mener à bien une étude comparative stricte avec les muscles posturaux. Une fois les

cellules hMuStem isolées, une analyse phénotypique a été menée par immunocytochimie, RT-PCR, mais aussi cytométrie en flux dans le cadre de la mise en place d'une collaboration à la fois avec la société MacoPharma et Blandine Lieubeau de l'USC1383 INRA/Oniris/Université de Nantes. Cette caractérisation phénotypique a été complétée par une étude du comportement de différenciation *in vitro* par la mise au point de protocole d'induction myogénique, adipogénique, ostéogénique et endothélial. Enfin, une collaboration avec l'Institut de Myologie à Paris m'a permis d'administrer les cellules hMuStem par voie intramusculaire dans des souris immunodéficientes Rag2⁻IL2rb⁻ cryolées afin d'évaluer leur capacité de régénération musculaire *in vivo*.

III. Résumé des résultats obtenus

Dans cette étude, nous décrivons pour la première fois le candidat cellulaire MuStem issu de tissus musculaires humains. Nous montrons que la population obtenue *in vitro* est polyclonale et morphologiquement composée d'une fraction de petites cellules rondes réfringentes et d'une fraction majoritaire de cellules fines et fusiformes. Une forte capacité proliférative est également mise en évidence pour ces cellules avec plus de 23 doublements de population assurés sur une période de 38 jours soit un temps de doublement inférieur à 1,7 jour. Sur le plan phénotypique, nous établissons qu'à l'image des cellules canines, la population hMuStem correspond à des progéniteurs myogéniques précoces d'origine périvasculaire comme en atteste la combinaison des marqueurs myogéniques CD56, Myf5, desmine et péricytaire mésenchymateux CD140b, CD146, ALP, CD29, CD44, CD73 ou encore CD90, CD105. La population est par ailleurs exempte de cellules contaminantes de type hématopoïétique, endothélial. Une oligopotence des cellules hMuStem est démontrée avec une différenciation myogénique, adipogénique et ostéogénique révélée par coloration spécifique et expression de marqueurs des lignées considérées.

De façon majeure, l'administration de cellules hMuStem dans un muscle lésé de souris immunodéficiente montre une capacité d'intégration au sein du tissu musculaire et plus spécifiquement une participation active à la régénération musculaire avec jusqu'à 80% de noyaux retrouvés dans les fibres musculaires et la production de protéines humaines que sont la dystrophine et la spectrine.

Ces résultats ont fait l'objet d'un article actuellement en révision dans American Journal of Pathology (numéro d'identification : AJP16-0377)

IV. Article

Regenerative myogenic potential of human MuStem cells following transplantation into injured skeletal muscle

Judith Lorant,^{1,2} Cindy Schleder,^{1,2} Florence Robriquet,^{1,2,3} Blandine Lieubeau,^{2,4} Elisa Négroni,⁵ Charlotte Saury,^{1,2,6} Isabelle Leroux,^{1,2} Lucie Chabrand,⁶ Sabrina Viau,⁶ Candice Babarit,^{1,2} Mireille Ledevin,^{1,2} Laurence Dubreil,^{1,2} Antoine Hamel,⁷ Armelle Magot,⁸ Chantal Thorin,⁹ Laëtitia Guevel,^{1,2,3} Bruno Delorme,⁶ Yann Péréon,⁸ Gillian Butler-Browne,⁵ Vincent Mouly,⁵ and Karl Rouger^{1,2}

¹INRA, UMR 703 PAnTher, Nantes, F-44307, France

²LUNAM Université, Oniris, École nationale vétérinaire, agro-alimentaire et de l'alimentation Nantes-Atlantique, Nantes, F-44307, France

³Université de Nantes, Nantes, France

⁴INRA, USC 1383, Oniris Université de Nantes, EA 4644 IECM, Nantes, F-44307, France

⁵Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, INSERM UMRS974, CNRS FRE3617, Center for Research in Myology, 47 Bd de l'Hôpital, Paris, F-75013, France

⁶MacoPharma, Biotherapy division, Mouvaux, F-59420, France

⁷Service de Chirurgie Infantile, Centre Hospitalier Universitaire Hôtel-Dieu, Nantes, F-44093, France

⁸CHU de Nantes, Centre de Référence des maladies neuromusculaires Nantes-Angers, Service des Explorations Fonctionnelles, Hôtel-Dieu, Nantes, F-44093, France

⁹Laboratoire de Physiopathologie Animale et Pharmacologie fonctionnelle, F-44307, Nantes, France

Number of text pages: 48; 4 figures, 2 tables, 4 supplementary figures and 5 supplementary tables.

Short running head: Phenotypic features of hMuStem cells

Grant: This research was supported by funds from the “Association Française contre les Myopathies” (AFM N°15990) and the FEDER (Fonds Européens de Développement Régional N°37085 and 38436). It was carried out in the context of the IHU-Cesti project that received French government financial support managed by the National Research Agency via the investment for the future programme ANR-10-IBHU-005. The IHU-Cesti project is also supported by Nantes Metropole and the Pays de la Loire Region. The recipient of all these grants was K.R.

*Correspondence: Karl Rouger (K.R.); INRA, UMR 703, École Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l’Alimentation Nantes-Atlantique (Oniris), Route de Gachet, CS. 40706, F-44307 Nantes, France; Phone: +33 (0) 240 687 873; Fax: +33 (0) 240 180 002; E-mail: karl.rouger@nantes.inra.fr; Address reprint requests to Karl Rouger

Disclosure: None declared.

ABSTRACT

Systemic delivered allogeneic MuStem cells contribute to persisting stabilization of the GRMD dog clinical status and muscle degenerative process. However, it remains unknown whether the human counterpart could be identified, considering recent demonstrations of divergent features between species for several somatic stem cells. Here, we report that MuStem cells reside in human muscle and display a high proliferation potential allowing generating clinically relevant amount of cells. We show that they reproducibly correspond to a population of early myogenic-committed progenitors with perivascular mesenchymal imprint, revealing a blood vessel wall origin. In addition, these oligopotent cells are negative for the classical pluripotent stem cell markers and exhibit interesting survival behavior under oxidative stress. Importantly, hMuStem cells display a regenerative myogenic potential following transplantation into injured muscle of immunodeficient mice. Together, our findings provide new insights supporting the notion that hMuStem cells could represent a potential therapeutic candidate for dystrophic patients.

INTRODUCTION

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is an X-linked recessive muscle disorder that represents the most common form of muscular dystrophy, affecting about one in 3,500 to 5,500 male births [1-2]. It is caused by mutations or deletions in the dystrophin gene, which gives rise to the lack of the protein, resulting in muscle fiber degeneration followed by severe endomysial sclerosis [3]. This leads to progressive muscle weakness and premature death near 30 years of age [4-5]. Currently, there is no effective treatment for DMD although the development of pharmacological strategies as well as viral-based transfer of shorter form of dystrophin, oligonucleotide induced exon-skipping and cell therapy strategies based on the use of precursor cells [6].

In cell-based strategy, intramuscular (IM) injections of murine [7-8] or human [9-10] myoblasts generated encouraging results with demonstration of dystrophin expression restoration in the *mdx* mice corresponding to the DMD murine model. Nevertheless, limited successes were subsequently obtained on clinical trials showing only poor dystrophin⁺ fiber formation and no clinical benefit [11-12]. These disappointing results were mainly due to massive death and limited dissemination of injected cells [13-15]. Over the past few years, several cell types distinct from satellite cells (SC) and exhibiting myogenic fate after engraftment into damaged or diseased muscle have been described as blood circulating cells, muscle-derived stem cells (MDSC), vessel-associated stem cells, mesenchymal stem cells (MSC) or interstitial cells [16-23]. After IM or intra-arterial (IA) injection in *scid/mdx* mice, blood- and muscle-derived CD133⁺ cells were able to participate in muscle regeneration and to colonize the SC niche [16, 23]. Such cells were even more effective than myoblasts when injected intramuscularly in *Rag*^{-/-} *gC*^{-/-} *C5*^{-/-} mice [24]. Human mesoangioblasts (Mabs)/pericyte-derived cells crossed the vessel barrier following IA injection in *scid/mdx* mice and colonized host muscle where they generated numerous human dystrophin⁺ fibers and replenished the SC pool [17]. In addition, DMD Mabs/pericytes transduced with a lentiviral vector expressing human mini- or micro-dystrophin were shown to reach the muscle tissue and participate to host muscle regeneration after IA injection in *scid/mdx* mice [17] or in Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) dogs that represents the clinically relevant DMD model [22]. Following IM or IA injections in *mdx* mice, murine MDSC exhibited an improved ability to restore dystrophin expression compared to myoblasts [20]. Similarly, human adipose-derived stem cells (ADSC) reached skeletal muscle, engrafted and expressed dystrophin after local or systemic delivery, in *mdx* mice or GRMD dogs in the absence of immunosuppression [21, 25]. IM injection of myogenic endothelial cells (MEC) in *scid/mdx*

mice was shown to give rise to efficient muscle fiber regeneration and dystrophin restoration [26]. Finally, PW1⁺ interstitial cells (PICs) were shown to generate new myofibers, SC and PICs following engraftment into damaged muscle [19]. Together, these compelling results have opened up novel opportunities for cell therapy of muscular dystrophies to face to the limited efficacy of myoblast transplantation.

However, several major obstacles have hindered development of analogous approaches in clinically relevant models or in clinical trials. Injection of bone marrow CD271⁺ MSC into cardiotoxin-injured muscle of dog leukocyte antigen (DLA)-identical donor recipient pair of CXMD_J dogs gave rise to only a limited number of clustered dystrophin⁺ fibers [27]. Systemic injections of umbilical tissue MSC in GRMD dogs demonstrated the inability of these cells to differentiate into muscle cells and express human dystrophin [28]. After transplantation of human MDSC (PP6 preplate cells) in the *Gastrocnemius* muscle of *scid/mdx* mice, modest regenerative index was observed [29]. In addition, intra-peritoneal injection of human pericytes obtained from muscle, adipose tissue, fallopian tube and endometrium in double mutant $Utr^{tm1Ked}DMD^{mdx/J}$ mice was not associated with any clinical or morphological sign of improvement [30]. A double-blinded phase I clinical trial, consisting of IM injection of autologous muscle-derived CD133⁺ cells in DMD patients, resulted in an increase in capillary vascularization, and a lack of adverse effect but also a lack of demonstration of effective integration into muscle fibers [31]. Importantly, a phase I/IIa clinical trial consisting of multiple IA infusions of human leukocyte antigen (HLA)-matched donor Mabs/pericytes into immunosuppressed DMD patients revealed that even if this strategy corresponds to a moderately safe protocol, in return it is associated with a very low level of donor cell engraftment with no or only a few dystrophin⁺ fibers as well as a lack of any functional improvement [32].

In 2011, we isolated delayed adherent MDSC from healthy dogs (we named them cMuStem cells) and established that their systemic delivery into immunosuppressed GRMD dogs was associated with a striking and persistent clinical stabilization [33]. Concomitantly, we observed a remodeling of the muscle tissue with an enhancement of long-term muscle fiber regeneration and targeting of the ubiquitin-dependent protein degradation pathway as well as modifications in both lipid homeostasis and energy metabolism processes [34-35]. These preclinical data positioned MuStem cells as a possible attractive therapeutic avenue for DMD patients. However, they can only be considered to be of major interest if a similar cell counterpart is identified in human skeletal muscle. Here, we report for the first time the isolation of human MuStem cells (hMuStem cells) based on an adaptation of the protocol

initially developed for canine muscle. In addition, we provide an extensive phenotype analysis of the hMuStem cell population as well as the *in vitro/in vivo* behavior of these cells. Overall, we demonstrate a regenerative myogenic potential of hMuStem cells, reinforcing the fact that they could be presented as a therapeutic option in view of clinical application for dystrophic patients.

MATERIALS & METHODS

Human Skeletal Muscle Tissue

Muscle samples were obtained from *Paravertebralis* (pP) of 20 year-old female and 15 year-old male patients (pP1 and pP2, respectively). Locomotor (pL) muscles corresponding to *gastrocnemius* muscle of 38 year-old and *fascia lata tensor* muscle of 45 year-old males patients (pL1 and pL2, respectively) were also considered. Patients were free of known muscular disease and operated for scoliosis at the Department of Pediatric surgery of the Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Nantes (France). All patients gave written informed consent. All protocols were approved by the Clinical Research Department of the CHU (Nantes, France), according to the rules of the French Regulatory Health Authorities (Permit numbers: MESR/DC-2010-1199). Biological sample bank was constituted in compliance with the national guidelines regarding the use of human tissue for research (Permit numbers: CPP/29/10).

Animals

Immunodeficient Rag2⁻ IL2rb⁻ mice [36-37] were housed in the specific pathogen-free animals facilities at the Faculty of Medicine of the University Pierre and Marie Curie (UPMC, Paris, France). Mice were fed *ad libitum* and allowed continuous access to tap water. Twelve 5- to 6-month-old mice were used as recipients for human cell implantation. All surgeries were performed under Ketamine/Xylazine anesthesia. To minimize suffering, buprenorphine was administrated to animals prior to surgery and during the next two days. All experiments were carried out in accordance with the guidelines from the French National Research Council for the Care and use of Laboratory Animals (Referenced number: 2016071316136141).

Isolation of Human MuStem Cells

Freshly surgically taken muscle tissues were placed in cold phosphate buffered saline (PBS; PAA, Les Rumeaux, France) supplemented with 2% UI/mL penicillin, 0.1 mg streptomycin,

0.25 mg/mL amphotericin B (PSF; Sigma-Aldrich) and transferred to the laboratory. They were weighed, washed several times in PBS/2% PSF, carefully minced into 1 mm³ pieces using forceps and scalpel and enzymatically digested (15 min, 37°C) by a mix of collagenase type-VIII (2,000 U/g of tissue, Sigma-Aldrich) and 0.2% hyaluronidase type-1S (Sigma-Aldrich). The pre-digested tissue was centrifuged (100 g, 5 min), the supernatant collected and neutralized with 20% (v/v) FCS while the pellet was digested (30 min, 37°C) with 0.125% Pronase E (Sigma-Aldrich). After centrifugation (100 g, 5 min), the supernatant was collected, pooled with those obtain after the first enzymatic digestion and submitted to successive centrifugation (300 g, 15 min) and sequential filtering through 100, 70, and 40 µm pore-diameter nylon mesh (BD Biosciences). Muscle-derived cells (MDCs) were resuspended in PBS (PAA) supplemented with 2% fetal calf serum (FCS; Sigma-Aldrich) and 1% PSF (Sigma-Aldrich) and viability was assessed using 0.1% trypan blue staining (VWR, Strasbourg, France). hMuStem cells were isolated after six days using a modified version of the preplating technique previously described [33]. They were plated at 1.10⁵ viable cells/cm² to gelatin-coated plastic flasks (Sigma-Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, France) under standard condition (37°C in 95% humidified air and 5% CO₂) and amplified in growth medium (MacoPharma, Mouvaux, France) containing 10% FCS, 1% PSF, 10 ng/mL human recombinant basic fibroblast growth factor and 25 ng/mL human recombinant epidermal growth factor (PromoCell, Heidelberg, Germany). Growth medium was replaced every four days. At confluence, cell layers were dissociated with trypsin-EDTA at 0.25% v/v (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Cell were then resuspended in growth medium and seeded at 1.10⁴ cells/cm² (passage 1, P1). Myoblasts, corresponding to a pool of MDCs that adhered during the first two days, were plated at 2.10⁴ viable cells/cm² to gelatin-coated plastic flasks and grown in HAM F12 (Invitrogen) supplemented with 15% FCS and 1% PSF.

***In vitro* Proliferation Analysis**

Four independent hMuStem cell-derived primary cultures were plated in gelatin-coated flask at a density of 1.10⁴ cells/cm² in growth medium and placed under standard condition. Cell population growth was monitored over a period of 38 days. The population doubling level (PDL) and the doubling time (DT) were calculated at each passage performed when cultures reach 80% confluence, as previously described [38].

Cytogenetic analysis

After amplification, four batches of hMuStem cells were harvested and the reverse heat Giemsa (RHG)–banding was performed. A total of 25 to 30 metaphases were analyzed from each batch of cells. The karyotypes were described according to the International System for Human Cytogenetics Nomenclature KARGER 2016.

Flow Cytometry

Four *in vitro* expanded hMuStem cell samples (P5) were resuspended in cold PBS/2% human serum and 1.10^5 cells were incubated (30 min, 4°C) in the dark with fluorochrome-conjugated antibodies (Ab) at saturating concentration (Table 1). For intracellular labelling, cells were previously fixed using Cytofix/Cytoperm (20 min, 4°C; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) and washed twice with PBS/0.2% saponin (Sigma-Aldrich). Isotype-matched Ab and fluorescence minus control samples were used as negative controls for gating and analyses. When applicable, 7-amino-actinomycin D (7-AAD; BD Biosciences) was added to evaluate cell viability. Samples were acquired using a FACS Aria flow cytometer (BD Biosciences) and data were analysed using FlowJo software (FlowJo, Ashland, Oregon). For each labelling, at least 15,000 viable cells were considered.

Table 1. List of antibodies used for hMuStem cell characterization by FACS analysis

Primary antibody	Compagny and catalogue number	Corresponding isotype
ALP-APC	R&D Systems, FAB1448A	Mouse IgG1-APC
ASMA-PE	R&D Systems, IC1420P	Mouse IgG2a-PE
CD4-PE	Beckman-Coulter, A07751	Mouse IgG1-PE
CD8-PE	Beckman-Coulter, A07757	Mouse IgG1-PE
CD15-PE	BD Biosciences, 555402	Mouse IgM-PE
CD19-PE	BD Biosciences, 555413	Mouse IgG1-PE
CD29-PE	BD Biosciences, 555443	Mouse IgG1-PE
CD31-PE	BD Biosciences, 555446	Mouse IgG1-PE
CD33-PE	BD Biosciences, 555450	Mouse IgG1-PE
CD34-PE	BD Biosciences, 345802	Mouse IgG1-PE
CD38-PE	BD Biosciences, 555460	Mouse IgG1-PE

CD44-PE	BD Biosciences, 555479	Mouse IgG2b-PE
CD45-PE	BD Biosciences, 555483	Mouse IgG1-PE
CD49b-PE	BD Biosciences, 559669	Mouse IgG2a-PE
CD56-AF647	BD Biosciences, 562413	Mouse IgG1- AF647
CD56-PE	BD Biosciences, 555516	Mouse IgG1-PE
CD73-PE	BD Biosciences, 550257	Mouse IgG1-PE
CD90-PE	BD Biosciences, 555596	Mouse IgG1-PE
CD105-PE	BD Biosciences, 560839	Mouse IgG1-PE
CD117-PE	BD Biosciences, 555714	Mouse IgG1-PE
CD133-PE	R&D Systems, 130- 080-801	Mouse IgG1-PE
CD140b-PE	BD Biosciences, 556002	Mouse IgG2a-PE
CD144-PerCPCy5.5	BD Biosciences, 561566	Mouse IgG1- PerCPCy5.5
CD146-PE-Cy7	BD Biosciences, 562135	Mouse IgG1-PE- Cy7
CD151-PE	BD Biosciences, 556057	Mouse IgG1-PE
CD166-PE	BD Biosciences, 556057	Mouse IgG1-PE
CD338-PE	BD Biosciences, 561180	Mouse IgG2b-PE
SSEA3-PE	BD Biosciences, 560237	Rat IgM-PE
SSEA4-PE	R&D Systems, FAB1435P	Mouse IgG3-PE
TRA1-60-PE	BD Biosciences, 560193	Mouse IgM-PE
TRA1-81-PE	BD Biosciences, 560161	Mouse IgM-PE
VEGFR1-PE	R&D Systems, FAB321P	Mouse IgG1-PE
VEGFR2-PE	R&D Systems, FAB357P	Mouse IgG1-PE
VWF-PE	R&D Systems, IC27641P	Mouse IgG2b-PE
Mouse IgG1 control:AF647	BD Biosciences, 557714	N/A
Mouse IgG1 control:PE	BD Biosciences, 555749	N/A
Mouse IgG1 control:PE-Cy7	BD Biosciences, 557872	N/A
Mouse IgG1 control:PerCPCy5.5	BD Biosciences, 550795	N/A
Mouse IgG2a control:AF488	BD Biosciences, 557703	N/A
Mouse IgG2a control:PE	R&D Systems, IC003P	N/A

Mouse IgG2b control:PE	BD Biosciences, 555743	N/A
Mouse IgG3 control:PE	R&D Systems, IC007P	N/A
Mouse IgM control:PE	BD Biosciences, 555584	N/A
Rat IgM control:PE	BD Biosciences, 553943	N/A

Gene Expression

Total RNA was extracted from either dry pellets of 2.10^6 cells or muscle tissue samples, using RNeasy mini kit and RNeasy Fibrous kit (Qiagen, Santa Clara, CA, USA) respectively following manufacturer's instructions. Total RNA was treated with DNase (Ambion, Austin, TX, USA), quantified using a NanoDrop spectrophotometer (Labtech, Wilmington, DE, USA) and processed for reverse transcriptase using standard protocol. Briefly, RT reactions were carried out on 0.5 μ g of total RNA using the GoScript reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA). Gene-specific oligonucleotide primers were designed using Oligo Primer Analysis Software v.7 (Molecular Biology Insights Inc., Colorado Springs, CO, USA) and synthesized by MWG Operon (Eurofins, Ebersberg, Germany). PCR amplifications were performed on 0.5 μ L of cDNA with the following program: initial denaturation (12 min, 95°C) followed by 35 cycles (30 s, 94°C; 30 s, 60°C; 30 s, 72°C) and a final extension (10 min, 72°C). The PCR products were migrated and visualized on a 2% agarose gel with GelRed staining. For RT-qPCR, all cDNA amplifications were performed in triplicate, using $1/20^{\text{th}}$ of the reverse transcription products with the MESA BLUE qPCR kit (Eurogentec, Seraing, Belgium). Quantitative PCR was run on the Thermocycler CFX96 (Biorad, Hercules, CA, USA) with the following parameters: initial denaturation step (5 min, 95 °C) and a total of 40 cycles (15 sec, 95 °C; 1 min, 60 °C per cycle). RPS18 was selected as an endogenous control and the relative expression levels were calculated by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. Primers are supplied in Table 2.

Table 2. Summary of primers used for RT-PCR analysis

Name	Type		Sequence	Product (bp)	Accession number
RPS18	Housekeeping gene	For	5'-ACCAAGAGGGCGGGAGAA-3'	85	NM_022551.2
		Rev	5'-CTGGGATCTTGTACTGGCGTC-3'		
Pax3		For	5'-GAGTTCATCAGCCGCATCC-3'	105	NM_181457.3
		Rev	5'-TGTTTGGCCTTCTTCTCGCTT-3'		
Pax7		For	5'-CAAGATTCTTTGCCGCTACC-3'	390	NM_002584.2
		Rev	5'-TTCAGTGGGAGGTCAGGTTC-3'		
Myf5		For	5'-CCACGACCAACCCCAACCA-3'	122	NM_005593.2
		Rev	5'-TCCCAGCAGGCTATAAGTAGT-3'		
MyoD		For	5'-CAAGCGCAAGACCACCAAC-3'	123	NM_002478.4
		Rev	5'-TGGTTTGGATTGCTCGACGTG-3'		
Myogenin	Myogenic markers	For	5'-CCCTACAGATGCCCAAC-3'	126	NM_002479.4
		Rev	5'-GATGCCCGGCTTGAAGAC-3'		
MRF4		For	5'-GAAAATCTGCCCCACTGACC-3'	330	NM_002469.2
		Rev	5'-GCCCCCTGGAATGATCGGAAA-3'		
Desmin		For	5'-TGAAGATGGCCCTGGATGTGGA-3'	206	NM_001927.3
		Rev	5'-GGCCTCACTGACGACCTCC-3'		
M-cadherin		For	5'-ACAGATGCCGACGCCCGAG-3'	134	NM_004933.2
		Rev	5'-TCGCGTCCAGCCCCACTT-3'		
C-met		For	5'-AGCCAATTTATCAGGAGGTGT-3'	202	NM_001127500.1
		Rev	5'-CTGGCTGGGCTCTTCTATCTG-3'		
Adiponectin	Adipogenic markers	For	5'-ACTGCAACATTCCTGGGCT-3'	212	NM_001177800.1
		Rev	5'-ACGCTCTCCTTCCCATAAC-3'		
LPL		For	5'-GAGTATGCAGAAGCCCCGAG-3'	214	NM_000237.2
		Rev	5'-CCACATCTCCAAGTCTCTCTC-3'		
Osteoprotegerin	Osteogenic marker	For	5'-TGCTGCGCGCTCGTGTCTG-3'	386	NM_002546.3
	Rev	5'-CCAGCTTGACCCTCCAAATCC-3'			
CD31		For	5'-ACAACAGACATGGCAACAAGG-3'	130	NM_000442.4
		Rev	5'-AGTTCTGTTATGTTGACCACGA-3'		
VWF	Endothelial markers	For	5'-CCGAAGCACCATCTACCCTG-3'	150	NM_000552.3
		Rev	5'-TAAGTGAAGCCCAGCCGACA-3'		
CD144		For	5'-TTCCAGCAGCCTTCTACCAC-3'	144	NM_001795.4
		Rev	5'-GAAGAAGTGGCCCTTGTC-3'		
Klf4		For	5'-AGAGGAGCCCAAGCCAAAGA-3'	181	NM_004235.4
		Rev	5'-TTTCCATCCACAGCCGTCCCAG-3'		
Nanog	Pluripotent markers	For	5'-AGAAGAGTGTCGCAAAAAGGAAG-3'	261	NM_024865.2
		Rev	5'-TCTGCGTCACACCATGCTATT-3'		
Oct-4A		For	5'-CAGCGACTATGCACAACGAGA-3'	151	NM_002701.4
		Rev	5'-GAAAGGGACCGAGGAGTACAG-3'		
Sox2		For	5'-ATGCACCGCTACGACGTGA-3'	150	NM_003106.3
		Rev	5'-GGACTTGACCACCGAACCCAT-3'		

Immunofluorescence Analysis

MuStem cells and myoblasts (P5) were plated on gelatin-coated Lab-Tek culture chamber slides (Nalge-Nunc, Rochester, NY, USA) at 2.10^4 cells/cm² in growth medium during three days. Induced pluripotent stem (iPS) cells were used as positive control for pluripotent marker labelling. Cells were fixed in 2% paraformaldehyde (PFA) in PBS (10 min, 4°C or at room

temperature/RT), permeabilized with 0.3-0.5% triton X-100 (4°C, 20 to 30 min) and incubated (60 min, RT) in blocking buffer (5% goat serum in PBS). Cells were then incubated with the Ab listed in Table 3. Cells were finally counterstained (15 min, 37°C) with DAPI fluorescent cell-permeable DNA probe (Life Technologies Ltd, Paisley, UK). More than 300 cells were counted per sample by using Fiji image analysis software v.2 [39]. Data were presented as the mean \pm SD.

Table 3. List of antibodies used for hMuStem cell characterization by immunocytochemistry

Primary antibody	Compagny and catalogue number	Dilution	Incubation temperature and time	Secondary antibody
PAX7	DSHB	1:10	60min, 37°C	GAM Alexa 488
MYF5	LifeSpan BioSciences, C138416/35039	1:500	60min, 37°C	GAR Alexa 488
MYOD	Dako, M3512	1:10	60min, 37°C	GAM Alexa 488
MYOGENIN	DSHB, F5D	1:10	60min, 37°C	GAM Alexa 488
OCT-4A	Cell Signaling Technology, C30A3	1:100	ON, 4°C	Biotinylated Ab + Streptavidin Alexa 555
NANOG	Cell Signaling Technology, 4903P	1:100	ON, 4°C	Biotinylated Ab + Streptavidin Alexa 555
KLF4	Cell Signaling Technology, 4038P	1:100	ON, 4°C	Biotinylated Ab + Streptavidin Alexa 555

***In Vitro* Differentiation Potential Assay**

For myogenic differentiation, hMuStem cells (P5) were plated at 3.10^4 cells/cm², maintained in standard growth medium for 24 hours after that 10% FCS was replaced by 2% horse serum. After 7 days, differentiation was assessed based on cell morphology and expression of the sarcomeric myosin heavy chain isoform (sarcMyHC). Cultures were fixed in 4% PFA, treated with 0.5% Triton X-100/20% (w/v) goat serum in PBS and incubated (60 min, 37°C) with anti-human sarcMyHC Ab (1:500, DSHB). Specific antibody binding was revealed using either AlexaFluor® 488-coupled (1:500, Invitrogen) or biotinylated secondary goat-anti-mouse Ab (1:300, Dako) followed by peroxidase-coupled streptavidin (1:300, Dako). The nuclei were finally counterstained with DRAQ5 (Biostatus). Fusion index was determined by determining the percentage of nuclei within sarcMyHC⁺ myotubes (>2 nuclei) in two randomly field per well in three replicate wells. At least 1199 nuclei per well were considered. For adipogenic and osteogenic differentiations, hMuStem cells (P5) were plated

at 1.10^4 cells/cm², maintained in standard growth medium until 80% confluence and then incubated in specific cell-type differentiation media, as previously described [40]. For endothelial differentiation, hMuStem cells were amplified in EGMTM-2 medium (Lonza, Basel, Swiss) for 7 days. Then, cell layer was dissociated with trypsin and cells were seeded on Matrigel coating (3 g/mL, BD Biosciences) in EGMTM-2 medium. Differentiation was assessed 3 days later based on capillary-like formation. RT-PCR analysis of lineage-specific genes were performed using primers listed in Table 2.

H₂O₂-Induced Oxidative Stress

hMuStem cells and myoblasts isolated from the same muscle samples (P5, n=4) were seeded onto gelatin-coated dishes at 6.10^4 cells/cm² in 24-well plates and incubated for 4 hours at 37°C to allow their adhesion. Then, 200 µM H₂O₂ (Sigma-Aldrich) was added. After 24, 48 and 72 hours, both adhering and floating cells were harvested in each well, centrifuged (300 g, 10 min), resuspended in PBS/2%FCS and transferred in TrucountTM tubes (BD Biosciences). After addition of 7-AAD, numbers of viable cells were determined by flow cytometry. All the experiments were performed in duplicate. To consider possible differences observed between the cell batches in terms of proliferation, the percentages of living cells were calculated compared to the condition without addition of H₂O₂ for each corresponding cell preparation. The effects of time on the percentage of living cells were analyzed with a linear mixed effects model to take into account the repeated measurement design. The conditions of independence and normality of the residuals on one hand and random effects on the other hand were checked by graph or residual plots as recommended in the parametric estimation field.

***In Vivo* Experiment and Histological Analysis**

Rag2⁻ IL2rb⁻ mice were anesthetized with an intra-peritoneal injection (0.1 mL per 20 g body weight) of a solution containing 100 mg/mL Ketamine (Merial, Lyon, France), 20 mg/mL Rompun 2% (Bayer, Puteaux, France) in PBS. To minimize suffering, mice received a subcutaneous injection of a painkiller 0.3 mg/mL buprenorphine (50 µg/kg of body weight; Axience, Pantin, France). Cryolesion of *Tibialis anterior* (TA) muscle was induced just before transplantation as previously described [41]. Cell layers of four hMuStem cell-derived primary cultures (P5) were dissociated, cells were pelleted, resuspended (2.5×10^5 cells in 15 µL PBS) and each injected through the skin into left TA muscle (n=3 mice per cell batch), using a 50 mL syringe with a 22 gauge needle. Three weeks later, TA muscles were removed,

frozen in isopentane/liquid nitrogen and entirely cut into 10 μm sections. For every 350 μm along the complete length of the muscle, 8 transverse sections corresponding to a 80 μm length were used for quantitative analysis. The number of human nuclei or spectrin⁺/dystrophin⁺ fibers in each section examined was counted and the total values were determined for each TA muscle investigated, as previously described [24].

To quantify cytoplasmic and interstitial hMuStem cell nuclei, a triple labelling was performed. Sections were treated with Triton-X100 0.3% detergent (10 min, RT) and with blocking buffer (10% goat serum in PBS; 30 min, RT) before incubated (60 min, 37°C) with a solution of mouse anti-human lamin A/C primary Ab (1:50, Leica Biosystems, Nussloch, Germany) followed by Alexa-555 rabbit anti-mouse secondary Ab (1:300, Invitrogen) in a humid chamber (60 min, RT). The sections were then treated with goat blocking serum (30 min, RT) before incubation with a solution containing both rabbit anti-mouse dystrophin Ab (1:50, Chemicon, Rolling Meadows, IL, USA), and rat anti-mouse laminin Ab (1:100, Sigma-Aldrich; 60 min, 37°C). Secondary Ab corresponding to a mixture of Alexa-488 goat anti-rabbit Ab (1:300, Invitrogen) and Alexa-555 goat anti-rat Ab (1:300, Invitrogen) were finally added (60 min, RT). Nuclei were then counterstained by DRAQ5 (1:1000, Invitrogen; 15 min, RT). Finally, sections were mounted in Mowiol Medium (Calbiochem EMD Biosciences). To visualize human dystrophin⁺ and spectrin⁺ myofibers, double labelling against human proteins and human lamin A/C were realized by same protocol using monoclonal mouse anti-human Ab NCL-Dys3 and NCL-Spect1 (1:20; Leica Biosystems; 60 min, 37°C), respectively. The number of hMuStem cells and human protein⁺ fibers in the injected muscles were determined on the images acquired with laser confocal scanning microscope LSM780 Zeiss (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany) at x20 magnification and by using Fiji image analysis software v.2. Non-injected mice muscle and human muscle were used as negative and positive controls, respectively.

RESULTS

hMuStem Cells Reside in Adult Skeletal Muscle and Exhibit Both High Proliferation Rate and Ability to Survive under Oxidative Stress

MuStem cells were initially isolated from a pool of posterior limb and postural muscles of 2.5-month-old healthy dogs [33]. To analyze whether a similar muscle-resident cell subset could be identified in humans, we performed experiments using a modified version of the original protocol. We isolated hMuStem cells from small biopsies of *Paravertebralis* (pP)

muscle or locomotor (pL) muscles (n=2 each), collected from 15 to 45 year-old male (n=3) or female (n=1) subjects free from known muscle disease. Six days after the first plating, floating cells corresponding to 0.9 to $1.8 \cdot 10^5$ cells per gram of muscles, were seeded on new gelatin-coated plastic to finally obtain three days later a marginal fraction of poorly adherent cells corresponding to hMuStem cells. Independently of the source of the tissue samples from which they were collected, hMuStem cells remain as small round cells for the following seven days. After that, they start to proliferate as pseudo-clonal cultures composed of poorly adherent cells (Figure 1 upper left), some of which clearly remain in the supernatant as refringent round cells (Figure 1 upper left, arrows). While most of the thin fusiform cells divide to generate spindle-shaped cells, pairs of round cells are regularly observed during the first step of proliferation (Figure 1 upper left, insert), revealing ability for these cells to proliferate as floating cells. In contrast, myoblasts rapidly form lengthened and large spindle-shaped cells for which cell outlines could appear difficult to define (Figure 1 upper right). After two passages, hMuStem cell-derived primary cultures are composed of some round cells (Figure 1 bottom left, arrows) and a majority of spindle-shaped cells that are characterized by their thin and elongated form (Figure 1 bottom left, arrowhead) compared to larger cytoplasm observed on myoblasts (Figure 1 bottom right). Moreover, we found that hMuStem cells proliferate by generating highly confluent cultures with multilayers of mononucleated refractile cells and without any thickening (Figure 1 bottom left), even after one month of culture and/or alignment of elongated cells. In contrast, cultured myoblasts generate cell monolayers and exhibit a rapid thickening of their cell membrane as soon as they reach confluence (Figure 1 bottom right).

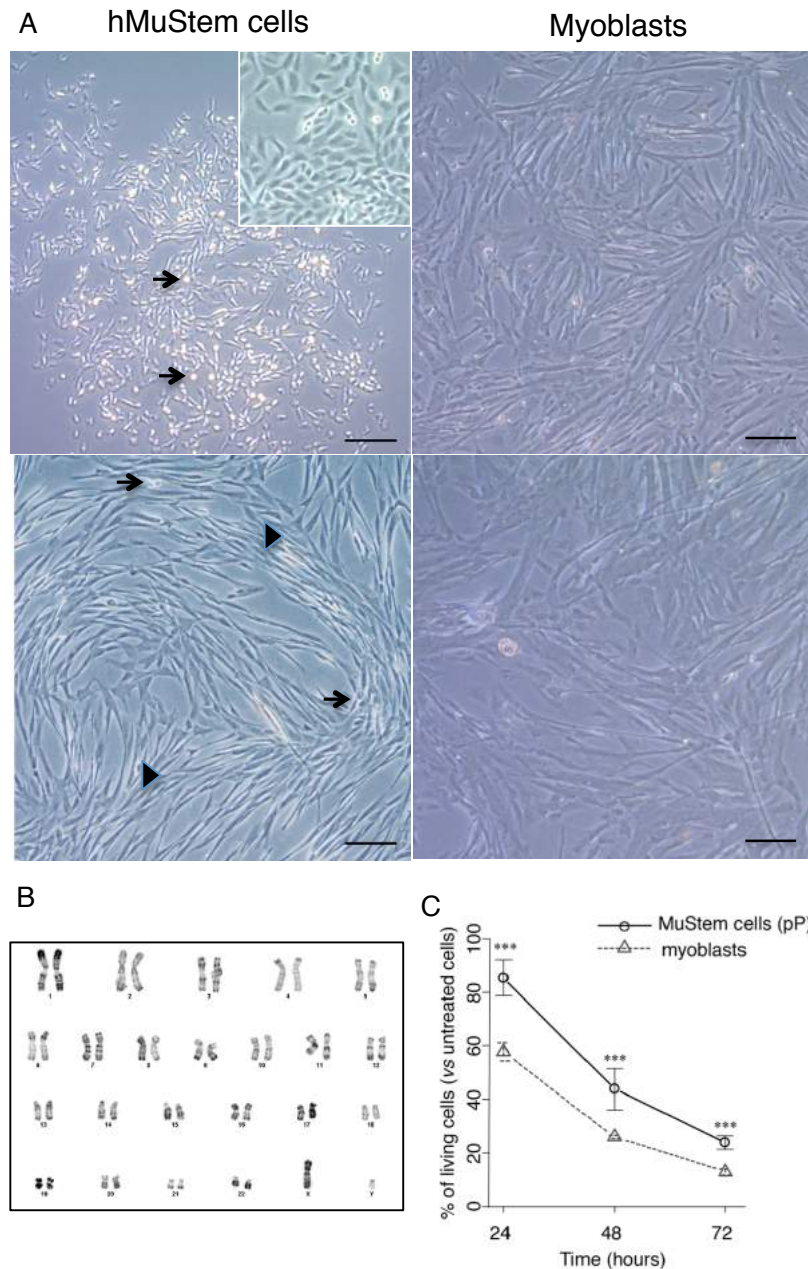
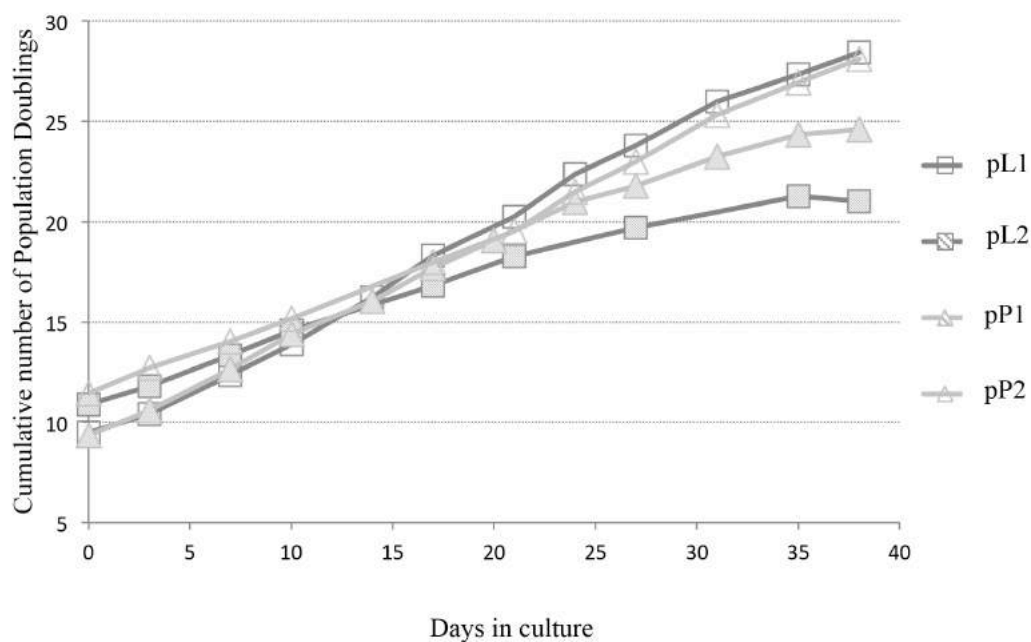


Figure 1. Morphological features and survival potential under oxidative stress condition of hMuStem cells and myoblasts

(A) Upper left: seven days after the end of the isolation protocol, phase contrast microscopy reveals that hMuStem cells form colony-unit composed of round and thin cells (arrow) as well as short spindle-shaped cells. A part of cells remains in the supernatant as floating cells (insert). Upper right: typical lengthened and large spindle-shaped cells were observed in myoblast-derived primary culture. Bottom left: expanded hMuStem cell-derived primary culture is characterized by a large majority of thin elongated cells aligned in networks (arrowhead) and a permanent presence of some refractile round cells (arrow). Bottom right: monolayer of spindle-shaped cells and thick multinucleated cells characterized the expanded myoblast-derived primary cultures. (B) Karyotype of hMuStem cells revealed neither chromosome duplication or deletion nor structural abnormality (n=6) (C) The number of living cells was determined after exposure to 200 μ M H_2O_2 and expressed

in percentage considering cell count obtained in untreated culture condition. Data are expressed as mean \pm S.E.M; n=4. ***p<0.001, mixed-effects model.

Due to its scarcity in adult tissue, the *in vitro* expansion potential of a cell candidate is essential for therapeutic application and especially for a whole body treatment. We found that hMuStem cells (n=4 batches, at passage 4 to 5) are able to generate a mean cumulative number of population doubling (CPD) of 25.5 ± 3.48 over a period of 38 days, corresponding to a doubling time (DT) of 1.51 ± 0.19 days (Figure S1). Interestingly, we observed that the number of CPD (range: 21.0-28.4) was not really different despite distinct origin of the muscle, age or gender of the donors. Importantly, we evaluated the cytogenetic status of our cells by RHG banding analysis in order to see if this important proliferative capacity leads to karyotype abnormalities. No numerical and/or structural chromosomes abnormality has been found on all the observed metaphases (Figure 1B).



Supplemental Figure 1. Proliferation analysis of long-term cultured hMuStem cells

DMD muscle is characterized by an inflammatory component associated with a production of reactive oxygen species. In this context, several studies have shown that oxidative stress is responsible for the rapid death of myoblasts following transplantation [42-43]. Here, we sought to determine how hMuStem cells behave when confronted with oxidative stress. hMuStem cells and myoblasts (P5, n=4 each) collected from pP muscle were exposed to 200 μ M hydrogen peroxide (H_2O_2) during 24, 48 or 72 hrs in their respective growth medium. hMuStem cell-derived primary cultures display significantly higher percentage of viable cells

compared with myoblasts at each time point ($p < 0.0001$) (Figure 1C, Table 4), demonstrating that they are more resistant to H₂O₂-induced cytotoxic effect than myoblasts.

Table 4. Influence of the cell type and time on the percentage of living cells at 200 μ M H₂O₂

Effect of time		Mean	Standard Error	<i>p</i> -value
24 hours	MuStem cells	85.3	6.8	
	Myoblasts	57.7	3.4	
	Difference	27.6	NA	0.005
48 hours	MuStem cells	43.8	7.8	
	Myoblasts	26.0	0.6	
	Difference	17.9	NA	0.031
72 hours	MuStem cells	23.8	2.5	
	Myoblasts	12.8	1.1	
	Difference	10.9	NA	0.003
Effect of cell type at any time				
	MuStem cells	50.9	8.4	
	Myoblasts	32.2	5.8	
	Difference	18.8		0.0001

hMuStem Cells Correspond Predominantly to Early Myogenic-Committed Cells of perivascular origin

In order to characterize the hMuStem cell population in terms of cell content, a large panel of lineage-specific markers was tested on cell batches (n=4), using RT-PCR, flow cytometry and immunocytochemical analysis at P5 (CPD range: 10.4 to 12.7). First, we determined that 69 to 97% and 45 to 93% of the cells express the muscle cell markers CD56 and desmin, respectively (Figure 2A, Table 5). RT-PCR analysis showed a lack of Pax7 mRNA in all hMuStem cell populations while Pax3 as well as M-cadherin and c-met transcripts corresponding to classical markers of SC and proliferative myogenic cells are always detected. In addition, we demonstrated the presence of Myf5, MyoD, MRF4 and myogenin mRNAs in all batches (Figure 2B). This was implemented at the protein level by the detection of 14 to 75% Myf5⁺ cells as well less than 14% and 5% of MyoD⁺ cells and myogenin⁺ ones, respectively (Figure 2A, Table 5). Overall, these results revealed that hMuStem cells predominantly correspond to early myogenic-committed progenitors as previously described for canine counterparts [33]. All hMuStem cell batches showed a homogenous expression of the characteristic MSC markers CD29, CD44, CD73, CD90 and CD105 independently of the postural or locomotor muscle origin (Figure 2C). In addition, they do not express classical hematopoietic markers (CD34, CD45, CD117) and consistently are defined by a lin⁻

phenotype based on the lack of expression for the CD4, CD8, CD19, CD33 and CD38 antigens (Figure S2A). The hMuStem cells are also negative for the expression of endothelial markers CD31, CD144, VEGFR1 and VEGFR2 (Figure 2C). Interestingly, they are uniformly negative for CD133 as well as for CD338 and CD15 commonly used to identify SP cells and myo-adipogenic cells (Figure S2B).

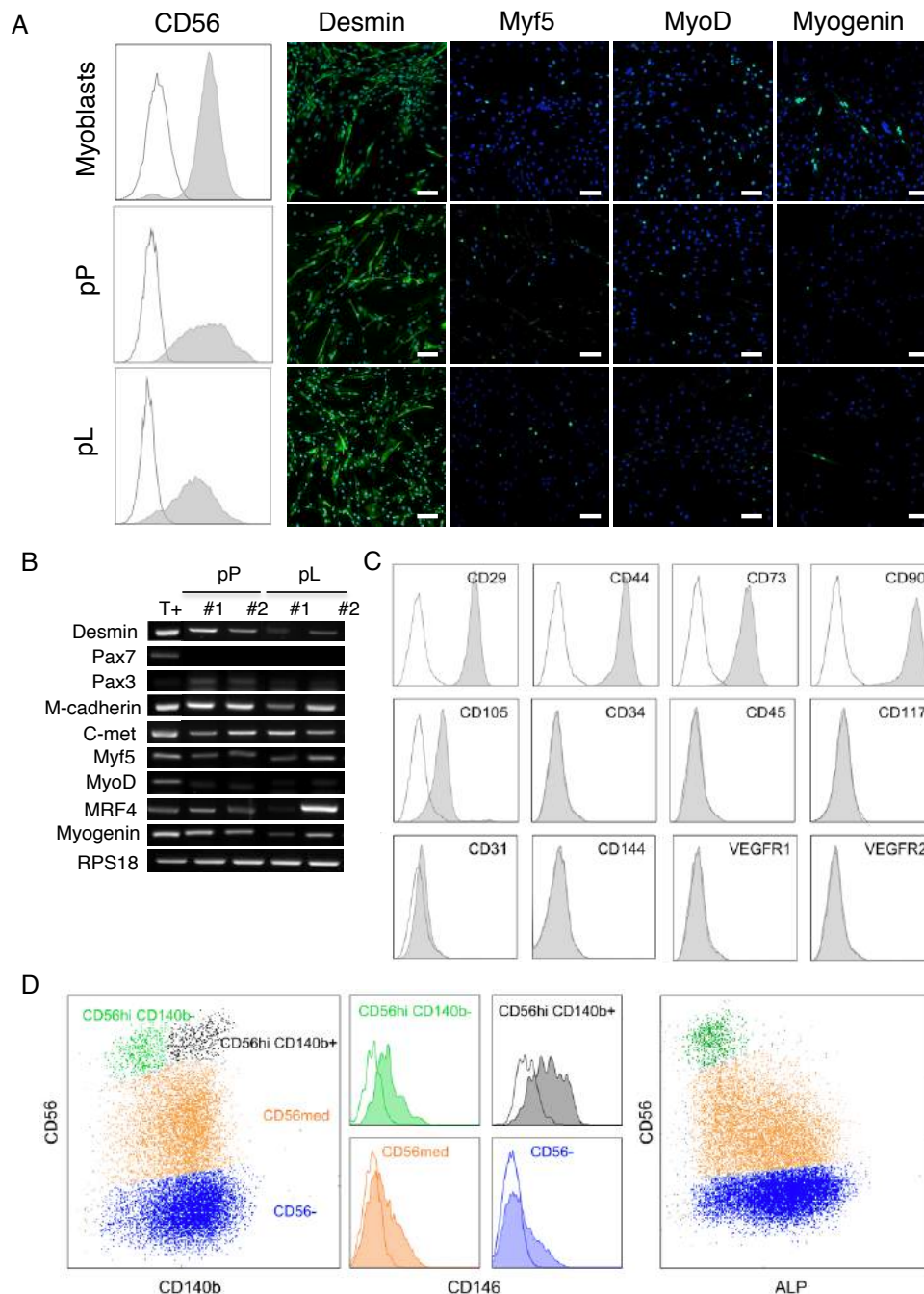


Figure 2. Cell lineage-specific phenotype of hMuStem cells

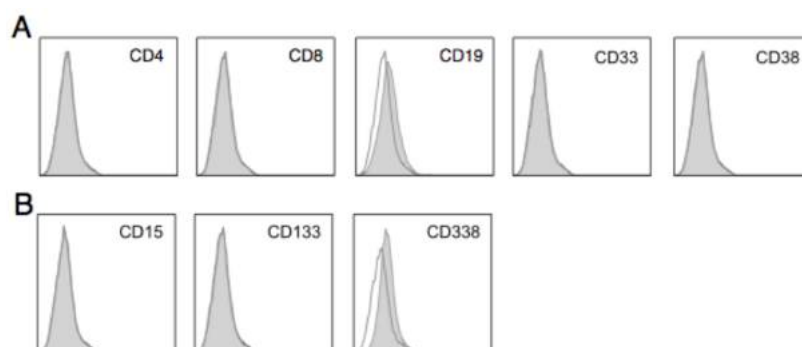
(A) Immunolabellings against CD56, Desmin, Myf5, MyoD and myogenin were performed on hMuStem cells (P5) initially obtained from postural (pP) and locomotor (pL) muscle and cultivated in growth medium. Myoblasts were used as positive control. For labellings done on culture chamber slides, nuclei were

counterstained with 10 $\mu\text{g/mL}$ DAPI (Blue). Scale bar: 100 μm . (B) Expression of myogenic proteins and regulatory factors at RNA level by four cell preparations (P5). Myoblasts and RPS18 were used as positive control (T+) and housekeeping gene, respectively. (C) Representative flow cytometry profiles revealing the expression of MSC markers CD29, CD44, CD73, CD90 and CD105 by hMuStem cells and the lack of expression of the hematopoietic marker CD34, CD45 and CD117, endothelial marker CD31, CD144, VEGFR1, VEGFR2. Control- and specific antibody-stained cells are shown in white and gray profiles, respectively. (D) Representative flow cytometry images revealing the main four subsets identified in hMuStem cell batches based on CD56 and CD140b expression. CD146 expression in each subpopulation is shown in histograms. Isotype control and positive signal are in empty and full areas, respectively. Finally, the ALP/CD56 pattern is represented.

Table 5. Myogenic phenotype of hMuStem cell population

Percentage of CD56, Desmin, Myf5, MyoD and myogenin positive cells determined in the four hMuStem cell batches. For analysis of CD56 labelling done in flow cytometry, at least 15,000 viable cells were considered. Concerning the others markers, eight randomly selected fields were used to analyze at least 300 cells and determine the proportion of cells positive for each of the myogenic marker. nd: not detected.

	pP1	pP2	pL1	pL2
CD56	73%	97%	69%	95%
Desmin	45%	93%	88%	78%
Myf5	75%	29%	14%	40%
MyoD	14%	6%	nd	3%
Myogenin	<1%	5%	nd	<1%



Supplemental Figure 2. Expression of lin^- and cell type-specific markers by hMuStem cells

Multi-labellings with CD56 and well-described perivascular cell markers evidenced $\text{CD56}^+/\text{CD140b}^+$ cells, $\text{CD56}^+/\text{CD146}^+$ cells and $\text{CD56}^+/\text{ALP}^+$ ones in the hMuStem cell population (Figure 2D and Table 6). Most of the cells express an intermediate level of CD56 (CD56^{med} cells) and are also CD140b^+ while they are CD146 low or negative. In addition, they appear partly ALP^+ (from 30% to 100 %). We also identified a population of CD56^{hi} cells, representing from 4 to 17% of the hMuStem cell population, which can be further

divided into CD140b⁺ and CD140b⁻ fractions, both being CD146⁺ and ALP⁻. Among the CD56⁻ cell fraction identified in two batches, cells are CD140b⁺ with a variable expression of CD146 (from 22 to 35%). Moreover, ALP is detected in 40 to 80% of the cells. Overall, we show that hMuStem cell population consists of a majority of early myogenic-committed progenitors that exhibit a perivascular mesenchymal imprint evoking a pericyte origin and conventional CD56⁻/CD140b⁺/CD146⁺/ALP⁺ pericytes.

Table 6. Phenotypic composition of hMuStem cell population

Expression of perivascular markers by four cell preparations (P5) initially obtained from postural (pP) and locomotor (pL) muscles. Percentages of the three main subsets found in hMuStem cell batches are represented. nd: not detected.

Cell subsets	pP muscle-derived MuStem cells		pL muscle-derived MuStem cells	
	pP1	pP2	pL1	pL2
CD56 ⁺	73%	97%	69%	95%
CD56 ^{med} / CD140b ⁺ (ALP ⁺)	56% (30%)	80% (76%)	65% (85%)	91% (>99%)
CD56 ^{hi} / ALP ⁻	17%	17%	4%	4%
CD140b ⁺	8%	2%	2%	2%
CD140b ⁻	9%	15%	2%	2%
CD56 ⁻ / CD140b ⁺ (ALP ⁺)	24% (40%)	nd	35% (80%)	nd

hMuStem Cells Display an Oligopotential Status

Next, we investigated the degree of plasticity of the hMuStem cells. First, we examined the *in vitro* differentiation potential in mesodermal lineages of cells at P5. Seven days after being placed in low serum “fusion promoting” medium, all hMuStem cell batches form multinucleated myotubes expressing sarcomeric myosin heavy chain isoform (sarcMyHC) (Figure 3A) and displayed a fusion index of $28 \pm 3\%$, revealing an ability for the cultured hMuStem cells to differentiate into the myogenic lineage. The potential of differentiation into adipocytes was showed with the cytoplasmic accumulation of small lipid vesicles in all hMuStem cell-derived cultures two weeks after their switch in adipogenic induction media, using Oil Red O staining (Figure 3B). Also, adiponectin and lipoprotein lipase (LPL) mRNAs were detected by RT-PCR (Figure 3C). In addition, Alizarin Red staining revealed the formation of calcium deposits in all cultures when cultivated for three weeks in osteogenic induction media (Figure 3B). An expression of the osteogenic-specific gene, osteoprotegerin (OPG), was detected by RT-qPCR (mean CT of 26.4 ± 1.81 ; data not shown). Finally, we showed that even if cells in hMuStem cell population cultivated in endothelial-specific

medium align and form capillary-like structures when they are plated on Matrigel (Figure 3D), they never express the endothelial markers CD31, CD144 and von Willebrand factor (VWF) (data not shown). This demonstrated that hMuStem cells fail to commit in endothelial lineage.

Next, we addressed the profile of the pluripotent stem cell markers at both RNA and protein levels. We demonstrated that all hMuStem cell batches expressed Klf4 and Nanog RNA (Figure 3E). In contrast, Sox2 mRNA was only detected on one pP muscle-derived hMuStem cells batch. Also, Oct-4A transcript appeared lacking in all cell samples. RT-qPCR revealed mean CT values of 26.9 ± 1.3 and 30.9 ± 1.0 for Klf4 and Nanog mRNAs respectively, revealing relative high and low expression while Sox2 was not detected (data not shown). Finally, we showed at the protein level that KLF4 and NANOG is expressed by $95 \pm 3 \%$ and $83 \pm 10 \%$ of hMuStem cells, respectively (Figure 3F). Interestingly, flow cytometry analysis determined that hMuStem cell populations are also uniformly negative for the glycolipid antigens SSEA1, SSEA3 and the keratin sulfate antigens TRA1-60 and TRA1-81 (Figure 3G). SSEA4 is not detected on the pP muscle-derived hMuStem cells while 45 to 100 % of pL muscle-derived ones are SSEA4⁺. Taken together, our results indicated that hMuStem cells correspond to oligopotent cells.

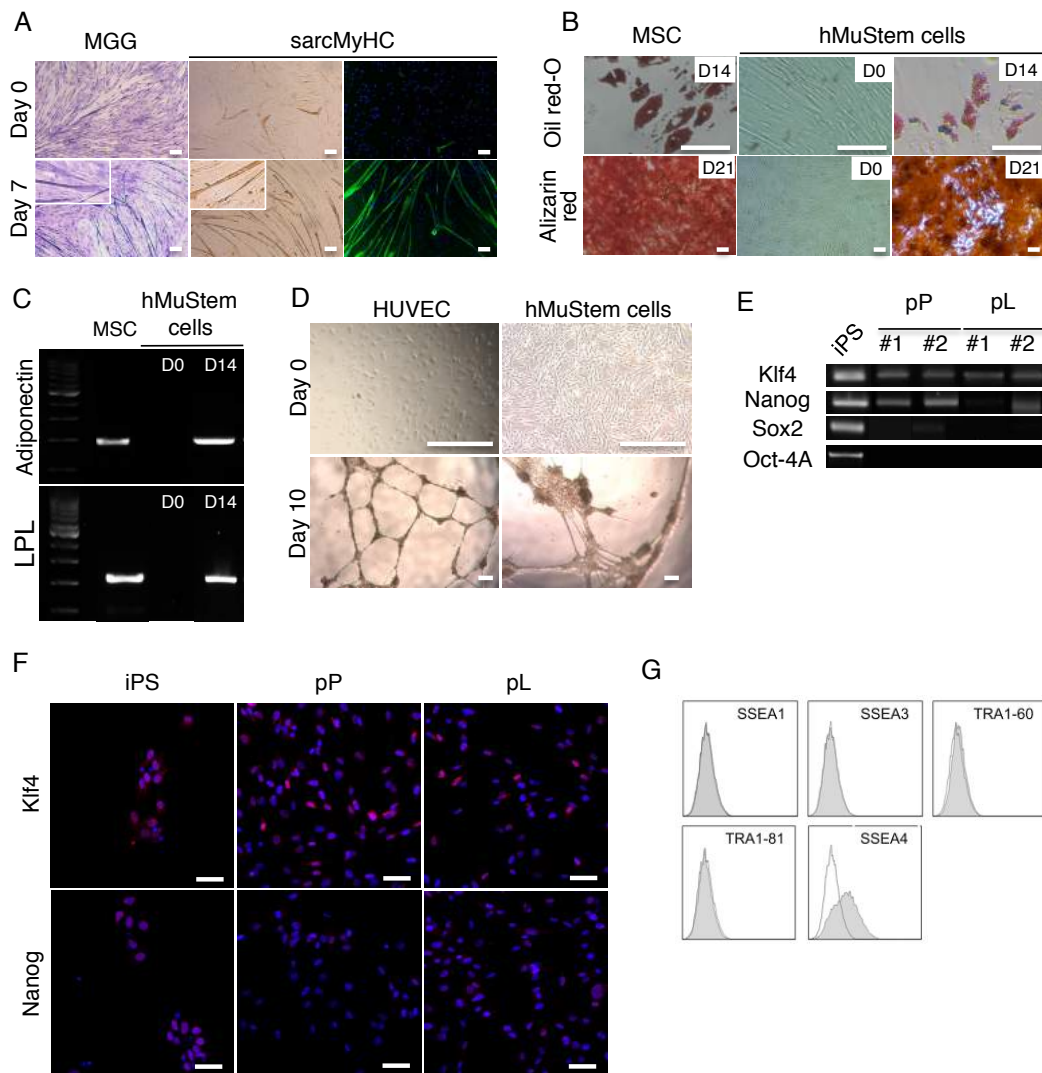


Figure 3. Multilineage potential and pluripotent phenotype of long-term cultured hMuStem cells

(A) Cultured hMuStem cells were grown in low-serum medium for 7 days, then fixed and submitted to May-Grünwald Giemsa (MGG) staining and sarcomeric MyHC (sarcMyHC) immunolabelling to reveal multinuclei myotubes. hMuStem cells placed on growth medium were used as negative control. Fusion index was calculated on sarcMyHC fluorescent-labelled cells. Nuclei were counterstained with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DAPI (Blue). Scale bar: 100 μm . (B) Top: after 14 days in adipogenic induction medium, the differentiation of hMuStem cells was assessed by detection of lipid vesicles through Oil Red O staining. Bottom: at 80% of confluency, hMuStem cells were placed in osteogenic differentiation medium for 21 days. Alizarin Red staining revealed the formation of calcium deposits. Scale bar: 100 μm . (C) RT-PCR revealed the presence of adiponectin and lipoprotein lipase (LPL) RNA on hMuStem cells only after the adipogenic induction. (D) hMuStem cells were cultivated in endothelial medium for 7 days before plated in Matrigel for further 3 days. Phase contrast microscopy revealed the formation of capillary-like structures. Scale bar: 300 μm . (E) Expression of classical pluripotent marker mRNA. MSC, HUVEC and iPSCs were used as positive controls for B-D, E and F, respectively. (F) Immunolabellings against KLF4 and NANOG were performed on hMuStem cells (P5) cultivated in growth medium. Nuclei were counterstained with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DAPI (Blue). Scale bar: 50 μm . (G) Representative flow cytometry images revealing the lack of expression of SSEA1, SSEA2, TRA1-60 and TRA1-81 by hMuStem cells and SSEA4

expression (restricted to pL muscle-derived cells). Isotype control and positive signal are shown in white and gray, respectively.

hMuStem Cells Participate to Regeneration in Injured Muscles

We next investigated the *in vivo* behavior of hMuStem cells especially in terms of contribution to muscle fiber regeneration. For this purpose, $3 \cdot 10^5$ hMuStem cells prepared from pP and pL muscles (n=2 each) were injected into cryodamaged TA muscles of the immunodeficient Rag2⁻ IL2rb⁻ mice (n=3 per cell batch). Three weeks later, specific human lamin A/C immunolabelling showed the presence of hMuStem cell nuclei in all the injected muscles, revealing an ability of the hMuStem cells to integrate into the host injured muscle tissue (Figure 4A, 4B). The maximum total number of lamin A/C⁺ nuclei found per muscle were respectively 50498 and 9891 for the two pP muscle-derived MuStem cell batches and 21686 and 30601 for the two pL muscle-derived ones (Table 7). This represents an average of 141 ± 82.0 and 45.7 ± 25.7 lamin A/C⁺ nuclei per section for pP muscle-derived MuStem cells and 43.7 ± 20.8 and 88.0 ± 63.0 nuclei per section for pL muscle-derived ones. Importantly, distribution analysis of lamin A/C⁺ nuclei established a capacity of fusion with the host muscle fibers for each of the injected pP and pL muscle-derived hMuStem cell batches with nevertheless a variable efficacy (Table 7).

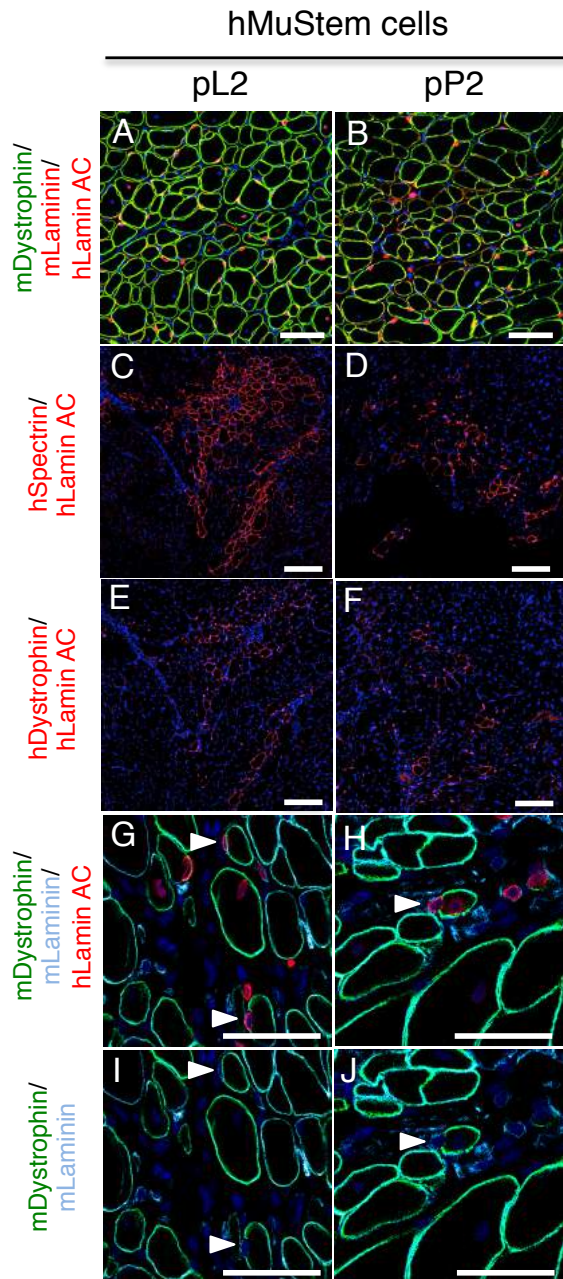


Figure 4. Contribution of long-term cultured hMuStem cells to muscle regeneration

hMuStem cells (P5) initially sorted from postural (pP) and locomotor (pL) muscle were injected into cryodamaged *Tibialis anterior* (TA) muscle of Rag2⁻ IL2rb⁻ mice. Three weeks later, frozen sections of recipient muscle were stained with specific antibodies against human lamin A/C (red), murine dystrophin (green) and murine laminin (red) (A, B, Scale bar: 100 μ m; blue; G and H, Scale bar: 50 μ m). A large number of human nuclei were found in muscle tissue. Immunolabellings against human lamin A/C, spectrin or dystrophin (red) were performed (C-F, Scale bar: 150 μ m). Numerous human spectrin⁺ and dystrophin⁺ fibers were detected. hMuStem cells were rarely found in a satellite cell location (arrowhead, G and H).

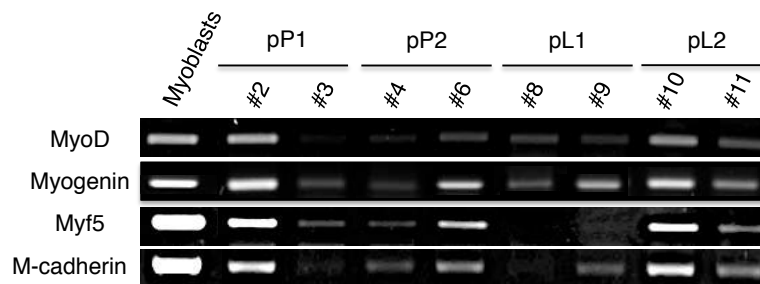
Table 7. Histological analysis of cryodamaged TA muscles of Rag2-IL2rb- mice following intramuscular injection of hMuStem cells

Human lamin A/C⁺ nuclei were counted per section and total number of human cells in the muscles was determined based on a linear density by considering the size of the hMuStem cell nuclei and the thickness of the section, as previously described [24]. The cytoplasmic, satellite and interstitial distribution is expressed as percentage while human spectrin⁺ and dystrophin⁺ fibers are expressed as the number of counted fibers per section.

Cell batch	Mice number	hLamin A/C ⁺ nuclei			hSpectrin ⁺ fibers with lamin A/C ⁺ nuclei	hDystrophin ⁺ fibers with lamin A/C ⁺ nuclei	
		hLamin A/C ⁺ nuclei number per muscle	Tissue distribution (%)			Number of fibers per section	
			Cytoplasmic location	Satellite cell location	Interstitial location		
pP1	#1	12169	23.5	1.50	75.0	70.4	6.00
	#2	50498	20.2	0.40	79.4	64.5	17.5
	#3	21312	16.8	any	83.2	40.0	4.70
	Mean ± SD	27993 ± 20019	20.2 ± 3.35	0.60 ± 0.78	79.2 ± 4.10	58.3 ± 16.1	9.40 ± 7.04
pP2	#4	9891	51.3	3.90	44.9	89.6	37.0
	#5	4181	38.2	0.70	61.1	50.5	any
	#6	2164	55.9	any	44.2	153	52.0
	Mean ± SD	5412 ± 4008	48.5 ± 9.18	1.50 ± 2.08	50.1 ± 9.56	97.7 ± 51.7	29.7 ± 26.8
pL1	#7	7142	20.9	2.70	76.5	62.8	3.00
	#8	6849	9.40	0.50	90.2	26.6	any
	#9	21686	11.2	0.30	88.5	55.8	12.0
	Mean ± SD	11892 ± 8483	13.8 ± 6.19	1.20 ± 1.33	85.1 ± 7.47	48.4 ± 19.2	5.00 ± 6.24
pL2	#10	30601	73.7	6.10	20.2	191	62.3
	#11	17180	86.3	0.80	13.0	124	48.3
	#12	10152	80.3	0.60	19.1	131	10.5
	Mean ± SD	15821 ± 10986	80.1 ± 6.30	2.50 ± 3.12	17.4 ± 3.88	149 ± 36.8	40.4 ± 26.8

In addition, the ability of the hMuStem cells (to participate to muscle fiber regeneration and) to differentiate *in vivo* into myogenic cells was demonstrated with the detection in all injected TA muscles of human-specific MyoD and myogenin as well as Myf5 and M-cadherin mRNAs, respectively (Figure S3). Furthermore, the presence of cytoplasmic lamin A/C⁺ nuclei was found to be associated with the expression of human spectrin protein (maximum number: 70 and 153 spectrin⁺ fibers per section for pP muscle-derived MuStem cells and 63 and 191 spectrin⁺ fibers per section for pL muscle-derived ones). Interestingly, although less frequent due to its late maturation, we also evidenced human dystrophin⁺ fibers in muscles of 10 upon 12 recipient mice (Table 7). These results give evidence that the incorporation of hMuStem cell nuclei into host muscle fiber is really effective, being associated with activation of human muscle-specific genes and production of “late” proteins (Figure 4 C-F). Confocal microscopy analysis indicated that hMuStem cell nuclei were rarely observed in satellite cell location, less than 5% of lamin A/C⁺ nuclei being found in this position (Figure 4 G-J; Table 7). Finally, we determined that the hMuStem cells with an interstitial location never express

the endothelial differentiation marker CD31 (data not shown). Taken together, our results indicated that hMuStem cells isolated from both the pP and pL muscles are able to participate to muscle fiber regeneration allowing the production of mature muscle proteins.



Supplemental Figure 3. Detection of human myogenic markers in Rag2⁻ IL2rb⁻ mouse muscles following hMuStem cell injection

RT-PCR analysis revealed the presence of the MyoD, myogenin, Myf5 and M-cadherin mRNAs in the *Tibialis anterior* (TA) muscle of the immunodeficient mice three weeks after intramuscular injection of hMuStem cells. Cultured myoblasts were used as positive control.

DISCUSSION

Over the last years, several adult stem cell populations were presented as having a myogenic potential, suggesting that their clinical use could allow surmounting the major limitations of the myoblast transplantation. Then, they were positioned as promising candidates for the setting-up of therapeutic strategy, notably for DMD. In return, when protocols were developed with these cells of human origin [28-30, 44] and/or in clinically relevant context [25, 27, 32] the regenerative potential initially described was unfortunately not identically found. These works pointed out the difficulties to easily translate from preclinical to clinical data and the need to define carefully standardized experimental protocols.

hMuStem cells could be isolated from skeletal muscle tissue of different source

In a previous study, canine MuStem cells (cMuStem cells) were obtained from a large sample of posterior limb muscles of 2.5-month old healthy dogs [33]. Based on an adaptation of this protocol, we report here that hMuStem cells could be successfully isolated from small biopsies of postural or locomotor muscles of 15 to 45-year old women and men. Like cMuStem cells, all hMuStem cell batches generated a polyclonal population morphologically composed of predominantly spindle-shaped flat cells and low percentage of round cells. hMuStem cell-derived primary cultures are all able to produce more than 20 PDLs in 38 days, revealing an extended proliferation capacity *in vitro*. This result is in agreement with those previously presented for cMuStem cells as well as for human myosphere-derived progenitor

cells (MDPCs) and freshly isolated muscle AC133⁺ cells that could respectively undergo more than 40 PDs before the onset of senescence [45] and 25 PDs in 50 days of culture [24]. hMuStem cells exhibited a mean DT of about 36 hrs, similar to that of human PP6 cells, Mabs (32 to 36 hrs) [29, 46] but shorter than those for MDPCs (60 to 111 hrs) and adipose-derived pericytes (60 hrs). Finally, although they exhibit an ability to spontaneously differentiate into myotubes, they also display a differentiation potential into osteocyte and adipocyte cell lineages when placed under suitable inductive *in vitro* condition, like cMuStem cells. Since features of several adult stem cells among which MDSC [47], ADSC and MSC [48-49] have been shown to be variably influenced by the age and the gender of the donor, future experiments done in a more important number of cell batches would be necessary to determine if these morphological and behavioral features are homogeneously found in the hMuStem cells.

hMuStem cells correspond predominantly to early myogenic-committed progenitors with a perivascular origin

Based on concomitant detection of CD56, desmin, M-cadherin and myogenic regulatory factors, we establish here that cultured hMuStem cells are early myogenic-committed progenitors, as previously mentioned for canine cells [33]. Consistently, human PP6 cells were characterized as being positive for CD56 as well Myf5, MyoD and myogenin mRNAs [29]. It should be noted that although the percentage of CD56⁺ cells are quite similar in canine and human ($81 \pm 4\%$ and $84 \pm 15\%$, respectively), the proportion of hMuStem cells expressing MRF's appear to be less important than those observed in canine ones, especially for the key regulators of myogenic determination and myoblast differentiation MyoD and myogenin. This suggests that hMuStem cells contain an enriched population of cells positioned at the early stage of the myogenic programme. Recently, several biological properties of adult stem cells have been shown impacted by the age of donors [48-49]. Since cMuStem cells were always isolated from very young dogs in comparison to hMuStem cells that were isolated from adult human subjects, this difference could also be due to the divergent age between dog and human donors.

The last years, Peault's group proposed that adult stem cells identified in multiple human organs could be related to a common ancestor corresponding to perivascular cells expressing MSC markers [50-51]. Like long-term cultured human perivascular cells, we determined that *in vitro* expanded hMuStem cells express the pericyte markers CD146, CD140b, ALP, the recognized MSC markers CD29, CD44, CD73, CD90 and CD105, but not the markers of

hematopoietic cells (CD45) and endothelial ones (CD31, CD34, CD144, VEGFR1 and VEGFR2). These results evoke a possible blood vessel wall origin for the MuStem cells. Moreover, the high expression we observed for the MSC markers is consistent with the description done for hMDPCs and human PP6 cells isolated by the preplating technique from muscle biopsies of subjects with no known muscle disease [29, 52]. In return, MDPCs were clearly distinct from hMuStem cells with 91.27% of CD144⁺ cells. Based on expression of endothelial markers, it has been hypothesized that MDPC subsets may originate from blood vessels [53] and correspond to myo-endothelial cells [54]. Our present results clearly indicate that it is not the case for the hMuStem cells. A main point resides in the difference concerning the myogenic imprint between human perivascular cells and MuStem cells. While freshly isolated or long-term cultured muscle-derived perivascular cells did not express the CD56 protein as well Pax7, Myf5, myogenin and M-cadherin at RNA level [50, 17], expanded hMuStem cells were characterized by a panel of myogenic markers. Interestingly, cultured mdcs preparations obtained with the same protocol used to previously isolate pericytes were mostly defined as containing a CD56⁺ subpopulation and expressing the myogenic markers Pax3, Myf5 and MyoD mRNAs. Only few preparations expressed Pax7. In agreement with these data, we detected Pax3, Myf5 and MyoD mRNAs in all hMuStem cell batches whereas we did not observe Pax7 expression. It is interesting to note that the expression of Pax7, Myf5 and MyoD was shown to decrease with time in culture of a mdcs preparation from non dystrophic muscle whilst Pax3 expression was maintained [44]. It would be informative to explore the expression of the MRFs in poorly expanded hMuStem cells to control if the quite restricted expression is not related to the *in vitro* expansion time. The fraction of CD56⁺ cells ranged from 69-97% of the hMuStem cell population, which seems higher than the one obtained for the whole mdcs population (1.5-47%) [44]. The authors revealed that mdcs that did not express CD56 gave rise to CD56⁺ cells capable of myogenesis during the cell culture process, as previously shown [17]. Then, it can be postulate that this higher proportion of CD56⁺ cells in hMuStem cell population result from an elevated conversion of the initial CD56⁻ cells through the *in vitro* proliferation process.

Based on the lack of CD15/SSEA-1 antigen expression, we additionally found that hMuStem cells do not correspond to the adipogenic CD56⁻/CD15⁺ cells, which are progeny of the myo-adipogenic CD56⁺/CD15⁺ progenitors [55]. *In vitro*, the proliferation of these bipotent cells also give rise to CD56⁺/CD15⁻ progenitors that express Myf5 but not the SC marker Pax7, as we determined here for the hMuStem cells. Intriguingly, RT-PCR analysis showed that CD56⁺/CD15⁻ cells express PW1/Peg3 that was also detected in all hMuStem cell

preparations. Considering that CD56⁺/CD15⁻ cells, which were found in the interstitial compartment of human muscle [56], were defined as positive for MSC markers CD44, CD49, CD90, CD146 and negative for lineage markers CD45, CD106, CD117, CD133, we cannot exclude that hMuStem cells could belong to the CD56⁺/CD15⁻ cell fraction. Overall, our data demonstrated that hMuStem cells consist to a population of early myogenic progenitors with a perivascular mesenchymal imprint.

hMuStem cells do not correspond to pluripotent stem cells

In parallel to their *in vitro* differentiation potential into myogenic, adipogenic and osteogenic cells, we showed that whether hMuStem cells are able to form capillary-like structure in 3D-culture condition, in return they do not express CD31, CD144 or VWF. In addition, hMuStem cells that adopted an interstitial location after injection into injured muscle never differentiated in endothelial cells. Overall, these data suggest that hMuStem cells fail to commit to the endothelial cell lineage in contrast to blood- and muscle-derived AC133⁺ cells whom IM injection in *scid/mdx* mice resulted in CD34⁺/CD144⁺ cells and α -sma⁺ cells that were located near or with small vessels and around capillaries, respectively [16]. Recent studies have shown that MSC may express embryonic stem cell markers [57-59]. In agreement with results obtained in hMDPCs [52], hMuStem cells express the transcription factor NANOG even if the percentage of NANOG⁺ cells is more important (77.6 to 85.9% vs. 40.1%). The glycolipid antigen SSEA-4 was detected in hMuStem cells, as previously shown in MSC from various human tissues [58, 60]. In contrast, hMuStem cells are uniformly negative for the other markers of stemness such as SOX-2, OCT-4A, TRA1-60, TRA1-81 and SSEA3, which demonstrates a lack of pluripotency and indicate a certain degree of commitment to specific lineages for hMuStem cells. This feature distinguished hMuStem cells from pre-plated hMDPCs that contained 11.76 and 32.43% of OCT-4⁺ and SOX-2⁺ cells, respectively [52].

hMuStem cells contribute to muscle regeneration

We show that hMuStem cells can engraft into host tissue where they efficiently participate to muscle fiber regeneration, which is in agreement with our previous results obtained with cMuStem cells intramuscularly injected into immunosuppressed GRMD dogs [33]. Indeed, we detected many hundreds of hMuStem cell nuclei fused with host fibers and production of human proteins, which distinguishes hMuStem cells from human PP6 cells that were characterized by modest regenerative index after transplantation in muscles of *scid/mdx* mice

[29]. One possible element to explain the difference between these two cell types may be that the human PP6 cells corresponded to cells adhering between 48 and 120 hrs while the hMuStem cells were defined as cells adhering after 144 hrs. Similarly to our data, perivascular cells freshly sorted from human adult skeletal muscle generated numerous human spectrin⁺ myofibers after IM injections in cardiotoxin-damaged muscle of *scid/mdx* mice [50]. Human muscle-derived AC133⁺ cells were also shown to contribute to extensive muscle regeneration following IM transplantation into irradiated and cryodamaged TA muscles of immunodeficient Rag2⁻/γ chain⁻/C5-mice [24, 61]. However, they also efficiently participate in SC formation with 25% of human nuclei corresponding to SC, which contrast with the modest contribution we determined for the hMuStem cells. Meng et al. [61] demonstrated that AC133⁺ cells that had undergone greater expansion *in vitro* contribute less to muscle regeneration *in vivo*. It would be informative to determine the behavior of hMuStem cells submitted to limited *in vitro* expansion especially as those used here for *in vivo* experiments correspond to high mean population doubling cells comparatively to AC133⁺ cells previously investigated. In parallel to a limited contribution of hMuStem cells to generate SC compared to those observed with cMuStem cells, we established that hMuStem cells can adopt an interstitial location as canine cells with however a higher percentage of endomysial cells. We cannot exclude the possibility that this distinct behavior of hMuStem cells to generate muscle-resident cells is not related to the context of damaged muscle in which they were investigated. Indeed, we can hypothesize that hMuStem cells were much less requested in mice muscle that was submitted to only one experimental injury and contained normal SC pool compared to cMuStem cells placed in GRMD dog skeletal muscle, which is characterized by repeated fiber necrosis/regeneration processes and a SC exhaustion. Interestingly, a similar ability to give rise to interstitial cells had been described for the PICs corresponding to muscle-resident stem cells located in the interstitium and defined as PW1/peg3⁺ cells [19]. Intriguingly, these cells exhibit a broad range of genes common to MSC [62], do not express Pax7, exhibit myogenic potential *in vitro* and form myofibers and SC after engraftment in damaged mice muscle [19], as we describe here for the hMuStem cells. It was recently shown that the expression level of PW1 correlates with the myogenic competence and migratory capacities of Mabs [63]. Considering that all hMuStem cell batches tested express PW1 mRNA, further experiments may be developed to determine in what manner these two populations share other biological properties.

Concerning the hMuStem cell behavior after IM injection, we determined that all batches isolated from muscle of 15 to 45-year old subjects free of known muscle disease contribute to

skeletal muscle regeneration with nevertheless distinct efficacy. When we compared the percentage of donor nuclei inside the basal lamina and human spectrin⁺ fibers, we found that the highest percentage concerned the muscles injected with hMuStem cell batches containing the higher proportion of CD56⁺ cells that include CD140b⁺/ALP⁺ cells, suggesting a better myogenic potential for this CD56⁺ cell subset. These data are in agreement with those presented for CD56⁺ and CD56⁻ mdcs isolated from one DMD patient [44]. In terms of phenotype profile associated with our CD56⁺ and CD56⁻ hMuStem cells, no clear difference appeared on MRFs expression but a limitation of the present study resides in the minor number of the cell batches. RT-PCR analysis showed that neither CD56⁺ nor CD56⁻ mdcs were positive for Pax7 but both expressed similar levels of Myf5 and MyoD [44], as shown with hMuStem cells. In return, CD56⁺ mdcs expressed more desmin and MHC than the CD56⁻ ones, suggesting a more differentiated status of CD56⁺ mdcs. Concerning hMuStem cells, we did not observe major difference in percentage of myogenin⁺ cells, all being below 5.5% of the whole cells.

In conclusion, our results reinforced the notion from which MuStem cells may represent an interesting agent for clinical application in DMD context. Additional experiments are now required to consolidate this hypothesis among which one should analyze the ability of hMuStem cells to exhibit muscle homing after a systemic delivery and contribute to muscle repair. Then, we should determine if hMuStem cells exhibit same behavior of canine counterparts after their intra-arterial delivery into GRMD dogs. This appears of major interest as Meng et al. [61] failed to obtain any contribution to muscle regeneration from intra-arterially delivered AC133⁺ cells in immunodeficient injured mice models that contrast to their data after local injection [61]. Similarly, if a regenerative myogenic potential was established after IM delivery of mdcs, in return a lack of participation to muscle fiber formation was noted after systemic delivery [44]. Further works will need to more clearly identify the phenotypic composition of cultured hMuStem cell population to make the most robust contribution to muscle fiber regeneration.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Christian Pinset (I-Stem, Evry, France) and Laurent David (iPSC platform, IRS, Nantes, France) for supply of iPS cells.

REFERENCES

1. Emery AEH. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases – A world survey. *Neuromuscul Disord.* 1991; *1*, 19-29.
2. Moat SJ, Bradley DM, Salmon R, Clarke A and Hartley L. Newborn bloodspot screening for Duchenne muscular dystrophy: 21 years experience in Wales. *Eur J Hum Genet.* 2013; *21*, 1049–53.
3. Hoffman EP, Brown RH Jr and Kunkel LM. Dystrophin: The Protein Product of the Duchenne Muscular Dystrophy Locus. *Cell.* 1987; *51*, 919-28.
4. Eagle M, Bourke J, Bullock R, Gibson M, Mehta J, Giddings D, Straub V and Bushby K. Managing Duchenne muscular dystrophy-the additive effect of spinal surgery and home nocturnal ventilation in improving survival. *Neuromuscul Disord.* 2007; *17*, 470-5.
5. Kohler M, Clarenbach CF, Bahler C, Brack T, Russi EW and Bloch KE. Disability and survival in Duchenne muscular dystrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2009; *80*, 320-5.
6. Berardi E, Annibali D, Cassano M, Crippa S and Sampaolesi M. Molecular and cell-based therapies for muscle degenerations: a road under construction. *Front Physiol.* 2014; *5*, 1-13.
7. Partridge TA, Morgan JE, Coulton GR, Hoffman EP and Kunkel LM. Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts. *Nature.* 1989; *337*, 176-9.
8. Kinoshita I, Vilquin JT, Guérette B, Asselin I, Roy R and Tremblay JP. Very efficient myoblast allotransplantation in mice under FK506 immunosuppression. *Muscle Nerve.* 1994; *17*, 1407-15.
9. Huard J, Tremblay G, Verreault S, Labrecque C and Tremblay JP. Utilization of an antibody specific for human dystrophin to follow myoblast transplantation in nude mice. *Cell Transplant.* 1993; *2*, 113-8.

10. Huard J, Verreault S, Roy R, Tremblay M and Tremblay JP. High efficiency of muscle regeneration after human myoblast clone transplantation in SCID mice. *J Clin Invest.* 1994; 93, 586-99.
11. Gussoni E, Pavlath GK, Lanctot AM, Sharma KR, Miller RG, Steinman L and Blau HM. Normal dystrophin transcripts detected in Duchenne muscular dystrophy patients after myoblast transplantation. *Nature.* 1992; 356, 435-8.
12. Mendell JR, Kissel JT, Amato AA, King W, Signore L, Prior TW, Sahenk Z, Benson S, McAndrew PE, Rice R, Nagaraja H, Stephens R, Lantry L, Morris GE and Burghes AHM. Myoblast transfer in the treatment of Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med.* 1995; 333, 832-8.
13. Huard J, Bouchard JP, Roy R, Malouin F, Dansereau G, Labrecque C, Albert N, Richards CL, Lemieux B and Tremblay JP. Human myoblast transplantation: preliminary results of 4 cases. *Muscle Nerve.* 1992; 15, 550-60.
14. Tremblay JP, Malouin F, Roy R, Huard J, Bouchard JP, Satoh A and Richards CL. Results of a triple blind clinical study of myoblast transplantations without immunosuppressive treatment in young boys with Duchenne muscular dystrophy. *Cell Transplant.* 1993; 2, 99-112.
15. Guérette B, Asselin I, Vilquin JT, Roy R and Tremblay JP. Lymphocyte infiltration following allo- and xenomyoblast transplantation in mdx mice. *Muscle Nerve.* 1995; 18, 39-51.
16. Benchaouir R, Meregalli M, Farini A, D'Antona G, Belicchi M, Goyenvalle A, Battistelli M, Bresolin N, Bottinelli R, Garcia L and Torrente Y. Restoration of Human Dystrophin Following Transplantation of Exon-Skipping-Engineered DMD Patient Stem Cells into Dystrophic Mice. *Cell Stem Cell.* 2007; 6, 646-57.
17. Dellavalle A, Sampaolesi M, Tonlorenzi R, Tagliafico E, Sacchetti B, Perani L, Innocenzi A, Galvez BG, Messina G, Morosetti R, Li S, Belicchi M, Peretti G, Chamberlain JS, Wright

WE, Torrente Y, Ferrari S, Bianco P and Cossu G. Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat Cell Biol.* 2007; *9*, 255-67.

18. Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, Kunkel LM and Mulligan RC. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature.* 1999; *401*, 390-4.

19. Mitchell KJ, Pannérec A, Cadot B, Parlakian A, Besson V, Gomes ER, Marazzi G and Sassoon DA. Identification and characterization of a non-satellite cell muscle resident progenitor during postnatal development. *Nat Cell Biol.* 2010; *12*, 257-66.

20. Qu-Petersen Z, Deasy B, Jankowski R, Ikezawa M, Cummins J, Pruchnic R, Mytinger J, Cao B, Gates C, Wernig A and Huard J. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *J Cell Biol.* 2002; *157*, 851-64.

21. Rodriguez AM, Pisani D, Dechesne CA, Turc-Carel C, Kurzenne JY, Wdziekonski B, Villageois A, Bagnis C, Breittmayer JP, Groux H, Ailhaud G and Dani C. Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J Exp Med.* 2005; *201*, 1397-405.

22. Sampaolesi M, Blot S, D'Antona G, Granger N, Tonlorenzi R, Innocenzi A, Mognol P, Thibaud JL, Galvez BG, Barthélémy I, Perani L, Mantero S, Guttinger M, Pansarasa O, Rinaldi C, Cusella De Angelis MG, Torrente Y, Bordignon C, Bottinelli R and Cossu G. Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature.* 2006; *444*, 574-9.

23. Torrente Y, Belicchi M, Sampaolesi M, Pisati F, Meregalli M, D'Antona G, Tonlorenzi R, Porretti L, Gavina M, Mamchaoui K, Pellegrino MA, Furling D, Mouly V, Butler-Browne GS, Bottinelli R, Cossu G and Bresolin N. Human circulating AC133+ stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle. *J Clin Invest.* 2004; *114*, 182-95.

24. Negroni E, Riederer I, Chaouch S, Belicchi M, Razini P, Di Santo J, Torrente Y, Butler-Browne GS and Mouly V. In Vivo Myogenic Potential of Human CD133+ Muscle-derived Stem Cells: A Quantitative Study. *Mol Ther.* 2009; *17*, 1771-8.
25. Vieira NM, Valadares M, Zucconi E, Secco M, Bueno CR Jr, Brandalise V, Assoni A, Gomes J, Landini V, Andrade T, Caetano HV, Vainzof M and Zatz M. Human Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells Injected Systemically Into GRMD Dogs Without Immunosuppression Are Able to Reach the Host Muscle and Express Human Dystrophin. *Cell Transplant.* 2012; *21*, 1407-17.
26. Zheng B, Cao B, Crisan M, Sun B, Li G, Logar A, Yap S, Pollett JB, Drowley L, Cassino T, Gharaibeh B, Deasy BM, Huard J and Péault B. Prospective identification of myogenic endothelial cells in human skeletal muscle. *Nat Biotechnol.* 2007; *25*, 1025-34.
27. Nitahara-Kasahara Y, Hayashita-Kinoh H, Ohshima-Hosoyama S, Okada H, Wada-Maeda M, Nakamura A, Okada T and Takeda S. Long-term Engraftment of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells That Differentiate to Form Myogenic Cells in Dogs With Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol Ther.* 2012; *20*, 168-77.
28. Zucconi E, Vieira NM, Bueno CR Jr, Secco M, Jazedje T, Costa Valadares M, Fussae Suzuki M, Bartolini P, Vainzof M and Zatz M. Preclinical Studies with Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cells in Different Animal Models for Muscular Dystrophy. *J Biomed Biotechnol.* 2011; *2011*, 715251.
29. Chirieleison SM, Feduska JM, Schugar RC, Askew Y and Deasy BM. Human Muscle-Derived Cell Populations Isolated by Differential Adhesion Rates: Phenotype and Contribution to Skeletal Muscle Regeneration in Mdx/SCID Mice. *Tissue Eng Part A.* 2012; *18*, 232-41.
30. Valadares MC, Gomes JP, Castello G, Assoni A, Pellati M, Bueno C, Corselli M, Silva H, Bartolini P, Vainzof M, Margarido PF, Baracat E, Péault B and Zatz M. Human adipose tissue derived pericytes increase life span in Utrn (tm1Ked) Dmd (mdx) /J mice. *Stem Cell Rev.* 2014; *10*, 830-40.

31. Torrente Y, Belicchi M, Marchesi C, D'Antona G, Cogiamanian F, Pisati F, Gavina M, Giordano R, Tonlorenzi R, Fagiolari G, Lamperti C, Porretti L, Lopa R, Sampaolesi M, Vicentini L, Grimoldi N, Tiberio F, Songa V, Baratta P, Prella A, Forzenigo L, Guglieri M, Pansarasa O, Rinaldi C, Mouly V, Butler-Browne GS, Comi GP, Biondetti P, Moggio M, Gaini SM, Stocchetti N, Priori A, D'Angelo MG, Turconi A, Bottinelli R, Cossu G, Rebullia P and Bresolin N. Autologous transplantation of muscle-derived CD133+ stem cells in Duchenne muscle patients. *Cell Transplant*. 2007; *16*, 563-77.
32. Cossu G, Previtali SC, Napolitano S, Cicalese MP, Tedesco FS, Nicastro F, Noviello M, Roostalu U, Natali Sora MG, Scarlato M, De Pellegrin M, Godi C, Giuliani S, Ciotti F, Tonlorenzi R, Lorenzetti I, Rivellini C, Benedetti S, Gatti R, Markt S, Mazzi B, Tettamanti A, Ragazzi M, Imro MA, Marano G, Ambrosi A, Fiori R, Sormani MP, Bonini C, Venturini M, Politi LS, Torrente Y and Ciceri F. Intra-arterial transplantation of HLA-matched donor mesoangioblasts in Duchenne muscular dystrophy. *EMBO Mol Med*. 2015; *7*, 1513-28.
33. Rouger K, Larcher T, Dubreil L, Deschamps JY, Le Guiner C, Jouvion G, Delorme B, Lieubeau B, Carlus M, Fornasari B, Theret M, Orlando P, Ledevin M, Zuber C, Leroux I, Deleau S, Guigand L, Testault I, Le Rumeur E, Fiszman M and Chérel Y. Systemic Delivery of Allogenic Muscle Stem Cells Induces Long-Term Muscle Repair and Clinical Efficacy in Duchenne Muscular Dystrophy Dogs. *Am J Pathol*. 2011; *179*, 2501-18.
34. Robriquet F, Lardenois A, Babarit C, Larcher T, Dubreil L, Leroux I, Zuber C, Ledevin M, Deschamps JY, Fromes Y, Cherel Y, Guevel L and Rouger K. Differential Gene Expression Profiling of Dystrophic Dog Muscle after MuStem Cell Transplantation. *PLoS One*. 2015; *10*, e0123336.
35. Lardenois A, Jagot S, Lagarrigue M, Guével B, Ledevin M, Larcher T, Dubreil L, Pineau C, Rouger K and Guével L. Quantitative proteome profiling of dystrophic dog skeletal muscle reveals a stabilized muscular architecture and protection against oxidative stress after systemic delivery of MuStem cells. *Proteomics*. 2016; doi: 10.1002/pmic.201600002.
36. Kuwajima S, Sato T, Ishida K, Tada H, Tezuka H and Ohteki T. Interleukin 15-dependent crosstalk between conventional and plasmacytoid dendritic cells is essential for CpG-induced immune activation. *Nat Immunol*. 2006; *7*, 740-6.

37. Vosshenrich CA, Ranson T, Samson SI, Corcuff E, Colucci F, Rosmaraki EE and Di Santo JP. Roles for common cytokine receptor gamma-chain-dependent cytokines in the generation, differentiation, and maturation of NK cell precursors and peripheral NK cells in vivo. *J Immunol.* 2005; *174*, 1213-21.
38. Blasco MA, Lee HW, Hande MP, Samper E, Lansdorp PM, DePinho RA and Greider CW. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell.* 1997; *91*, 25-34.
39. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P and Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012; *9*, 676-82.
40. Delorme B and Charbord P. Culture and characterization of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Methods Mol Med.* 2007; *140*, 67-81.
41. Riederer I, Negroni E, Bigot A, Bencze M, Di Santo J, Aamiri A, Butler-Browne G and Mouly V. Heat shock treatment increases engraftment of transplanted human myoblasts into immunodeficient mice. *Transplant Proc.* 2008; *40*, 624-30.
42. Suzuki K, Murtuza B, Beauchamp JR, Smolenski RT, Varela-Carver A, Fukushima S, Coppin SR, Partridge TA and Yacoub MH. Dynamics and mediators of acute graft attrition after myoblast transplantation to the heart. *FASEB J.* 2004; *18*, 1153-5.
43. Urish KL, Vella JB, Okada M, Deasy BM, Tobita K, Keller BB, Cao B, Piganelli JD and Huard J. Antioxidant Levels Represent a Major Determinant in the Regenerative Capacity of Muscle Stem Cells. *Mol Biol Cell.* 2009; *20*, 509-20.
44. Meng J, Muntoni F and Morgan JE. Stem cells to treat muscular dystrophies – Where are we? *Neuromuscul Disord.* 2011; *21*, 4-12.

45. Wei Y, Li Y, Chen C, Stoelzel K, Kaufmann AM and Albers AE. Human skeletal muscle-derived stem cells retain stem cell properties after expansion in myosphere culture. *Exp Cell Res.* 2011; *317*, 1016-27.
46. Morosetti R, Mirabella M, Gliubizzi C, Broccolini A, Sancricca C, Pescatori M, Gidaro T, Tasca G, Frusciante R, Tonali PA, Cossu G and Ricci E. Isolation and Characterization of Mesoangioblasts from Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy Muscle Biopsies. *Stem Cells.* 2007; *25*, 3173-82.
47. Deasy BM, Lu A, Tebbets JC, Feduska JM, Schugar RC, Pollett JB, Sun B, Urish KL, Gharaibeh BM, Cao B, Rubin RT and Huard J. A role for cell sex in stem cell-mediated skeletal muscle regeneration: female cells have higher muscle regeneration efficiency. *J Cell Biol.* 2007; *177*, 73-86.
48. Beane OS, Fonseca VC, Cooper LL, Koren G and Darling EM. Impact of aging on the regenerative properties of bone marrow-, muscle-, and adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells. *PLoS One.* 2014; *9*, e115963.
49. Shu W, Shu YT, Dai CY and Zhen QZ. Comparing the biological characteristics of adipose tissue-derived stem cells of different persons. *J Cell Biochem.* 2012; *113*, 2020-6.
50. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng PN, Traas J, Schugar R, Deasy BM, Badylak S, Buhring HJ, Giacobino JP, Lazzari L, Huard J and Péault B. A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs. *Cell Stem Cell.* 2008; *3*, 301-13.
51. Park TS, Gavina M, Chen CW, Sun B, Teng PN, Huard J, Deasy BM, Zimmerlin L and Péault B. Placental perivascular cells for human muscle regeneration. *Stem Cells Dev.* 2011; *20*, 451-63.
52. Li Y, Shen Z, Shelat H and Geng YJ. Reprogramming somatic cells to pluripotency: a fresh look at Yamanaka's model. *Cell Cycle.* 2013; *12*, 3594-8.

53. Péault B, Rudnicki M, Torrente Y, Cossu G, Tremblay JP, Partridge T, Gussoni E, Kunkel LM and Huard J. Stem and Progenitor Cells in Skeletal Muscle Development, Maintenance, and Therapy. *Mol Ther.* 2007; *15*, 867-77.
54. Chen CW, Corselli M, Péault B and Huard J. Human blood-vessel-derived stem cells for tissue repair and regeneration. *J Biomed Biotechnol.* 2012; *2012*, 597439.
55. Pisani DF, Clement N, Loubat A, Plaisant M, Sacconi S, Kurzenne JY, Desnuelle C, Dani C and Dechesne CA. Hierarchization of myogenic and adipogenic progenitors within human skeletal muscle. *Stem Cells.* 2010; *28*, 2182-94.
56. Vauchez K, Marolleau JP, Schmid M, Khattar P, Chapel A, Catelain C, Lecourt S, Larghéro J, Fiszman M and Vilquin JT. Aldehyde Dehydrogenase Activity Identifies a Population of Human Skeletal Muscle Cells With High Myogenic Capacities. *Mol Ther.* 2009; *17*, 1948-58.
57. Gang EJ, Bosnakovski D, Figueiredo CA, Visser JW and Perlingeiro RC. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood.* 2007; *109*, 1743-51.
58. Greco SJ, Liu K and Rameshwar P. Functional similarities among genes regulated by OCT4 in human mesenchymal and embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2007; *12*, 3143-54.
59. Riekstina U, Cakstina I, Parfejevs V, Hoogduijn M, Jankovskis G, Muiznieks I, Muceniece R and Ancans J. Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. *Stem Cell Rev.* 2009; *5*, 378-86.
60. Barraud P, Stott S, Møllgård K, Parmar M and Björklund A. In vitro characterization of a human neural progenitor cell coexpressing SSEA4 and CD133. *J Neurosci Res.* 2007; *85*, 250-9.
61. Meng J, Chun S, Asfahani R, Lochmüller H, Muntoni F and Morgan J. Human Skeletal Muscle-derived CD133+ Cells Form Functional Satellite Cells After Intramuscular Transplantation in Immunodeficient Host Mice. *Mol Ther.* 2014; *22*, 1008-17.

62. Pannérec A, Formicola L, Besson V, Marazzi G and Sassoon DA. Defining skeletal muscle resident progenitors and their cell fate potentials. *Development*. 2013; *140*, 2879-91.
63. Bonfanti C, Rossi G, Tedesco FS, Giannotta M, Benedetti S, Tonlorenzi R, Antonini S, Marazzi G, Dejana E, Sassoon D, Cossu G and Messina G. PW1/Peg3 expression regulates key properties that determine mesoangioblast stem cell competence. *Nat Commun*. 2015; *6*, 6364.

Chapitre 2. Etude des propriétés immunomodulatrices de la population MuStem humaine

I. Positionnement

Malgré des démonstrations cliniques prometteuses, la thérapie cellulaire allogénique reste aujourd'hui confrontée à une limite majeure qui est la réponse immunitaire. Au cours des quinze dernières années, des propriétés immunomodulatrices ont été décrites pour quelques types de cellules souches adultes en particulier les cellules souches mésenchymateuses (CSM) et les mésoangioblastes, permettant d'envisager une alternative à cette limite. Ainsi, un effet pléiotrope des CSM a été démontré sur le système immunitaire inné comme adaptatif avec des actions principalement paracrines. Compte tenu de la filiation périvasculaire mésenchymateuse de la population hMuStem, la seconde partie de ma thèse a consisté à déterminer si des propriétés immunomodulatrices ciblant le système inné et/ou adaptatif pouvaient lui être attribuées par l'étude *in vitro* de son impact respectivement sur l'activité du complément et la prolifération lymphocytaire.

II. Résumé de la démarche expérimentale

Le détail du matériel et méthodes utilisés étant décrit dans l'article joint ci-après, je ne ferai ici qu'un résumé des principaux points méthodologiques.

Le matériel biologique nécessaire aux expérimentations, à savoir les lymphocytes humains et les érythrocytes ovins, a été obtenu grâce à la mise en place respectivement d'une prestation de service auprès de la plate-forme Développement et Transfert à la Clinique du CHU de Nantes et d'une collaboration avec l'UMR 1300 INRA/Oniris. Une analyse phénotypique a été menée sur les cellules hMuStem par ELISA, immunocytochimie, RT-PCR, ainsi que par cytométrie en flux dans le cadre d'une collaboration avec Blandine Lieubeau de l'USC1383 INRA/Oniris/Université de Nantes. J'ai également mis au point la technique de dosage de kynurénine ainsi que des composés nitrés à partir des surnageants des cellules hMuStem. Cette caractérisation phénotypique a été complétée par une étude du comportement immunomodulateur *in vitro*. Afin d'étudier l'impact des cellules hMuStem sur la prolifération lymphocytaire, j'ai acquis une méthodologie basée sur l'incorporation de thymidine tritiée radioactive par les cellules en prolifération sur la plate-forme de radioactivité de l'Institut de Recherche

Scientifique/Université de Nantes. D'autre part, l'étude de l'impact des cellules hMuStem sur la lyse érythrocytaire médiée par le complément m'a conduit à développer une nouvelle technique au sein de l'UMR en m'appuyant sur les données de la littérature.

III. Résumé des résultats obtenus

Concernant l'immunité adaptative, nous montrons *in vitro* une faible immunogénicité des cellules hMuStem avec l'absence de prolifération lymphocytaire lors de la coculture avec les cellules hMuStem. D'autre part, la coculture directe entre cellules hMuStem et des lymphocytes préalablement activés par une MLR ou par un mitogène s'accompagne d'une diminution importante de la prolifération lymphocytaire, démontrant une capacité des cellules hMuStem à inhiber leur activation *in vitro*. Ces résultats fonctionnels peuvent être mis en parallèle des résultats de phénotypage obtenus. En effet, si les cellules hMuStem n'expriment pas Fas Ligand, IDO2, IL1 α , IL1 β , IL10 et l'IL33, elles sécrètent ou expriment en revanche l'IL6, IL8, IL35, HGF, HO-1, iNOS et PGE2. La L-Kynurénine détectée dans le surnageant des cellules hMuStem indique une présence de l'enzyme IDO fonctionnelle. En ce qui concerne les molécules de surface et notamment les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) impliquées dans le contact direct avec les lymphocytes, les cellules hMuStem sont toutes positives pour le HLA de classe I et négatives pour les HLA-DR, DP et DQ ainsi que le HLA-E et G. Le HLA-DR, DP et HLA-E sont en revanche exprimés après stimulation IFN γ . Par ailleurs, les molécules de costimulation CD80 et CD86 ne sont jamais exprimées.

En ce qui concerne l'immunité innée, nous montrons une capacité des cellules hMuStem à inhiber partiellement la lyse érythrocytaire médiée par le complément selon une modalité paracrine impliquant le facteur H. Sur le plan phénotypique, une expression du CD55 et du CD59, inhibiteurs du complément ainsi qu'une sécrétion de facteur H ont été mises en évidence.

Ces résultats ont fait l'objet :

- *de deux posters présentés au congrès de la Société Européenne de Thérapie Cellulaire et Génique (ESGCT) en octobre 2014 à La Haye (Pays-Bas) et au congrès international Myology en mars 2016 à Lyon.*
- *de trois communications orales présentées à l'ESGCT en octobre 2015 à Helsinki (Finlande), au congrès Nantes Actualités Transplantations (NAT) en juin 2016 à*

Nantes et au congrès PCS Cell Science & Stem Cell Conference en juin 2016 à Barcelone.

– *d'un article en préparation pour Journal of Immunology*

IV. Article

Title: Multiple immunomodulatory properties of human MuStem cells through action on both adaptive and innate immunity

Running title: Immune behavior of hMuStem cells

Judith Lorant^{*†}, Blandine Lieubeau^{¶†}, Nicolas Jaulin^{‡§}, Marine Charrier^{*†}, Candice Babarit^{*}, Cindy Schleder^{*†}, Isabelle Leroux^{*†}, Yann Péréon^{||}, Oumeya Adjali^{‡§} and Karl Rouger^{*†#}

^{*}INRA, UMR 703 PAnTher, Nantes, F-44307, France

[†]LUNAM Université, Oniris, École nationale vétérinaire, agro-alimentaire et de l'alimentation Nantes-Atlantique, Nantes, F-44307, France

[¶]INRA, USC 1383, Oniris Université de Nantes, EA 4644 IECM, Nantes, F-44307, France

[‡]Atlantic Gene Therapies, F-44000, France.

[§]INSERM, UMR1089, Centre Hospitalier Universitaire, Nantes, F-44000, France.

^{||}Centre de Référence maladies Neuromusculaires Nantes-Angers, Laboratoire d'Explorations Fonctionnelles, Hôtel-Dieu, Nantes, F-44093, France

Author's contributions: JL: performed experiments, collection and/or assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing; BL: performed flow cytometry experiments, data analysis and interpretation, manuscript writing; NJ: performed co-culture experiments, data analysis and interpretation; MC: performed Elisa assay, dosage and erythrocyte lysis experiments, data analysis; CB: performed RT-PCR analysis; CS, IL: performed MuStem cell isolation experiments; YP: provision of study material; OA: design of experiments, data analysis and interpretation; KR: conception and design, collection and/or assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing

Correspondence: Karl Rouger; INRA, UMR703, École Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes-Atlantique (Oniris), Route de Gachet, CS. 40706, F-44307 Nantes, France; Phone: +33 (0) 240 687 873; Fax: +33 (0) 240 180 002; E-mail: karl.rouger@nantes.inra.fr

Disclaimers: Not applicable.

Acknowledgments: This work was supported by a grant from the FEDER (Fonds Européen de Développement Régional; N°37085 and N°38436). It was realized in the context of the IHU-Cesti project that received French government financial support managed by the National Research Agency via the investment of the future program ANR-10-IBHU-005. The IHU-Cesti project was also supported by Nantes Metropole and the Pays de la Loire Region.

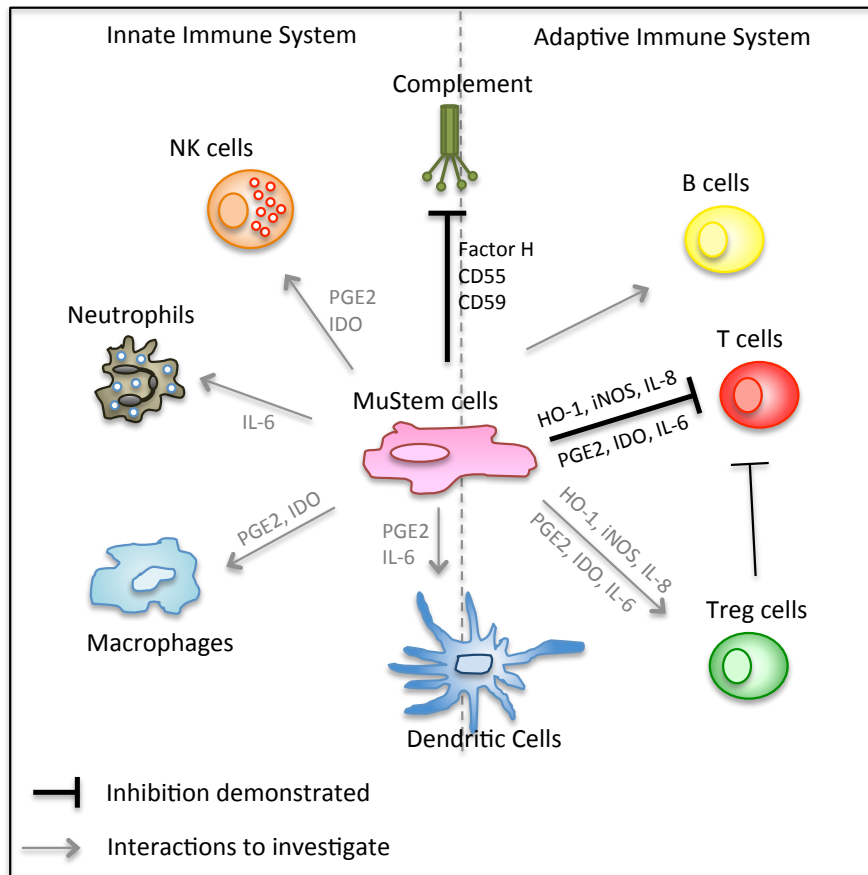
Keywords: Cell therapy, Allogeneic transplantation, Stem cells, Immunomodulation, Immune response.

ABSTRACT

Over the last years, many studies demonstrated *in vitro* pleiotropic immunomodulatory properties for adult stem cells, especially mesenchymal stem cells or vessel-associated stem cells. These cells interact with a wide variety of immune cells via direct cell-cell interactions and secretion of paracrine factors. We isolated a muscle-derived stem cell population in different species, named Mustem cells, which have a mesenchymal/perivascular origin and exhibit *in vitro/in vivo* myogenic potential, positioning them as promising candidate for a therapeutic application in a context of Duchenne Muscular Dystrophy, a severe and fatal degenerative muscle disease. Here, we demonstrated that human MuStem (hMuStem) cells are weakly immunogenic *in vitro*, as they do not activate allogeneic lymphocyte proliferation. Moreover, they inhibit mixed lymphocyte reaction and proliferation of concanavalin A-stimulated lymphocytes in a dose-dependent manner. hMuStem cells exert an immune tolerant phenotype, being characterized by presence of MHC class I antigens associated with the lack of MHC class II antigens and the co-stimulatory molecules. Also, they secrete various immunomodulatory molecules such as PGE₂, IDO, HO-1 or iNOS. After stimulation with the inflammatory molecules TNF α and IFN γ , hMuStem cells become positive for HLA-II molecules and upregulate the secreted factors. Moreover, we showed that hMuStem cells inhibit complement-mediated hemolysis mainly through secretion of factor H. Overall, these results demonstrate *in vitro* a global action of hMuStem cells on both innate and adaptive immunity. Combine to their participation in regenerating damaged tissues, these

immunomodulatory properties suggest that even HLA-mismatched hMuStem cells might be suitable for cell therapy of muscular dystrophies.

GRAPHICAL ABSTRACT



Introduction

MuStem cells are adult stem cells isolated from healthy skeletal muscles of Turkey, Dog and human based on their initial delayed adhesion properties [1, 2, Lorant *et al.*, submitted]. They are defined by their large proliferation potential, their oligopotency and specially an ability to commit in myogenic differentiation as well as their combined expression of myogenic and perivascular mesenchymal markers. Allogeneic cells have been demonstrated to strikingly improve the clinical status of the Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) dog representing the clinically relevant animal model of Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) and to generate persistent muscle repair [2, 3, 4, 5]. These results positioned the MuStem cell population among the few promising candidates for an attractive therapeutic avenue for DMD patients. Although the use of more and more effective immunosuppressive regimen [6], major limit in allogeneic-based cell therapy resides in the immune reject [7, 8]. This was particularly

true in the case of DMD that is characterized by a highly degenerative muscle tissue displaying a sustained inflammatory component as well as a large amount of resident and active immune cells [9, 10].

Over the past years, various *in vitro* and *in vivo* studies attributed to mesenchymal stem cells (MSCs) an ability to modulate the functions of different immune cell subpopulations involved in adaptive and innate immunity via direct cell-cell interactions and secretion of soluble paracrine factors [11, 12]. These include CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes, regulatory T cells (Tregs) [13, 14], natural killer (NK) cells [15] as well as B cells [16], dendritic cells (DC) [17] and macrophages [18]. In particular, *in vitro* mixed lymphocyte reactions and transplantation of MSCs across MHC barriers revealed that MSCs inhibit T cell proliferation induced by mitogens, CD3 and CD28 antibodies as well as by allogeneic antigens [19]. In addition, *in vitro* studies showed that MSCs suppress cytotoxic T lymphocyte activity directly by inhibiting their proliferation following allogeneic antigen stimulation and indirectly by promoting the activities of helper T lymphocytes and Tregs [20, 21, 22]. Melief *et al.* [23] showed that culture-expanded bone marrow-derived MSCs promote the generation of CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺ T cells in human PBMC populations via TGF- β 1 and induce differentiation of monocytes toward macrophage type 2 cells that express CD206 and CD163 and secrete high levels of IL-10 and CCL-18. Upon co-cultivation of MSCs with peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), CCL1 and sHLA-G were induced leading to a shift from allogeneic T cell responses to the secretion of a Th2 cytokine profile and inhibition of cytotoxic T cell-mediated lysis of allogeneic cells [11]. Human mesoangioblasts, vessel-associated stem/progenitor cells, also inhibit T lymphocyte proliferation through a cell-contact independent mechanism involving indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) and prostaglandin E-2 (PGE-2) [23]. It was determined that MSCs inhibit the division of stimulated T cells by preventing their entry into the S phase of the cell cycle and mediating an irreversible G0/G1 phase arrest [24]. Concerning the innate immune system, *in vitro* work revealed that MSCs can suppress the maturation of monocytes into DCs and so prevent their antigen-presentation function [17, 25]. It has been shown that co-culture of macrophages and monocytes with MSCs induces a regulatory macrophage population through increased levels of IL-10, reduced levels of TNF- α and IL-12 and low co-stimulatory molecule CD86 and HLA class II [26, 27, 28]. Generation of an immunoregulatory type of macrophages was also demonstrated *in vivo* [29]. MSCs were described as able to inhibit complement activation by producing factor H through IDO and PGE2 synthesis [30]. Finally, it was established that MSCs inhibit IL-2-induced NK cell proliferation, which is primarily mediated by the soluble

immunosuppressive factors TGF- β , sHLA-G and PGE-2 as well as cell–cell contact [11, 31]. As a result, MSCs have been used in the treatment of a variety of disorders [32, 33], notably revealing that co-transplantation of autologous MSCs and HSCs led to enhanced HSC engraftment [34] and that allogeneic transplantation of MSCs reduced the incidence and severity of graft-versus-host disease (GvHD) [35]. Overall, these immunomodulatory properties determined for the MSCs may allow their use even in allogeneic context for new therapeutic applications including stem cell-based therapies.

In this study, we sought to examine *in vitro* the immunogenicity of human MuStem cells and to characterize if they could modulate the function of immune cells in a similar manner to MSCs. For that purpose, hMuStem cells were tested for their interaction with T lymphocytes and the complement system through *in vitro* assays. Flow cytometry experiments, Elisa assays and Kynurenin/NO dosage were performed to determine the profile of specific cell surface and secreted markers on hMuStem cells. Here, we present novel findings that demonstrate that hMuStem cells display an immune regulatory phenotype and are able to interact with and modulate *in vitro* the functions of both T cells and complement,

Materials and Methods

Chemical reagents

Collagenase type-VIII, hyaluronidase type-1S, pronase E, dimethylsulfoxide, trichloroacetic acid, p-dimethylbenzaldehyde, acetic acid, concanavaline A (ConA), NaCl, Sodium Barbitol, CaCl₂ and MgCl₂ were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France) unless stated otherwise. TNF α and IFN γ molecules were purchased from Miltenyi (Bergisch Gladbach, Germany) and streptavidin-agarose from Biorad (Hercules, CA, USA).

Human skeletal muscle tissue

Tissue samples were obtained from *Paravertebralis* muscles of 12- to 15-year-old subjects free of known muscle disease and operated for scoliosis at the Department of Pediatric surgery of the Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Hôtel Dieu de Nantes (France). All patients gave written informed consent. All protocols were approved by the Clinical Research Department of the CHU (Nantes, France), according to the rules of the French Regulatory Health Authorities. Biological sample bank was constituted in compliance with the national guidelines regarding the use of human tissue for research (Permit numbers: MESR/DC-2010-1199; CPP/29/10).

Sheep red blood cells

Sheep red blood cells (SRBC) were kindly provided by Dr. Nathalie Delacotte (INRA UMR 1300 Oniris, Nantes, France) and kept in RPMI 1640 (Lonza, Basel, Swiss) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Pierce-Hyclone, Logan, UT, USA) and 1% 100 UI/mL penicillin/0.1mg/mL streptomycin/0.25 µg/mL amphotericin B (PSF, Sigma, St. Louis, MO, USA) at 4°C in the dark. SRBC were washed every week by suspension homogenization before centrifugation (5 min, 400 g) to discard dead cells or free hemoglobin and SRBC sediment was taken back in fresh medium.

Other cell types

Human CD3⁺ lymphocytes were isolated by centrifugal counter-flow elutriation from blood samples of patients (Clinical Transfer Facility, CICBT0503, Nantes, France) and next sorted by negative magnetic sorting using EasySep™ kit (>90% of purity; Stemcell Technologies, Vancouver, Canada). Mesenchymal stem cells (MSCs), adherent Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) and Raw cells were plated on Lab-Tek chamber slides (Nalge Nunc., International, Rochester, NY) at 2.10⁴ cells/cm² in growth medium (MSCs: 89% αMEM/10% FCS/1% PSF ; PBMCs and Raw cells: 89% RPMI 1640/10% FCS/1% PSF) during three days and served as controls for immunocytochemistry study.

Isolation of human MuStem cells

Freshly surgically resected muscle tissues were placed in cold phosphate buffered saline (PBS; PAA, Les Rumeaux, France) supplemented with 2% PSF and transferred to the laboratory. They were weighed, washed several times in PBS/2% PSF, carefully minced into 1 mm³ pieces using forceps and scalpel and enzymatically digested (15 min, 37°C) by a mix of collagenase type-VIII (2,000 U/g of tissue, Sigma-Aldrich) and 0.2% hyaluronidase type-1S (Sigma-Aldrich). The pre-digested tissue was centrifuged (100 g, 5 min), the supernatant collected and neutralized with 20% (v/v) FCS while the pellet was further digested (30 min, 37°C) with 0.125% Pronase E (Sigma-Aldrich). After centrifugation (100 g, 5 min), the supernatant was collected, pooled with the previous ones and submitted to successive centrifugations (300 g, 15 min) and sequential filtering through 100-, 70-, and 40-µm pore-diameter nylon mesh (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA).

Muscle-derived cells (MDCs) were resuspended in PBS/1% PSF/2% FCS and viability was assessed using 0.1% trypan blue staining (VWR, Strasbourg, France). hMuStem cells were

isolated using a modified version of the preplating technique, as previously described (Rouger et al., 2011). Cells were initially plated at 10^4 viable cells/cm² in gelatin-coated flasks under standard condition (37°C in 95% humidified air and 5% CO₂) and grown in medium (Macopharma, Mouvax, France) containing 10% FCS, 1% PSF, 10 ng/mL human recombinant basic fibroblast growth factor and 25 ng/mL human recombinant epidermal growth factor (PromoCell, Heidelberg, Germany). Growth medium was replaced every four days. At confluence, cell layers were dissociated with 0.25% v/v trypsin-EDTA (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Cell were then resuspended in growth medium and seeded at 1.10^4 cells/cm² (passage 1, P1). Five batches of hMuStem cells at P5 were used for the different experiments. In some experiments, cells were treated 48h or 72h with 25 µg/mL TNFα or 50 µg/mL IFNγ (Miltenyi).

Isolation of human PBMCs

PBMCs were isolated by gradient-density centrifugation (400 g, 20 min, RT) on Ficoll 1.077 (PAA). PBMC rings were collected in PBS/5% FCS and centrifuged (400 g, 10 min, 4°C). The supernatant was removed and the pellet was washed twice with PBS/5% FCS before centrifugation (300 g, 10 min, 4°C). Cells were counted in Türk and Trypan dyes. Red blood cells were lysed in a lysis buffer (NH₄Cl, KHCO₃, Na₂EDTA; 10 min, RT) and washed twice. PBMCs were frozen in FCS/10% Dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich) prior to test.

Flow cytometry

hMuStem cells or lymphocytes were resuspended in cold PBS/2% human serum and 10^5 cells were incubated (30 min, 4°C) in the dark with fluorochrome-conjugated antibodies (Ab) at saturating concentration (Table 1). Isotype-matched Ab and fluorescence minus one control samples were used as negative controls for gating and analyses. When applicable, 7-amino-actinomycin D (7-AAD; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) was added to evaluate cell viability. Samples were acquired using a FACS Aria flow cytometer (BD Biosciences) and data were analyzed using FlowJo software (FlowJo, Ashland, Oregon). For each labeling, at least 15,000 viable cells were considered.

Table 1. List of antibodies used for FACS and immunocytochemistry analysis**A.**

Antigen	Conjugation	Clone	Company	Isotype
CD55		IA10	BD Biosciences	Mouse IgG1-PE
CD59		p282 (H19)	BD Biosciences	Mouse IgG1-PE
CD80	PE	L307.4	BD Biosciences	Mouse IgG1-PE
CD86		2331 (FUN-1)	BD Biosciences	Mouse IgG1-PE
HLA-A,B,C		W6/32	eBiosciences	Mouse IgG1-PE
HLA-DP	NA	HI43	SEROTEC	Mouse IgG1
HLA-DQ	FITC	Tu169	BD Biosciences	Mouse IgG1-FITC
HLA-DR		LN3	eBiosciences	Mouse IgG1-PE
HLA-E	PE	3D12	BIOLEGEND	Mouse IgG1-PE
HLA-G		87G	BIOLEGEND	Mouse IgG2a-PE
HO-1	NA	HO-1-1	Abcam	Mouse IgG1

B.

Antigen	Secondary antibody	Clone	Company	Dilution, incubation temperature and time
HO-1	Biotinylated Ab + Streptavidin Alexa 555	HO-1-1	Enzo ifesciences	1:200, 60 min, 37°C
iNOS		sc-651	Santa Cruz	1:100, ON, 4°C

Immunocytochemistry

Cells were fixed in cold methanol (15 min, -20°C) and treated with 0.3% triton X-100 (30 min, 4°C). After incubation (60 min, RT) in blocking buffer (5% goat serum in PBS), cells were incubated with the Ab listed in Table 1. Cells were finally counterstained (15 min, 37°C) with DAPI fluorescent cell-permeable DNA probe (Life Technologies Ltd, Paisley, UK). More than 300 cells were counted per sample by using Fiji image analysis software (Schindelin *et al.*, 2012). Data were presented as the mean \pm SD.

RT-PCR analysis

Total RNA was extracted from either dry pellets of 2.10^6 cells or muscle tissue samples, using RNeasy mini kit (Qiagen, Santa Clara, CA, USA) or RNeasy Fibrous kit (Qiagen) following manufacturer's instructions, respectively. Total RNA was treated with DNase (Ambion, Austin, TX, USA), quantified using a NanoDrop spectrophotometer (Labtech, Wilmington, DE, USA) and processed for reverse transcriptase using standard protocol described in Supplemental Information. RT reactions were carried out on 0.5 μ g of total RNA using the

GoScript reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA). Gene-specific oligonucleotide primers were designed using Oligo Primer Analysis Software v.7 (Molecular Biology Insights Inc., Colorado Springs, CO, USA) and synthesized by MWG Operon (Eurofins, Ebersberg, Germany). List of primers is supplied in Table S1. PCR amplifications were performed on 0.5 μ L of cDNA with the following program: initial denaturation (12 min, 95°C) followed by 35 cycles (30 s, 94°C; 30 s, 60°C; 30 s, 72°C) and a final extension (10 min, 72°C). The PCR products were migrated and visualized on a 2% agarose gel with GelRed staining. RPS18 was used as an endogenous control.

Table S1. Summary of modeled primers used for RT-PCR analysis

Gene name		Sequence 5'-3'	Product size (bp)	Accession number
RPS18	Fw	ACCAAGAGGGCGGGAGAA	85	NM_022551.2
	Rv	CTGGGATCTTGTACTGGCGTC		
Cox2	Fw	TGATGATTGCCCGACTCCCT	188	NM_000963.2
	Rv	CTGGCCCTCGCTTATGATCT		
Factor H	Fw	TTCTGGGCTTGTGGCTTGT	327	NM_001014975.2
	Rv	CTGGGTGCCTTCTGGATATGTTT		
FasL	Fw	ATGCACCGCTACGACGTGA	150	NM_003106.3
	Rv	GGACTTGACCACCGAACCCAT		
HO-1	Fw	CCAACATTGCCAGTGCCACC	104	NM_002133.2
	Rv	CTTGGCCTCTTCTATCACCCCT		
IDO1	Fw	AAAGGCAACCCCCAGCTATC	315	NM_002164.5
	Rv	CAGGGAGACCAGAGCTTTCACA		
IDO2	Fw	CATAGAAGACATCCACTCAGCAC	200	NM_194294.2
	Rv	GAGGCCCTGGGAGATGGTTTG		
IL1 α	Fw	CCCAAGATGAAGACCAACCAG	209	NM_000575.3
	Rv	AAAGTCAGTGATAGAGGGTGG		
IL1 β	Fw	CAGCTACGAATCTCCGACCACCA	298	NM_000576.2
	Rv	GGAGGTGGAGAGCTTTCAGT		
IL6	Fw	AAAGAGGCACTGGCAGAAAACAA	257	NM_000600.3
	Rv	GGGGTGGTTATTGCATCTAGATT		
IL8	Fw	ACCTTTCCACCCAAATTTATCA	277	NM_000584.3
	Rv	CCTACAACAGACCCACACAATAC		
IL10	Fw	CCTTGTCTGAGATGATCCAGTT	145	NM_000572.2
	Rv	AGAAATCGATGACAGCGCC		
IL33	Fw	AAATCCCAACAGAAGGCCAAAG	166	NM_033439.3
	Rv	GACAGGCAGCGAGTACCAG		
IL35	Fw	GTGTCCAGCGCGCAGCCTC	169	NM_000882.3
	Rv	TTGTCTGGCCTTCTGGAGCATGT		
TGF β 2	Fw	CCTGCTAATGTTATTGCCCTCCT	244	NM_001135599.2
	Rv	CCTGCTGTGCTGAGTGTCTG		

ELISA assay

Supernatant of stimulated or unstimulated hMuStem cells was collected, centrifuged to discard any cell fragment and stocked at -20°C. The presence of the secreted proteins namely

Factor H, Hepatocyte Growth Factor (HGF), Interleukin-1 alpha (IL1 α), Interleukin-1 beta (IL1 β), Interleukin-10 (IL10), Interleukin-33 (IL33), Interleukin-35 (IL35) and Prostaglandin E2 (PGE2) was measured by ELISA (HGF, IL1 α , IL1 β : R&D Systems; IL10, PGE2: Enzo Life Sciences; IL33: Abcam; IL35: MyBioSource), according manufacturing procedures (detection threshold: Factor H, 0.2 ng/mL; HGF, 40 pg/mL; IL1 α , 1.0 pg/mL; IL1 β , 1.0 pg/mL; IL10, 3.75 pg/mL; IL33, 0.2 pg/mL; IL35, 15.6 pg/mL; PGE2, 13.4 pg/mL).

Kynurenin and NO dosage

Supernatant of stimulated or unstimulated hMuStem cells was collected, centrifuged to discard any cell fragment and stored at -20°C. For kynurenin assay, supernatants were incubated with trichloroacetic acid (30%; Sigma-Aldrich) and centrifuged (5 min, 10.000 g). An equal volume of Ehrlich's reagent corresponding to 2% p-dimethylbenzaldehyde (Sigma-Aldrich) in glacial acetic acid was added to each sample and incubated for 10 min at RT. For NO dosage, supernatant of hMuStem cell primary cultures are incubated (10 min, RT) with Griess reagent (Griess Reagent Kit, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). The optical density (OD) was read on plate reader (LT-4000 Microplate Reader) with Labtech Manta Lite software (Labtech International Ltd.) at 450 nm and 548 nm for kynurenin and NO, respectively. Kynurenin and nitrite concentrations were calculated in comparison with standards consisting in serial dilution series of kynurenin (Sigma-Aldrich) from 150 to 600 mM and of nitrite (Cayman Chemical) from 5 to 35 μ M, respectively.

Evaluation of lymphocyte proliferation after coculture with hMuStem cells

Cultured hMuStem cells (n=4) in either unstimulated or stimulated (TNF α or IFN γ) culture conditions were harvested and irradiated at 35Gy during 10 min. Recovered hMuStem cells were co-cultured with 10⁵ unactivated T-cells per well during 5 days (hMuStem cells:T-cell ratios: 2:1, 1:1, 1:4, 1:16 and 1:64). Another experiment consisted in co-culturing irradiated hMuStem cells (n=4) in either unstimulated or stimulated (TNF α or IFN γ) culture conditions with 10⁵ T-cells per well stimulated with either concavaline A (Con A, Sigma-Aldrich) or allogeneic irradiated (35Gy) PBMCs (MLR assay) during 5 days (hMuStem cells:T-cell;PBMC ratios: 2:1:1, 1:1:1, 1:4:4, 1:16:16 and 1:64:64).

For both experiments, cells were then incubated overnight with tritiated thymidine (0.925 μ Bq/mL, PerkinElmer, Zaventem, Belgium) and harvested on filter using Harvester Mach III (Tomtec, Hamden, USA). Radioactivity was measured on the filters using 1450 MicroBeta Jet

(Perkin Elmer). Activation threshold was determined by considering proliferation mean of unstimulated lymphocytes alone \pm 3 SD. Percentages of inhibition were calculated as follows:
% inhibition = 100 – radioactivity measure of the sample / radioactivity measure of activated T-cell control.

Erythrocyte lysis

SRBCs were washed twice in Veronal Buffered Saline (VBS: 0.75 M NaCl/25.95 mM Sodium Barbital/1.15 mM CaCl₂/6.10⁻³ M MgCl₂) to discard free hemoglobin. SRBCs were centrifuged (5 min, 600 g) and resuspended in appropriate volume to obtain 1.10⁸ SRBCs per well of 96-well plate. For factor H depletion, supernatants of hMuStem cell primary cultures were successively incubated (60 min, RT) with biotin-conjugated anti-factor H antibody (2 g/mL, Abcam) and streptavidin-agarose beads (15 g/mL, BioRad). Samples were then centrifuged and supernatants of factor H-depleted hMuStem cell primary cultures were harvested. Supernatants, undepleted or depleted of factor H, were added on SRBCs at a final concentration of 80% v/v. After incubation (30 min, 37°C), cells were centrifuged and supernatants were transferred in 96-well plate. The OD was read at 405 nm on plate reader (LT-4000 Microplate Reader) with Labtech Manta Lite software (Labtech International Ltd.). Positive and negative controls consist in SRBCs lysed with distilled water (100% lysis) or incubated with 15% human serum and SRBCs incubated with VBS, respectively.

Statistical analysis

All data were reported as mean \pm SD. Lymphocyte proliferations were compared between different ratio of co-cultured MuStem cells, using a Kruskal-Wallis test completed with multiple comparisons between pairs. Secretion of soluble molecules by hMuStem cells were compared between unstimulated and TNF α or IFN γ stimulation conditions, using Mann-Whitney test. Hemolysis results were compared between factor-H depleted or undepleted supernatant, using multiple t-test with Holm-Sidak correction. A value of $P < 0.05$ was considered to be statistically significant.

Results

hMuStem cells were able to inhibit in vitro T cell proliferation

Independent hMuStem cell batches (n=4) were co-cultured in different ratios with unactivated lymphocytes (MCR) as well as with MLR- or ConA-activated lymphocytes. Results are summarized in Figure 1. In contact with unactivated lymphocytes, hMuStem cells did not

induce lymphocyte proliferation at any ratio in comparison with positive control, suggesting a weak immunogenicity for the hMuStem cells (Fig. 1A). When hMuStem cells were added to MLR- or Con-A activated lymphocytes, a significant decrease of the lymphocyte proliferation was determined at 1:2, 1:1 and 4:1 (Lymphocytes:MuStem cells) ratio (Fig. 1B), that reveals an ability of the hMuStem cells to inhibit *in vitro* T cell proliferation activity. In return, this effect was lost when lower ratios of hMuStem cells (16:1 and 64:1) were applied. Neither TNF α nor IFN γ stimulation of hMuStem cells has impact on this inhibitory capacity (Fig. S1).

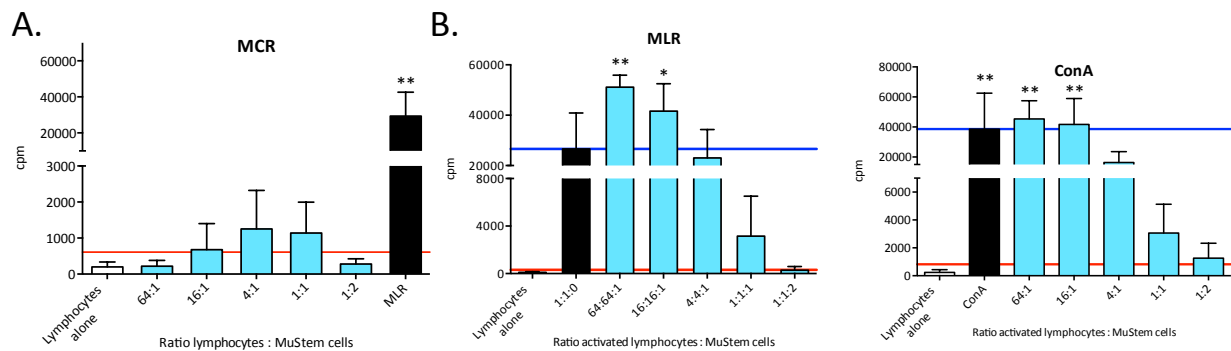


Figure 1: hMuStem cells display inhibitory effect on T-cell proliferation. hMuStem cells were seeded at 1.10^5 cells per square centimeter and cocultured for 5 days with (A) unactivated lymphocytes or (B) activated lymphocytes with either ConA or allogeneic PBMC (MLR), at different ratio. Summary of independent experiments with hMuStem cells from four different donors. Results are expressed as mean \pm SEM.

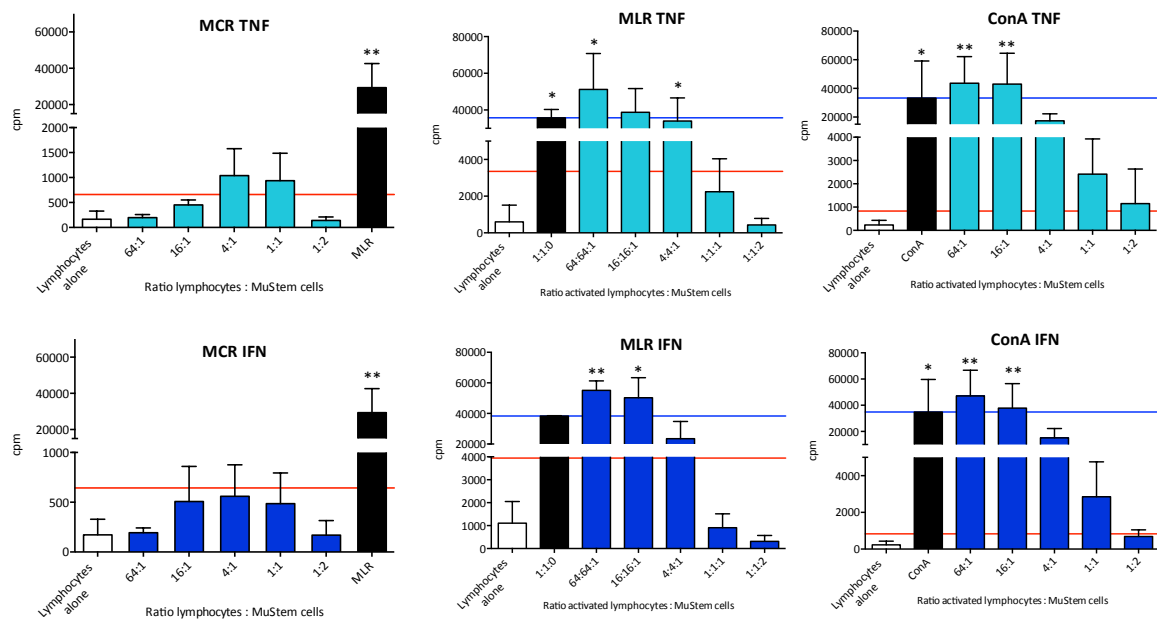


Figure S1: TNF or IFN stimulation do not influence inhibitory effect of hMuStem cells on T-cell proliferation. hMuStem cells were seeded at 1.10^5 cells per square centimeter and were treated with TNF α or

IFN γ before cocultured for 5 days with (A) unactivated lymphocytes or (B) activated lymphocytes with either ConA or allogeneic PBMC (MLR), at different ratio. Summary of independent experiments with hMuStem cells from four different donors. Results are expressed as mean \pm SEM.

hMuStem cells display an immune regulatory phenotype

To investigate the mechanisms of action potentially involved in this lymphocyte proliferation inhibition, hMuStem cells were phenotyped. All hMuStem cells were positive for HLA class I surface antigens while they were negative for HLA class II (DR, DP and DQ) in native condition (Fig. 2). Importantly, they homogeneously acquired HLA-DR and DP expression following IFN γ stimulation whereas only one cell batch express HLA-DQ. We focused also on the expression of the non-classical HLA molecules, namely HLA-E and HLA-G. hMuStem cells express HLA-E only following IFN γ stimulation while they are always negative for HLA-G. Finally, hMuStem cells were characterized by the lack of expression for the costimulatory molecules CD80 and CD86.

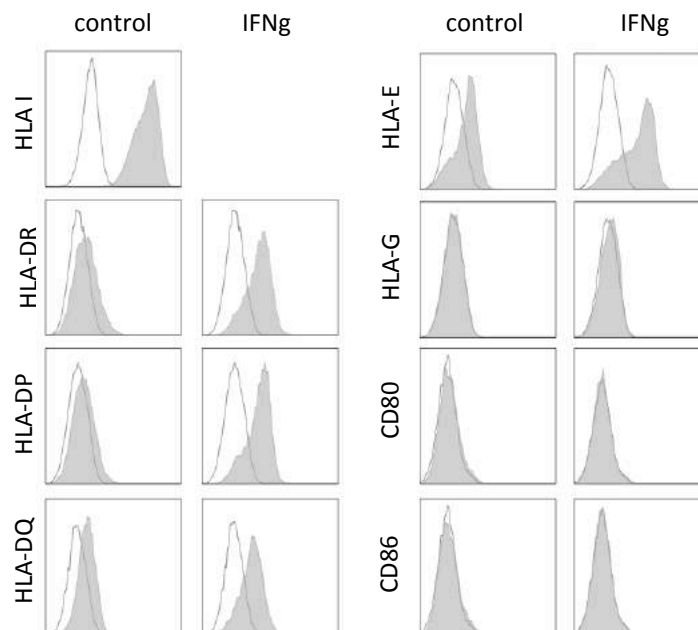


Figure 2: hMuStem cells express MHC molecules in native or stimulated conditions. The expression of surface markers on hMuStem cells was assessed by flow cytometry. Histograms show level of surface marker expression on hMuStem cells (red) and isotype control (black). Data are one representative of five hMuStem cells donors.

All MuStem cell batches were defined in native conditions by the presence of the transcript Cox2, the enzyme that produces PGE2 (Fig. 3A). By ELISA assay, we determined the PGE2

secretion of hMuStem cells at 32.8 ± 19.7 pg/mL per cell million (Fig. 3B). This secretion was upregulated after TNF α (10302 ± 15858 pg/mL per million) but not IFN γ stimulation (26.7 ± 11.0 pg/mL per million) (Fig. 3D). IL-6, IL-8, IL-33 and IL-35 transcripts were detected by RT-PCR analysis on all hMuStem cell batches (Fig. 3A). In native condition, 418 ± 184 pg/mL, 422 ± 146 pg/mL and 6887 ± 4383 pg/mL per cell million of IL-6, IL-8, and IL-35 were determined, respectively (Fig. 3B). In return, IL33 was not detected. Finally, hMuStem cells also produced HGF at 4259 ± 2281 pg/mL per cell million (Fig. 3B). An up-regulation of IL-6 and IL-8 secretion was observed after TNF α stimulation (48547 ± 34535 pg/mL per million and 112069 ± 57631 pg/mL per million, respectively). A decrease of IL-8 secretion was induced by IFN γ stimulation (146 ± 77.1 pg/mL per million) and of IL-35 secretion by TNF α stimulation (1037 ± 784 pg/mL per million) whereas no effect of this stimulation was observed in IL-6 production (295 ± 222 pg/mL per million) (Fig. 3D).

The expression of HO-1 was determined by RT-PCR in all hMuStem cell batches tested (Fig. 3A). Twenty to 70% of HO-1⁺ cells were demonstrated by immunocytochemistry and FACS analysis (Fig.3E-F). In native or stimulated conditions, all hMuStem cell batches were characterized by the presence of TGF β (Fig. 3A) and the lack of FasL (data not shown) at RNA level.

In native conditions, hMuStem cells expressed neither IDO1 nor IDO2 at RNA level (Fig. 3C and data not shown). Following TNF α or IFN γ stimulation, hMuStem cells did not express IDO2 whereas IDO1 transcript was detected after IFN γ stimulation. 252 ± 91.7 mM of kynurenin, the enzyme product by IDO, were detected in the supernatant of the hMuStem cell primary cultures (Fig. 3B). In addition, IL-1 α and IL-1 β were detected at transcript level only after TNF α stimulation (Fig. 3C) but no secretion was shown after ELISA assays (data not shown). hMuStem cells are negative for IL10 secretion under native or stimulated conditions (data not shown). On the different hMuStem cell batches tested, we determined that 100% of cells express iNOS, using immunocytochemistry (Fig. 3G). 6.9 ± 1.2 μ M, 8.9 ± 1.2 μ M and $8.3 \pm 2,4$ μ M of this enzyme were detected in the supernatants of unstimulated, TNF α -stimulated and IFN γ -stimulated hMuStem cell primary cultures, respectively (data not shown).

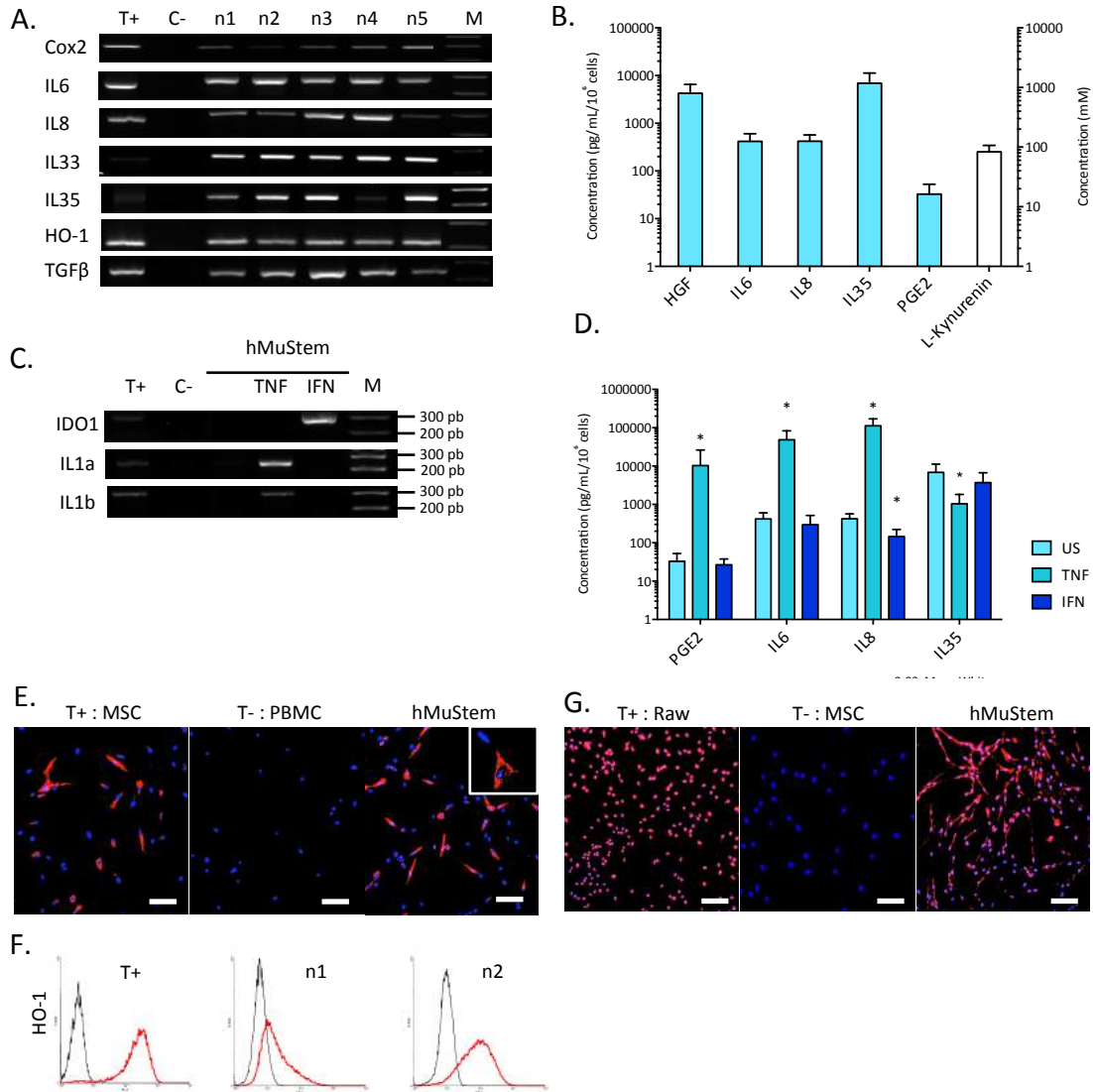


Figure 3: hMuStem cells secrete numbers of immunomodulatory molecules. The expression levels of (A) Cox2, IL-6, IL-8, IL-33, IL-35, HO-1, TGFβ, IDO1, IL1α and IL1β were assessed by PCR analysis. MSC (Cox2, IL-6, IL-8, HO-1 and TGFβ) and PBMC (IL-33, IL-35, IDO1, IL1α and IL1β) were used as positive controls (B): HGF, IL-6, IL-8 and PGE2 quantification was performed using enzyme-linked immunosorbent assays on supernatants (left Y axis) while IDO activity was evaluated by dosing L-kynurenin in hMuStem cell supernatant (right Y axis). Results are expressed as mean ± SEM. (C) IDO1, IL1α and IL1β were assessed by PCR analysis. PBMC were used as positive controls (D): PGE2, IL-6, IL-8 and IL-35 quantification was performed using enzyme-linked immunosorbent assays on supernatants of unstimulated (US), TNFα or IFNγ stimulation. Results are expressed as mean ± SEM. p value *, <.03. (E) HO-1 expression was evaluated by immunocytochemistry using MSC and PBMC as positive and negative controls, respectively. Scale bar: 50 μM. (F) The expression of HO-1 was assessed by flow cytometry. Macrophages are used as positive controls (T+). Histograms show level of surface marker expression on two batches of hMuStem cells (red) and isotype control (black). (G): iNOS expression was evaluated by immunocytochemistry using Raw cells and MSC as positive and negative controls, respectively. Scale bar: 50 μM.

hMuStem cells inhibit complement formation by factor H secretion

By FACS analysis, we showed that 80 to 91% and 91 to 99% of all hMuStem cells were CD55⁺ and CD59⁺, respectively (Fig. 4A-B). Moreover, we determine by ELISA that hMuStem cells secrete Factor H in native conditions (11,7 to 158 ng/mL) and present an up-regulation after TNF α (12,5 to 204 ng/mL) and IFN γ stimulation (11,6 to 389 ng/mL) (Fig. 4C). To determine if hMuStem cells have an impact on complement formation, an hemolysis experiment that consisted in incubating sheep red blood cells (SRBCs) with human serum as source of complement and adding hMuStem cell supernatant, was realized. Red blood cells in distilled water (total lysis) or in serum without supernatant (Ctrl+) were used as positive control and represent 100% of hemolysis. When hMuStem cell supernatant was added, we observed a decreased of hemolysis of about 28% in native or stimulated conditions (Fig. 4D). Importantly, when we used Factor-H depleted hMuStem cell supernatant, hemolysis was restored (Fig. 4D), showing a partial implication of Factor H in inhibition of complement-mediated hemolysis by hMuStem cells.

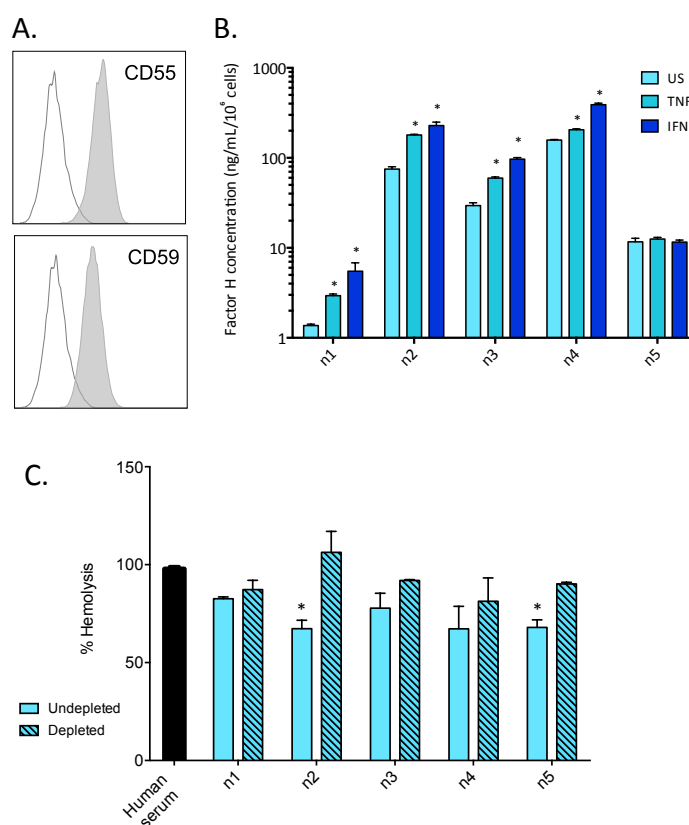


Figure 4: hMuStem cells display inhibitory effect on complement-mediated hemolysis mediated by Factor H production. The expression levels of (A) CD55 and (B) CD59 was assessed by flow cytometry. Histograms show level of surface marker expression on hMuStem cells (M2) and isotype control area (M1). (C) Factor H quantification was performed using enzyme-linked immunosorbent assays on supernatants of unstimulated (US), TNF α or IFN γ stimulation. Results are expressed as mean \pm SEM. p value *, <.05. (D) Complement inhibition was evaluated by hemolysis assay using sheep red blood cells in distilled water (total lysis) or red blood cells in human serum (Ctrl +) as positive controls. Factor H-depleted or undepleted hMuStem cell supernatant were added to red blood cells in human serum. Results are expressed as mean \pm SEM. p value ****, <.0001.

Discussion

To define the immunological status of the human MuStem cells is crucial for the set-up of therapeutic strategy based on this adult stem cell population. A large number of studies reported immunomodulatory properties of human MSC or mesoangioblasts *in vitro* by acting on innate and adaptive immunity. In this study, we investigated whether hMuStem cells could display such properties. We showed for the first time that a population of skeletal muscle-derived stem cells is weakly immunogenic *in vitro*, as demonstrated by a low proliferation of allogeneic lymphocytes in contact with MuStem cells. These results are similar to those obtained in literature with mesoangioblasts [23] that display the same low immunogenicity. Concerning MSCs, this capacity is controversial. Some groups demonstrated that direct co-culture of MSCs with unstimulated allogeneic PBMC for 7 days leads to a proliferation of these cells [37]. Nevertheless, this study has been done by removing MSCs after 7 days with PBMCs and then left the PBMCs alone before investigated the proliferation. The majority of the studies showed that direct co-culture between MSCs and PBMCs lead to a weak proliferation of these cells. [38-39] This weak immunogenicity of MuStem cells could not be correlated with HLA I level, which is highly expressed. One can make the hypothesis that secreted soluble factors are sufficient to avoid T cell activation. Even if it is commonly considered that T cell activation is initiated by receptor triggering, some authors demonstrated that activation could be antigen independent, as the proliferation of lymphocytes by both allogeneic and autologous MSC in transwell systems, indicated that T cells could be activated by soluble factors [37].

Importantly, we demonstrated that hMuStem cells are able to inhibit ConA or MLR-activated T-cells in a dose dependent manner with an effect observed until 1:4 ratio and 1:1 for ConA and MLR activation, respectively. This dose effect was also described with MSCs [38-39]. Yang *et al.* showed an inhibitory effect at 1:1 up to 1:50 (MSCs:PBMCs) with a CD3/CD28 stimulation [40] whereas Tsé *et al.* demonstrated an effect at 1:6 ratio [39]. Concerning mesoangioblasts, CD3/CD28 activation is counteract from 1:1 to 4:1 ratio (Mabs:PBMCs) [23]. However, the thymidine uptake could be linked to proliferation of cells but also to survival, so we couldn't conclude if this decrease of proliferation is linked to a decrease of activation or survival of T cell in contact to hMuStem cells. In order to explain the action modalities of hMuStem cells on T cell proliferation, we reported negativity for HLA-DR, DP, DQ, E and G in native conditions whereas IFN γ stimulation leads to an up-regulation of HLA-DR, DP and G which contrast with MSC and mesoangioblast phenotype that are negative for HLA-II even after stimulation [23, 41, 42]. HLA-G, a tolerogenic non-classical

form of MHC found in trophoblast, is expressed constitutively by MSCs [43, 44]. Moreover, hMuStem cells do not express in any condition, costimulatory molecules CD80 and CD86, like MSCs and mesoangioblasts. This data suggest that, even if hMuStem cells display the machinery required for nonself antigen presentation, they fail to induce allogeneic T-cell proliferation.

An important part of our work was to determine the secretory profile of hMuStem cells. We detected an important secretion of HGF (4259 ± 2281 pg/mL per cell million), IL6 (418 ± 184 pg/mL per cell million), IL8 (422 ± 146 pg/mL per cell million), IL35 (6887 ± 4383 pg/mL per cell million) and PGE2 ($32,8 \pm 19,7$ pg/mL per cell million). In comparison, MSC secrete between 125 pg/mL and 343 pg/mL of HGF [45, 46], 776.46 ± 86.32 pg/48 h/ 10^5 cells of IL6 [47] and 80 pg/mL/48h of PGE2 [48]. As it has been described for MSCs and mesoangioblasts, hMuStem cells are sensitive to TNF α stimulation with a strong up-regulation of IL6, IL8 and PGE2 respectively. PGE2 is clearly involved in the immunomodulatory effect of MSCs and mesoangioblasts not only in lymphocytes but also in macrophages [48, 49] but if mesoangioblasts, similarly to hMuStem cells, responds to TNF α [23], MSC are only sensitive to IFN γ concerning PGE2 secretion [50]. This difference could be link to different activated pathways that could have a impact on in vivo behavior of cells. Importantly, the secretion of IL6 and IL8 by hMuStem cells is quite hard to explain because their functions are still controversial. IL6 and IL8 are classically described as inflammatory cytokines [51] but IL6 has been reported to partially mediate immunosuppressive effect of MSCs [52, 53]. It has been described that IL6 and IL8 are strongly secreted by muscle tissue, which is considered today by some authors as an endocrine organ [54]. These cytokines called myokines are especially secreted by myoblasts under native or inflammatory conditions. IL6 is secreted constitutively by human myoblasts (3312 pg/mL) and is affected by TNF α (16811 pg/mL) and IFN γ (5918 pg/mL) and IL8 also (114 pg/mL in native conditions; 1153 pg/mL with TNF α stimulation and 865 pg/mL with IFN γ stimulation) [55]. IL6 was described as a key regulator of satellite cell proliferation [56]. The secretion of myokines by hMuStem cells could be linked to their myogenic origin.

Concerning IDO, MSCs as mesoangioblasts are able to express these enzymes only in inflammatory condition with a detection of enzyme metabolite, L-kynurenin, at 20 μ M for MSCs [57]. hMuStem cells present a stronger secretion of this molecule with $252 \pm 91,7$ mM.

Finally, iNOS enzyme is expressed by hMuStem cells and nitrites are detected in supernatant of hMuStem cells at $6.9 \pm 1.2 \mu\text{M}$ whereas in literature, MSCs secrete among $20 \mu\text{M}$ of nitrites [58].

Interestingly, we do not detect any secretion of IL10 and no transcript expression of FasL, in contrast to MSCs that are defined by expression of these molecules [59, 60] although the secretion of IL10 is still controversial with some studies that showed an absence of IL10 in MSC supernatant [40].

Concerning the interaction between innate immunity and hMuStem cells, and in concordance with the results in literature concerning MSCs, we demonstrated that MuStem cell population is able to inhibit complement-mediated lysis and this effect is, in part, mediated by factor H secretion. Tu *et al.* showed that MSCs secrete 300 ng/mL of Factor H and confirmed that MSCs inhibit complement-mediated lysis of about 40%. The depletion of MSC supernatant from factor H lead to a restauration of hemolysis, demonstrating that this molecule is involved in the effect [30]. The inhibition of complement by hMuStem cells is not complete and we can hypothesis that surface molecules expressed by hMuStem cells, CD55 and CD59, may be involved in the effect of hMuStem cells. It would be interesting to use neutralizing antibodies to demonstrate this implication.

In this study, we demonstrate that, even if hMuStem cells display some similar pattern as MSCs, they also are quite different in terms of secreted factors, cell surface molecules profile and interaction with lymphocytes. It would be major to strongly confirm and correlate the phenotype with the *in vitro* effect observed on lymphocyte proliferation by performing inhibitory based-assay.

Over the last years, many works have demonstrated large panel of immunomodulatory properties for MSCs that may allow them to survive in xenogeneic environment [24, 44, 45]. Based on the present demonstration of similar properties for hMuStem cells, it may be highly informative to develop hMuStem cells transplantation protocol in the dystrophic dogs representing the DMD animal model, in order to investigate the behavioral features in terms of efficacy and safety of the therapeutic product.

Collectively, the results obtained in this study demonstrate immunomodulatory properties for hMuStem cells and precise action modalities of this population that could explain their therapeutic efficacy observed.

Acknowledgments

We thank Antoine Hamel and Armelle Magot (Service de Chirurgie Infantile, Centre Hospitalier Universitaire Nantes). We would like to thank the Clinical Transfer Facility (CICBT0503, Nantes, France) for the furniture of the human CD3+ T-cells and the Plateau Technique de Radioactivité SFR Santé (Nantes, France) for providing radioactivity laboratory and equipments. We also thank Emmanuelle Moreau and Nathalie Delacotte from UMR1300 INRA/Oniris, in Nantes, for kindly provided us sheep red blood cells. We thank Philippe Blancou, Christine Chauveau and Julien Pogu (UMR1064 INSERM, Nantes) for helpful discussion and HO-1 antibody gift. Finally, we thank Vincent Sauzeau (UMR1087 INSERM) for kindly provided us Griess reactive kit.

Disclosure of potential conflicts of interest

All authors declare that they have no financial and personal relationships with other people, or organizations that could inappropriately influence their work.

References (pas plus de 100)

- [1] Rouger K, Fornasari B, Armengol V, Jouvion G, Leroux I, Dubreil L, Feron M, Guevel L, Cherel Y. (2007). Progenitor cell isolation from muscle-derived cells based on adhesion properties. *J Histochem Cytochem* 55(6):607-18.
- [2] Rouger K, Larcher T, Dubreil L, Deschamps JY, Le Guiner C, Jouvion G, Delorme B, Lieubeau B, Carlus M, Fornasari B, Theret M, Orlando P, Ledevin M, Zuber C, Leroux I, Deleau S, Guigand L, Testault I, Le Rumeur E, Fiszman M, Chérel Y. (2011). Systemic delivery of allogenic muscle stem cells induces long-term muscle repair and clinical efficacy in duchenne muscular dystrophy dogs. *Am J Pathol* 179(5):2501-18.
- [3] Robriquet F, Lardenois A, Babarit C, Larcher T, Dubreil L, Leroux I, Zuber C, Ledevin M, Deschamps JY, Fromes Y, Cherel Y, Guevel L, Rouger K. (2015). Differential Gene Expression Profiling of Dystrophic Dog Muscle after MuStem Cell Transplantation. *PLoS One* 10(5):e0123336.
- [4] Robriquet F, Babarit C, Larcher T, Dubreil L, Ledevin M, Goubin H, Rouger K, Guével L. (2016). Identification in GRMD dog muscle of critical miRNAs involved in pathophysiology and effects associated with MuStem cell transplantation. *BMC Musculoskelet Disord* 17:209.

- [5] Lardenois A, Jagot S, Lagarrigue M, Guével B, Ledevin M, Larcher T, Dubreil L, Pineau C, Rouger K, Guével L. (2016). Quantitative proteome profiling of dystrophic dog skeletal muscle reveals a stabilized muscular architecture and protection against oxidative stress after systemic delivery of MuStem cells. *Proteomics* 16(14):2028-42.
- [6] Borel JF, Baumann G, Chapman I, Donatsch P, Fahr A, Mueller EA, Vigouret JM. (1996). In vivo pharmacological effects of ciclosporin and some analogues. *Adv Pharmacol* 35:115-246.
- [7] Swijnenburg RJ, Tanaka M, Vogel H, Baker J, Kofidis T, Gunawan F, Lebl DR, Caffarelli AD, de Bruin JL, Fedoseyeva EV, Robbins RC. (2005). Embryonic stem cell immunogenicity increases upon differentiation after transplantation into ischemic myocardium. *Circulation* 112(9 Suppl):I166-72.
- [8] Zhao T, Zhang ZN, Rong Z, Xu Y. (2011). Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature* 474(7350):212-5.
- [9] Evans NP, SA Misyak, JL Robertson, J Bassaganya-Riera and RW Grange. (2009). Immune-mediated mechanisms potentially regulate the disease time-course of duchenne muscular dystrophy and provide targets for therapeutic intervention. *PM R* 1:755–768.
- [10] Evans NP, SA Misyak, JL Robertson, J Bassaganya-Riera and RW Grange. (2009). Dysregulated intracellular signaling and inflammatory gene expression during initial disease onset in Duchenne muscular dystrophy. *Am J Phys Med Rehabil* 88:502–522.
- [11] Shi M, Liu ZW, Wang FS. (2011). Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol* 164(1):1-8.
- [12] Weil BR, Manukyan MC, Herrmann JL, Abarbanell AM, Poynter JA, Wang Y, Meldrum DR. (2011). The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells: implications for surgical disease. *J Surg Res* 167(1):78-86.
- [13] Maccario R, Podestà M, Moretta A, Cometa A, Comoli P, Montagna D, Daudt L, Ibatucci A, Piaggio G, Pozzi S, Frassoni F, Locatelli F. (2005). Interaction of human mesenchymal

stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4⁺ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica* 90(4):516-25.

[14] Ge W, Jiang J, Baroja ML, Arp J, Zassoko R, Liu W, Bartholomew A, Garcia B, Wang H: Infusion of mesenchymal stem cells and rapamycin synergize to attenuate alloimmune responses and promote cardiac allograft tolerance. *Am J Transplant* 2009, 9:1760–1772.

[15] Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. (2008). Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* 111(3):1327-33.

[16] Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Risso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A. (2006). Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 107(1):367-72.

[17] Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E, Willemze R, Fibbe WE. (2006). Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34⁺-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 177(4):2080-7.

[18] Singer NG, Caplan AI. (2011). Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annu Rev Pathol* 6:457-78.

[19] Devine SM, Cobbs C, Jennings M, Bartholomew A, Hoffman R. (2003). Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood* 101(8):2999-3001.

[20] Aggarwal S, Pittenger MF. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105(4):1815-22.

[21] Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, Giunti D, Ceravolo A, Cazzanti F, Frassoni F, Mancardi G, Uccelli A. (2005). Mesenchymal stem cells

ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood* 106(5):1755-61.

[22] Melief SM, Schrama E, Brugman MH, Tiemessen MM, Hoogduijn MJ, Fibbe WE, Roelofs H. (2013). Multipotent stromal cells induce human regulatory T cells through a novel pathway involving skewing of monocytes toward anti-inflammatory macrophages. *Stem Cells* 31(9):1980-91.

[23] English K, Tonlorenzi R, Cossu G, Wood KJ. (2013). Mesoangioblasts suppress T cell proliferation through IDO and PGE-2-dependent pathways. *Stem Cells Dev* 22(3):512-23.

[24] Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F. (2005). Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* 105:2821-2827.

[25] Ramasamy R, Fazekasova H, Lam EW, Soeiro I, Lombardi G, Dazzi F. (2007). Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. *Transplantation* 83(1):71-6.

[26] Kim J, Hematti P. (2009). Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. *Exp Hematol* 37(12):1445-53.

[27] Maggini J, Mirkin G, Bognanni I, Holmberg J, Piazzón IM, Nepomnaschy I, Costa H, Cañones C, Raiden S, Vermeulen M, Geffner JR. (2010). Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile. *PLoS One* 5(2):e9252

[28] Spaggiari GM, Abdelrazik H, Becchetti F, Moretta L. (2009). MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood* 113(26):6576-83.

[29] Németh K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Mayer B, Parmelee A, Doi K, Robey PG, Leelahavanichkul K, Koller BH, Brown JM, Hu X, Jelinek I, Star RA, Mezey E. (2009). Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med* 15(1):42-9.

- [30] Tu Z, Li Q, Bu H, Lin F. (2010). Mesenchymal stem cells inhibit complement activation by secreting factor H. *Stem Cells Dev* 19(11):1803-9.
- [31] Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. (2006). Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells* 24(1):74-85.
- [32] Caimi PF, Reese J, Lee Z, Lazarus HM. (2010). Emerging therapeutic approaches for multipotent mesenchymal stromal cells. *Curr Opin Hematol* 17(6):505-13.
- [33] García-Gómez I, Elvira G, Zapata AG, Lamana ML, Ramírez M, Castro JG, Arranz MG, Vicente A, Bueren J, García-Olmo D. (2010). Mesenchymal stem cells: biological properties and clinical applications. *Expert Opin Biol Ther* 10(10):1453-68.
- [34] Zhang X, Li JY, Cao K, Lu H, Hong M, Qian S, Wu H, Liu P, Xu W. (2010). Cotransplantation of HLA-identical mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in Chinese patients with hematologic diseases. *Int J Lab Hematol* 32(2):256-64.
- [35] Zhou H, Guo M, Bian C, Sun Z, Yang Z, Zeng Y, Ai H, Zhao RC. (2010). Efficacy of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of sclerodermatous chronic graft-versus-host disease: clinical report. *Biol Blood Marrow Transplant* 16(3):403-12.
- [36] Yang C, Li J, Lin H, Zhao K, Zheng C. (2015) Nasal mucosa derived-mesenchymal stem cells from mice reduce inflammation via modulating immune responses. *PLoS One*. 3:e0118849.
- [37] Crop MJ., Baan CC., Korevaar SS., Ijzermans JN., Weimar W. and Hoogduijn MJ. (2010) Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells induce explosive T-cell proliferation. *Stem Cells Dev*. 12:1843-53.

[38] Le Blanc K., Tammik C., Rosendahl K., Zetterberg E. and Ringden O. (2003) HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 31:890–896.

[39] Tse WT., Pendleton JD., Beyer WM., Egalka MC. and Guinan EC. (2003) Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* 75:389–397.

[40] Han KH., Ro H., Hong JH., Lee EM., Cho B., Yeom HJ., Kim MG., Oh KH., Ahn C. and Yang J. (2011) Immunosuppressive mechanisms of embryonic stem cells and mesenchymal stem cells in alloimmune response. *Transpl Immunol.* 1:7-15.

[41] Lee HJ., Kang KS., Kang SY., Kim HS., Park SJ., Lee SY., Kim KD., Lee HC., Park JK., Paik WY., Lee LY. and Yeon SC. (2015) Immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood. *J Vet Sci.* [Epub ahead of print]

[42] Vieira NM., Valadares M., Zucconi E., Secco M., Bueno CR. Jr, Brandalise V., Assoni A., Gomes J., Landini V., Andrade T., Caetano HV., Vainzof M. and Zatz M. (2012) Human adipose-derived mesenchymal stromal cells injected systemically into GRMD dogs without immunosuppression are able to reach the host muscle and express human dystrophin. *Cell Transplant.* 7:1407-17.

[43] Montespan F., Deschaseaux F., Sensébé L., Carosella ED. and Rouas-Freiss N. (2014) Osteodifferentiated mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue express HLA-G and display immunomodulatory properties in HLA-mismatched settings: implications in bone repair therapy. *J Immunol Res.* 2014:230346.

[44] Selmani Z., Naji A., Gaiffe E., Obert L., Tiberghien P., Rouas-Freiss N., Carosella ED. and Deschaseaux F. (2009) HLA-G is a crucial immunosuppressive molecule secreted by adult human mesenchymal stem cells. *Transplantation.* 9 Suppl:S62-6.

- [45] Li C., Li G., Liu M., Zhou T. and Zhou H. (2016) Paracrine effect of inflammatory cytokine-activated bone marrow mesenchymal stem cells and its role in osteoblast function. *J Biosci Bioeng.* 2:213-9.
- [46] Yang Y., Chen QH., Liu AR., Xu XP., Han JB. and Qiu HB. (2015) Synergism of MSC-secreted HGF and VEGF in stabilising endothelial barrier function upon lipopolysaccharide stimulation via the Rac1 pathway. *Stem Cell Res Ther.* 6:250.
- [47] De Luca A., Lamura L., Gallo M., Maffia V. and Normanno N. (2012) Mesenchymal stem cell-derived interleukin-6 and vascular endothelial growth factor promote breast cancer cell migration. *J Cell Biochem.* 11:3363-70.
- [48] Zhao G., Miao H., Li X., Chen S., Hu Y., Wang Z. and Hou Y. (2016) TGF- β -induced miR-494 inhibits macrophage polarization via suppressing PGE2 secretion in mesenchymal stem cells. *FEBS Lett.* 11:1602-13.
- [49] Zafranskaya M., Nizheharodava D., Yurkevich M., Ivanchik G., Demidchik Y., Kozhukh H. and Fedulov A. (2013) PGE2 contributes to in vitro MSC-mediated inhibition of non-specific and antigen-specific T cell proliferation in MS patients. *Scand J Immunol.* 5:455-62.
- [50] Ylöstalo JH., Bartosh TJ., Coble K. and Prockop DJ. (2012) Human mesenchymal stem/stromal cells cultured as spheroids are self-activated to produce prostaglandin E2 that directs stimulated macrophages into an anti-inflammatory phenotype. *Stem Cells.* 10:2283-96.
- [51] Djouad F., Charbonnier LM., Boufi C., Louis-Plence P., Bony C., Apparailly F. et al. (2007) Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells* 8:2025–32.
- [52] Najar M., Rouas R., Raicevic G., Boufker HI., Lewalle P., Meuleman N., et al. (2009) Mesenchymal stromal cells promote or suppress the proliferation of T lymphocytes from cord blood and peripheral blood: the importance of low cell ratio and role of interleukin-6. *Cytotherapy* 5:570–83.

- [53] Djouad F., Fritz V., Apparailly F., Louis-Pence P., Bony C., Sany J., et al. (2005) Reversal of the immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells by tumor necrosis factor alpha in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 5:1595–603.
- [54] Marino M., Scuderi F., Provenzano C. and Bartoccioni E. (2011) Skeletal muscle cells: from local inflammatory response to active immunity. *Gene Ther.* 2:109-16.
- [55] De Rossi M., Bernasconi P., Baggi F., de Waal Malefyt R. and Mantegazza R. (2000) Cytokines and chemokines are both expressed by human myoblasts: possible relevance for the immune pathogenesis of muscle inflammation. *Int Immunol.* 9:1329-35.
- [56] Toth KG., McKay BR., De Lisio M., Little JP., Tarnopolsky MA. and Parise G. (2011) IL-6 induced STAT3 signalling is associated with the proliferation of human muscle satellite cells following acute muscle damage. *PLoS One.* 3:e17392.
- [57] Ryan JM., Barry F., Murphy JM. and Mahon BP. (2007) Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol.* 2:353-63.
- [58] Bouffi C., Bony C., Courties G., Jorgensen C. and Noël D. (2010) IL-6-dependent PGE2 secretion by mesenchymal stem cells inhibits local inflammation in experimental arthritis. *PLoS One.* 12:e14247.
- [59] Kim YH., Wee YM., Choi MY., Lim DG., Kim SC. and Han DJ. (2011) Interleukin (IL)-10 induced by CD11b(+) cells and IL-10-activated regulatory T cells play a role in immune modulation of mesenchymal stem cells in rat islet allografts. *Mol Med.* 7-8:697-708.
- [60] Gu YZ., Xue Q., Chen YJ., Yu GH., Qing MD., Shen Y., Wang MY., Shi Q. and Zhang XG. (2013) Different roles of PD-L1 and FasL in immunomodulation mediated by human placenta-derived mesenchymal stem cells. *Hum Immunol.* 3:267-76.
- [61] Weiss ML., Mitchell KE., Hix JE., Medicetty S., El-Zarkouny SZ., Grieger D. and Troyer DL. (2003) Transplantation of porcine umbilical cord matrix cells into the rat brain. *Exp Neurol.* 2:288-99.

Chapitre 3. Impact des modalités d'immunosuppression requises pour la transplantation allogénique de la population MuStem

I. Positionnement

En 2011, l'UMR a fait la preuve de concept de l'administration systémique de cellules souches MuStem en contexte d'immunosuppression continue chez le chien GRMD. Cependant, dans l'optique de développer une stratégie de transplantation directement transposable en clinique, il demeure majeur de déterminer les conditions d'immunosuppression requises. En effet, il a été largement décrit un effet négatif de traitements immunosuppresseurs comme la cyclosporine sur la prolifération et la différenciation musculaire, qui impacte directement l'efficacité de régénération des cellules souches transplantées. D'autre part, l'administration au long court de ce type de traitements chez le patient, malgré leurs effets bénéfiques autorisant la prise de greffe, entraîne également des effets secondaires importants parmi lesquels une cytotoxicité, une sensibilité accrue aux infections et une formation de cancers.

Dans ce contexte, la troisième partie de ma thèse a consisté à optimiser les conditions de transplantation des cellules MuStem allogéniques par la mise en place d'un protocole expérimental chez le chien GRMD dont l'objectif a été de déterminer si l'administration systémique de ces cellules pouvait être réalisée sans immunosuppression ou sous une couverture transitoire restreinte à la période d'injection. Ce travail a été réalisé conjointement avec Thibaut Larcher qui est vétérinaire pathologiste au sein de l'UMR et qui a pris en charge l'analyse clinique et tissulaire des chiens transplantés. Ma contribution a consisté à prendre en charge avec un assistant-ingénieur de l'UMR1089 INSERM de l'IRS de Nantes (Nicolas Jaulin) l'immunomonitoring des chiens GRMD transplantés à travers l'étude de la réponse anti-cellulaire et humorale contre les cellules administrées et la dystrophine.

II. Résumé de la démarche expérimentale

Le détail du matériel et méthodes utilisés étant décrit dans l'article joint ci-après, je ne ferai ici qu'un résumé des principaux points méthodologiques.

Un protocole a été mis en place sur le centre de thérapies génique et cellulaire de Boisbonne (Oniris) avec 30 chiens inclus dont 13 chiens GRMD définis par leur

histocompatibilité, grâce à un travail collaboratif mené avec Catherine André et Benoît Hédan de l'Institut de Génétique et Développement de Rennes. Les chiens sont soumis à deux injections intra-artérielles de cellules MuStem séparées de 2 à 3 semaines. Ils sont placés sous immunosuppression (IS) transitoire une semaine avant la première injection, le traitement immunosuppresseur étant arrêté deux semaines après la deuxième injection. Un suivi hebdomadaire des animaux a été réalisé par Thibaut Larcher sur plus de 7 mois sur la base d'une évaluation graduée de 17 critères spécifiques de l'état général des chiens et de leurs capacités locomotrices. Les données d'immunomonitoring ont été générées sur deux sites, à savoir l'UMR 703 INRA/Oniris et l'UMR 1089 INSERM. J'ai plus précisément pris en charge l'analyse de la réponse cellulaire anti-MuStem en utilisant la méthodologie d'incorporation de la radioactivité précédemment évoquée.

III. Résumé des résultats obtenus

L'immunomonitoring des chiens a été réalisé en ciblant la réponse cellulaire anti-MuStem et anti-dystrophine ainsi que la réponse humorale anti-dystrophine. Concernant la réponse cellulaire anti-MuStem, la réalisation d'une réaction cellulaire mixte consistant à incuber les cellules MuStem du donneur avec les PBMC du receveur a révélé une absence de réponse ou une réponse faible des PBMC pour le groupe de chiens transplantés sous IS transitoire. En revanche, une prolifération significative des PBMC a été démontrée pour le groupe des chiens transplantés sans IS. Aucune réponse cellulaire ou humorale contre la protéine dystrophine n'a été mise en évidence, dans aucun des groupes de chiens considérés.

Sur le plan histologique, une augmentation significative de l'activité de régénération est observée chez les chiens injectés soumis à une IS transitoire par rapport aux chiens non immunosupprimés non injectés. Cette augmentation de la régénération n'est pas observée chez les chiens transplantés sans IS. Une dégradation progressive du score clinique est démontrée chez les chiens transplantés sans IS avec une perte de la force musculaire et de la capacité locomotrice à partir de 14 semaines d'âge, comme cela est classiquement décrit chez le chien GRMD. A partir de deux semaines après l'arrêt du traitement IS et jusqu'à la fin du protocole, une remarquable stabilisation du score clinique est observée chez les chiens transplantés avec une IS transitoire. De façon intéressante, nous montrons que cette stabilisation des chiens transplantés avec une IS transitoire est similaire à celle précédemment publiée sur les chiens GRMD transplantés

sous IS continue. Ainsi, nous mettons en évidence que la transplantation de cellules MuStem allogéniques nécessite un traitement immunosuppresseur mais que ce dernier peut être restreint à la période d'injection pour obtenir le même effet clinique et tissulaire que précédemment observé sous IS continue.

Ces résultats ont fait l'objet :

- *d'un poster présenté au congrès de l'ESGCT en octobre 2014, à La Haye (Pays-Bas)*
- *d'un article actuellement en reviewing dans Stem Cell Translational Medicine (numéro d'identification : SCTM-16-0426)*

IV. Article

Systemic Delivery of Allogeneic MuStem Cells in Dystrophic Dogs only Requires a Short-Term Immunosuppression to Avoid Host Immunity

Journal:	<i>Stem Cells Translational Medicine</i>
Manuscript ID	SCTM-16-0426
Manuscript Type:	Original Research
Date Submitted by the Author:	10-Oct-2016

Full Title: Systemic Delivery of Allogeneic MuStem Cells in Dystrophic Dogs only Requires a Short-Term Immunosuppression to Avoid Host Immunity

Short Title: MuStem cell transplantation and immunosuppression

Judith Lorant^{1,2,¶}, Thibaut Larcher^{1,2,¶}, Nicolas Jaulin^{3,4}, Benoît Hedan^{5,6}, Isabelle Leroux^{1,2}, Céline Zuber^{1,2}, Laurence Dubreil^{1,2}, Mireille Ledevin^{1,2}, Hélicia Goubin^{1,2}, Sophie Moullec^{2,7}, Jack-Yves Deschamps^{1,2,7}, Catherine André^{5,6}, Yan Chérel^{1,2,†}, Oumeya Adjali^{3,4} and Karl Rouger^{1,2,*}

¹INRA, UMR703 PAnTher, Nantes, France.

²LUNAM Université, Oniris, Ecole nationale vétérinaire, agro-alimentaire et de l'alimentation Nantes-Atlantique, Nantes, France.

³Atlantic Gene Therapies, France.

⁴INSERM, UMR1089, Centre Hospitalier Universitaire, Nantes, France.

⁵CNRS, UMR6290, Institut de Génétique et Développement de Rennes, Université Rennes 1, Rennes, France.

⁶Université Rennes 1, UEB, IFR140, Faculté de Médecine, Rennes, France.

⁷Centre de Boisbonne, Nantes, France.

Author's contributions: J.L., T.L.: performed experiments, collection and/or assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing, final approval of manuscript; N.J., B.H.: performed experiments, data analysis and interpretation; I.L., C.Z., L.D., M.L., H.G.: performed experiments; S.M., J.Y.D.: provision of study material, performed experiments; C.A.: conception and design; Y.C.: conception and design, performed experiments; O.A.: conception and design, data analysis and interpretation; K.R.: conception and design, provision of study material, collection and/or assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing, final approval of manuscript

*Correspondence: Karl Rouger, *Ph.D.*, INRA UMR703, Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation, Nantes-Atlantique (Oniris), Atlanpole - La Chantrerie; F-44307 Nantes, France, Telephone: +33 (0)2 40 68 78 73, Fax: +33 (0)2 40 18 00 02, E-mail: karl.rouger@inra.fr

†These authors contributed equally to this work.

Acknowledgements for grants: This work was supported by a grant from the Association Française contre les Myopathies (AFM; N°15550 and N°15990) and the FEDER (Fonds Européen de Développement Régional; N°37085 and N°38436). It was realized in the context of the IHU-Cesti project that received French government financial support managed by the National Research Agency via the investment of the future program ANR-10-IBHU-005. The IHU-Cesti project was also supported by Nantes Metropole and the Pays de la Loire Region.

Key Words: Adult stem cells, Immunosuppression, Allogeneic transplantation, GRMD dog, Immune response, Cell therapy

Abstract

Promising therapeutic approaches have merged in the field of neuromuscular diseases consecutively to the demonstration of a regenerative potential for some adult stem cells. Allogeneic MuStem cell transplantation into continuously immunosuppressed golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs generated a striking clinical stabilization and persistent muscle repair. However, several adverse effects were reported after long-term immunosuppression (IS) in medical practice, raising safety concerns. To address this issue, we evaluated whether a lack of IS or an IS restricted to the MuStem cell infusion period would be sufficient to support a sustained benefit of the allogeneic transplantation in a clinically relevant context.

Following arterial infusions of MuStem cells in dog leukocyte antigen-identical littermate donor/recipient pairs, a mixed cell reaction with the host PBMC and the corresponding donor cells revealed no to weak lymphocyte proliferation in transplanted GRMD dogs under transient IS (GRMD^{MU/tr-IS}). In contrast, a significant proliferation was determined in GRMD dogs without IS (GRMD^{MU/no-IS}). In addition, neither cellular nor humoral anti-dystrophin response was revealed. Histologically, an increased myogenic regenerative activity was demonstrated four months after the cell infusion in GRMD^{MU/tr-IS} dogs compared to GRMD^{MU/no-IS} ones. Finally, a stabilized clinical status was shown for GRMD^{MU/tr-IS} dogs from two weeks after the IS arrest while GRMD^{MU/no-IS} dogs exhibited no clinical benefit.

Our results revealed that a transient IS is necessary but sufficient to avoid host immunity against allogeneic MuStem cells and sustain benefits up to five months post-infusion. These data are critical for the design of safer strategy by limiting the use of immunosuppressants.

Introduction

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is a X-linked recessive muscle disease that is caused by mutations in the dystrophin gene, which results in an absence of the protein at the fiber membrane [1, 2]. This most common form of muscular dystrophy is characterized by an extensive and progressive degeneration of skeletal and cardiac muscles [3, 4]. Clinically, it causes progressive muscle weakness leading to a reduced motility, a wheelchair dependency and a severe limitation of life expectancy of affected boys [5, 6]. As yet, there is no effective treatment for DMD despite the recent development of several therapeutic strategies based on new drugs, viral vector-based dystrophin transfer, oligonucleotide induced exon-skipping or precursor/stem cell delivery [7].

In cell-based therapy, the myoblast that derives from satellite cells (SC) and corresponds to the natural precursor of muscle fibers was the first candidate tested [8, 9]. Despite

encouraging results showing that intramuscular (IM) injections of murine [10, 11] or human [12, 13] myoblasts could restore dystrophin expression in the *mdx* mice, a DMD murine model, subsequent clinical trials demonstrated limited success of the strategy with only few dystrophin⁺ fibers and no clinical benefit [14, 15]. This was attributed to the low survival and migration of injected cells, the low number of donor-derived muscle fibers as well as the recipient humoral and cellular immune responses against allogeneic donor cells [16-19]. Over the past years, identification of tissue-specific progenitors/stem cell populations with *in vivo* myogenic potential and homing capacities following systemic delivery has given a new impetus to correct the dystrophic phenotype [20-25]. After IM or intra-arterial (IA) injection in *scid/mdx* mice, human blood- and muscle-derived AC133⁺ cells were shown to contribute to muscle regeneration, SC replenishment, dystrophin restoration and muscle function recovery [26]. Similar results were obtained with genetically corrected AC133⁺ cells isolated from DMD patients [27]. In addition, IA delivery of wild-type mesoangioblasts (Mabs) corrected the dystrophic phenotype in α -sarcoglycan null mice [28] and even mobility in the golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs submitted to an immunosuppressive regimen [29]. In comparison, genetically corrected autologous canine Mabs appeared much less effective, positioning favorably the allogeneic strategy.

Concomitantly to these successful demonstrations of myogenic potential, an immune privileged behavior has been recently reported for some of these tissue-specific stem cells. *In vivo*, murine muscle-derived stem cells (MDSC) exhibited an improved ability to restore dystrophin compared to myoblasts after their injection in *mdx* mice, notably due to their capacity to escape rapid immune rejection linked to their low level of major histocompatibility complex class I expression [30-32]. When intramuscularly injected into non-immunocompromised *mdx* mice, human adipose-derived stem cells (ADSC) gave rise to large number of dystrophin⁺ fibers and were not rejected up to 6 months after their injection. The lack of an immune recognition may be due in part to the low level of cell surface class I and the lack of class II human leukocyte antigen (HLA) [33]. In addition, an ability to engraft and express dystrophin was determined in GRMD dogs without immunosuppression (IS) several months after local or systemic delivery of hADSC [34]. Overall, these results strongly evoked that these cells could have particular immunoregulatory properties, as previously shown for the mesenchymal stem cells (MSC) and Mabs with an ability to modulate both innate and adaptive immunity [35-38]. Such biological features may be of major interest in allogeneic stem cell-based strategies considering that long-term IS is difficult to envisage in

medical practice. In the last couple of decades, the development of a large panel of new immunosuppressive molecules [39, 40] has allowed a significant increase in short-term graft survival rate after organ transplantation [41, 42]. One of the main drugs used is cyclosporine (CsA) [43]. Nevertheless, its long-term use is associated with aggressive toxicity in kidney [44], liver [45] and heart [46, 47] as well others adverse effects such as increased sensitivity to infections [48] and lymphoma formation [49, 50]. In skeletal muscle, myalgia, cramps and muscle weakness have also been reported [51, 52]. In addition, CsA inhibits *in vitro* and *in vivo* the myogenic differentiation of the muscle precursor cells [53, 54], induces their apoptosis [55] and delays the muscle regeneration following injury [56, 57].

Recently, we have isolated delayed adherent MDSC we named cMuStem cells from healthy dogs and demonstrated that their systemic delivery into GRMD dogs placed under continuous IS was associated with a striking clinical stabilization and long-term muscle repair [58, 59]. Here, we sought to determine in what manner the immunosuppressive regimen is required to support the infusion protocol of allogeneic MuStem cells. More specifically, we searched to define whether IS could be suppressed or a short-term IS limited to the injection time window may be suitable for a phenotypic correction as previously described with a continuous IS.

For that purpose, an intra-arterial delivery protocol of MuStem cells was developed using donor/recipient pairs of dogs with identical dog leukocyte antigen (DLA). Four to five-month-old recipient dogs were submitted or not to transient IS. A monitoring of host immune responses against both MuStem cells and dystrophin protein and a longitudinal study based on clinical follow-up and were made up to the age of 9 months. At this endpoint, a histological analysis was performed.

Methods

Animals

Thirty male golden retrievers were included in the study. All the dogs were obtained from the Centre d'Élevage du Domaine des Souches (CEDS, Mézilles, France) or the Boisbonne Center for Gene and Cell Therapy of Oniris (Nantes, France). The dogs were housed at the Boisbonne Center in a controlled environment (temperature $21\pm 1^{\circ}\text{C}$, 12 hours light/dark cycle). Affected dogs were identified at birth using polymerase chain reaction (PCR)-based genotyping, as previously described [60]. Elevated serum creatine kinase levels confirmed dystrophic diagnosis. Seven 2.5-month-old healthy dogs were used for MuStem cell isolation while four others were used to collect control muscle samples. Nineteen GRMD dogs were subdivided into two main groups as described in Table 1 and used for clinical and/or

pathophysiological investigations: a first group was composed of dogs receiving MuStem cells i) without IS regimen (GRMD^{MU/no-IS}, n=4), ii) with transient IS (GRMD^{MU/tr-IS}, n=4) or iii) with continuous IS (GRMD^{MU/co-IS}, n=3) and a second group of mock dogs i) without IS regimen (GRMD^{mo/no-IS}, n=3) or ii) submitted to transient IS (GRMD^{mo/tr-IS}, n=5). This study was carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the French National Research Council. The protocol was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Pays de la Loire Region, France (Permit Number: CEEA.2012.121). All the surgeries were performed under sodium pentobarbital anesthesia and all efforts were made to minimize suffering. Pain evaluation was performed every day during a complete clinical evaluation by a veterinarian and an analgesia treatment was set up if necessary. Dogs were euthanized by intravenous administration of sodium pentobarbital (2000 mg, Dolethal, Vetoquinol SA, Magny Verneuil).

Table 1. Summary of investigations performed on dogs. An identification number and a name define each animal. The age of dogs at the onset of the experiments are mentioned in weeks. Cause of death, immunosuppressive status (none or transient) of the GRMD dogs and number of injected cells are indicated.

		GRMD dogs					Immunosuppression		MuStem cell injection			Experiments
Group	ID number	Name	Former ID number	Littermate	Age of death	Cause of death	Age at the setting-up	Age at the arrest	Cell number (10 ⁷ /kg)	Age at the first injection	Age at the last injection	
MU/no-IS	1	ICÓNE		a	35	End of protocol	None		6.3-10.2	17	19	Complete evaluation
	2	IDEM		a	29	End of protocol	None		7.9-9.7	13	15	Complete evaluation
	3	INDOU		a	31	End of protocol	None		8.2-10.0	14	16	Complete evaluation
	4	IRON		b	35	End of protocol	None		9.7-11.7	18	20	Complete evaluation
MU/t-IS	5	GAROU		c	36	End of protocol	Transient	17	10.0-11.1	18	20	Complete evaluation
	6	GAVROCHE		c	36	End of protocol	Transient	16	11.0-11.3	17	19	Complete evaluation
	7	GEPETTO		c	36	End of protocol	Transient	17	9.7-11.2	18	20	Complete evaluation
	8	HOLLIDAY		d	38	End of protocol	Transient	19	9.8-10.0	20	22	Complete evaluation
MU/co-IS	9	DAKAR	16	e	51	Cardiac insufficiency	Continuous	7	1.6-2.7	8	17	Clinical follow-up
	10	DIABLO	18	f	109	Aspiration pneumonia	Continuous	15	0.6-1.4	17	25	Clinical follow-up
	11	DUMBO	17	h	54	Aspiration pneumonia	Continuous	13	0.5-0.7	15	32	Clinical follow-up
mo/no-IS	12	DIEU		f	51	Aspiration pneumonia	None					Clinical follow-up
	13	DOBBY		f	109	Digestive complication	None					Clinical follow-up
	14	GAMELLE		h	54	End of protocol	None					Clinical follow-up
mo/t-IS	15	GABIN		i	39	End of protocol	Transient	20				Complete evaluation
	16	GRINGO		i	39	End of protocol	Transient	20				Complete evaluation
	17	HAMLET		j	38	End of protocol	Transient	19				Complete evaluation
	18	HITCHCOK		j	38	End of protocol	Transient	19				Complete evaluation
	19	HIZAC		k	39	End of protocol	Transient	20				Complete evaluation

Dog leukocyte antigen genotyping

DNA from blood samples of breeders and litters was extracted using the NucleoSpin® Blood L kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France) according to the manufacturer's instructions. All the samples were genotyped by Illumina Infinium Canine 170K SNP HD array by Integragen (Evry, France). To identify DLA-identical littermate donor/recipient pairs for dog #1 to #8, phasing haplotypes of major histocompatible complex (MHC) loci were performed manually based on SNPs positions on CanFam3, CFA12: 0-3 496 085 containing MHC class I, II and III genes and CFA35: 24 006 657-26 506 199 containing MHC class I genes, as previously presented [61]. GRMD^{Mu/co-IS} dogs (#9 to #11) were transplanted with a pool of cMuStem cells obtained from five non DLA-identical donor healthy dogs.

Isolation of canine MuStem cells

Tissues were collected from a pool of hind limb muscles of 2.5-month-old healthy dogs (n=7) and immediately placed in cold Phosphate Buffered Saline (PBS, PAA; Les Rumeaux, France) supplemented with 2% 100 UI/mL penicillin/0.1mg/mL streptomycin/0.25 µg/mL amphotericin B (PSF, Sigma, St. Louis, MO, USA). Tissues were submitted to mechanical and enzymatic dilacerations to obtain muscle-derived cell suspension. A modified preplating protocol was then performed to isolate canine MuStem cells (cMuStem cells), as previously established [58]. Cells were expanded at 37°C with 5% CO₂, maintained at roughly 75% of confluence and passaged every 4 to 5 days. The medium was replaced every two days. As previously mentioned, MuStem cells exhibit a large expansion capacity and correspond to early myogenic progenitors and uncommitted cells.

Immunosuppressive treatment

The GRMD dogs were daily immunosuppressed with 27 mg/kg of oral CsA (Neoral®; Novartis, Rueil-Malmaison, France) in combination with 6 mg/kg mycophenolate mofetil (CellCept®; Roche, Paris, France). Ten mg/kg of ketoconazole (Nizoral®; Janseen-Cilag, Issy-les-Moulineaux, France) was also added daily to decrease CsA catabolism. Blood levels of CsA were controlled twice a week and maintained between 250 and 350 ng/mL by individual adjustments of the dose. The IS was started one week before cell administration and arrested two weeks after the last administration (transient IS).

Systemic delivery procedure

MuStem cells were injected as previously described [58]. Briefly, they were suspended at 1.5×10^7 cells/mL in 0.9% NaCl/2.5% homologous serum/10 U/mL heparin. Two intra-femoral injections of 6.3×10^7 - 1.2×10^8 MuStem cells/kg were performed in seven GRMD dogs at 2- to 3-week intervals, using laminar flow at a rate of 15 mL/min (Table 1). Systemic injections were always performed on GRMD dogs aged between 13 and 22 weeks.

Isolation of canine peripheral blood mononucleated cells and splenocytes

Blood samples were collected every two weeks from GRMD dogs until sacrifice and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by gradient-density centrifugation (2000 rpm, 20 minutes, RT) on ficoll 1,077 (PAA). PBMC rings were collected in PBS (Lonza)-5% fetal calf serum (FCS, Pierce-Hyclone, Logan, UT, USA) and centrifuged (1800 rpm, 10 min, 4°C). The supernatant was removed and the pellet was washed twice with PBS-5% FCS before centrifugation (1400 rpm, 10 min, 4°C). Cells were counted in Türk and Trypan dye. At the necropsy, spleen was harvested and treated for 45 min with collagenase D (2 mg/mL; Roche, Bâle, Swiss). The reaction was stopped by adding EDTA 0.1 M pH 7.2 during 5 min. Freshly isolated splenocytes were washed once with 50 mL of PBS-5% FCS. Red blood cells were lysed in a lysis buffer (NH_4Cl , KHCO_3 , Na_2EDTA) (10 min, RT) and washed twice. PBMC and splenocytes were frozen in FCS-10% Dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) prior to testing.

Evaluation of Peripheral Blood Mononucleated Cell proliferation

cMuStem cells ($n=7$, independent cell batches) were thawed and seeded at 10,000 cells/cm² for one week. At this time, host's PBMC harvested before and following cell delivery protocol were thawed in cMuStem cell proliferation medium and cultured at 37°C with 5% CO₂ overnight. cMuStem cells were harvested and irradiated at 35 Gy as well as splenocytes from another dog which were used as a positive control. PBMC were then cultured in quadruplicates at 1.10^5 per well in 96-well plates with cMuStem cells, control splenocytes or with 10 µg/mL of Concanavaline A (ConA, Sigma-Aldrich). A dilution range of cMuStem cells was done at 2:1, 1:1, 1:4, 1:16 and 1:64 (MuStem cells:PBMC) to demonstrate a dose effect. Coculture lasted 5 days before tritiated thymidine (1:40, NET027A001MC, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) was incubated overnight at 37°C, 5% CO₂. Cells were harvested on a filter using a Harvester (Perkin Elmer) and radioactivity was read as counts per minute (cpm) with MicroBeta plate counter (Perkin Elmer).

IFN γ ELISpot

The assay was performed using a library of 15-mers peptides overlapping in sequence by 10 amino acids covering the canine dystrophin sequence (15 per 10 mers, Pepscreen, Sigma) assembled in seven pools of 105 peptides. After 18 to 20 hours of resting at 37°C, 5% CO₂, recipient thawed splenocytes were seeded in PVDF membrane 96-well plate (Millipore, Billerica, MA, USA) coated overnight with mouse anti-canine IFN γ capture antibody (Canine IFN γ ELISpot Development Module, catalogue number: SEL781, R&D, Minneapolis, MN, USA). They were then stimulated for 24 hours with the peptide pools. Cells and non-bound protein were washed away before adding biotinylated goat anti-canine IFN γ detection antibody (Canine IFN γ ELISpot Development Module, R&D) overnight at 4°C. Streptavidin-AP (ELISpot Blue Color Module) was incubated (2 hours, RT). NBT/BCIP substrate (ELISpot Blue Color Module, R&D) was added in each well of the plate for 30 min, read with iSpot Reader Spectrum (AID, Strassberg, Germany) and then analyzed with AID ELISpot software. As controls, splenocytes from transplanted GRMD dogs were either stimulated with PMA/ionomycin (positive control, 10 ng/mL and 500 ng/mL, respectively) or cultured in medium alone (negative control). Responses were considered positive when the number of spot-forming colonies per million cells was >50 and at least threefold higher than unstimulated cells.

Western-blot analysis

The analysis of anti-dystrophin IgG antibodies in transplanted dog's sera was performed by Western-blot, as described earlier [62]. Briefly, protein muscle extracts from healthy or GRMD dogs were subjected to 3-8% Tris-Acetate Precast polyacrylamide gel electrophoresis (Invitrogen) and then transferred to a Hybond ECL nitrocellulose membrane (Invitrogen). After overnight saturation, membranes were incubated (2 hours, RT) with sera (dilution 1:500) from transplanted dogs obtained at different time points. Subsequently, detection was performed by hybridization with peroxidase conjugated rabbit anti-dog IgG antibody (1:5000, catalogue number: 304-001-003, Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA) followed by enhanced chemiluminescence detection (Pierce). Two positive controls were used: (i) an anti-dystrophin IgG positive canine serum (kindly provided by S. Blot, Veterinary School of Alfort, France) obtained from a GRMD dog immunized against the dystrophin protein and (ii) an anti-dystrophin antibody (1:100, catalogue number: NCL-DYS1, Novocastra) revealed with a peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG antibody (1:2000, catalogue number: P044701, Dako, Santa Clara, CA, USA).

Muscle sampling

Fragments of *Triceps brachialis* muscle were collected from 9-month-old GRMD^{MU/no-IS} (n=4), GRMD^{MU/tr-IS} (n=4), GRMD^{mo/tr-IS} (n=5) dogs and healthy dogs (n=4) during a complete necropsy examination at the end of the protocol. Muscle samples were divided into two parts for immunohistochemistry and molecular/biochemical analysis.

Immunohistochemistry

Muscle samples were snap-frozen in isopentane cooled in liquid nitrogen and stored at -80°C until processing. After incubation in blocking buffer (PBS/5% goat serum, 1 hour, RT), transversal cryosections of 12 µm were successively incubated with mouse monoclonal anti-dystrophin antibody (1:50, overnight, RT; catalogue number: NCL-DYS2, Menarini, Rungis, France), Alexa fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG (1:400, 1 hour, RT; catalogue number: ab150113, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and the fluorescent DNA-dye DRAQ5 (1:1,000, 15 minutes, RT; catalogue number: DR05500, Biostatus, Leicestershire, UK). Immunofluorescence labeling was observed with a confocal microscope (Zeiss, Marly-le-Roi, France).

Histomorphometry

Myogenic regenerative potential was evaluated using immunolabeling against the developmental isoform of the myosin heavy chain (MyHCd) (1:20, catalogue number: NCL-MHCd, Menarini). Microscopic fields were randomly chosen to evaluate at least 700 fibers (1010±232). Endomysial fibrosis was analyzed after immunolabeling against collagen I (1:500, catalogue number: 02150026, MP biomedical, Illkirch, France). The percentage of the labeled area on the whole muscle section was calculated. All measurements were performed using Nikon Imaging Software (Nikon, Champigny sur Marne, France). For each measurement, repeatability was tested by the same observer measuring five times the same sample. The intra-assay variation coefficients were all lower than 5%.

Clinical monitoring

A clinical evaluation of GRMD dogs was performed weekly by a veterinarian, as previously described [58, 63]. Briefly, 11 locomotion criteria and 6 items related to the general health status were considered. Each item was scored from 0 to 2, with 0 corresponding to a normal appearance, 1 to an intermediate phenotype, and 2 to a severe alteration. The clinical score

was expressed as the percentage of the maximum score (defined as 100% for a healthy dog) and a tendency curve (mobile means order 3) was built to represent the score evolution.

Statistical analysis

All data were reported as mean \pm SD. Clinical scores were compared between each GRMD dog group with reiterated measure ANOVA followed by a post-hoc Tukey test, using XLStat software (Addinsoft, Paris, France). Percentages of regenerative fibers and fibrotic area fractions were compared between GRMD^{MU/no-IS}, GRMD^{MU/tr-IS} and GRMD^{mo/tr-IS} dogs, using a Mann-Whitney test with a two-tailed *P* value. A value of *P* < 0.05 was considered to be statistically significant.

Results

Transplanted GRMD dogs under transient immunosuppression do not exhibit deleterious immunity against both MuStem cells and dystrophin

Our previous results showed the potential of cMuStem cells to generate clinical and tissue benefits after systemic delivery in GRMD dogs placed under IS covering the entire experimental period [58]. Here, we monitored the immune responses of the recipient GRMD dogs developed against both transplanted cells and dystrophin to investigate the requirement of an IS associated with systemic delivery of allogeneic MuStem cells. For that purpose, we reproduced a systemic delivery protocol in GRMD dogs submitted to none (GRMD^{MU/no-IS}) or transient IS (GRMD^{MU/tr-IS}). In both groups, all the littermate donor-recipient pairs were defined as being DLA-haplo- or geno-identical. In addition, another group of non-transplanted dogs with transient IS (GRMD^{mo/tr-IS}) was included. Their experimental settings are summarized in Table 1. The data of representative animal from GRMD^{MU/tr-IS}, GRMD^{MU/no-IS} and GRMD^{mo/no-IS} dog groups are shown in Figure 1 (data corresponding to each dog were presented in Figures S1 to S3). Results are summarized in Table 2.

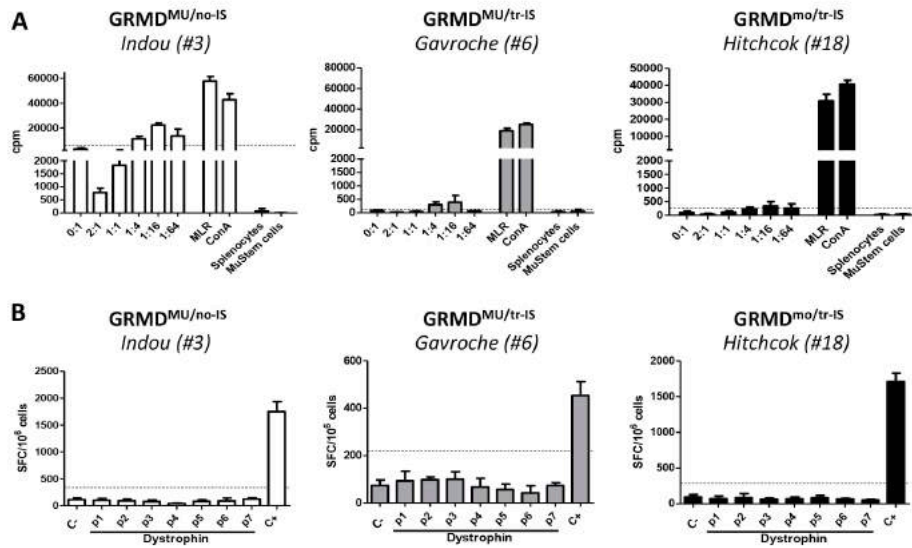


Figure 1. Cellular responses against donor's MuStem cells and dystrophin. **A.** Mixed cell reaction with the recipients PBMC collected at the time of sacrifice. The PBMC were stimulated with donor MuStem cells at increasing ratio. Lymphocyte proliferation was measured using a thymidine uptake-based assay and expressed as counts per minute (cpm). The threshold of positivity was determined as the basal proliferation of PBMC (medium alone) + 3 SD. Representative dogs from GRMD^{MU/no-IS} (left panel), GRMD^{MU/tr-IS} (middle panel) and GRMD^{mo/tr-IS} (right panel) groups are shown. **B.** IFN γ ELISpot. Negative (C-) and positive (C+) controls correspond to splenocytes in medium alone or stimulated with PMA/ionomycin, respectively. Responses were considered positive when the number of spot-forming cells (SFC) per million cells was >50 and at least threefold higher than unstimulated cells.

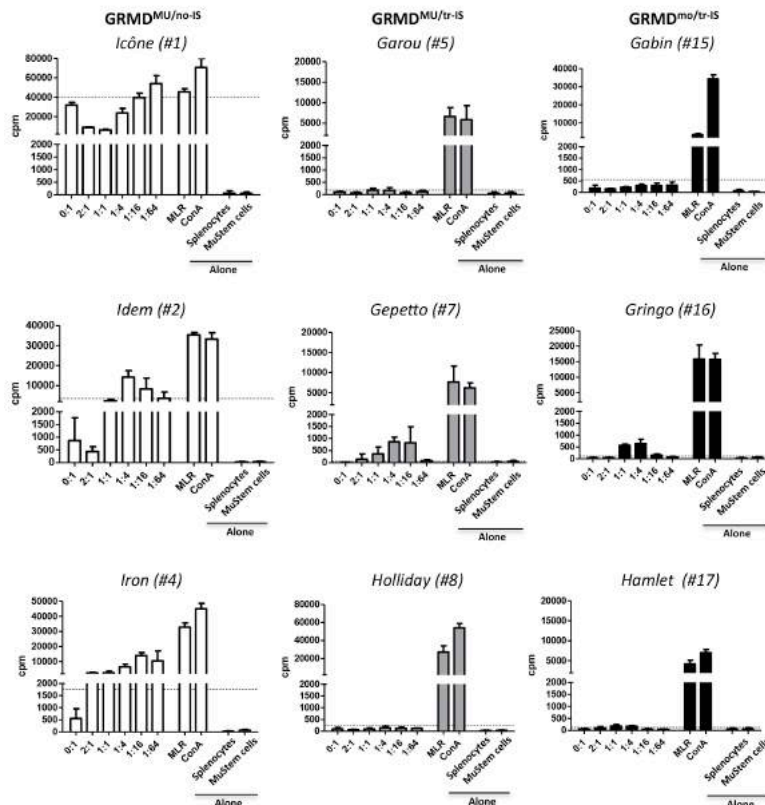


Figure S1. Cellular response against donor's MuStem cells. Mixed cell reactions were performed with the recipients PBMC collected at the time of sacrifice. The PBMC were stimulated with donor MuStem cells at increasing ratio. Lymphocyte proliferation was measured using a thymidine uptake-based assay and expressed as counts per minute (cpm). The threshold of positivity was determined as the basal proliferation of PBMC (medium alone) + 3 SD. All dogs from GRMD^{MU/no-IS} (left panel), GRMD^{MU/tr-IS} (middle panel) and GRMD^{mo/tr-IS} (right panel) groups are shown.

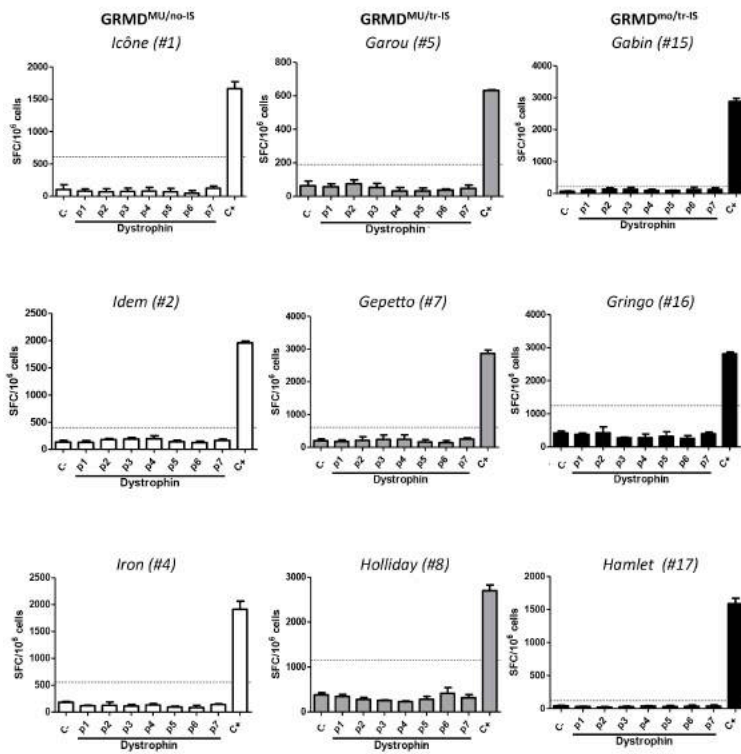


Figure S2. Cellular response against dystrophin by IFN γ ELISpot. Negative (C-) and positive (C+) controls correspond to splenocytes in medium alone or stimulated with PMA/ionomycin, respectively. Responses were considered positive when the number of spot-forming cells (SFC) per million cells was >50 and at least three-fold higher than unstimulated cells.

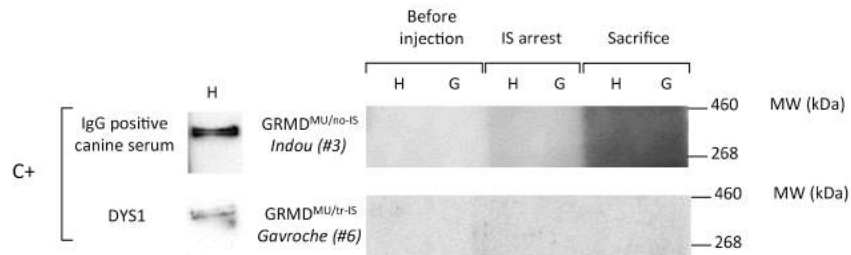


Figure S3. Humoral response against dystrophin by western blot analysis. GRMD^{MU/no-IS} and GRMD^{MU/tr-IS} dog's sera collected before injection, at IS arrest and at sacrifice, were incubated with either healthy (H) or GRMD (G) dog muscle extracts to detect dystrophin antibody. An IgG positive canine serum and an anti-dystrophin antibody incubated with healthy muscle extracts were used as positive controls (C+).

Table 2. Analysis of immune responses against both MuStem cells and dystrophin protein. For the anti-MuStem cell immunity, PBMC of the recipient GRMD dogs were tested against the corresponding donor's MuStem cells. The selected dilution was 1:16 with a detection threshold corresponding to the basal proliferation (PBMC in medium alone + 3 SD). For the cellular anti-dystrophin immunity, recipient splenocytes harvested at euthanasia were tested against overlapping dystrophin peptide library using an IFN γ ELISpot assay. For the humoral anti-dystrophin response (circulating specific IgG antibodies), transplanted dog's sera were tested by a western blot-based assay.

GRMD dogs		Anti-MuStem cell immunity			Anti-dystrophin immunity				
Group	ID number	Name	Cellular response (recipient PBMC)		Cellular response (splenocytes)	Humoral response			
			Before injection	IS arrest	Sacrifice	Before injection	IS arrest	Sacrifice	Heatmap
MU/no-IS	1	ICÔNE	87	21861	54003	Neg	NA	NA	0
	2	IDEM	247	ND	8287	Neg	Neg	Neg	10000
	3	INDOU	3119	3177	22422	Neg	Neg	Neg	20000
	4	IRON	214	3976	14017	Neg	Neg	Neg	30000
MU/tr-IS	5	GAROU	127	ND	ND	Neg	Neg	Neg	40000
	6	GAVROCHE	379	247	384	Neg	Neg	Neg	50000
	7	GEPETTO	248	59	827	Neg	Neg	Neg	60000
	8	HOLLIDAY	53	ND	ND	Neg	NA	NA	NA

NA: Western Blot was not performed

Results are here expressed in cpm

Host immunity against MuStem cells was examined in a mixed cell reaction (MCR)-based assay where host PBMC harvested at different time points were co-cultured with MuStem cells of the donor using an increasing ratio. Concerning the GRMD^{MU/tr-IS} dog group, no or weak proliferation of PBMC collected at two time points after the cell transplantation (i.e., at the IS arrest and the dog euthanasia) was determined in the presence of donor MuStem cells in all animals (Figures 1A and S1). Same results were obtained in the GRMD^{mo/tr-IS} dog group. In contrast, significant PBMC proliferation was observed in animals from GRMD^{MU/no-IS} dog group (n = 4, 8287 to 54003 cpm for instance at the time of sacrifice for the 1:16 MCR ratio) as shown in Table 2 and Figure 1A. Anti-dystrophin cellular and humoral immune responses were then monitored in transplanted dogs. Using an ELISpot assay, no IFN γ secretion was detected after dystrophin peptide stimulation of splenocytes harvested at the end of the protocol in all dogs whatever the IS regimen, showing that splenocytes did not become reactive following MuStem cell infusion (Figures 1B and S2). Accordingly and using a western blot-based assay, no IgG anti-dystrophin antibody was detected in all animals whatever the time point and the IS treatment (Figure S3). These results showed that the MuStem cell infusion protocol realized with a transient IS did not generate cellular and humoral responses against both MuStem cells and dystrophin while an anti-allogeneic antigen immune response is observed when cells are delivered without IS.

Increased myogenic regenerative activity observed in the MuStem cell-transplanted GRMD dog under transient immunosuppression

Lesions typically described in GRMD dogs were identically observed in HES stained sections of 32-week-old GRMD^{MU/tr-IS}, GRMD^{mo/tr-IS} and GRMD^{MU/no-IS} dogs. Briefly, muscle fibers displayed some heterogeneity of size with presence of small fibers, some being centronucleated, and large hyaline ones. To note, foci of mononuclear cell infiltration, calcium deposits and mild fibrosis were present. Low level of subsarcolemmal expression of dystrophin was observed in muscle sections, which did not allow us to detect the protein using Western blot analyses. Myogenic regenerative activity was assessed using a specific immunolabeling directed against the developmental MyHC isoform whose expression is restricted to development and regeneration processes. In the transiently immunosuppressed dog group, MyHCd⁺ fibers were 39.8 \pm 4.8% and 19.3 \pm 6.4% in the *Triceps brachialis* muscle of GRMD^{MU/tr-IS} and GRMD^{mo/tr-IS} dogs respectively, demonstrating a significant effect of the MuStem cell delivery (p=0.005) (Figure 2). Strikingly, MyHCd⁺ fibers represented 25.2 \pm 3.5% GRMD^{MU/no-IS} dogs, revealing that this effect on the formation of newly

regenerated muscle fibers is compromised when cells are delivered without IS. These results indicate that the set-up of a transient IS is required to allow the MuStem cells to actively and persistently contribute to muscle fiber regeneration.

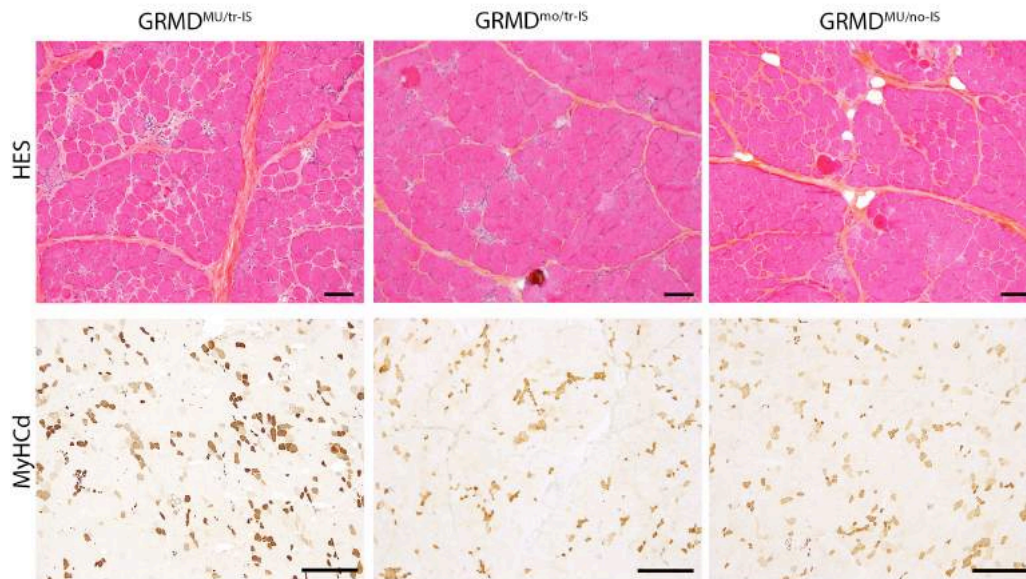


Figure 2. Histological impact of the systemic delivery of MuStem cells on the *Triceps brachialis* muscle. Hematoxylin-eosin-safranin topographic staining (upper panel) and MyHCd labeling for muscle regeneration (lower panel) of representative muscle sections. Three groups of 9-month-old GRMD dogs are represented: MuStem cell-injected dogs with transient IS (GRMD^{MU/tr-IS}, left), mock GRMD dogs with transient IS (GRMD^{mo/tr-IS}, middle) and MuStem cell-injected dogs without IS (GRMD^{MU/no-IS}, right). Note the heterogeneity of muscle fiber sizes showing numerous small fibers especially in the GRMD^{MU/tr-IS} dog group. Based on MyHCd labeling, most of these small fibers appeared to correspond to newly regenerated ones indicating a global increase in regenerative activity (brown staining) in GRMD^{MU/tr-IS} compared to the one observed in GRMD^{MU/no-IS} and GRMD^{mo/tr-IS} dog muscles. Scale bar = 100 μ m.

Persisting clinical stabilization of MuStem cell-transplanted GRMD dogs under transient immunosuppressive treatment

A weekly clinical and locomotion ability evaluation first revealed that the GRMD^{MU/no-IS} dogs displayed a well-known progressive clinical impairment with a striking decline in their muscle strength and locomotion abilities from 14 to 35 weeks of age, as described in GRMD^{mo/no-IS} dogs (Figure 3A). The clinical composite score quantified this clinical status with GRMD^{MU/no-IS} dogs that displayed a score of $40.6 \pm 16.3\%$ at 35 weeks of age. This reveals that MuStem cell transplantation does not generate beneficial clinical effect in absence of IS. Concerning the GRMD^{MU/tr-IS} dog group, no clinical difference was noted before the age of 24 weeks compared to animals of the GRMD^{MU/no-IS} dog group. From 2 weeks after the time of IS arrest (*i.e.*, 24 weeks of age) to the end of the protocol, a remarkable stable clinical score was

observed in GRMD^{MU/tr-IS} dogs with a score of $65.5 \pm 9.2\%$ at 35 weeks of age as compared to the slow decrease in the clinical score of GRMD^{MU/no-IS} dogs (Figure 3B). A reiterated measure ANOVA statistical test underlines a significant impact of the transient IS on the clinical score ($F=11,726$; $p=0.001$) between GRMD^{MU/tr-IS} and GRMD^{MU/no-IS} dogs from 26 to 35 weeks. Importantly, GRMD^{MU/tr-IS} dogs present a similar clinical stabilization than those of GRMD dogs placed under continuous IS (GRMD^{MU/co-IS}) that displayed a score between 60 to 90% from 24 to 36 weeks of age, as already published [58] (Figure 3C). Noteworthy, the clinical score of the GRMD^{mo/tr-IS} dog group displayed a mild improvement following cessation of the IS treatment with important differences between dogs (coefficient of variation: 11.4%). No statistical difference was identified between GRMD^{MU/tr-IS} and GRMD^{mo/tr-IS} dog groups that does not allow us to show unequivocal that the clinical stabilization observed with the GRMD^{MU/tr-IS} dogs reflects only a positive effect generated by the MuStem cells infused under IS.

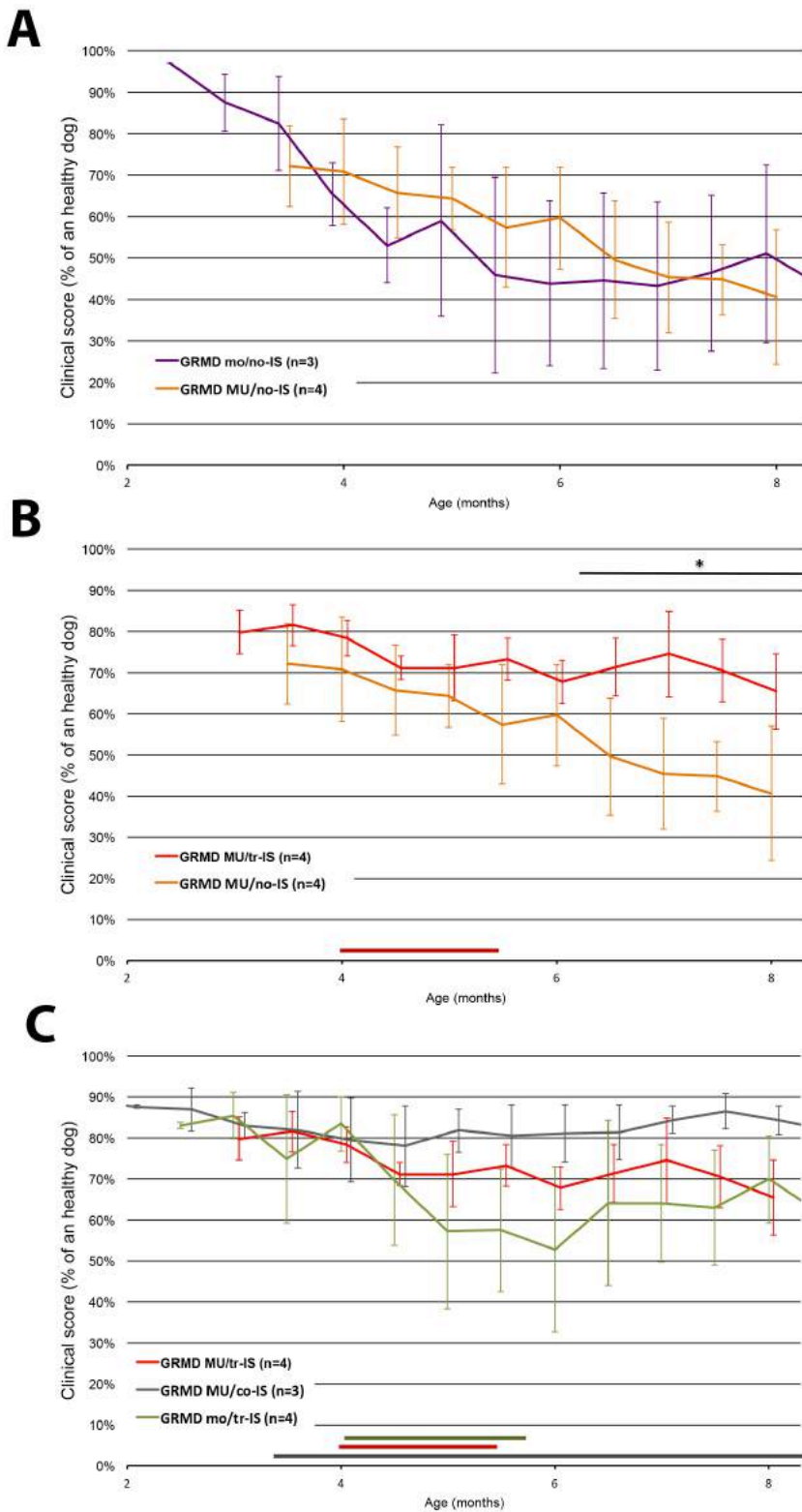


Figure 3. Clinical assessment of GRMD dogs. A clinical score was assessed weekly from 2 months of age and expressed as a percentage of a theoretical healthy dog score. Clinical score (mean±SD) of MuStem cell-injected GRMD dogs without IS (GRMD^{MU/no-IS} in orange, $n = 4$), with transient IS (GRMD^{MU/tr-IS} in red, $n = 4$) or with continuous IS (GRMD^{MU/co-IS} in grey, $n = 3$) was determined in comparison with mock GRMD dogs (GRMD^{mo/no-IS} in purple, $n = 4$ and GRMD^{mo/tr-IS} in green, $n = 4$). The corresponding immunosuppressive period is represented in the lower part of the graph by a color line. **A.** MuStem cell delivery did not mitigate the clinical impairment of GRMD^{MU/no-IS} dogs in comparison with GRMD^{mo/no-IS} dogs. **B.** A significant stabilization of the clinical score was observed in GRMD^{MU/tr-IS} dogs in comparison with GRMD^{MU/no-IS} group. **C.** Comparable stabilized clinical curves were obtained for GRMD^{MU/tr-IS} dogs and GRMD^{MU/co-IS} ones (previously published data [58]). No clinical difference as assessed by the scoring used here was observed between GRMD^{MU/tr-IS} and GRMD^{mo/tr-IS} dog groups.

Discussion

In view of clinical application, the use of allogeneic cells displays several advantages in comparison to those of *ex-vivo* corrected autologous cells. Among these favorable features, a better *in vitro* proliferation capacity was described evoking a whole-body treatment and/or delivery protocols based on repeated cell infusions. A higher myogenic regenerative index was also demonstrated. [64]. In addition, allogeneic cell-based therapy allows a better standardization in cell batch confection by avoiding to use of the patient's muscles which are very heterogeneous in terms of tissue damage and thus of cell yield. Finally, in case of repeated cell delivery, cell banking allows a better clinical reactivity to treat patients. However, the main limit in the use of allogeneic product for cell therapy protocol resides in the immune rejection and it is why organ transplant and cell infusion in allogeneic context are always designed in conjunction with IS [65-67]. Nevertheless, the long-term use of immunosuppressants is associated with numerous and severe adverse effects, limiting their clinical application [46, 47]. Over the last decade, some immunomodulatory properties have been attributed to several somatic stem cells and especially to MSC [37, 68, 69], evoking even their use as a new strategy for immunosuppression, in combination of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for instance [70].

In 2011, we demonstrated that the systemic delivery of allogeneic MuStem cells into GRMD dogs submitted to continuous IS allows a persistent clinical stabilization and increased regeneration [58]. Here, we show that similar clinical and tissue benefits could be obtained when delivery protocol is performed into DLA-haplo- or geno-identical dogs under transient IS. In return, a lack of beneficial effect with an induction of cellular response against allogeneic cells was observed when transplantation was done without the use of IS, clearly establishing the requirement of a transient IS for the MuStem cell transplantation. The longitudinal clinical evaluation revealed a remarkable stabilization of the transplanted dogs under transient IS compared to the progressive impairment of the ones without IS. It was also noticed that mock group receiving only transient IS exhibits a break in the evolution of the clinical curve when stopping IS treatment with a rebound effect that contrasts with the homogenous stabilization observed from the period of cell infusion for the group of interest. Considering that CsA treatment has been shown to be associated with adverse effects among which several clinical signs such as myalgia and muscle weakness [51, 52], it is possible that this inflection of the clinical curve can reflect a better general clinical status due to the loss of these adverse effects. This emphasizes that clinical evaluation of a cell therapy-based strategy with an immunosuppressive component needs to be carefully interpreted as already

mentioned [71]. A possibility to make sure not to attribute clinically effect of the IS to the cell product would be to include a long-time follow-up after the arrest of the IS treatment, so that the consequences of the IS become blurred. Due to a continuous degenerative process, the dystrophic muscle displays a relatively high level of pro-inflammatory cytokines and immune cell infiltrates especially composed of lymphocytes and macrophages [72, 73]. This inflammatory status makes the dystrophic muscle tissue a particularly unfavorable target for cell engraftment and explains in part why neutralization of the immune system is initially required despite the use of DLA-identical donor-recipient pairs of dogs. Our data related to the induction of the host's immune response against allogeneic donor antigens are in agreement with previous results obtained after injection of MyoD-transduced canine CD271⁺ MSC into the TA muscle of CXMD₁ dogs in the absence of IS. Eight weeks later, the injected muscles were characterized by the presence of numerous cellular infiltrates positive for CD8 and CD11 markers around degenerating donor fibers while the number of dystrophin⁺ cells was relatively low [74]. In addition, a lack of detection of human cells, histological change as well as motor ability were reported after eight successive intra-peritoneal injections of human pericytes obtained from four different tissues in double mutant *Utrn^{tm1Ked} Dmd^{mdx} /J* mice without IS [75]. In contrast, following IV and IM injections of hADSC in *SJL* [76] and *mdx* mice [33], an ability of xenogeneic cell engraftment into host muscles was reported without the use of IS. Indeed, chimeric human/mouse muscle fibers were detected with the re-expression of defective proteins as well as an improvement of muscle performance. Nevertheless, it is important to note that these data were obtained in two mice models exhibiting mild dystrophic phenotype in contrast with previous results collected in clinically relevant DMD models namely DKO mice and GRMD dogs.

In the present study, the clinical and tissue benefits observed in the transplanted GRMD dogs submitted to transient IS were histologically associated with very low levels of subsarcolemmal expression of dystrophin, as we previously reported in GRMD dogs under continuous IS [58, 59]. It is suggested that the global effect observed following the MuStem cell transplantation is mainly related to the stimulation of the myogenic regenerative activity that could allow a preservation of the muscular architecture in spite of a limited dystrophin restoration. Similar results were described with the intra-femoral injection of 5.10⁸ CD271⁺ MSC transduced with MyoD into immunosuppressed wild-type dogs for which TA muscle was previously injured with cardiotoxin [74]. In this study, eight weeks after the transplantation, rare donor muscle fibers were detected in the damaged muscle, suggesting that the dispersion of the infused cells throughout the whole body can only result in scattered

events. Then, we can hypothesize that the number of donor MuStem cell's nuclei per recipient muscle fiber is too low to allow a sufficient expression of dystrophin. In order to significantly improve the efficacy of the IA delivery of allogeneic Mabs into immunosuppressed GRMD dogs notably in terms of dystrophin restoration, Sampaolesi et al. [29] demonstrated the need to perform five successive injections of $5 \cdot 10^7$ cells in comparison to the three initially done and which only allowed the generation of 2 to 10% of dystrophin⁺ fibers. In addition, detection of rare human nuclei and limited number of dystrophin⁺ fibers with weak immunolabelling was also reported in another study six months following nine successive IV injections of $5 \cdot 10^7$ hADSCs/kg in GRMD dogs [34]. Importantly, we have shown in the present study that this low dystrophin expression is not associated with host cellular or humoral responses against the protein, although we cannot exclude a limit of sensitivity to detect antibody presence in dog's sera or cell response. Identically, a lack of detection of anti-dystrophin antibodies was reported eight weeks after IM injection of allogeneic MyoD-transduced CD271⁺ MSC in CXMD₁ dogs in the absence of IS and thus despite the presence of some dystrophin⁺ fibers [74]. The lack of immunity against the newly expressed dystrophin may be explained by either the low amount of expressed protein and the subsequent potential antigen levels or the presence of some revertant fibers that express dystrophin in the GRMD canine model that could act in a tolerogenic way. Nevertheless, this hypothesis related to the revertant fibers does not seem to be supported in DMD patients who can present preexisting circulating anti-dystrophin T cells with a proportion that increase in individuals not subjected to corticosteroid treatment [77, 78]. Those observations in humans suggest that anti-dystrophin immunity issue must be considered in the design of cell therapy trials.

MSC have been shown to be involved in a large number of immunomodulation pathways thanks to their interactions with a broad range of immune cells types [79]. Among the reported immunomodulatory mechanisms, it has been demonstrated that vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM1) and intracellular cell adhesion molecule-1 (ICAM1) could mediate MSC immunomodulation via a direct adhesion to activated T cells [80]. Also, it has been established that Mabs inhibit T cell proliferation through a cell contact independent mechanism involving indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) and prostaglandin E2 (PGE-2) [37]. Based on our present data pointing out the need of only a transient immunosuppressive treatment limited to the period of MuStem cell infusion for a therapeutic effect, it could be postulated that an initial inhibition of the immune system is required to allow donor MuStem cells to engraft into recipient muscle tissue where it could then secrete immunomodulatory soluble factors and/or establish contact with immune cell subsets to allow their persisting

engraftment. Further experiments aiming to determine the cell surface markers expressed by the MuStem cells as well as the soluble factors they secrete will be highly informative.

Conclusion

Overall, the original data presented here indicate that a long-term immunosuppressive regimen is not required in the context of allogeneic MuStem cell transplantation in the GRMD dog model and that a transient IS limited to the transplantation period is sufficient to generate sustained benefits. While further experiments are needed to investigate how the therapeutic effects associated with MuStem cell delivery is maintained once IS is stopped, our results are critical from a safety perspective for the design of future MuStem cell-based trials.

Acknowledgements

We thank Gillian Butler-Browne (Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, INSERM UMRS974, CNRS FRE3617, Center for Research in Myology, Paris, France) for helpful discussion and improving the manuscript. We are grateful to Maeva Dutilleul for their technical assistance with animal care and operations, collecting biological samples, cell isolation culture and histology. We also thank all the staff of the Boisbonne Center for Gene and Cell Therapy (Oniris, Nantes, France) for the handling and care of the GRMD dog colony.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

Authors indicated no potential conflict of interest.

References

1. Bonilla E, Samitt CE, Miranda AF et al. Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin at the muscle cell surface. *Cell*. 1988;54(4):447-452.
2. Hoffman EP, Brown RH Jr, Kunkel LM. Dystrophin: The Protein Product of the Duchenne Muscular Dystrophy Locus. *Cell*. 1987;51:919-928.
3. Emery AEH. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases – A word survey. *Neuromuscul Disord*. 1991;1:19-29.

4. Moat SJ, Bradley DM, Salmon R et al. Newborn bloodspot screening for Duchenne muscular dystrophy: 21 years experience in Wales. *Eur J Hum Genet.* 2013;21:1049-1053.
5. Dubowitz V. Carrier detection and genetic counselling in Duchenne dystrophy. *Dev Med Child Neurol.* 1975;17:352-356.
6. Manzur AY, Muntoni F. Diagnosis and new treatments in muscular dystrophies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2009;80(7):706-714.
7. Berardi E, Annibali D, Cassano M et al. Molecular and cell-based therapies for muscle degenerations: a road under construction. *Front Physiol.* 2014;5:1-13.
8. Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol.* 1961;9:493-495.
9. Morgan JE, Partridge TA. Muscle satellite cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35(8):1151-1156.
10. Kinoshita I, Vilquin JT, Guérette B et al. Very efficient myoblast allotransplantation in mice under FK506 immunosuppression. *Muscle Nerve.* 1994;17(12):1407-1415.
11. Partridge TA, Morgan JE, Coulton GR et al. Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts. *Nature.* 1989;337:176-179.
12. Huard J, Tremblay G, Verreault S et al. Utilization of an antibody specific for human dystrophin to follow myoblast transplantation in nude mice. *Cell Transplant.* 1993;2(2):113-118.
13. Huard J, Verreault S, Roy R et al. High efficiency of muscle regeneration after human myoblast clone transplantation in SCID mice. *J Clin Invest.* 1994;93(2):586-599.
14. Gussoni E, Pavlath GK, Lanctot AM et al. Normal dystrophin transcripts detected in Duchenne muscular dystrophy patients after myoblast transplantation. *Nature.* 1992;356:435-438.

15. Mendell JR, Kissel JT, Amato AA et al. Myoblast transfer in the treatment of Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med*. 1995;333(13):832-838.
16. Guérette B, Asselin I, Vilquin JT et al. Lymphocyte infiltration following allo- and xenomyoblast transplantation in mdx mice. *Muscle Nerve*. 1995;18(1):39-51.
17. Huard J, Bouchard JP, Roy R et al. Human myoblast transplantation: preliminary results of 4 cases. *Muscle Nerve*. 1992;15(5):550-560.
18. Tremblay JP, Malouin F, Roy R et al. Results of a triple blind clinical study of myoblast transplantations without immunosuppressive treatment in young boys with Duchenne muscular dystrophy. *Cell Transplant*. 1993;2:99-112.
19. Vilquin JT, Wagner E, Kinoshita I et al. Successful histocompatible myoblast transplantation in dystrophin-deficient mdx mouse despite the production of antibodies against dystrophin. *J Cell Biol*. 1995;131(4):975-988.
20. Chirieleison SM, Feduska JM, Schugar RC et al. Human muscle-derived cell populations isolated by differential adhesion rates: phenotype and contribution to skeletal muscle regeneration in Mdx/SCID mice. *Tissue Eng Part A*. 2012;18(3-4):232-241.
21. Crisan M, Yap S, Casteilla L et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 2008;3(3):301-313.
22. Dellavalle A, Sampaolesi M, Tonlorenzi R et al. Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat Cell Biol*. 2007;9(3):255-267.
23. Meng J, Adkin CF, Xu SW et al. Contribution of human muscle-derived cells to skeletal muscle regeneration in dystrophic host mice. *PLoS One*. 2011;6(3):e17454.
24. Meng J, Chun S, Asfahani R et al. Human skeletal muscle-derived CD133(+) cells form functional satellite cells after intramuscular transplantation in immunodeficient host mice. *Mol Ther*. 2014;22(5):1008-1017.

25. Minasi MG, Riminucci M, De Angelis L et al. The meso-angioblast: a multipotent, self-renewing cell that originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues. *Development*. 2002;129:2773-2783.
26. Torrente Y, Belicchi M, Sampaolesi M et al. Human circulating AC133(+) stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle. *J Clin Invest*. 2004;114(2):182-195.
27. Benchaouir R, Meregalli M, Farini A et al. Restoration of human dystrophin following transplantation of exonskipping- engineered DMD patient stem cells into dystrophic mice. *Cell Stem Cell*. 2007;1:646–657.
28. Sampaolesi M, Torrente Y, Innocenzi A et al. Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. *Science*. 2003;301:487-492.
29. Sampaolesi M, Blot S, D'Antona G et al. Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature*. 2006;444:574-579.
30. Oshima H, Payne TR, Urish KL et al. Differential myocardial infarct repair with muscle stem cells compared to myoblasts. *Mol Ther*. 2005;12:1130-1141.
31. Qu Z, Balkir L, van Deutekom JC et al. Development of approaches to improve cell survival in myoblast transfer therapy. *J Cell Biol*. 1998;142(5):1257-1267.
32. Qu-Petersen Z, Deasy B, Jankowski R et al. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *J Cell Biol*. 2002;157:851–864.
33. Rodriguez AM, Pisani D, Dechesne CA et al. Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J Exp Med*. 2005;201:1397-1405.
34. Vieira NM, Valadares M, Zucconi E et al. Human adipose-derived mesenchymal stromal cells injected systemically into GRMD dogs without immunosuppression are able to reach the host muscle and express human dystrophin. *Cell Transplant*. 2012;21(7):1407-1417.

35. Yan Z, Zhuansun Y, Liu G et al. Mesenchymal stem cells suppress T cells by inducing apoptosis and through PD-1/B7-H1 interactions. *Immunol Lett.* 2014;162:248-255.
36. François M, Romieu-Mourez R, Li M et al. Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. *Mol Ther.* 2012;20(1):187-195.
37. English K, Tonlorenzi R, Cossu G et al. Mesoangioblasts suppress T cell proliferation through IDO and PGE-2-dependent pathways. *Stem Cells Dev.* 2013;22(3):512-523.
38. Melief SM, Schrama E, Brugman MH et al. Multipotent stromal cells induce human regulatory T cells through a novel pathway involving skewing of monocytes toward anti-inflammatory macrophages. *Stem Cells.* 2013;31(9):1980-1991.
39. Borel JF, Baumann G, Chapman I et al. In vivo pharmacological effects of ciclosporin and some analogues. *Adv Pharmacol.* 1996;35:115-246.
40. Kahan BD. Immunosuppressive therapy. *Curr Opin Immunol.* 1992;4(5):553-560.
41. Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA et al. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N Engl J Med.* 2000;342(9):605-612.
42. Henry ML. Cyclosporine and tacrolimus (FK506): a comparison of efficacy and safety profiles. *Clin Transplant.* 1999;13(3):209-220.
43. Burke Jr JF, Pirsch JD, Ramos EL et al. Long-term efficacy and safety of cyclosporine in renal transplant recipients *N Engl J Med.* 1994 ;331:358-363.
44. Wongmekiat O, Thamprasert K. Investigating the protective effects of aged garlic extract on cyclosporin-induced nephrotoxicity in rats. *Fundam Clin Pharmacol.* 2005;19(5):555-562.

45. Warren RB, Griffiths CE. Systemic therapies for psoriasis: methotrexate, retinoids, and cyclosporine. *Clin Dermatol*. 2008;26(5):438-447.
46. Chi J, Zhu Y, Fu Y et al. Cyclosporin A induces apoptosis in H9c2 cardiomyoblast cells through calcium-sensing receptor-mediated activation of the ERK MAPK and p38 MAPK pathways. *Mol Cell Biochem*. 2012;367(1-2):227-236.
47. Zhu Y, Chi J, Liu Y et al. Knockdown of dishevelled-1 attenuates cyclosporine A-induced apoptosis in H9c2 cardiomyoblast cells. *Mol Cell Biochem*. 2013;374(1-2):113-123.
48. Fishman JA. Infection in solid-organ transplant recipients. *N Engl J Med*. 2007;357:2601-2614.
49. Bottomley, MJ, Harden PN. Update on the long-term complications of renal transplantation. *Br Med Bull*. 2013;106:117-134.
50. Herman M, Weinstein T, Korzets A et al. Effect of cyclosporin A on DNA repair and cancer incidence in kidney transplant recipients. *J Lab Clin Med*. 2001;137: 14.
51. Biring MS, Fournier M, Ross DJ et al. Cellular adaptations of skeletal muscles to cyclosporine. *J Appl Physiol*. 1998;84(6):1967-1975.
52. Fernández-Solá J, Campistol J, Casademont J et al. Reversible cyclosporin myopathy. *Lancet*. 1990;335(8685):362-363.
53. Friday BB, Horsley V, Pavlath GK. Calcineurin activity is required for the initiation of skeletal muscle differentiation. *J Cell Biol*. 2000;149(3):657-666.
54. Hardiman O, Sklar RM, Brown RH Jr. Direct effects of cyclosporin A and cyclophosphamide on differentiation of normal human myoblasts in culture. *Neurology*. 1993;43(7):1432-1434.
55. Hong F, Lee J, Song JW et al. 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.* 2002;16(12):1633-1635.
56. Sakuma K, Nishikawa J, Nakao R et al. Calcineurin is a potent regulator for skeletal muscle regeneration by association with NFATc1 and GATA-2. *Acta Neuropathol.* 2003;105(3):271-280.
57. Sakuma K, Nakao R, Aoi W et al. Cyclosporin A treatment upregulates Id1 and Smad3 expression and delays skeletal muscle regeneration. *Acta Neuropathol.* 2005;110(3):269-280.
58. Rouger K, Larcher T, Dubreil L et al. Systemic delivery of allogenic muscle stem cells induces long-term muscle repair and clinical efficacy in duchenne muscular dystrophy dogs. *Am J Pathol.* 2011;179(5):2501-2518.
59. Robriquet F, Lardenois A, Babarit C et al. Differential Gene Expression Profiling of Dystrophic Dog Muscle after MuStem Cell Transplantation. *PLoS One.* 2015;10(5):e0123336.
60. Honeyman K, Carville KS, Howell JM et al. Development of a snapback method of single-strand conformation polymorphism analysis for genotyping Golden Retrievers for the X-linked muscular dystrophy allele. *Am J Vet Res.* 1999;60(6):734-737.
61. Yuhki N, Beck T, Stephens R et al. Comparative genomic structure of human, dog, and cat MHC: HLA, DLA, and FLA. *J Hered.* 2007;98(5):390-399.
62. Le Guiner C, Montus M, Servais L et al. Forelimb treatment in a large cohort of dystrophic dogs supports delivery of a recombinant AAV for exon skipping in Duchenne patients. *Mol Ther.* 2014;22(11):1923-1935.
63. Thibaud JL, Monnet A, Bertoldi D et al. Characterization of dystrophic muscle in golden retriever muscular dystrophy dogs by nuclear magnetic resonance imaging. *Neuromuscul Disord.* 2007;17(7):575-584.

64. Hare JM, Fishman JE, Gerstenblith G et al. Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow–derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial. *JAMA*. 2012;308(22):2369-2379.
65. Baroja-Mazo A, Revilla-Nuin B, Ramírez P et al. Immunosuppressive potency of mechanistic target of rapamycin inhibitors in solid-organ transplantation. *World J Transplant*. 2016;6(1):183-192.
66. Cossu G, Previtali SC, Napolitano S et al. Intra-arterial transplantation of HLA-matched donor mesoangioblasts in Duchenne muscular dystrophy. *EMBO Mol Med*. 2015;7(12):1513-1528.
67. Ventura-Aguiar P, Campistol JM, Diekmann F. Safety of mTOR inhibitors in adult solid organ transplantation. *Expert Opin Drug Saf*. 2016;15(3):303-319.
68. Gebler A, Zabel O, Seliger B. The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. *Trends Mol Med*. 2012;18(2):128-134.
69. Ichim TE, Alexandrescu DT, Solano F et al. Mesenchymal stem cells as anti-inflammatories: implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Cell Immunol*. 2010;260(2):75-82.
70. Uccelli A, Pistoia V, Moretta L. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? *Trends Immunol*. 2007;28(5):219-226.
71. Davies KE, Grounds MD. Treating muscular dystrophy with stem cells? *Cell*. 2006;127(7):1304-1306.
72. Guérette B, Skuk D, Célestin F et al. Prevention by anti-LFA-1 of acute myoblast death following transplantation. *J Immunol*. 1997;159(5):2522-2531.

73. Villalta SA, Rinaldi C, Deng B et al. Interleukin-10 reduces the pathology of mdx muscular dystrophy by deactivating M1 macrophages and modulating macrophage phenotype. *Hum Mol Genet.* 2011;20(4):790-805.
74. Nitahara-Kasahara Y, Hayashita-Kinoh H, Ohshima-Hosoyama S et al. Long-term engraftment of multipotent mesenchymal stromal cells that differentiate to form myogenic cells in dogs with Duchenne muscular dystrophy. *Mol Ther.* 2012;20(1):168-177.
75. Valadares MC, Gomes JP, Castello G et al. Human adipose tissue derived pericytes increase life span in Utrn (tm1Ked) Dmd (mdx) /J mice. *Stem Cell Rev.* 2014;10(6):830-840.
76. Vieira NM, Bueno CR Jr, Brandalise V et al. SJL dystrophic mice express a significant amount of human muscle proteins following systemic delivery of human adipose-derived stromal cells without immunosuppression. *Stem Cells.* 2008;26(9):2391-2398.
77. Flanigan KM, Campbell K, Viollet L et al. Anti-dystrophin T cell responses in Duchenne muscular dystrophy: prevalence and a glucocorticoid treatment effect. *Hum Gene Ther.* 2013;24(9):797-806.
78. Mendell JR, Campbell K, Rodino-Klapac L et al. Dystrophin immunity in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med.* 2010;363(15):1429-1437.
79. English K, French A, Wood KJ. Mesenchymal stromal cells: facilitators of successful transplantation? *Cell Stem Cell.* 2010;7(4):431-442.
80. Ren G, Zhao X, Zhang L et al. Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. *J Immunol.* 2010;184:2321-2328.

Discussion

On ne fait jamais attention à ce qui a été fait ; on ne voit que ce qui reste à faire

Marie Curie

Dans le domaine des pathologies neuromusculaires et en particulier des dystrophies musculaires, différents types de cellules progénitrices ont été isolés ces dernières années à partir de tissus adultes distincts. Ces candidats à la thérapie cellulaire ont tous démontré des propriétés d'intérêt majeur, notamment en termes de différenciation musculaire, laissant entrevoir pour certains des possibilités d'impact important sur la régénération du muscle. Si les démonstrations précliniques réalisées pour la plupart sur des modèles murins ou canins se sont avérées concluantes (Farini *et al.*, 2009), les deux essais cliniques mis en place avec l'utilisation des mésoangioblastes et des cellules AC133⁺ se sont en revanche révélés décevants avec une absence d'effet bénéfique, démontrant par là le niveau de complexité pour identifier un médicament de thérapie innovant (Torrente *et al.*, 2007; Cossu *et al.*, 2015).

Parmi les populations d'intérêt potentiel, les MDSC isolées à partir de tissus musculaires murins sur la base d'un déficit d'adhérence présentent une forte capacité proliférative autorisant une administration systémique (Qu-Petersen *et al.*, 2002). Elles sont également capables de participer à la régénération musculaire en fusionnant directement avec les fibres endogènes et en reconstituant un stock de cellules satellites. Cependant, très peu d'études ont été réalisées à partir du candidat humain, limitant grandement l'utilisation des MDSC dans une visée clinique. Les travaux de notre laboratoire ont démontré qu'une population dérivée du tissu musculaire canin sain, les cellules cMuStem, présentent des caractéristiques intéressantes en terme clinique, notamment une forte capacité proliférative ainsi qu'un impact clinique après administration systémique chez le chien GRMD, modèle cliniquement pertinent de la DMD (Rouger *et al.*, 2011; Robriquet *et al.*, 2015, 2016; Lardenois *et al.*, 2016). Cependant, un des points cruciaux avant de pouvoir envisager de proposer la population MuStem comme produit de thérapie cellulaire est de réussir à l'isoler du tissu humain et d'en proposer une carte phénotypique et comportementale complète mettant en évidence un ensemble de propriétés d'intérêt. C'est strictement la tâche qui m'a été confiée lors de ma thèse.

Mon travail expérimental a permis de déterminer que les cellules MuStem humaines se définissent comme une population de progéniteurs myogéniques précoces d'origine mésenchymateuse/périvasculaire et caractérisée par une forte capacité proliférative, une oligopotence ainsi qu'une capacité de régénération musculaire *in vivo* après

injection dans un muscle lésé de souris immunodéficiente. La population hMuStem possède par ailleurs des propriétés immunomodulatrices démontrées par une interaction avec l'immunité adaptative mais également innée, en inhibant la prolifération lymphocytaire et l'activité du complément *in vitro*. Enfin, l'étude des modalités d'administration des cellules MuStem allogéniques chez le chien GRMD m'a conduit à définir la nécessité d'un traitement immunosuppresseur qui peut cependant être limité à la période d'injection des cellules afin d'observer un bénéfice clinique et tissulaire.

Je vais m'attacher à discuter dans la suite de ce manuscrit ces points principaux en mettant en perspective les résultats obtenus avec ceux de la littérature.

I. Nature de l'agent cellulaire

L'identification de candidats cellulaires d'intérêt thérapeutique potentiel a rapidement posé la question de leur nature et notamment de leur parenté les uns envers les autres. Une des difficultés majeures rencontrées concerne la grande diversité des techniques d'isolement utilisées qui diffèrent entre les laboratoires et rendent extrêmement complexe la comparaison stricte entre populations.

1. Origine tissulaire

Certains candidats cellulaires sont clairement isolés de tissus spécifiques, rendant l'identification de leur origine plus aisée comme par exemple les CSH et CSM issues de la moelle osseuse ou du tissu adipeux (Sherwood *et al.*, 2004). Concernant les cellules MuStem, nous sommes confrontés à la difficulté de préciser leur origine. En effet, nous isolons ces cellules à partir de tissu musculaire sans être en mesure de déterminer s'il s'agit de cellules résidentes ou de cellules "de passage" au sein du tissu musculaire. De plus, nous ignorons si elles occupent la loge satellitaire ou si elles sont plutôt localisées dans l'interstitium. De façon intéressante, il est aujourd'hui avancé une origine mésenchymateuse et périvasculaire d'un grand nombre de cellules souches adultes ayant des propriétés myogéniques (Crisan *et al.*, 2011). Les cellules MuStem humaines, de part leur phénotype détaillé ci-après, pourraient faire partie de celles-ci.

2. Phénotype

En condition clonale, les colonies de cellules hMuStem se composent de cellules fusiformes et rondes, cette double morphologie étant retrouvée après culture clonale, démontrant qu'un seul type cellulaire peut indifféremment redonner les deux

morphologies. Une caractérisation approfondie nous a permis de positionner la population hMuStem comme un ensemble de progéniteurs myogéniques précoces d'origine mésenchymateuse/périvasculaire. En effet, les cellules hMuStem sont CD56⁺ à hauteur de 48 à 97% tandis qu'elles expriment Myf5 de 15 à 75% et dans une moindre mesure MyoD (2 à 14%). De plus, elles présentent les transcrits Pax3, myogénine, MRF4, desmine, M-cadhérine et c-met, montrant clairement une empreinte myogénique. Contrairement aux cellules canines, les cellules hMuStem n'expriment pas Pax7 ce qui pourrait être lié aux différences entre espèces ou à la différence d'âge (2 à 3 mois contre 15 à 51 ans) et de muscle considéré (groupe de muscles locomoteurs contre muscle paravertébral ou locomoteur). Nous avons également pu montrer que la population hMuStem n'exprime pas les marqueurs hématopoïétiques et est définie par une négativité pour les marqueurs Lin⁻ (CD4, CD8, CD19, CD33 et CD38) et endothéliaux. Elles sont uniformément négatives pour les marqueurs CD133, CD338 et CD15, classiquement utilisés pour qualifier respectivement les cellules AC133, cellules SP et cellules myo-adipogéniques (Benchaouir *et al.*, 2007; Frank *et al.*, 2006; Pisani *et al.*, 2010). De façon intéressante, le phénotypage de la population hMuStem a révélé une positivité de l'ensemble des cellules pour les marqueurs mésenchymateux CD29, CD44, CD73, CD90, CD105. Il est cependant à noter que ces marqueurs initialement définis comme spécifiques de la lignée mésenchymateuse sont à présent décrits comme relativement ubiquitaires. Ils sont en effet retrouvés dans un grand nombre de populations de cellules souches adultes parmi lesquelles les mésoangioblastes et les MDSC mais aussi dans les SC (Tedesco *et al.*, 2012; Danisovic *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2015), laissant suggérer une origine ancestrale commune entre ces populations. Pour la première fois, nous montrons par une analyse de multimarquages au FACS que la population MuStem peut se diviser en trois sous-populations : (i) une population majoritaire de cellules CD56⁺ qui présentent une expression variable du marqueur CD140b et une négativité pour le CD146, (ii) une population de cellules CD56^{hi} représentant 6 à 17% des cellules hMuStem et qui peut être divisée en fractions CD140b⁻ et CD140b⁺, toutes présentant une expression pour le CD146, (iii) une population péricytaire conventionnelle CD56⁻/CD140b⁺/CD146⁺/ALP⁺. Nous appuyons donc le fait que la population hMuStem est clairement composée de cellules périvasculaires/mésenchymateuses qui présentent un engagement plus ou moins prononcé dans le programme myogénique. Il est important de noter que les conditions

d'isolement et d'amplification des cellules souches adultes impactent de façon majeure leur phénotype. Ceci a été démontré pour les cellules AC133 (Pozzobon *et al.*, 2009) qui perdent rapidement l'expression du CD133 et également les MDSC (Jankowski *et al.*, 2001) pour lesquelles les variations de durées de preplating utilisées à l'isolement rendent délicat la comparaison de leur phénotype entre les différentes équipes de recherche (Gharaibeh *et al.*, 2008; Chirieleison *et al.*, 2012).

Les cellules hMuStem présentent une capacité de différenciation myogénique spontanée lorsqu'on les place dans des conditions d'appauvrissement sérique, confirmant l'engagement dans la lignée myogénique de cette population. Cette capacité est également partagée par les CSM du tissu adipeux ainsi que par les MDSC (Westerman *et al.*, 2010) tandis que les cellules AC133 présentent, elles, une capacité de différenciation myogénique moins marquée (Yin *et al.*, 1997). De façon majeure, nous avons défini une oligopotence pour les cellules hMuStem qui sont capables de s'engager dans les lignées adipogénique et ostéogénique. En revanche, malgré une formation de structures "capillaires-like" en milieu 3D, elles ne parviennent pas à s'engager dans la lignée endothéliale et restent négatives pour le CD31. A titre de comparaison, les CSM et mésoangioblastes partagent une différenciation adipo- et ostéogénique avec les cellules hMuStem et peuvent également s'engager dans la lignée chondrogénique (Prockop, 1997; Tagliafico, 2004; Morosetti *et al.*, 2006). Il sera intéressant de vérifier la capacité des cellules hMuStem à s'engager dans cette lignée, procédure d'ores et déjà en cours dans le laboratoire.

II. Mécanismes d'action des cellules MuStem

Un des résultats majeurs acquis par le laboratoire ces dernières années concerne la remarquable stabilisation clinique et tissulaire des chiens transplantés avec des cellules MuStem allogéniques (Rouger *et al.*, 2011). Cette amélioration du phénotype dystrophique ne s'accompagne cependant que d'une faible restauration de la dystrophine, n'expliquant pas cet effet observé et entrant en contradiction avec le dogme établi selon lequel l'amélioration clinique ne peut s'obtenir qu'en restaurant un niveau suffisant de dystrophine (Jankowski *et al.*, 2002a). Je me suis donc attachée à comprendre les mécanismes d'action des cellules MuStem afin de documenter les voies pouvant être impactées par leur transplantation. Comme nous l'avons exposé dans le précédent paragraphe, nous avons défini la population MuStem comme une population

clairement engagée dans le programme myogénique avec une filiation mésenchymateuse/périvasculaire. Ces deux facettes peuvent suggérer deux types de voies impliquées :

- un effet sur la régénération tissulaire, avec une fusion éventuelle des cellules MuStem avec les fibres endogènes ou encore une participation au contingent des cellules de réserve, comme cela a été démontré pour les myoblastes, les MDSC et les péricytes (Huard *et al.*, 1994; Dellavalle *et al.*, 2011; Chirieleison *et al.*, 2012).
- une action sur l'inflammation et l'immunorégulation, de part leur origine mésenchymateuse, les CSM ayant montré des capacités d'immunomodulation qui pourraient être bénéfiques dans le cadre de la DMD, pathologie à composante inflammatoire (Vieira *et al.*, 2008b).

1. Impact sur la régénération musculaire

Mes travaux de thèse ont permis de démontrer une participation des cellules hMuStem à la régénération musculaire trois semaines après injection intramusculaire dans le muscle *Tibialis anterior* cryolésé de souris immunodéficiente Rag2^{-/-} IL2rb^{-/-}. En premier lieu, une capacité d'intégration au sein du tissu musculaire a été établie, au même titre que les péricytes ou les MDSC (Dellavalle *et al.*, 2011; Chirieleison *et al.*, 2012). La distribution des cellules injectées a permis de déterminer la présence de noyaux en position cytoplasmique, montrant une capacité de fusion des cellules hMuStem avec les fibres endogènes murines selon une intensité variable en fonction des lots. La capacité de participation à la régénération musculaire est également confirmée par la détection des transcrits MyoD, myogénine ainsi que Myf5 et M-cadhérine dans les tissus musculaires murins injectés. Ces résultats sont d'autant plus forts que nous sommes dans un contexte de greffe xénogénique qui pourrait limiter les phénomènes de fusion des cellules hMuStem avec les fibres endogènes. De plus, la présence de ces noyaux humains cytoplasmiques s'accompagne d'une expression des protéines humaines que sont la spectrine et dans une moindre mesure la dystrophine, montrant la fonctionnalité des noyaux fusionnés. Cette restauration modérée de dystrophine est également à mettre en parallèle avec le statut du modèle animal considéré qui ne présente pas de dystrophie et produit donc sa propre dystrophine endogène. Le niveau de dystrophine relativement faible observé est donc à mettre directement en corrélation avec les conditions expérimentales dans lesquelles nous sommes. On peut cependant noter que dans la littérature de plus en plus d'études commencent à démontrer qu'une

amélioration clinique et tissulaire est possible sans pour autant restaurer le niveau de dystrophine, que ce soit par thérapie cellulaire (Kerkis *et al.*, 2008; Tedesco *et al.*, 2011) ou moléculaire (Denti *et al.*, 2008; Cacchiarelli *et al.*, 2010).

De façon surprenante, nous avons montré que les cellules hMuStem ne sont retrouvées que rarement (moins de 5%) dans la loge satellitaire comme cela a été démontré pour les cellules AC133⁺ avec 6% (Torrente *et al.*, 2004). Ceci contraste d'une part avec les données obtenues chez le chien où les cellules canines colonisent la niche satellitaire à hauteur de 17% des cellules injectées (Rouger *et al.*, 2011) et d'autre part avec les données bibliographiques concernant les cellules PICs (Mitchell *et al.*, 2010) et les cellules SP (Gussoni *et al.*, 1999). Cependant, il est à noter que ces études ont été faites dans un contexte allogénique pouvant favoriser le positionnement des cellules en loge satellitaire, contrairement à la greffe xénogénique. Enfin, nous avons déterminé que les cellules hMuStem en position interstitielle n'expriment pas le marqueur endothélial CD31, ce qui les distingue des cellules AC133⁺ (Benchaouir *et al.*, 2007). Il pourrait s'agir de cellules interstitielles de soutien peu différenciées dans le programme myogénique et ne fusionnant pas avec les fibres endogènes mais susceptibles de répondre à une demande de régénération ultérieure.

Deux études réalisées par le groupe de Jennifer Morgan ont montré successivement l'efficacité de l'administration locale de péricytes et de cellules AC133⁺ humains respectivement dans les modèles murins *mdx* nu/nu et *Rag2*^{-/-} γ chain^{-/-}/C5 cryolésé avec une fusion avec les fibres endogènes et une expression de protéines structurales humaines (Meng *et al.*, 2011b, 2014). Néanmoins, ces études ont également démontré une absence d'efficacité de ces deux types cellulaires après administration systémique, les auteurs ne détectant aucune cellule humaine après l'injection. Ces résultats sont en opposition avec ceux préalablement par Dellavalle *et al.* (2007) et Benchaouir *et al.* (2007). Ces études ayant été réalisées chez la souris *mdx/scid*, il ne peut être exclu que la différence de comportement observée suite à l'administration systémique puisse être liée au modèle animal utilisé. Il sera donc primordial en considérant un possible impact négatif du modèle animal considéré de confirmer la capacité d'intégration au tissu musculaire et de participation à la régénération musculaire des cellules hMuStem à partir d'un abord systémique afin de positionner la population humaine comme un candidat à la thérapie de la DMD, cette voie d'abord étant la seule capable de toucher

l'ensemble de la musculature. Pour renseigner au mieux sur le comportement de la population MuStem à partir d'un abord systémique, il sera également nécessaire de pouvoir générer des données de biodistribution de cet agent. Il sera cependant requis d'être vigilant sur le fait que les modèles de transplantation xénogénique peuvent être limitants pour ce type d'étude en raison de non-interaction et/ou d'affinité limitées entre les molécules impliquées dans les processus de migration qui sont liées strictement aux barrières d'espèces. Fort de ce constat, les futurs travaux devront être réalisés à l'aide de nouveaux modèles intégratifs pour consolider les résultats obtenus avec l'agent définitif et s'affranchir du contexte xénogénique. On peut en décrire deux : i) un modèle qui porte sur la pathologie avec la greffe autologue de cellules Mustem canines produites en conditions compatibles avec le grade clinique chez le chien GRMD et ii) un modèle qui s'attache à la proximité de l'espèce cible avec l'injection de la population MuStem autologue chez le primate non humain avec la limite qu'il s'agirait ici d'un animal non dystrophique ce qui peut aussi influencer la capacité de dissémination des cellules.

Il est intéressant de noter que les MDSC, comme les CSM ou les péricytes présentent une capacité de différenciation en cardiomyocytes. En effet, les CSM et les MDSC traitées avec du 5-azacytidine *in vitro* se différencient en cellules cardiaques (Tomita *et al.*, 1999; Winitzky *et al.*, 2005). Différentes études *in vivo* ont démontrées un impact de ces différents candidats cellulaires sur la fonction cardiaque. Après transplantation de péricytes humains dans le coeur infarci de souris, une amélioration de la fonction cardiaque avec une réduction de la zone nécrosée, une augmentation de la vascularisation du myocarde, une diminution de la dilatation cardiaque ainsi qu'une meilleure contraction du ventricule gauche ont été notées (Katare *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2013). La transplantation de CSM allogéniques dans un modèle porcin d'ischémie cardiaque s'accompagne d'une prolifération des cellules cardiaques endogènes vingt fois supérieure aux animaux non injectés (Hatzistergos *et al.*, 2010). Enfin, l'administration locale de MDSC murines chez la souris soumise à une ligature coronarienne conduit à leur fusion avec les cardiomyocytes endogènes, une augmentation de la vascularisation du myocarde ainsi que de la capacité contractile du ventricule gauche (Oshima *et al.*, 2005; Sekiya *et al.*, 2013). Ces effets bénéfiques passent principalement par des actions paracrines des cellules injectées qui i) augmentent la prolifération des cardiomyocytes

et la différenciation des cellules souches résidentes endogènes, ii) jouent un rôle cytoprotecteur, iii) augmentent la néovascularisation et iv) limitent l'inflammation et les processus pro-fibrotiques (Kinnaird *et al.*, 2004; Gnecci *et al.*, 2006; Amsalem *et al.*, 2007; Przybyt *et al.*, 2013). Dans le contexte de la DMD, une cardiomyopathie sévère est décrite chez le patient (Connuck *et al.*, 2008). Il serait donc pertinent d'évaluer l'impact éventuel de la population MuStem sur la fonction cardiaque. En cas de résultats positifs, ces études permettraient d'élargir le domaine d'application de la population MuStem, par exemple dans les cardiomyopathies non liées à la DMD ainsi que dans l'infarctus du myocarde, enjeux majeurs de santé public.

2. Impact sur la régulation du système immunitaire

Parmi les modalités d'action envisagées pour expliquer l'effet des cellules MuStem, nous avons émis l'hypothèse d'une interaction entre ces cellules et le système immunitaire comme cela a été décrit notamment pour les CSM (Singer and Caplan, 2011). Il convient de distinguer deux effets potentiels : (i) l'impact des cellules souches sur l'inflammation, composante importante de la physiopathologie de la DMD; (ii) l'immunomodulation au sens strict, associée à l'induction de tolérance et ayant un impact direct sur la prise de greffe cellulaire.

Concernant l'inflammation, la mise en place et la progression de la DMD sont associées à la surexpression de gènes inflammatoires, en particulier un fort taux de la cytokine pro-inflammatoire TNF α à la fois chez le patient (Comim *et al.*, 2015) et la souris *mdx* (Barros Maranhao *et al.*, 2015). La diminution de l'inflammation tissulaire pourrait donc s'accompagner de bénéfices cliniques pour le patient, ce qui est déjà utilisé aujourd'hui dans le cadre de traitements pharmacologiques anti-inflammatoires (Goemans and Buyse, 2014).

Le phénotype des cellules hMuStem que je me suis attaché à renseigner pourrait impacter directement le niveau d'inflammation du tissu dans lequel elles seraient administrées. En effet, j'ai pu montrer une importante sécrétion du HGF, d'IL6, IL8, IL35 et de PGE2, tous décrits comme inhibant l'inflammation. Les cellules hMuStem présentent des capacités sécrétoires relativement comparables à celles observées pour les CSM (Li *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2016). De façon intéressante, comme cela a été décrit pour les CSM et mésoangioblastes, les cellules hMuStem sont sensibles à la stimulation au TNF α avec une sécrétion augmentée d'IL6, IL8 et PGE2. Cette sensibilité est d'autant plus importante que ces cellules vont être transplantées dans un environnement

inflammatoire qui va donc directement agir sur leur capacité sécrétoire. Les myoblastes possèdent la capacité à sécréter l'IL6 de façon constitutive et cette sécrétion est affectée par le TNF α et l'IFN γ . L'interprétation de la sécrétion d'IL6 et d'IL8 est délicate dans la mesure où si l'IL6 agit comme un régulateur de la prolifération des cellules satellites (Toth *et al.*, 2011) et est décrit comme acteur de l'effet immunosuppresseur des CSM (Djouad *et al.*, 2005; Najjar *et al.*, 2009), l'IL6 et l'IL8 sont aussi classiquement décrites comme pro-inflammatoires (Djouad *et al.*, 2007). La sécrétion de myokines par les cellules hMuStem pourrait ainsi être liée à leur origine musculaire. De façon intéressante, et contrairement aux CSM, les cellules hMuStem ne secrètent pas d'IL10, molécule anti-inflammatoire.

En ce qui concerne le phénomène d'immunomodulation, il est clair que l'agent cellulaire administré aux patients DMD rencontrera un environnement inflammatoire hostile à sa survie. La présence de cellules immunitaires de l'hôte dans des muscles lésés en régénération affecte directement la capacité thérapeutique des cellules injectées (Wynn, 2008). C'est dans ce contexte que l'immunomodulation joue un rôle majeur dans l'efficacité thérapeutique des cellules souches adultes en augmentant leur prise de greffe.

Nous avons montré pour la première fois que la population MuStem est faiblement immunogène *in vitro* avec une faible prolifération des lymphocytes allogéniques co-cultivés avec les cellules hMuStem. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus avec les mésoangioblastes (English *et al.*, 2013). Concernant les CSM, cette capacité est encore controversée. Si la majorité des études réalisées montre que la co-culture directe entre CSM et PBMC aboutit à une faible prolifération de ces derniers (Le Blanc *et al.*, 2003; Tse *et al.*, 2003), certaines ont démontré le maintien d'une prolifération des PBMC allogéniques. Néanmoins, ces études ont été réalisées en retirant les CSM au bout des 7 jours et en poursuivant la culture des PBMC seuls avant d'évaluer leur prolifération (Crop *et al.*, 2010). Cette faible immunogénicité des cellules MuStem ne peut pas être corrélée à un faible niveau d'expression du HLA-I, celui-ci étant exprimé par 100% des cellules. On peut émettre l'hypothèse que l'importante sécrétion de facteurs immunomodulateurs par les cellules hMuStem soit suffisante pour éviter une prolifération lymphocytaire. Il est classiquement admis que l'activation des cellules T est initiée par l'activation de récepteurs. Cependant, certains auteurs ont avancé l'idée selon laquelle cette activation pouvait être antigène indépendant, ceci étant démontré par la

prolifération des lymphocytes mis en contact avec des CSM allogéniques comme autologues, y compris dans des cultures en chambres séparées (Crop *et al.*, 2010).

Une capacité à inhiber une activation préalable des lymphocytes, que ce soit à l'aide d'un mitogène, la ConA, ou d'une réaction lymphocytaire mixte (MLR) de façon dose-dépendante a également été établie pour les cellules hMuStem avec un effet marqué à 1:1 et jusqu'à 1:4 pour la stimulation à la ConA. Ce type d'effet dose est également documenté pour les CSM (Le Blanc *et al.*, 2003; Tse *et al.*, 2003). L'équipe de Yang a montré un effet inhibiteur à un rapport de 1:1 jusqu'à 1:50 (CSM:PBMC) en stimulation CD3/CD28 (Han *et al.*, 2011) tandis que Tsé et ses collègues démontrent un effet au rapport 1:6 (Tse *et al.*, 2003). Concernant les mésoangioblastes, une activation CD3/CD28 peut être inhibée à des rapports allant de 1:1 à 4:1 (Mésoangioblastes:PBMC) (English *et al.*, 2013). Cependant, ce type d'étude réalisée par incorporation de thymidine tritiée ne permet pas de déterminer si la diminution d'incorporation est liée à une réelle diminution de la prolifération ou plutôt à une diminution de la survie des cellules T. Il sera donc intéressant de confirmer ces résultats par des approches d'évaluation de prolifération en FACS avec un marquage des lymphocytes en CFSE.

De façon à renseigner les modalités d'action des cellules hMuStem pouvant expliquer l'inhibition de la prolifération, j'ai déterminé que cette population est négative pour les molécules du HLA-DR, DP, DQ, E et G en condition native tandis qu'après stimulation à l'IFN γ , une détection du HLA-DR, DP et G est observée. Ces résultats contrastent avec ceux obtenus pour les CSM et les mésoangioblastes qui sont négatives pour le HLA-II, même après stimulation (Vieira *et al.*, 2012; English *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2015) et pour les CSM qui expriment constitutivement le HLA-G non conventionnel (Selmani *et al.*, 2009; Montespan *et al.*, 2014). Enfin, les cellules MuStem, tout comme les CSM et mésoangioblastes, n'expriment pas les molécules de costimulation lymphocytaire CD80 et CD86. L'ensemble de ces données suggère que, même si les cellules MuStem présentent la machinerie nécessaire à la présentation d'antigènes, elles n'induisent pas de prolifération lymphocytaire allogénique *in vitro*.

Concernant les molécules secrétées,IDO est un enzyme produite par les cellules hMuStem et dont on détecte le métabolite, la L-kynurénine, de façon très importante dans le surnageant des cellules MuStem, à $252 \pm 91,7$ mM, en comparaison des 20 μ M obtenus pour les CSM (Ryan *et al.*, 2007). Enfin, iNOS est exprimée de façon constitutive par les cellules hMuStem et les nitrites sont présents dans le surnageant à hauteur de 6.9

± 1.2 µM tandis que les CSM secrètent aux alentours de 20 µM de nitrites (Bouffi *et al.*, 2010).

Je me suis intéressée à l'interaction entre les cellules hMuStem et l'immunité innée. Comme décrit pour les CSM, la population MuStem est capable d'inhiber partiellement la lyse médiée par le complément et j'ai démontré que cet effet est lié à la sécrétion de facteur H (66 ng/mL/million de cellules). Assez peu d'études se sont intéressées au contact entre les cellules souches et le complément. L'équipe de Tu a démontré une sécrétion d'environ 300 ng/mL de facteur H et confirmé que la lyse médiée par le complément est inhibée de 40% par le surnageant de CSM. La déplétion en facteur H du surnageant de CSM restaure la lyse, démontrant l'implication de cette molécule dans l'effet des CSM (Tu *et al.*, 2010). L'inhibition de la lyse par les cellules hMuStem est plus modeste, de l'ordre de 28% de diminution de l'hémolyse, pouvant être lié au niveau de sécrétion en facteur H plus faible.

L'ensemble de ce travail a ainsi permis de mettre en évidence des modalités d'action pouvant expliquer l'effet des cellules MuStem en démontrant des propriétés immunomodulatrices *in vitro*. Il est largement décrit dans la littérature un effet pléiotropique des CSM sur la sphère immunitaire tant au niveau des modalités d'action que des partenaires. Ainsi, les CSM sont capables d'induire un changement phénotypique des macrophages pro-inflammatoires vers un profil régulateur anti-inflammatoire (Kim and Hematti, 2009; Abumaree *et al.*, 2013). Les macrophages régulateurs ainsi induit ont un rôle pivot dans la mesure où ils peuvent à leur tour agir en tant que médiateurs paracrines sur d'autres cellules de l'immunité telles que les populations T régulatrices (Eggenhofer and Hoogduijn, 2012; Melief *et al.*, 2013). Les macrophages jouant un rôle central dans i) les mécanismes d'inflammation, ii) le maintien de l'homéostasie cellulaire au sein des tissus mais également iii) la réparation et le remodelage tissulaire (Murray and Wynn, 2011), il serait intéressant d'étudier les éventuelles interactions entre ces cellules et la population MuStem. De façon intéressante, une interaction entre les CSM et les cellules dendritiques (DC) a également été démontrée. La sécrétion d'IL6 par les CSM induit un phénotype tolérogénique des DC avec une diminution de l'expression des molécules de co-stimulation ainsi que de la capacité à stimuler la prolifération et la migration des lymphocytes T (Deng *et al.*, 2014; Consentius *et al.*, 2015). De plus, différentes équipes ont démontré que la

transplantation de CSM associée à la greffe de peau chez la souris permettait une diminution du taux de cytokines pro-inflammatoires, de la réponse des lymphocytes à la stimulation et une survie plus importante du greffon. Une capacité des CSM à induire une tolérance périphérique a été évoquée (Larocca *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2014). L'étude de l'interaction de la population MuStem avec les DC serait également d'intérêt majeur pour renseigner la capacité de l'agent cellulaire à induire une tolérance à sa propre greffe, ce qui permettrait de potentialiser son effet thérapeutique. Nombre de ces effets immunomodulateurs passent par la sécrétion de molécules. La population MuStem présentant une forte capacité sécrétrice, il pourrait être intéressant d'explorer le contenu des exosomes. Finalement, l'utilisation de souris humanisées, c'est-à-dire irradiées puis injectées avec des cellules souches hématopoïétiques afin de générer un système immunitaire humain (Huntington and Di Santo, 2008; Jacobson *et al.*, 2010; van Lent *et al.*, 2010), pourrait permettre d'étudier l'interaction entre la population MuStem et l'ensemble des cellules du système immunitaire et d'autre part de déterminer si une tolérance est mise en place ou non à l'échelle de l'organisme suite à l'injection de ces cellules.

Au vu des résultats collectivement obtenus, nous posons l'hypothèse d'un potentiel effet bivalent de la population hMuStem, reflet de sa nature avec une proportion de cellules agissant directement sur la régénération musculaire, à travers une fusion avec les fibres endogènes et une seconde fraction cellulaire localisée dans l'interstitium et qui présenterait un effet paracrine immunomodulateur.

III. Contexte d'administration

L'administration systémique de cellules MuStem allogéniques chez le chien GRMD soumis à une immunosuppression (IS) continue par injection de cyclosporine (CsA) et de mycophénolate mofetil (MMF) s'accompagne d'une stabilisation clinique des chiens transplantés ainsi qu'une régénération musculaire au long terme. Cependant, la CsA, si elle bloque la calcineurine et ainsi l'activation lymphocytaire, génère également des effets secondaires importants chez les patients traités au long terme (Sakuma *et al.*, 2005). Dans ce contexte, nous avons évalué la pertinence d'un traitement IS restreint à la période d'injection des cellules.

Nous montrons un bénéfice clinique et tissulaire similaire à celui observé précédemment chez les chiens transplantés placés sous IS transitoire. De façon importante, une absence d'impact bénéfique ainsi qu'une détection de réponse cellulaire anti-MuStem sont rapportées après transplantation sans IS, ce qui confirme la nécessité d'un traitement IS. Comme précédemment exposé, le tissu DMD est un environnement fortement inflammatoire (Guérette *et al.*, 1997; Villalta *et al.*, 2011) le rendant défavorable à la prise de greffe cellulaire, ce qui peut expliquer l'absence de bénéfice observé sans IS. Ces résultats présentant une réponse immunitaire contre les cellules du donneur sont en accord avec ceux obtenus après l'administration de CSM CD271⁺ canines dans le TA de chiens CXMD_J en absence d'IS. En effet, huit semaines après injection, une infiltration par des cellules CD8 et CD11 est observée (Nitahara-Kasahara *et al.*, 2012). Une absence de détection des cellules humaines, d'amélioration histologique ainsi que de capacité motrice ont été rapportés après huit injections successives de péricytes humains par voie intra-péritonéale chez la souris *Utrn^{tm1Ked} Dmd^{mdx} /J* (DKO) sans IS (Valadares *et al.*, 2014). A l'opposé, d'autres études ont démontré une capacité de CSM du tissu adipeux xénogéniques à s'intégrer dans le tissu musculaire sans l'utilisation de traitement IS après administrations par voie intraveineuse ou intramusculaire chez la souris *SJL* (Vieira *et al.*, 2008b) ou *mdx* (Rodriguez *et al.*, 2005). Des fibres chimériques humaines et murines sont détectées avec la ré-expression des protéines déficientes et une amélioration de la force musculaire. Cependant, il est à noter que ces résultats ont été obtenus dans deux modèles *SJL* et *mdx* qui présentent un phénotype dystrophique modéré, comparé aux modèles canin CXMD_J ou murin DKO, précédemment évoqués.

Ces résultats peuvent être mis en regard de ceux obtenus *in vitro* sur la population hMuStem et démontrant des propriétés immunomodulatrices. Cependant, aucune étude n'a été réalisée sur la population canine, ceci étant liée à la difficulté technique d'obtenir des anticorps permettant un phénotypage complet du candidat canin. Les résultats obtenus *in vivo* à partir de la population canine suggèrent qu'une IS transitoire limitée à la période d'injection permettrait d'inhiber la genèse d'une réaction immune dirigée contre les cellules transplantées et de permettre ainsi la greffe des cellules MuStem dans le tissu musculaire où elles peuvent ensuite sécréter des facteurs solubles et établir des contacts directs avec les cellules immunitaires afin de maintenir leur propre greffe et de participer à la régénération musculaire.

Ces résultats sont majeurs dans la définition des conditions d'administration des cellules MuStem en vue d'un futur essai clinique. Comme présenté dans l'introduction bibliographique, de nombreuses stratégies thérapeutiques sont proposées, notamment en ce qui concerne les traitements pharmacologiques. Ainsi, la prednisolone, de part son action anti-inflammatoire, a un effet bénéfique sur le patient DMD (Escolar *et al.*, 2011). Malgré la démonstration dans le présent travail de propriétés immunomodulatrices de la population MuStem, celles-ci pourraient s'avérer insuffisantes dans un contexte tissulaire aussi défavorable que le muscle dystrophique. Il serait donc pertinent d'agir en amont sur l'environnement tissulaire dans lequel la population MuStem sera injectée en administrant ce traitement anti-inflammatoire en combinaison de celui de thérapie cellulaire. Les donneurs de NO que sont la L-arginine combinée à la metformine permettent de diminuer le stress oxydatif tissulaire (Hafner *et al.*, 2016) tandis que le tadalafil diminue l'ischémie et rétablit le flux sanguin (Martin *et al.*, 2012; Nelson *et al.*, 2014). Considérant l'impact du stress oxydatif et de l'oxygénation tissulaire liée au niveau de vascularisation sur le devenir cellulaire, il serait également intéressant de combiner les traitements anti-oxydants avec la transplantation de la population MuStem. Enfin, la myostatine présente au sein du tissu musculaire, a un impact sur la prolifération et la différenciation des cellules résidentes. Il a en effet été montré que l'inhibition de la myostatine provoque une augmentation de l'expression de Myf5 et de la myogénine dans les myoblastes humains (Kemaladewi *et al.*, 2011). Ainsi, il sera peut-être opportun d'envisager l'utilisation d'anticorps neutralisants cette molécule après injection de la population MuStem afin d'optimiser l'efficacité du traitement.

L'ensemble des résultats obtenus ici apporte une meilleure compréhension de la nature de la population hMuStem, de ses modalités d'action ainsi qu'une meilleure connaissance du contexte de transplantation qui sera nécessaire de mettre en place pour prendre en considération la composante allogénique. Ce travail permet d'ouvrir sur de nombreuses perspectives parmi lesquelles l'impact fonctionnel et tissulaire d'une administration systémique de la population MuStem humaine, la mise en place d'études de biodistribution ainsi que l'obtention des données de sécurité devant encore être réalisées dans le but de proposer un futur essai clinique.

Annexe

Science sans conscience n'est que ruine de l'âme.

Rabelais

Chapitre 1. Impact de l'apport nutritif sur le phénotype et le comportement *in vitro* des CSM

I. Positionnement

Mes connaissances fondamentales sur l'immunomodulation des cellules souches associées à mes compétences techniques pour l'évaluation de la prolifération lymphocytaire par incorporation de thymidine tritiée m'ont permises d'être sollicitée par un porteur de projet avec lequel mon encadrant Karl Rouger collabore et ce afin de compléter son étude concernant l'impact de l'apport nutritif sur le phénotype et le comportement des CSM *in vitro*. Dans ce travail, j'ai eu en charge la mise en place de cocultures entre des CSM et des lymphocytes allogéniques dans le but de déterminer si les différents types d'apport nutritif pouvaient impacter la capacité d'immunomodulation des CSM.

II. Matériel et méthodes

Les cellules T CD3⁺ sont obtenues à partir d'échantillons sanguins par élutriation en force centrifuge et par tri magnétique négatif en utilisant un kit EasySep™ (>90% pureté, Stemcell Technologies, Vancouver, Canada) sur la plate-forme de développement et de transfert à la clinique (CHU, CICBT0503, Nantes). Après amplification des CSM humaines issues de moelle osseuse (BM-hMSC) dans les différents milieux de culture, leurs capacités à inhiber la prolifération des cellules T stimulées à la concanavaleine A (ConA) ou avec des PBMC allogéniques irradiés (MLR) est évaluée. Les BM-hMSC sont dissociées et irradiées à 35 Gy pendant 10 minutes. Elles sont ensuite cocultivées en gamme selon différents rapports pendant 5 jours avec des cellules T activées à la ConA (10 µg/mL) ou avec des PBMC allogéniques irradiés en plaque 96 puits. Les cellules sont ensuite incubées une nuit en thymidine tritiée et récupérées sur filtre. La radioactivité est mesurée pour finalement calculer le pourcentage d'inhibition.

III. Résumé des résultats obtenus

Nous montrons que les CSM indépendamment du type de supplémentation (SVF, lysat plaquettaire inactivé ou non) utilisé dans le milieu de culture, présentent une capacité d'immunomodulation équivalente.

Ces résultats ont fait l'objet d'un article actuellement en révision dans PLoS One (numéro d'identification : PONE-D-16-17770)

IV. Article

Pathogen reduction through additive-free short-wave UV light irradiation retains the optimal efficacy of human platelet lysate for the expansion of human bone marrow mesenchymal stem cells

Sabrina VIAU^{1*}, Lucie CHABRAND¹, Sandy EAP¹, Judith LORANT^{2,3}, Karl ROUGER^{2,3}, Francis GOUDALIEZ⁴, Chryslain SUMIAN⁴ and Bruno DELORME¹

1 Biotherapy Division, Macopharma, Mouvaux, France;

2 INRA, UMR 703 PAnTher, Nantes, France;

3 LUNAM Université, Oniris, École nationale vétérinaire, agro-alimentaire et de l'alimentation Nantes-Atlantique, Nantes, France;

4 Transfusion Division, Macopharma, Tourcoing, France

* E-mail: sabrina.viau@macopharma.com

Short title:

Preservation of optimal quality and efficacy in UV-C pathogen-reduced human platelet lysate.

Abstract:

Background: We recently developed and characterized a standardized and clinical grade human Platelet Lysate (hPL) that constitutes an advantageous substitute for fetal bovine serum (FBS) for human mesenchymal stem cell (hMSC) expansion required in cell therapy procedures, avoiding xenogenic risks (virological and immunological) and ethical issues. Because of the progressive use of pathogen-reduced (PR) labile blood components, and the requirement of ensuring the viral safety of raw materials for cell therapy products, we evaluated the impact of the novel procedure known as THERAFLEX UV-Platelets for pathogen reduction on hPL quality (growth factors content) and efficacy (as a medium supplement for hMSC expansion). This technology is based on short-wave ultraviolet light (UV-C) that induces non-reversible damages in DNA and RNA of pathogens while

preserving protein structures and functions, and has the main advantage of not needing the addition of any photosensitizing additives (that might secondarily interfere with hMSCs).

Methodology / Principal Findings: We applied the THERAFLEX UV-Platelets procedure on fresh platelet concentrates (PCs) suspended in platelet additive solution and prepared hPL from these treated PCs. We compared the quality and efficacy of PR-hPL with the corresponding non-PR ones. We found no impact on the content of five cytokines tested (EGF, bFGF, PDGF-AB, VEGF and IGF-1) but a significant decrease in TGF- β 1 (-21%, n=11, $p<0.01$). We performed large-scale culture of hMSCs from bone marrow (BM) during three passages and showed that hPL or PR-hPL at 8% triggered comparable BM-hMSC proliferation as FBS at 10% plus bFGF. Moreover, after proliferation of hMSCs in an hPL- or PR-hPL-containing medium, their profile of membrane marker expression, their clonogenic potential and immunosuppressive properties were maintained, in comparison with BM-hMSCs cultured under FBS conditions. The potential to differentiate towards the adipogenic and osteogenic lineages of hMSCs cultured in parallel in the three conditions also remained identical.

Conclusion / Significance: We demonstrated the feasibility of using UV-C-treated platelets to subsequently obtain pathogen-reduced hPL, while preserving its optimal quality and efficacy for hMSC expansion in cell therapy applications.

Funding:

Judith LORANT received financial support from French government (National Research Agency), Nantes Métropole and the Région Pays de la Loire.

Competing interests:

Sabrina VIAU, Lucie CHABRAND, Sandy EAP, Francis GOUDALIEZ, Chrystlain SUMIAN and Bruno DELORME are employees of Macopharma. Judith LORANT and Karl ROUGER have no competing financial interest to declare.

Introduction:

Human bone marrow-mesenchymal stem cells (BM-hMSCs) are adult multipotent stem cells with a potential for multi-lineage differentiation, a hematopoiesis-supportive capacity [1] and migration / homing properties [2]. In addition to these characteristics, their immunosuppressive properties [3, 4] and their profile of secretion of trophic factors [5] lead to an increase in hMSC uses in cell therapy clinical trials, mainly for immunomodulation and regenerative medicine purposes [6, 7].

In this context, defining proper conditions for necessary *ex vivo* hMSC expansion is critical. In particular, the immunological risk induced by the use of fetal bovine serum (FBS) as a medium supplement for cell culture in cell therapy procedures needs to be addressed [8]. Studies showed that FBS proteins may be internalized by hMSCs during culture (up to 7-30mg/cell), showing perinuclear localization [9]. Antibodies against FBS proteins may be detected in patient serum following cell infusion [10]. Human platelet lysate (hPL), obtained from the lysis of human platelets, is particularly rich in growth factors and nutritive elements and may constitute a non-xenogenic substitute for FBS [11, 12]. Indeed, the use of hPL and its derivatives in hMSC culture has been documented since 2005 [13] and 2003 [14], respectively, and hPL is commonly recognized as a way to avoid xenogenic risks (viruses and immunological) linked to FBS [15].

Although there are few reported cases of platelet transfusion-transmitted bacterial infections (estimated at 0.001% in the USA [16] and between 0.001% and 0.004% in Europe [17, 18]), the bacterial contamination of platelet concentrates (PCs) (estimated < 0.1% in Germany [19]) currently remains an issue in transfusions [20], mainly due to the storage of PCs at ambient temperature. The risk of bacterial contamination of hPL derived from PCs can be eliminated *via* a final step of aseptic filtration (pore size of 0.22 μm) in the production process. However, the issue of potential human virus contamination still remains, even if blood donors are screened and each blood collection is tested according to country specific regulations. The risk of viral transmission in transfusion appears to be very low for “well-known” viruses, such as HIV-1 and -2 (1 per 2.3 million blood product donations in USA) or hepatitis C (1 per 1.8 million) [15, 21] but cannot be completely excluded. Also of concern are (re)emerging viruses and variants of existing viruses. Furthermore, the species barrier is bypassed when FBS is replaced by hPL for human cell culture. Consequently, a viral inactivation step of hPL may rapidly become a mandatory regulatory requirement when *in vitro* expanded cell therapy products are used for clinical applications [22].

THERAFLEX UV-Platelets is a pathogen reduction technology for PCs based on ultraviolet (UV) light absorption by nucleic acids (DNA and RNA) [23]. This in turn causes the formation of cyclobutane pyrimidine and pyrimidine pyrimidone dimers, which block the elongation of nucleic acid transcripts [24]. Under orbital agitation, PCs are subjected to double-sided UV-C irradiation at a wavelength (254 nm) leading, on one side, to non-reversible damages in DNA and RNA of viruses, bacteria and parasites while, on the other side, preserving protein structures and functions [25]. The efficacy of this additive-free technology has been reported on lipid-enveloped and non-enveloped viruses [26], and a phase I clinical trial has been completed, demonstrating the safety and tolerability of THERAFLEX UV-Platelets-treated autologous PCs in subjects [27].

In this study, we evaluated the impact of the THERAFLEX UV-Platelets procedure for pathogen reduction of PCs used to produce hPL. The quality (growth factors content) and efficacy (as a medium supplement for hMSC proliferation) were assessed, and we particularly investigated the efficiency of hPL prepared from UV-C pathogen-reduced PCs for BM-hMSC expansion, while preserving their differentiation potential and immunosuppressive properties.

Material & Methods:

Pathogen reduction of PCs using THERAFLEX UV-Platelets

Leucoreduced PCs, obtained from pools of five buffy coats each, suspended in SSP+ additive solution (Macopharma, Mouvaux, France) and prepared according to French transfusion practices were obtained from EFS Nord de France. PCs were subjected to UV-C treatment using dedicated illumination devices (kit XUV4005XU and Macotronic UV illumination machine, Macopharma), in accordance with the THERAFLEX UV-Platelets procedure. A standard illumination dose of 0.2 J/cm² was used under agitation of the bag, as recommended by the manufacturer. An aliquot of each PC was collected before illumination for non-irradiated control.

HPL and PR-hPL preparation

Treated and non-treated PCs were frozen at -80°C and thawed overnight at +4°C. Centrifugation was performed at 3,500 g for 30 min, with low break. The pellet composed of cell debris was discarded. Platelet lysates prepared from non-irradiated (hPL) and irradiated PCs (PR-hPL) were aliquoted and stored at -80°C. One hPL unit and one PR-hPL unit were prepared from one PC. Before use for hMSC culture, hPL and PR-hPL were thawed at +37°C,

and used individually (corresponding to five donors in each unit) or as batches of three units (corresponding to 15 donors in each batch).

Growth factor assay in hPL and PR-hPL

The contents of basic fibroblast growth factor (bFGF, #DFB50), vascular endothelial growth factor (VEGF, #DVE00), epidermal growth factor (EGF, #DEG00), platelet-derived growth factor-AB (PDGF-AB, #DHD00C), insulin-growth factor (IGF)-1 (#DG100) and transforming growth factor (TGF)-b1 (#DB100B) in PR-hPL and their respective hPL controls were measured by ELISA (Bio-techne, Minneapolis, USA), following manufacturer instructions. The absorbance was measured using an Infinite® M200 PRO spectrometer (Tecan, Männedorf, Switzerland), and the results were analyzed using Magellan™ data analysis software (Tecan).

BM-hMSC culture

BM-hMSCs were cultured as previously described [28]. Briefly, cells were seeded on a cell culture-treated surface (Corning, New York, USA) in the presence of Minimum Essential Medium (MEMa) manufactured under GMP conditions (Macopharma) and supplemented with either MSC-qualified FBS (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA) with 1 ng/mL bFGF (Eurobio, Montpellier, France) or hPL or PR-hPL. Heparin (Biochrom, VWR, Radnor, USA) at 2 IU/mL was added to hPL- and PR-hPL-containing media to avoid gelation of the medium. 100 U/mL penicillin G / 0.1 mg/mL streptomycin sulfate (Lonza, Basel, Switzerland) was added under all conditions, and the media were renewed twice a week. Cell cultures were maintained in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. All experiments were performed between P1 and P4.

BM-hMSC proliferation determination

For miniaturized cell proliferation experiments, cells were seeded at 3,000 cells/cm² in 96-well plates (Corning). BM-hMSCs were cultured for 10 days under the culture conditions described above, with the concentration of FBS, hPL or PR-hPL ranging from 2 to 15%. Cell proliferation was determined using the CellTiter-Glo luminescent kit (Promega Corporation, Madison, USA) in accordance with the manufacturer's instructions. The luminescence level was measured using an Infinite® M200 PRO spectrometer (Tecan) and analyzed using i-control™ software (Tecan).

For “large-scale” BM-hMSC proliferation, cells were seeded at 4,000 cells/cm² in 75 cm² flasks (Corning). Cells were cultured using the culture conditions described above, with FBS at 10% v/v + 1 ng/mL bFGF or with hPL or PR-hPL at 8% v/v. When the cell layer under hPL conditions reached confluency, the medium was discarded, the cell layer was washed twice with phosphate buffer saline (PBS, Macopharma) and dissociated with TrypLE™ (Gibco). Cells were centrifuged at 300 g for 5 min and diluted in 10 mL of the appropriate medium. Cell number was determined using a cell counter, and viability was assessed by Trypan Blue exclusion (ViCell XR, Beckman Coulter, Brea, USA).

Determination of BM-hMSC clonogenic potential

After proliferation of BM-hMSCs under the different culture conditions tested, the colony-forming unit-fibroblast (CFU-F) assay was performed as previously described [28]. After cell layer dissociation by TrypLE™ (see above), cells were seeded at 100 and 200 cells in 25 cm² flasks (Corning). The medium was renewed on days 3 and 7. After 12 days of culture, cell layer was washed twice with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde (PFA, Sigma-Aldrich, St Louis, USA) in PBS for 10 min and washed twice with PBS. Colonies were stained with May-Grünwald (RAL, VWR), washed twice with distilled water and counterstained with Giemsa (Merck, VWR) diluted 10 times in PBS. Giemsa was then removed, and colonies were finally washed twice with water. Individual colonies composed of at least 50 cells were counted. CFU-F frequency was calculated based on the respective input cell number as numbers of CFU-F / BM-hMSCs initially plated (in percentage).

BM-hMSC immunophenotype

After proliferation of BM-hMSCs under the different culture conditions tested, the expression of a panel of surface markers was assessed, following previously described protocols [28]. After cell layer dissociation by TrypLE™ (see above), BM-hMSCs were subjected to centrifugation at 350 g for 5 min. Cells were resuspended in cold PBS and then centrifuged at 350 g for 5 min. For each antigen tested, 200,000 cells resuspended in cold PBS were incubated with phycoerythrin (PE)-conjugated CD29 (#555443), CD34 (#345802), CD40 (#555589), CD45 (#555483), CD73 (#550257), CD80 (#PN IM1976U), CD86 (#PN IM2729U), CD90 (#555596), CD105 (#560839) or HLA-DR (#PN IM0464U) monoclonal antibody, at saturating concentration, for 30 min in the dark at +4°C. Appropriate PE-conjugated isotype-matched controls (mouse IgG1 #555749 and IgG2b #555743) were included. Antibodies and isotype controls were purchased from Becton-Dickinson (Durham,

USA; CD29, CD34, CD40, CD45, CD73, CD90, CD105, IgG1 and IgG2b) or Beckman Coulter (CD80, CD86 and HLA-DR). BM-hMSCs were then washed twice with PBS by centrifugation at 350 g for 5 min. Pellets of BM-hMSCs were finally resuspended in 200 μ L of CellFix (Becton-Dickinson) and processed immediately for flow cytometric analysis. Acquisitions were performed using an ACCURI™ C6 flow cytometer equipped with 488 nm argon laser (Becton-Dickinson). At least 10,000 events were recorded for each analysis.

Differentiation potential assay of BM-hMSCs

After proliferation of BM-hMSCs in the different culture conditions tested, their adipogenic and osteogenic differentiation capacity was assessed by seeding cells at 30,000 cells/cm² on 12-well plates (Corning). Previously described protocols [28] were followed. Adipogenic differentiation was induced using Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) low glucose (#31885, Gibco) supplemented with 10% FBS, 1 μ M dexamethasone (Sigma-Aldrich), 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (Sigma-Aldrich) and 60 μ M indomethacine (Sigma-Aldrich). Osteogenic differentiation was induced using DMEM high glucose (#41965, Gibco) supplemented with 10% FBS, 0.1 μ M dexamethasone, 25 μ g/mL L-ascorbic acid (Sigma-Aldrich) and 3 mM NaH₂PO₄ (Sigma-Aldrich). Antibiotics (see above) were added to the cell culture medium, and the medium was renewed twice a week.

After 14 days of culture, adipogenic differentiation was revealed using Oil Red O staining. Briefly, the cell layer was stained with 1.8 g/L Oil Red O (Sigma-Aldrich) for 30 min after fixation with 4% PFA (see above). Lipid droplets in the cytoplasm of the cells appeared to be stained in red.

After 21 days of culture, osteogenic differentiation was revealed using Alizarin Red S and Von Kossa stainings after fixation with 4% PFA (see above). Briefly, cell layer was stained with 2% Alizarin Red S at pH 4.3 (Sigma-Aldrich) for 30 sec to 5 min. The staining reaction was stopped with distilled water. Calcium deposits appeared to be stained in red-orange. For Von Kossa staining, the cell layer was stained with 4% AgNO₃ (Sigma-Aldrich) for 30 min in the dark. The cell layer was then washed twice with distilled water, covered with distilled water and exposed to light for 1 hour. The staining reaction was stopped with 5% thiosulfate (Sigma-Aldrich) for 2 min. The extracellular matrix appeared to be stained in black.

Evaluation of immunosuppressive properties of BM-hMSCs

Human CD3⁺ T-cells were obtained from whole blood samples of donors (Clinical Transfer Facility, CICBT0503, Nantes, France) by centrifugal counter-flow elutriation and isolation by

negative magnetic sorting using an EasySep™ kit (>90% purity; Stemcell Technologies, Vancouver, Canada).

After proliferation of BM-hMSCs under the different culture conditions tested, their ability to suppress proliferation of T-cells stimulated with concavaline A (Con A, Sigma-Aldrich) was assessed. The cell layer was dissociated (see above) and irradiated at 35 Gy for 10 min. Recovered BM-hMSCs (5,000, 10,000, 20,000 or 100,000 cells per well) were co-cultured for five days with T-cells (100,000 per well) activated with Con A (10 µg/mL) in 96-well plates (BM-hMSC:T-cell ratios: 1:20, 1:10, 1:5 and 1:1). Controls included non-activated and activated T-cells with no BM-hMSCs.

After proliferation of BM-hMSCs under the different culture conditions tested, their ability to suppress proliferation of T-cells stimulated with allogeneic irradiated (35 Gy) PBMCs (MLR assay) was assessed. The cell layer was dissociated (see above) and irradiated at 35 Gy for 10 min. Recovered BM-hMSCs (20,000 or 100,000 cells per well) were co-cultured for five days with T-cells (100,000 per well) activated with PBMCs (100,000 cells per well) in 96-well plates (BM-hMSC:T-cell:PBMC ratios: 1:5:5 and 1:1:1). Controls included non-activated and activated T-cells with no BM-hMSCs.

For both experiments, cells were then incubated overnight with tritiated thymidine (0.925 µBq/mL, PerkinElmer, Zaventem, Belgium) and harvested on a filter using Harvester Mach III (Tomtec, Hamden, USA). Radioactivity was measured on the filters using 1450 MicroBeta Jet (Perkin Elmer). Percentages of inhibition were calculated as follows:

% inhibition = 100 – radioactivity measurement of the sample / radioactivity measurement of activated T-cell control.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using PRISM Software. Student's t-test, one-way ANOVA or two-way ANOVA and Bonferroni posttests were applied when appropriate. P<0.05 was considered statistically significant.

Results:

UV-C illumination of PCs induced a slight decrease in TGF-b1 content in hPL

We determined the concentration of bFGF, VEGF, EGF, PDGF-AB, IGF-1 and TGF-b1 in 11 units of PR-hPL and their respective hPL controls (**Figure 1**). We did not find any significant effect of the UV-C illumination of PCs on bFGF, VEGF, EGF, PDGF-AB and IGF-1 contents

in hPL. Under both conditions, the major growth factors present were IGF-1, PDGF-AB and TGF- β 1. In hPL, IGF-1 varied from 26.5 ng/mL to 38.6 ng/mL, PDGF-AB from 9.66 ng/mL to 47.9 ng/mL and TGF- β 1 from 35.9 ng/mL to 74.5 ng/mL. The contents of bFGF, VEGF and EGF were at least ten-fold lower, without any significant difference between hPL and PR-hPL. In hPL, bFGF varied from 75.8 pg/mL to 221 pg/mL, VEGF from 338 pg/mL to 961 pg/mL and EGF from 1,089 pg/mL to 1,868 pg/mL. Interestingly, TGF- β 1 was found to be slightly but significantly affected by UV-C illumination, with a decrease of 21% (from 61 ± 12 ng/mL to 48 ± 13 ng/mL, $p < 0.01$).

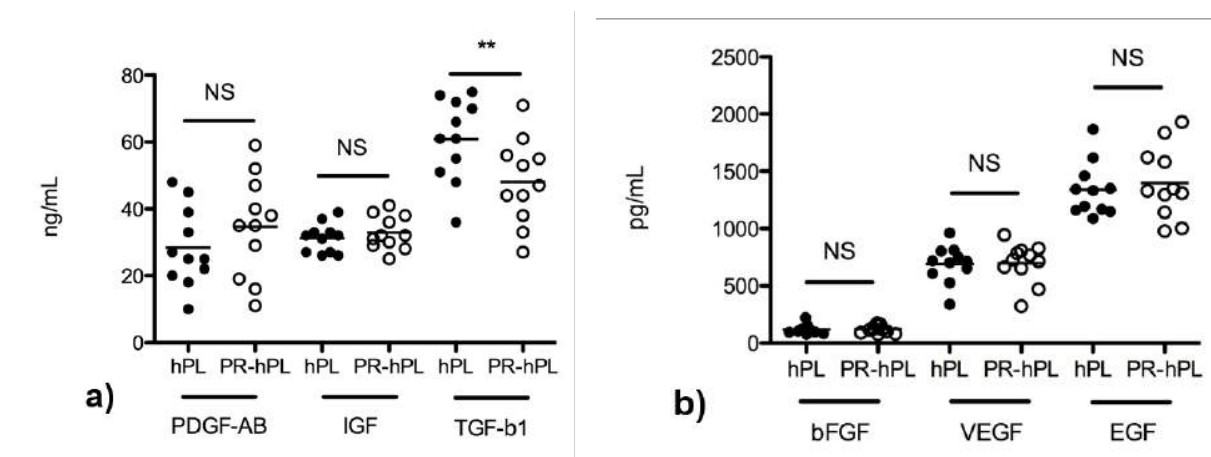


Figure 1: Growth factor contents in hPL and PR-hPL measured using commercially available ELISA kits. Results are presented as concentrations of PDGF-AB, IGF-1, TGF- β 1 (a), and bFGF, VEGF and EGF (b), (individual values and means of dosages in $n=11$ units of PR-hPL and their respective hPL controls). **: $p < 0.01$ hPL versus PR-hPL (Student's t-test).

hPL or PR-hPL triggered similar proliferation of BM-hMSCs

The possibility to use PR-hPL as a cell culture supplement for BM-hMSC proliferation was evaluated.

In a first step, because FBS displays batch-to-batch variability, requiring batch screening for hMSC culture, we carefully screened and selected an efficient FBS batch that we subsequently used as our control. Eight references of FBS were compared when used as a supplement for BM-hMSC proliferation, at the typical dose of 10% with bFGF at 1 ng/mL (**Figure 2**). Our results highlighted that huge variations were observed, the amplification yield ranging from 6.98 ± 0.63 to 15.88 ± 0.27 . FBS batch 3 leads to the best proliferation of BM-hMSCs (significant difference from all the other FBS batches except FBS batch 8) and is hMSC-dedicated from the manufacturer. We decided to select this batch of FBS for the following experiments.

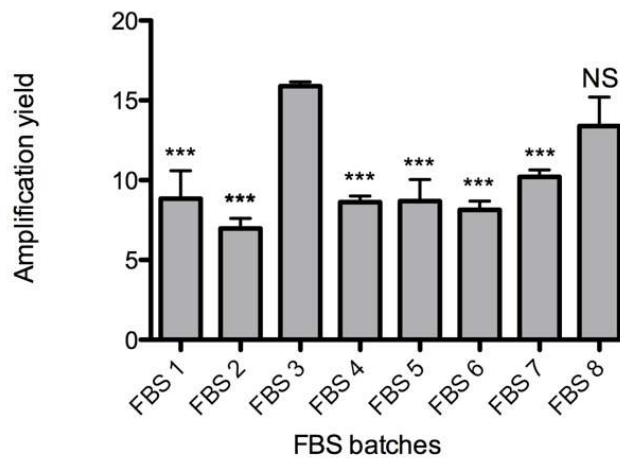


Figure 2: Proliferation of BM-hMSCs cultured in an FBS-containing medium. Eight references of FBS were tested at a dose of 10% with 1 ng/mL bFGF. Results are presented as amplification yields for means of triplicates. NS: *not significant*; ***: $p < 0.001$ versus FBS 3 (one-way ANOVA and Bonferroni posttests).

In a second step, we cultured BM-hMSCs for 10 days in a medium containing hPL or PR-hPL (at doses ranging from 0% to 15%) or FBS (from 2% to 15%, with bFGF at 1 ng/mL) (**Figure 3**). Individual units of hPL or PR-hPL were used. We could observe a dose-effect of hPL, PR-hPL and FBS on cell proliferation (**Figures 3a and 3b**). The variability between units of hPL was minimal (1.12-fold) and maximal (1.77-fold) at the doses of 8% and 2%, respectively (**Figure 3a**). When compared to the FBS-containing medium, the hPL-containing medium was always better or equivalent, considering individual units (**Figure 3a**) or a mean of six units (**Figure 3b**). Moreover, a dose of 8% hPL always presented a better or comparable efficacy than a dose of 10% FBS with 1 ng/mL bFGF (typical dose for BM-hMSC proliferation) (**Figures 3a and 3b**). Most interestingly, UV-C illumination of PCs appeared to have no effect on hPL efficacy (**Figure 3b**). We showed that PR-hPL was still more efficient than FBS (**Figure 3b**). Finally, we could observe that for the 10% dose, BM-hMSCs proliferation seemed to reach a maximum under FBS with bFGF conditions, while it may be further increased with higher supplementation under hPL or PR-hPL conditions, suggesting that the difference in efficacy between FBS with bFGF and hPL or PR-hPL may be further increased.

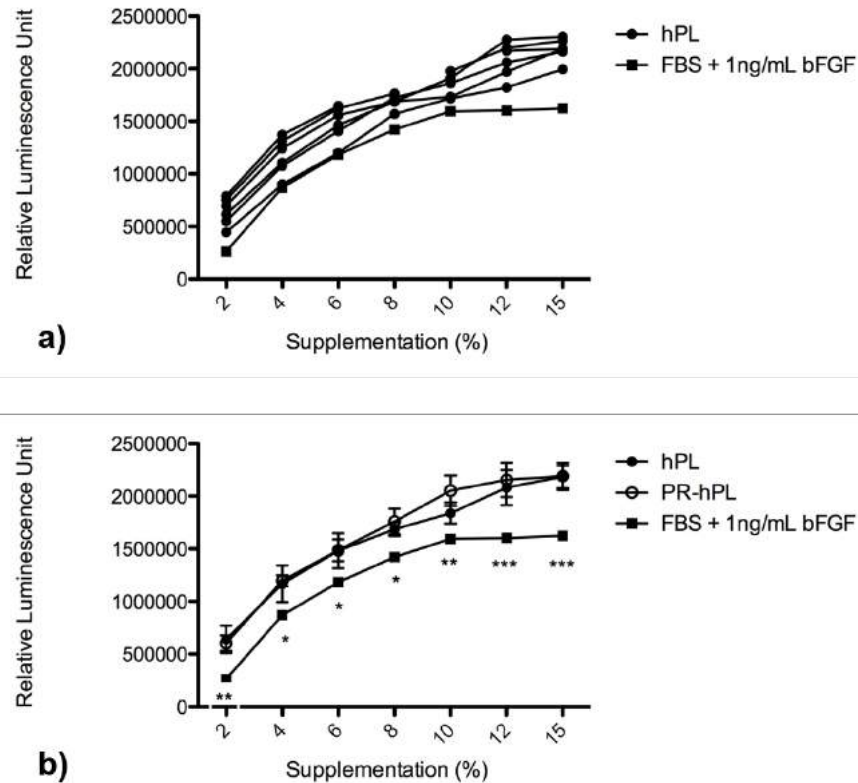


Figure 3: Proliferation of BM-hMSCs cultured for 10 days in an FBS+bFGF-, hPL- or PR-hPL-containing medium. Six units of PR-hPL and their respective hPL controls were tested at doses ranging from 0% to 15%. FBS (from 2% to 15%) with 1 ng/mL bFGF was used as a control. Proliferation was evaluated using the CellTiter-Glo assay. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ versus hPL / PR-hPL (two-way ANOVA and Bonferroni posttests).

Considering these first results, we chose the 8% dose of hPL or PR-hPL for further investigations. Batches of PR-hPL and hPL were obtained by pooling three units of PR-hPL and pooling the three respective hPL controls. Thus, each batch of hPL or PR-hPL included 15 donors. 10% FBS with bFGF at 1 ng/mL was used as a control.

In a third step, we compared the proliferation of BM-hMSCs cultured during three consecutive passages under the three different medium conditions: 10% FBS + 1 ng/mL bFGF, 8% hPL and 8% PR-hPL (**Figure 4**). Our results confirmed that using 8% hPL or PR-hPL leads to comparable proliferation of cells compared to 10% FBS + bFGF for the first and second passages (**Figure 4a**). After the third passage, the cumulative population doubling in the hPL- or PR-hPL-containing medium was significantly higher than in FBS-containing medium (**Figure 4a**, 12.1 ± 0.3 or 11.7 ± 0.8 versus 10.4 ± 1.6 , $p < 0.05$). The generation time was decreased in the hPL- or PR-hPL-containing medium, in comparison with the FBS-

containing medium (**Figure 4b**, not significant). The generation time increased in passage 2 *versus* passage 1 and in passage 3 *versus* passage 2, whatever the culture conditions (**Figure 4b**, overall effect of the passage: $p < 0.001$). Our results showed no differences between PR-hPL and hPL (**Figures 4a and 4b**).

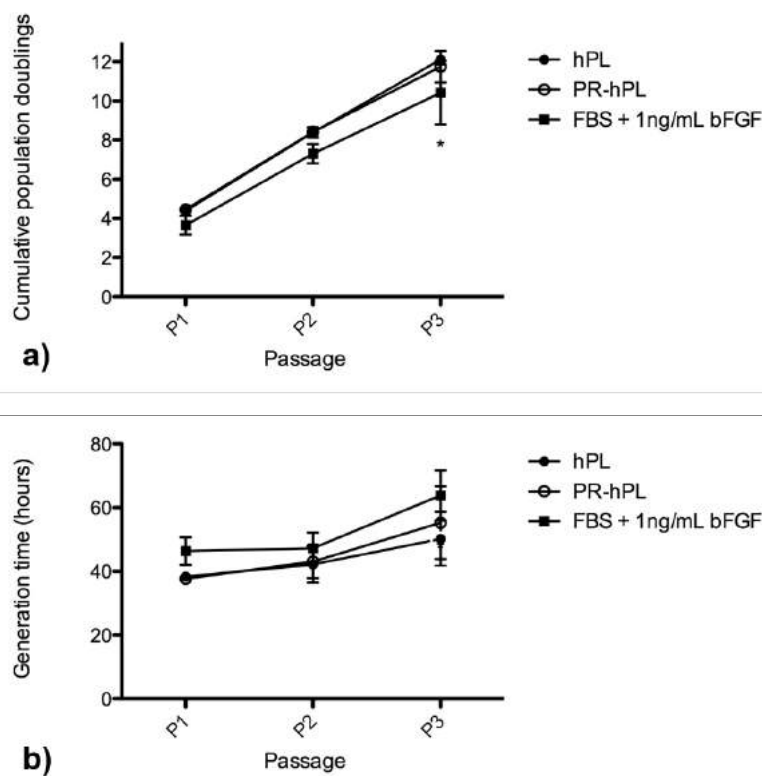


Figure 4: Proliferation of BM-hMSCs cultured in an FBS+bFGF-, hPL- or PR-hPL-containing medium during three consecutive passages. Results are presented as cumulative population doubling (**a**) and generation time (**b**), for means of $n=3$ experiments. *: $p < 0.05$ *versus* hPL / PR-hPL (two-way ANOVA and Bonferroni posttests).

hPL- or PR-hPL-containing medium preserved the clonogenic potential of BM-hMSCs

We also verified that the clonogenic potential of BM-hMSCs was maintained after culture under the different conditions. We showed no differences in the number of CFU-F between BM-hMSCs previously cultured in the hPL- and PR-hPL-containing medium: $23.7\% \pm 8.4\%$ *versus* $22.9\% \pm 4.7\%$, respectively ($n=3$ experiments, not significant).

Culture in hPL or PR-hPL did not alter membrane marker expression of BM-hMSCs

We investigated membrane marker expression of BM-hMSCs after proliferation in the FBS+bFGF-, hPL-, or PR-hPL-containing medium (**Table 1 and Figure 5**), in accordance

with ISCT guidelines [29, 30]. Our results showed that cells express BM-hMSC membrane markers (CD13, CD44, CD73, CD90 and CD105), whatever the culture conditions, and did not express hematopoietic markers (CD34 and CD45) or major histocompatibility complex class II (HLA-DR). We also verified that culture conditions did not induce the expression of co-stimulatory molecules. BM-hMSCs were found negative for the expression of CD40, CD80 and CD86 markers, whatever the culture conditions. We found that neither hPL nor PR-hPL impaired membrane marker expression of BM-hMSCs.

Table 1: Expression of CD13, CD34, CD40, CD44, CD45, CD73, CD80, CD86, CD90, CD105 and HLA-DR in BM-hMSCs cultured in an FBS+bFGF-, hPL- or PR-hPL-containing medium assessed by flow cytometry. Results are presented as percentages of positive cells for means of experiments with hMSCs from n=3 BM.

% of positive cells	10% FBS + 1 ng/mL bFGF	8% hPL	8% PR-hPL
BM-hMSC markers			
CD13	99.8 ± 0.2	99.9 ± 0.1	99.7 ± 0.4
CD44	96.9 ± 2.7	98.3 ± 0.9	98.8 ± 2.0
CD73	93.1 ± 0.3	98.6 ± 0.1	98.8 ± 0.3
CD90	97.8 ± 2.3	99.5 ± 0.3	99.3 ± 1.1
CD105	85.2 ± 2.8	92.1 ± 1.5	91.0 ± 1.2
Hematopoietic markers			
CD34	0.33 ± 0.10	0.10 ± 0.06	0.17 ± 0.12
CD45	0.03 ± 0.02	0.04 ± 0.02	1.06 ± 1.65
Major Histocompatibility Complex class II			
HLA-DR	0.81 ± 0.67	0.22 ± 0.12	0.03 ± 0.03
Co-stimulatory molecules			
CD40	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.02	0.48 ± 0.77
CD80	1.33 ± 0.13	1.02 ± 0.68	1.18 ± 0.79
CD86	0.12 ± 0.16	0.49 ± 0.49	0.07 ± 0.12

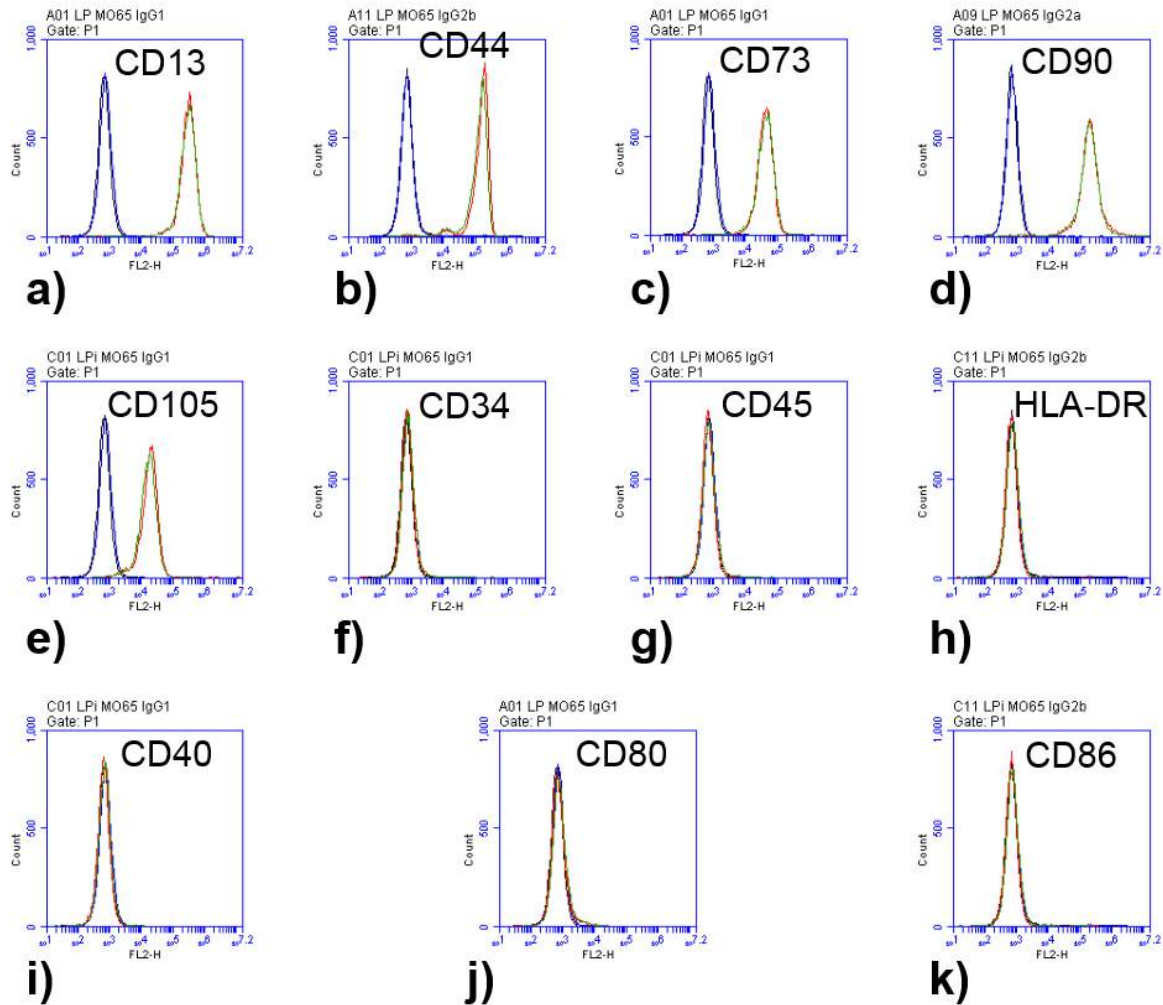


Figure 5: Representative histogram overlays for expression of CD13 (a), CD44 (b), CD73 (c), CD90 (d), CD105 (e), CD34 (f), CD45 (g), HLA-DR (h), CD40 (i), CD80 (j) and CD86 (k) of BM-hMSCs cultured in an hPL- (red curves *versus* isotype controls in black) or PR-hPL-containing medium (green curves *versus* isotype controls in blue).

BM-hMSC differentiation potential was maintained using hPL or PR-hPL in culture medium

We investigated the effect of the culture conditions on the BM-hMSC multilineage differentiation potential (**Figure 6**). We showed that BM-hMSCs amplified in FBS-, hPL-, or PR-hPL-containing medium were able to differentiate in adipocytes (**Figure 6a**) and osteoblasts (**Figures 6b and 6c**), when cultured in specific media. We found that neither hPL nor PR-hPL impaired BM-hMSC differentiation potential.

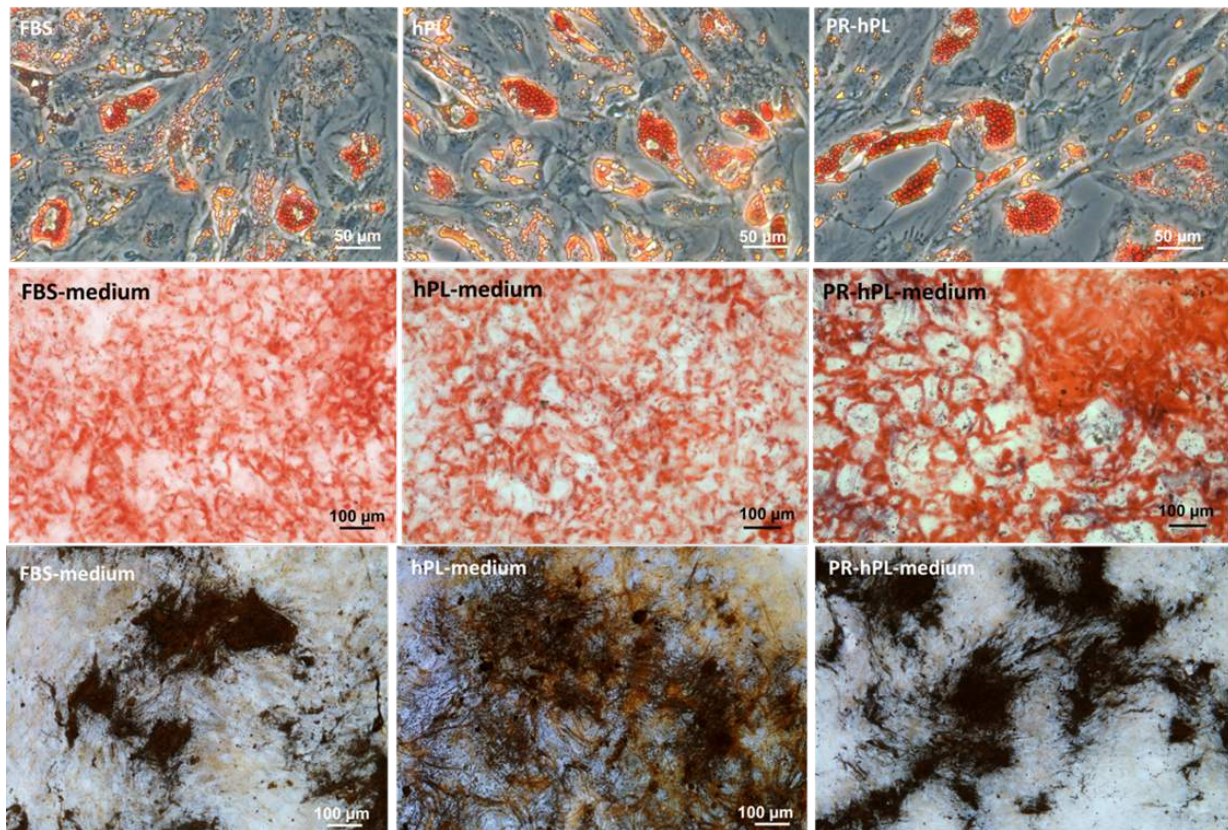


Figure 6: Adipocyte and osteoblast differentiation potential of BM-hMSCs after culture in an FBS+bFGF-, hPL- or PR-hPL-containing medium. Differentiations were induced using specific media. Lipid droplets in adipocytes were stained using Oil Red O (a). For the osteoblast differentiation, the calcium deposit was stained using Alizarin Red S (b) and extracellular matrix using Von Kossa (c). Representative photographs of experiments with hMSCs from n=3 BM.

BM-hMSCs cultured in hPL or PR-hPL kept their immunosuppressive properties

Lastly, we investigated the effect of the culture conditions on the BM-hMSC immunosuppressive properties (**Figure 7**). T-cell proliferation was induced using Con A and MLR assay. T-cell proliferation was determined after five days using ^3H -thymidine incorporation. We obtained a 104-fold and 14-fold activation using Con A induction and MLR assay, respectively ($66,136 \text{ cpm} \pm 5,868 \text{ cpm}$ and $9,250 \text{ cpm} \pm 5,608 \text{ cpm}$, respectively, *versus* $639 \pm 414 \text{ cpm}$ for non-activated cells).

We observed that mitogen-induced T-cell proliferation was inhibited by BM-hMSCs in a dose-dependent manner, whatever the culture conditions (**Figure 7a**). At the lowest ratio (1:20), results showed $12.10\% \pm 13.33\%$, $11.12\% \pm 0.61\%$ and $19.94\% \pm 12.21\%$ of

inhibition with BM-hMSCs previously cultured in FBS, hPL and PR-hPL, respectively. We obtained inhibition up to $97.57\% \pm 0.98\%$, $97.37\% \pm 1.48\%$ and $98.84\% \pm 0.29\%$ with BM-hMSCs previously cultured in FBS, hPL and PR-hPL, respectively (BM-hMSC:T-cell ratio 1:1).

The proliferation of T-cells in MLR assay was inhibited up to $80.91\% \pm 7.68\%$, $60.93\% \pm 9.20\%$ and $93.38\% \pm 2.17\%$ with BM-hMSCs previously cultured in FBS, hPL and PR-hPL, respectively (BM-hMSC:T-cell:PBMC ratio 1:1:1).

Using hPL or PR-hPL for BM-hMSC culture does not alter their immunosuppressive properties.

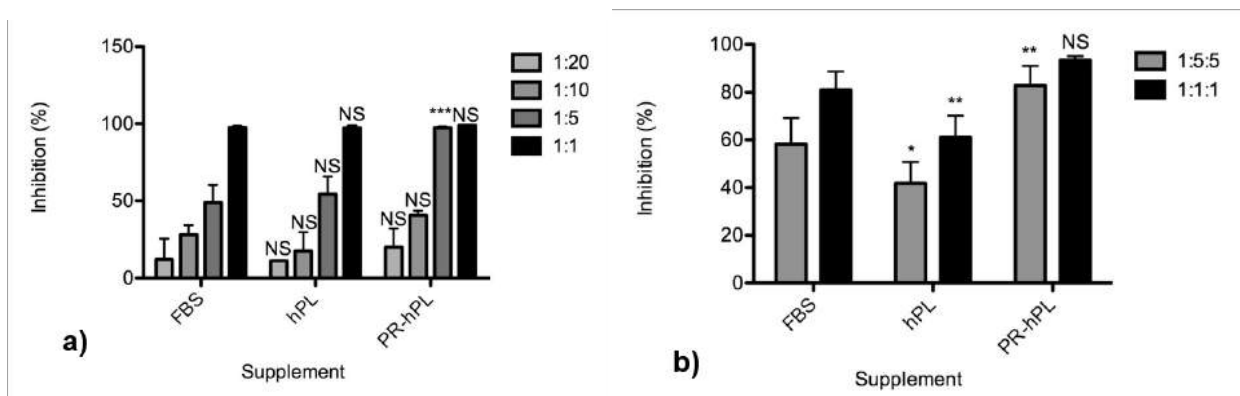


Figure 7: Immunosuppressive properties of BM-hMSCs after culture in an FBS+bFGF-, hPL- or PR-hPL-containing medium. T-cell proliferation was induced using Con A (a) or MLR assay (b). Results are presented as the percentage of inhibition of T-cell proliferation in experiments performed in quadruplicates. Experiments were performed with MSC:T-cell ratios of 1:20, 1:10, 1:5 and 1:1 (a) and MSC:T-cell:PBMC ratios of 1:5:5 and 1:1:1 (b) NS: not significant, *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ and ***: $p < 0.001$ versus FBS (two-way ANOVA and Bonferroni posttests).

Discussion:

It has been widely published that hPL is an advantageous substitute for FBS [11-13, 31]. The use of FBS raises xenogenic issues, such as immunological, virological and prion risks. The immunological risk is lowered using human supplements such as hPL; nevertheless, the risk remains that human proteins may be incorporated in infused cells and lead to immunological reactions in the receiving patient. Autologous use may reduce this risk. Concerning the virological risk, hPL is prepared from human blood products obtained from screened (qualified) donors, and every blood collection is tested according to national regulations on

blood products. However, zero risk does not exist, and prions are still an issue. Autologous use may reduce contamination risks with viruses and prions. It is well-known that FBS presents batch-to-batch variability, requiring batch screening for hMSC culture, whereas PCs are produced according to standard operating procedures, thus minimizing biological product variation. For this reason, it is possible to standardize hPL, by increasing the batch size via the pooling of several PCs, thus limiting batch-to-batch variability. Neither FBS nor hPL are defined products, but hPL, as a human supplement, can be characterized more easily. Finally, the use of FBS leads to ethical issues, regarding the origin of the product (bovine fetus) and the conditions of production, which are not applicable for hPL.

As previously shown, we confirmed in our study that, in comparison with cells cultured in FBS with bFGF, BM-hMSCs cultured in hPL display a better proliferation rate and fully meet the quality control criteria (expression of membrane markers, potential of adipocytes and osteoblasts differentiation, and inhibition of T-cell proliferation). Moreover, we demonstrated for the first time that the THERAFLEX UV-Platelets procedure performed on PCs has no impact on hPL quality and efficacy. The proliferation of BM-hMSCs in the PR-hPL-containing medium was still better than in the FBS-containing medium, and the quality of expanded BM-hMSCs was maintained (no difference observed in clonogenicity, membrane marker expression, differentiation potential and immunosuppressive properties). The only modification observed was a moderate but significant decrease of hPL TGF- β 1 content without any consequence on hPL quality and efficacy. In addition, the use of PR-hPL can also contribute to viral safety. We consequently demonstrated the feasibility of using THERAFLEX UV-Platelets-treated PCs to subsequently obtain hPL suitable for the scalable efficient expansion of BM-hMSCs in a xeno-free and optimally secured (pathogen-reduced) medium.

Among the six growth factors we assayed, the only one significantly affected by UV-C illumination is TGF- β 1, with a decrease of 21% (from 61 ± 12 ng/mL to 48 ± 13 ng/mL). TGF- β 1 is the most abundant of the three isoforms of TGF- β . It acts by binding TGF- β receptors I and II, leading to Smad2 and Smad3 phosphorylation. Smad4 associated with phosphorylated Smads form a complex that translocates to the nucleus and acts as a transcription factor [32].

First described as a potent chemotactic factor, TGF- β 1 has been shown to display pro- and anti-inflammatory properties [33]. The involvement of TGF- β 1 in the immunosuppressive properties of hMSCs has not been clearly described. More particularly, it has been shown that

adding neutralizing TGF- β 1 monoclonal antibody decreases the inhibition of PBMC proliferation by hMSCs [4] but this result has not been reproduced by others [34].

Using neutralizing TGF- β 1 monoclonal antibody, Fekete et al. suggested the involvement of TGF- β 1 in BM-hMSC proliferation [31]. However, TGF- β 1 whether associated or not with other trophic factors, failed to promote BM-hMSC proliferation in the absence of any supplement [31, 35], but a cocktail of factors including TGF- β 1 increased the proliferation in the presence of a small percentage of hPL. These results suggested that TGF- β 1 may be involved in BM-hMSC proliferation, acting synergistically with other factors in hPL. Studies from other groups have shown that TGF- β 1 may increase [36] or inhibit [37] the proliferation of hMSCs from BM or from endometria [38].

In our study, the decrease in TGF- β 1 content of PR-hPL was not correlated with any difference in terms of BM-hMSC proliferation or immunosuppressive properties. On one hand, the results described above are not clear cut and on the other hand, the still high level of TGF- β 1 in PR-hPL suggest that the decrease in TGF- β 1 content between hPL and PR-hPL has no impact on MSC proliferation or immune properties.

In our study, T-cell proliferation inhibition by BM-hMSCs was not impaired under either hPL or PR-hPL culture conditions. Comparing immunosuppressive properties of BM-hMSCs cultured in those two supplements, some studies showed that BM-hMSCs cultured in hPL displayed lesser properties of T-cell proliferation inhibition than BM-hMSCs cultured in FBS [11, 39, 40]; however, some others did not observe any difference [12, 13, 41]. Interestingly, Capelli and collaborators showed that the results observed may depend on the method used (mitogen-induced T-cell proliferation or MLR assay) [42]. More generally, a number of parameters may have an impact, such as the origin of the cells and the culture conditions. For instance, the inhibition of T-cell proliferation by adipose-tissue-derived hMSCs isolated in hPL has been shown to be increased in comparison with BM-hMSCs isolated in FBS or hPL [43]. The discrepancies in results may also be explained by the diversity of hPL used in these studies. Indeed, hPLs are not all the same, and the involvement of fibrinogen in the decrease in T-cell proliferation inhibition has been demonstrated [44]. Fibrinogen is a major component of plasma, and these results suggest that hPL prepared from PCs in additive solution may maintain hMSC immunosuppressive properties better than hPL obtained from PCs in plasma.

Three technologies have been developed for pathogen reduction in PCs [15, 20]. Intercept technology (described in [45]), is based on the blockage of pathogen replication by a synthetic psoralen (Amotosalen, S-59). Upon UV-A illumination (320 – 400nm), S-59 induces irreversible damage in nucleic acids. The Mirasol technology associates and combines the damaging effects of vitamin B2 (riboflavin) and UV-A and -B illumination (285 – 365nm) on nucleic acids [46]. The THERAFLEX UV-Platelets technology, (fully described in [23]), is based on short-wave UV illumination (254 nm) without the need for any additive. At this wavelength, UV-C light generates damage specifically in nucleic acids that is too extensive to be reversible. The efficacy of these three technologies against bacteria [47-49] and enveloped and non-enveloped viruses [26, 49, 50] has been described. In addition, the three technologies have been shown to perform inactivation of residual leukocytes [51-53], thus lowering the risk of transfusion-associated graft-versus-host disease. The preservation of platelets quality has been described for the three technologies, with only a slight activation of the cells and a slight increase of their metabolism [48, 54, 55].

In contrast to UV-A- or UV-B-based technologies, the THERAFLEX UV-Platelets technology does not need any photosensitizing additive. As a consequence, any risk of adverse effects with the photochemicals, their photoproducts or impurities (immune reactions, toxicity and carcinogenicity) can be excluded. Indeed, it has been estimated that residual quantities of S-59 (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and its photoproducts (115 $\mu\text{g}/\text{kg}$) have been infused to the platelet recipient after pathogen reduction using Intercept technology [45]. Even though toxicological studies in animals [45, 56] and clinical trials [57-60] have demonstrated the safety of photochemical-based pathogen reduction technologies, long-term studies may be needed for the evaluation of the risk of adverse effects, especially of carcinogenesis [23].

Moreover, it has been difficult to assess the safety margin of psoralen or its photoproducts bound to or incorporated by platelets when transfused into a patient [23] and quantities infused into the recipient may be increased in the case of BM-hMSCs cultured for several passages in hPL prepared from pathogen-reduced PCs. Considering this and the fact that pathogen-reduced PCs using S-59 and UV-A are contraindicated in patients displaying allergy to psoralens, the use of hPL prepared from pathogen-reduced PCs using Intercept technology [61-63] for BM-hMSCs intended for clinical use may lead to a regulatory issue. In this context, an additive-free technology, consequently with no need for conventional pharmacokinetic and toxicological assessments [20], may remain advantageous.

Our results demonstrate for the first time the feasibility of using the additive-free THERAFLEX UV-Platelets technology to subsequently obtain a pathogen-reduced hPL, suitable for GMP-compliant proliferation of BM-hMSCs intended for clinical use. Such pathogen-reduced hPL could become the gold standard for the preparation of cell therapy products.

References:

1. Delorme B, Chateauvieux S, Charbord P (2006) The concept of mesenchymal stem cells. *Regen Med* 1: 497-509.
2. Ponte AL, Marais E, Gallay N, Langonne A, Delorme B, Herault O, et al. (2007) The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem Cells* 25: 1737-45.
3. Aggarwal S, Pittenger MF (2005) Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105: 1815-22.
4. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanesi M, Longoni PD, Matteucci P, et al. (2002) Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 99: 3838-43.
5. Caplan AI, Dennis JE (2006) Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 98: 1076-84.
6. Francois M, Galipeau J (2012) New insights on translational development of mesenchymal stromal cells for suppressor therapy. *J Cell Physiol* 227: 3535-8.
7. Squillaro T, Peluso G, Galderisi U (2015) Clinical trials with mesenchymal stem cells: an update. *Cell Transplant*.
8. Sensebe L, Gadelorge M, Fleury-Cappellesso S (2013) Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices: a review. *Stem Cell Res Ther* 4: 66.
9. Spees JL, Gregory CA, Singh H, Tucker HA, Peister A, Lynch PJ, et al. (2004) Internalized antigens must be removed to prepare hypoimmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. *Mol Ther* 9: 747-56.
10. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, et al. (2002) Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 8932-7.
11. Bernardo ME, Avanzini MA, Perotti C, Cometa AM, Moretta A, Lenta E, et al. (2007) Optimization of in vitro expansion of human multipotent mesenchymal stromal cells for cell-therapy approaches: further insights in the search for a fetal calf serum substitute. *J Cell Physiol* 211: 121-30.
12. Bieback K, Hecker A, Kocaomer A, Lannert H, Schallmoser K, Strunk D, et al. (2009) Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem Cells* 27: 2331-41.
13. Doucet C, Ernou I, Zhang Y, Llense JR, Begot L, Holy X, et al. (2005) Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J Cell Physiol* 205: 228-36.

14. Lucarelli E, Beccheroni A, Donati D, Sangiorgi L, Cenacchi A, Del Vento AM, et al. (2003) Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. *Biomaterials* 24: 3095-100.
15. Shih DT, Burnouf T (2015) Preparation, quality criteria, and properties of human blood platelet lysate supplements for ex vivo stem cell expansion. *N Biotechnol* 32: 199-211.
16. Kuehnert MJ, Roth VR, Haley NR, Gregory KR, Elder KV, Schreiber GB, et al. (2001) Transfusion-transmitted bacterial infection in the United States, 1998 through 2000. *Transfusion* 41: 1493-9.
17. Andreu G, Morel P, Forestier F, Debeir J, Rebibo D, Janvier G, et al. (2002) Hemovigilance network in France: organization and analysis of immediate transfusion incident reports from 1994 to 1998. *Transfusion* 42: 1356-64.
18. Funk MB, Lohmann A, Guenay S, Henseler O, Heiden M, Hanschmann KM, et al. (2011) Transfusion-transmitted bacterial infections - haemovigilance data of German blood establishments (1997-2010). *Transfus Med Hemother* 38: 266-271.
19. Schrezenmeier H, Walther-Wenke G, Muller TH, Weinauer F, Younis A, Holland-Letz T, et al. (2007) Bacterial contamination of platelet concentrates: results of a prospective multicenter study comparing pooled whole blood-derived platelets and apheresis platelets. *Transfusion* 47: 644-52.
20. Schlenke P (2014) Pathogen inactivation technologies for cellular blood components: an update. *Transfus Med Hemother* 41: 309-25.
21. Lindholm PF, Annen K, Ramsey G (2011) Approaches to minimize infection risk in blood banking and transfusion practice. *Infect Disord Drug Targets* 11: 45-56.
22. Blumel J, Stuhler A (2010) [Important aspects of virus safety of advanced therapy medicinal products]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 53: 38-44.
23. Seltsam A, Muller TH (2011) UVC irradiation for pathogen reduction of platelet concentrates and plasma. *Transfus Med Hemother* 38: 43-54.
24. Douki T, Laporte G, Cadet J (2003) Inter-strand photoproducts are produced in high yield within A-DNA exposed to UVC radiation. *Nucleic Acids Res* 31: 3134-42.
25. Caillet-Fauquet P, Di Giambattista M, Draps ML, Sandras F, Branckaert T, de Launoit Y, et al. (2004) Continuous-flow UVC irradiation: a new, effective, protein activity-preserving system for inactivating bacteria and viruses, including erythrovirus B19. *J Virol Methods* 118: 131-9.
26. Mohr H, Steil L, Gravemann U, Thiele T, Hammer E, Greinacher A, et al. (2009) A novel approach to pathogen reduction in platelet concentrates using short-wave ultraviolet light. *Transfusion* 49: 2612-24.
27. Thiele T, Pohler P, Kohlmann T, Sumnig A, Aurich K, Selleng K, et al. (2015) Tolerance of platelet concentrates treated with UVC-light only for pathogen reduction--a phase I clinical trial. *Vox Sang* 109: 44-51.
28. Delorme B, Charbord P (2007) Culture and characterization of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Methods Mol Med* 140: 67-81.
29. Delorme B, Ringe J, Gallay N, Le Vern Y, Kerboeuf D, Jorgensen C, et al. (2008) Specific plasma membrane protein phenotype of culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells. *Blood* 111: 2631-5.

30. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8: 315-7.
31. Fekete N, Gadelorge M, Furst D, Maurer C, Dausend J, Fleury-Cappellesso S, et al. (2012) Platelet lysate from whole blood-derived pooled platelet concentrates and apheresis-derived platelet concentrates for the isolation and expansion of human bone marrow mesenchymal stromal cells: production process, content and identification of active components. *Cytotherapy* 14: 540-54.
32. Han G, Li F, Singh TP, Wolf P, Wang XJ (2012) The pro-inflammatory role of TGFbeta1: a paradox? *Int J Biol Sci* 8: 228-35.
33. Sanjabi S, Zenewicz LA, Kamanaka M, Flavell RA (2009) Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF-beta, IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. *Curr Opin Pharmacol* 9: 447-53.
34. Lepelletier Y, Lecourt S, Renand A, Arnulf B, Vanneaux V, Femand JP, et al. (2010) Galectin-1 and semaphorin-3A are two soluble factors conferring T-cell immunosuppression to bone marrow mesenchymal stem cell. *Stem Cells Dev* 19: 1075-9.
35. Fekete N, Rojewski MT, Lotfi R, Schrezenmeier H (2014) Essential components for ex vivo proliferation of mesenchymal stromal cells. *Tissue Eng Part C Methods* 20: 129-39.
36. Ng F, Boucher S, Koh S, Sastry KS, Chase L, Lakshmipathy U, et al. (2008) PDGF, TGF-beta, and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. *Blood* 112: 295-307.
37. Romieu-Mourez R, Francois M, Boivin MN, Stagg J, Galipeau J (2007) Regulation of MHC class II expression and antigen processing in murine and human mesenchymal stromal cells by IFN-gamma, TGF-beta, and cell density. *J Immunol* 179: 1549-58.
38. Gurung S, Werkmeister JA, Gargett CE (2015) Inhibition of Transforming Growth Factor-beta receptor signaling promotes culture expansion of undifferentiated human endometrial mesenchymal stem/stromal cells. *Sci Rep* 5: 15042.
39. Abdelrazik H, Spaggiari GM, Chiossone L, Moretta L (2011) Mesenchymal stem cells expanded in human platelet lysate display a decreased inhibitory capacity on T- and NK-cell proliferation and function. *Eur J Immunol* 41: 3281-90.
40. Oikonomopoulos A, van Deen WK, Manansala AR, Lacey PN, Tomakili TA, Ziman A, et al. (2015) Optimization of human mesenchymal stem cell manufacturing: the effects of animal/xeno-free media. *Sci Rep* 5: 16570.
41. Jonsdottir-Buch SM, Lieder R, Sigurjonsson OE (2013) Platelet lysates produced from expired platelet concentrates support growth and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *PLoS One* 8: e68984.
42. Capelli C, Domenghini M, Borleri G, Bellavita P, Poma R, Carobbio A, et al. (2007) Human platelet lysate allows expansion and clinical grade production of mesenchymal stromal cells from small samples of bone marrow aspirates or marrow filter washouts. *Bone Marrow Transplant* 40: 785-91.
43. Menard C, Pacelli L, Bassi G, Dulong J, Bifari F, Bezier I, et al. (2013) Clinical-grade mesenchymal stromal cells produced under various good manufacturing practice processes

differ in their immunomodulatory properties: standardization of immune quality controls. *Stem Cells Dev* 22: 1789-801.

44. Copland IB, Garcia MA, Waller EK, Roback JD, Galipeau J (2013) The effect of platelet lysate fibrinogen on the functionality of MSCs in immunotherapy. *Biomaterials* 34: 7840-50.
45. Ciaravi V, McCullough T, Dayan AD (2001) Pharmacokinetic and toxicology assessment of INTERCEPT (S-59 and UVA treated) platelets. *Hum Exp Toxicol* 20: 533-50.
46. Goodrich RP, Edrich RA, Li J, Seghatchian J (2006) The Mirasol PRT system for pathogen reduction of platelets and plasma: an overview of current status and future trends. *Transfus Apher Sci* 35: 5-17.
47. Lin L, Dikeman R, Molini B, Lukehart SA, Lane R, Dupuis K, et al. (2004) Photochemical treatment of platelet concentrates with amotosalen and long-wavelength ultraviolet light inactivates a broad spectrum of pathogenic bacteria. *Transfusion* 44: 1496-504.
48. Mohr H, Gravemann U, Bayer A, Muller TH (2009) Sterilization of platelet concentrates at production scale by irradiation with short-wave ultraviolet light. *Transfusion* 49: 1956-63.
49. Ruane PH, Edrich R, Gamp D, Keil SD, Leonard RL, Goodrich RP (2004) Photochemical inactivation of selected viruses and bacteria in platelet concentrates using riboflavin and light. *Transfusion* 44: 877-85.
50. Lin L, Hanson CV, Alter HJ, Jauvin V, Bernard KA, Murthy KK, et al. (2005) Inactivation of viruses in platelet concentrates by photochemical treatment with amotosalen and long-wavelength ultraviolet light. *Transfusion* 45: 580-90.
51. Fast LD, Dileone G, Li J, Goodrich R (2006) Functional inactivation of white blood cells by Mirasol treatment. *Transfusion* 46: 642-8.
52. Grass JA, Hei DJ, Metchette K, Cimino GD, Wieseahn GP, Corash L, et al. (1998) Inactivation of leukocytes in platelet concentrates by photochemical treatment with psoralen plus UVA. *Blood* 91: 2180-8.
53. Pohler P, Muller M, Winkler C, Schaudien D, Sewald K, Muller TH, et al. (2015) Pathogen reduction by ultraviolet C light effectively inactivates human white blood cells in platelet products. *Transfusion* 55: 337-47.
54. Apelseth TO, Bruserud O, Wentzel-Larsen T, Bakken AM, Bjorsvik S, Hervig T (2007) In vitro evaluation of metabolic changes and residual platelet responsiveness in photochemical treated and gamma-irradiated single-donor platelet concentrates during long-term storage. *Transfusion* 47: 653-65.
55. AuBuchon JP, Herschel L, Roger J, Taylor H, Whitley P, Li J, et al. (2005) Efficacy of apheresis platelets treated with riboflavin and ultraviolet light for pathogen reduction. *Transfusion* 45: 1335-41.
56. Reddy HL, Dayan AD, Cavagnaro J, Gad S, Li J, Goodrich RP (2008) Toxicity testing of a novel riboflavin-based technology for pathogen reduction and white blood cell inactivation. *Transfus Med Rev* 22: 133-53.
57. (2010) A randomized controlled clinical trial evaluating the performance and safety of platelets treated with MIRASOL pathogen reduction technology. *Transfusion* 50: 2362-75.

58. Drawz SM, Marschner S, Yanez M, Garcia de Coca A, Feys HB, Deeren D, et al. (2015) Observational study of corrected count increments after transfusion of platelets treated with riboflavin pathogen reduction technology in additive solutions. *Transfusion* 55: 1745-51.
59. Infanti L, Stebler C, Job S, Ruesch M, Gratwohl A, Irsch J, et al. (2011) Pathogen-inactivation of platelet components with the INTERCEPT Blood System : a cohort study. *Transfus Apher Sci* 45: 175-81.
60. van Rhenen D, Gulliksson H, Cazenave JP, Pamphilon D, Ljungman P, Kluter H, et al. (2003) Transfusion of pooled buffy coat platelet components prepared with photochemical pathogen inactivation treatment: the euroSPRITE trial. *Blood* 101: 2426-33.
61. Castiglia S, Mareschi K, Labanca L, Lucania G, Leone M, Sanavio F, et al. (2014) Inactivated human platelet lysate with psoralen: a new perspective for mesenchymal stromal cell production in Good Manufacturing Practice conditions. *Cytotherapy* 16: 750-63.
62. Iudicone P, Fioravanti D, Bonanno G, Miceli M, Lavorino C, Totta P, et al. (2014) Pathogen-free, plasma-poor platelet lysate and expansion of human mesenchymal stem cells. *J Transl Med* 12: 28.
63. Jonsdottir-Buch SM, Sigurgrimsdottir H, Lieder R, Sigurjonsson OE (2015) Expired and Pathogen-Inactivated Platelet Concentrates Support Differentiation and Immunomodulation of Mesenchymal Stromal Cells in Culture. *Cell Transplant* 24: 1545-54.

Acknowledgments:

We would like to thank the Clinical Transfer Facility (CICBT0503, Nantes, France) for furnishing the human CD3+ T-cells and the Plateau Technique de Radioactivité SFR Santé (Nantes, France) for providing the radioactivity laboratory and equipment. We also thank Stefan REICHENBERG and Thomas BOUCKENOOGHE for critically reviewing the manuscript.

Author contributions:

Conceived and designed the experiments: SV, KR, FG, CS, BD

Performed the experiments: SV, LC, SE, JL

Analyzed the data: SV, LC, SE, JL, BD

Wrote the paper: SV, LC, SE, JL, BD

Final approval of the manuscript: SV, BD

Chapitre 2. Valorisation scientifique

I. Publications

- I. *Judith Lorant*, Cindy Schleder, Florence Robriquet, Blandine Lieubeau, Elisa Négroni, Charlotte Saury, Isabelle Leroux, Lucie Chabrand, Sabrina Viau, Candice Babarit, Mireille Ledevin, Laurence Dubreil, Antoine Hamel, Armelle Magot, Chantal Thorin, Laëtitia Guével, Bruno Delorme, Yann Péréon, Gillian Butler-Browne, Vincent Mouly, and Karl Rouger. **Human MuStem cells, a mix of progenitor subsets suitable for efficient muscle regeneration in damaged muscle of immunodeficient mice** (en révision dans « American Journal of Pathology»)

- II. *Judith Lorant*, Thibaut Larcher, Nicolas Jaulin, Benoît Hedan, Isabelle Leroux, Céline Zuber, Laurence Dubreil, Mireille Ledevin, Hélicia Goubin, Sophie Moullec, Jack-Yves Deschamps, Catherine André, Yan Chérel, Oumeya Adjali and Karl Rouger. **Systemic Delivery of Allogeneic MuStem Cells in Dystrophic Dogs only Requires a Short-Term Immunosuppression to Avoid Host Immunity** (en révision dans « Stem Cell Translational Medicine»)

- III. *Judith Lorant*, Blandine Lieubeau, Nicolas Jaulin, Marine Charrier, Candice Babarit, Isabelle Leroux, Cindy Schleder, Yann Péréon, Oumeya Adjali and Karl Rouger. **Adaptive and innate immunity, combined targets impacted by hMuStem cells through solubles factors** (en préparation pour « Journal of Immunology »)

- IV. Sabrina Viau, Lucie Chabrand, Sandy Eap, *Judith Lorant*, Karl Rouger, Francis Goudaliez, Chryslain Sumian and Bruno Delorme. **Pathogen reduction through additive-free short-wave UV light irradiation retains the optimal efficacy of human platelet lysate for the expansion of human bone marrow mesenchymal stem cells** (en révision dans « PLOS One»)

II. Communications orales

- **Immunomodulatory properties of human MuStem cells: assessing their impact on adaptive and innate immunity.** European Society of Gene and Cell Therapy (ESGCT) Congress, Septembre 2015, Helsinki, Finlande

- **Human MuStem cells, a promising therapeutic candidate for muscular dystrophies with immunomodulatory properties** 21st Nantes Actualités Transplantation (NAT) congress, Juin 2016, Nantes, France
- **Human MuStem Cells Impact on Adaptive and Innate Immunity: Definition of Immunomodulatory Properties of a Cell-based Therapy Candidate for Duchenne Muscular Dystrophy.** PCS Cell Science & Stem Cell Conference, Juin 2016, Barcelone, Espagne

III. Communications affichées

- I. Judith LORANT, Nicolas Jaulin, Thibaut Larcher, Benoit Hedan, Jack-Yves Deschamps, Isabelle Leroux, Céline Zuber, Cindy Schleder, Mireille Ledevin, Maéva Dutilleul, Hélicia Goubin, Corinne Jounier, Sophie Moullec, Catherine André, Yan Chérel, Oumeya Adjali and Karl Rouger. ***In vitro* and *in vivo* characterization of immunomodulatory properties of MuStem cells.** ESGCT Congress, Octobre 2014, La Haye, Pays-Bas
- II. Judith LORANT, Nicolas Jaulin, Isabelle Leroux, Céline Zuber, Cindy Schleder, Marine Charrier, Blandine Lieubeau, Yann Péréon, Armelle Magot, Antoine Hamel, Oumeya Adjali and Karl Rouger. **Human MuStem cells: a cell-based therapy candidate for Duchenne Muscular Dystrophy, with immunomodulatory properties.** Myology Congress, Mars 2016, Lyon, France

Références bibliographiques

La logique vous conduira d'un point A à un point B,
l'imagination et l'audace vous conduiront où vous le désirez.

Albert Einstein

Articles scientifiques, ouvrages et thèses

- Aartsma-Rus, A., Fokkema, I., Verschuuren, J., Ginjaar, I., Van Deutekom, J., Van Ommen, G.J., and Den Dunnen, J.T. (2009). Theoretic applicability of antisense-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy mutations. *Hum. Mutat.* *30*, 293–299.
- Aartsma-Rus, A., Den Dunnen, J.T., and Van Ommen, G.J.B. (2010). New insights in gene-derived therapy: The example of Duchenne muscular dystrophy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1214*, 199–212.
- Aartsma-rus, A., Ginjaar, I.B., and Bushby, K. (2016). The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy. *J. Med. Genet.* *53*, 1–7.
- Abramson, S., Miller, R.G., and Phillips, R.A. (1977). The identification in adult bone marrow of pluripotent and restricted stem cells of the myeloid and lymphoid systems. *J. Exp. Med.* *145*, 1567–1579.
- Abumaree, M.H., Al Jumah, M.A., Kalionis, B., Jawdat, D., Al Khaldi, A., Abomaray, F.M., Fatani, A.S., Chamley, L.W., and Knawy, B.A. (2013). Human Placental Mesenchymal Stem Cells (pMSCs) Play a Role as Immune Suppressive Cells by Shifting Macrophage Differentiation from Inflammatory M1 to Anti-inflammatory M2 Macrophages. *Stem Cell Rev. Reports* *9*, 620–641.
- Acharyya, S., Villalta, S.A., Bakkar, N., Bupha-Intr, T., Janssen, P.M.L., Carathers, M., Li, Z.W., Beg, A.A., Ghosh, S., Sahenk, Z., et al. (2007). Interplay of IKK/NF- κ B signaling in macrophages and myofibers promotes muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy. *J. Clin. Invest.* *117*, 889–901.
- Ahn, A., and Kunkel, L. (1993). The structural and functional diversity of dystrophin. *Nat. Genet.* *3*, 283–291.
- Alameddine, H.S. (2012). Matrix metalloproteinases in skeletal muscles: Friends or foes? *Neurobiol. Dis.* *48*, 508–518.
- Alessandri, G., Pagano, S., Bez, A., Benetti, A., Pozzi, S., Iannolo, G., Baronio, M., Invernici, G., Caruso, A., Muneretto, C., et al. (2004). Isolation and culture of human muscle-derived stem cells able to differentiate into myogenic and neurogenic cell lineages. *Lancet* *364*, 1872–1883.
- Alexakis, C., Partridge, T., and Bou-Gharios, G. (2007). Implication of the satellite cell in dystrophic muscle fibrosis: a self-perpetuating mechanism of collagen overproduction. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *293*, C661–C669.
- Alexander, M.S., Rozkalne, A., Colletta, A., Spinazzola, J.M., Johnson, S., Rahimov, F., Meng, H., Lawlor, M.W., Estrella, E., Kunkel, L.M., et al. (2016). CD82 Is a Marker for Prospective Isolation of Human Muscle Satellite Cells and Is Linked to Muscular Dystrophies. *Cell Stem Cell* 1–8.
- Allamand, V., and Campbell, K.P. (2000). Animal models for muscular dystrophy: valuable tools for the development of therapies. *Hum. Mol. Genet.* *9*, 2459–2467.
- Allen, D.G., and Whitehead, N.P. (2011). Duchenne muscular dystrophy--what causes the increased membrane permeability in skeletal muscle? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *43*, 290–294.
- Ambrosio, C.E., Fadel, L., Gaiad, T.P., Martins, D.S., Araujo, K.P.C., Zucconi, E., Brolio, M.P., Giglio, R.F., Morini, A.C., Jazedje, T., et al. (2009). Identification of three distinguishable phenotypes in golden retriever muscular dystrophy. *Genet. Mol. Res.* *8*, 389–396.
- Amsalem, Y., Mardor, Y., Feinberg, M.S., Landa, N., Miller, L., Daniels, D., Ocherashvilli, A., Holbova, R., Yosef, O., Barbash, I.M., et al. (2007). Iron-oxide labeling and outcome

- of transplanted mesenchymal stem cells in the infarcted myocardium. *Circulation* *116*, 38–46.
- Anaya-Segura, M., Garcia-Martinez, F., Montes-Almanza, L., Diaz, B., Avila-Ramirez, G., Alvarez-Maya, I., Coral-Vazquez, R., Mondragon-Teran, P., Escobar-Cedillo, R., Garcia-Calderon, N., et al. (2015). Non-Invasive biomarkers for duchenne muscular dystrophy and carrier detection. *Molecules* *20*, 11154–11172.
- Andersen, D.C., Schroder, H.D., and Jensen, C.H. (2008). Non-cultured adipose-derived CD45- side population cells are enriched for progenitors that give rise to myofibres in vivo. *Exp. Cell Res.* *314*, 2951–2964.
- Andersen, D.C., Kristiansen, G.Q., Jensen, L., Füchtbauer, E.M., Schrøder, H.D., and Jensen, C.H. (2012). Quantitative gene expression profiling of CD45+ and CD45- skeletal muscle-derived side population cells. *Cytom. Part A* *81 A*, 72–80.
- Anderson, J.E. (2000). A Role for Nitric Oxide in Muscle Repair : Nitric Oxide – mediated Activation of Muscle Satellite Cells. *11*, 1859–1874.
- Andrades, J.A., Becerra, J., Muñoz-chápuli, R., Martínez, S., and Raya, Á. (2014). Stem cells therapy for regenerative medicine : Principles of present and future practice. *J. Biomed. Sci. Eng.* *7*, 49–57.
- Angelini, C., Fanin, M., Freda, M.P., Martinello, F., Miorin, M., Melacini, P., Siciliano, G., Pegoraro, E., Rosa, M., and Danieli, G.A. (1996). Prognostic factors in mild dystrophinopathies. *J. Neurol. Sci.* *142*, 70–78.
- Anjos-Afonso, F., and Bonnet, D. (2007). Nonhematopoietic/endothelial SSEA-1cells define the most primitive progenitors in the adult murine bone marrow mesenchymal compartment. *Blood* *109*, 1298–1306.
- Aoki, Y., Yokota, T., and Wood, M.J.A. (2013). Development of multiexon skipping antisense oligonucleotide therapy for duchenne muscular dystrophy. *Biomed Res. Int.* *2013*.
- 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.* *134*, 751–758.
- Arakia, E., Nakamura, K., Nakaob, K., Kameyac, S., Kobayashid, O., Nonakad, I., Kobayashia, T., Katsuki, M., Araki, E., Nakamura, K., et al. (1997). Targeted disruption of exon 52 in the mouse dystrophin gene induced muscle degeneration similar to that observed in Duchenne muscular dystrophy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *238*, 492–497.
- De Arcangelis, V., Strimpakos, G., Gabanella, F., Corbi, N., Luvisetto, S., Magrelli, A., Onori, A., Passananti, C., Pisani, C., Rome, S., et al. (2016). Pathways Implicated in Tadalafil Amelioration of Duchenne Muscular Dystrophy. *J. Cell. Physiol.* *231*, 224–232.
- Ardite, E., Barbera, J.A., Roca, J., and Fernández-Checa, J.C. (2004). Glutathione depletion impairs myogenic differentiation of murine skeletal muscle C2C12 cells through sustained NF-kappaB activation. *Am. J. Pathol.* *165*, 719–728.
- Arsic, N., Mamaeva, D., Lamb, N.J., and Fernandez, A. (2008). Muscle-derived stem cells isolated as non-adherent population give rise to cardiac, skeletal muscle and neural lineages. *Exp. Cell Res.* *314*, 1266–1280.
- Asakura, A., Seale, P., Girgis-Gabardo, A., and Rudnicki, M.A. (2002). Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J. Cell Biol.* *159*, 123–134.
- 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*, 3581–3586.
- Bachrach, E., Perez, A.L., Choi, Y.H., Illigens, B.M.W., Jun, S.J., Del Nido, P., McGowan, F.X., Li, S., Flint, A., Chamberlain, J., et al. (2006). Muscle engraftment of myogenic progenitor cells following intraarterial transplantation. *Muscle and Nerve* *34*, 44–52.
- Baharvand, H., and Matthaei, K.I. (2003). The ultrastructure of mouse embryonic stem cells. *Reprod. Biomed. Online* *7*, 330–335.
- Banks, G.B., and Chamberlain, J.S. (2008). Chapter 9 The Value of Mammalian Models for Duchenne Muscular Dystrophy in Developing Therapeutic Strategies (Elsevier Inc.).
- Barbin, I.C.C., Pereira, J.A., Bersan Rovere, M., de Oliveira Moreira, D., Marques, M.J., and Santo Neto, H. (2016). Diaphragm degeneration and cardiac structure in mdx mouse: Potential clinical implications for Duchenne muscular dystrophy. *J. Anat.* *228*, 784–791.
- Barros Maranhao, J., de Oliveira Moreira, D., Mauricio, A.F., de Carvalho, S.C., Ferretti, R., Pereira, J.A., Santo Neto, H., and Marques, M.J. (2015). Changes in caldesmon, TNF- α , TGF- β and MyoD levels during the progression of skeletal muscle dystrophy in mdx mice: A comparative analysis of the quadriceps, diaphragm and intrinsic laryngeal muscles. *Int. J. Exp. Pathol.* *96*, 285–293.
- Barthélémy, I., Uriarte, A., Drougard, C., Unterfinger, Y., Thibaud, J.L., and Blot, S. (2012). Effects of an Immunosuppressive Treatment in the GRMD Dog Model of Duchenne Muscular Dystrophy. *PLoS One* *7*.
- Barthélémy, I., Pinto-Mariz, F., Yada, E., Desquilbet, L., Savino, W., Silva-Barbosa, S.D., Faussat, A.-M., Mouly, V., Voit, T., Blot, S., et al. (2014). Predictive markers of clinical outcome in the GRMD dog model of Duchenne muscular dystrophy. *Dis. Model. Mech.* *7*, 1253–1261.
- 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*, 42–48.
- Barton, E.R., Morris, L., Musaro, A., Rosenthal, N., and Lee Sweeney, H. (2002). Muscle-specific expression of insulin-like growth factor I counters muscle decline in mdx mice. *J. Cell Biol.* *157*, 137–147.
- 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*, 375–381.
- Bassett, D.I., and Currie, P.D. (2003). The zebrafish as a model for muscular dystrophy and congenital myopathy. *Hum. Mol. Genet.* *12 Spec No*, R265–R270.
- Batchelor, C.L., and Winder, S.J. (2006). Sparks, signals and shock absorbers: how dystrophin loss causes muscular dystrophy. *Trends Cell Biol.* *16*, 198–205.
- Baumeister, R., and Ge, L. (2002). The worm in us - *Caenorhabditis elegans* as a model of human disease. *Trends Biotechnol.* *20*, 147–148.
- Beastrom, N., Lu, H., MacKe, A., Canan, B.D., Johnson, E.K., Penton, C.M., Kaspar, B.K., Rodino-Klapac, L.R., Zhou, L., Janssen, P.M.L., et al. (2011). Mdx5cv mice manifest more severe muscle dysfunction and diaphragm force deficits than do mdx mice. *Am. J. Pathol.* *179*, 2464–2474.
- 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*, 1113–1121.
- Belicchi, M., Erratico, S., Razini, P., Meregalli, M., Cattaneo, A., Jacchetti, E., Farini, A., Villa, C., Bresolin, N., Porretti, L., et al. (2010). Ex vivo expansion of human circulating myogenic progenitors on cluster-assembled nanostructured TiO₂. *Biomaterials* *31*, 5385–5396.
- Benchaouir, R., Meregalli, M., Farini, A., D'Antona, G., Belicchi, M., Goyenvalle, A., Battistelli, M., Bresolin, N., Bottinelli, R., Garcia, L., et al. (2007). Restoration of human dystrophin following transplantation of exon-skipping-engineered DMD patient stem cells into dystrophic mice. *Cell Stem Cell* *1*, 646–657.
- Bernasconi, P., Torchiana, E., Confalonieri, P., Brugnoli, R., Barresi, R., Mora, M., Comelio, F., Morandi, L., and Mantegazza, R. (1995). Expression of Transforming Growth Factor- β 1 in Dystrophic Patient Muscles. 1137–1144.
- Berry, S.E., Liu, J., Chaney, E.J., and Kaufman, S.J. (2007). Multipotential mesoangioblast stem cell therapy in the mdx / utrⁿ - / - mouse model for Duchenne muscular dystrophy. *2*, 275–288.
- Besson, V., Smeriglio, P., Wegener, A., Relaix, F., Nait, B., and Sassoon, D.A. (2011). Identifies Multiple Adult Stem and Progenitor Cell Populations. *Pnas* *3*, 1–6.
- Bianco, P., and Cossu, G. (1999). Uno, nessuno e centomila: searching for the identity of mesodermal progenitors. *Exp. Cell Res.* *251*, 257–263.
- Biggar, W.D., Gingras, M., Fehlings, D.L., Harris, V.A., and Steele, C.A. (2001). Deflazacort treatment of Duchenne muscular dystrophy. *J. Pediatr.* *138*, 45–50.
- Biggar, W.D., Politano, L., Harris, V.A., Passamano, L., Vajsar, J., Alman, B., Palladino, A., Comi, L.I., and Nigro, G. (2004). Deflazacort in Duchenne muscular dystrophy: A comparison of two different protocols. *Neuromuscul. Disord.* *14*, 476–482.
- Biggar, W.D., Harris, V.A., Eliasoph, L., and Alman, B. (2006). Long-term benefits of deflazacort treatment for boys with Duchenne muscular dystrophy in their second decade. *Neuromuscul. Disord.* *16*, 249–255.
- Bish, L.T., Yarchoan, M., Sleeper, M.M., Gazzara, J.A., Morine, K.J., Acosta, P., Barton, E.R., and Sweeney, H.L. (2011). Chronic losartan administration reduces mortality and preserves cardiac but not skeletal muscle function in dystrophic mice. *PLoS One* *6*, 1–6.
- Blau, H.M., Webster, C., and Pavlath, G.K. (1983). Defective myoblasts identified in Duchenne muscular dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *80*, 4856–4860.
- Bogdanovich, S., Krag, T., Barton, E., Morris, L., Whittmore, L., Ahima, R., and Khurana, T. (2002). Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature* *420*, 418–421.
- Bonifati, M.D., Ruzza, G., Bonometto, P., Berardinelli, a, Gorni, K., Orcesi, S., Lanzi, G., and Angelini, C. (2000). A multicenter, double-blind, randomized trial of deflazacort versus prednisone in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* *23*, 1344–1347.
- Bouffi, C., Bony, C., Courties, G., Jorgensen, C., and No??l, D. (2010). IL-6-dependent PGE₂ secretion by mesenchymal stem cells inhibits local inflammation in experimental arthritis. *PLoS One* *5*.
- Boyce, F.M., Beggs, a H., Feener, C., and Kunkel, L.M. (1991). Dystrophin is transcribed in brain from a distant upstream promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 1276–1280.
- Bremmer-Bout, M., Aartsma-Rus, A., de Meijer, E.J., Kaman, W.E., Janson, A.A.M., Vossen, R.H.A.M., van Ommen, G.J.B., den Dunnen, J.T., and van Deutekom, J.C.T. (2004). Targeted exon skipping in transgenic hDMD mice: A model for direct preclinical

- screening of human-specific antisense oligonucleotides. *Mol. Ther.* *10*, 232–240.
- Brenman, J.E., Chao, D.S., Xia, H., Aldape, K., and Bretz, D.S. (1995). Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* *82*, 743–752.
- Brunelli, S., Sciorati, C., D'Antona, G., Innocenzi, A., Covarello, D., Galvez, B.G., Perrotta, C., Monopoli, A., Sanvito, F., Bottinelli, R., et al. (2007). Nitric oxide release combined with nonsteroidal antiinflammatory activity prevents muscular dystrophy pathology and enhances stem cell therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 264–269.
- Bulfield, G., Siller, W.G., Wight, P.A., and Moore, K.J. (1984). X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *81*, 1189–1192.
- Burkin, D.J., Wallace, G.Q., Nicol, K.J., Kaufman, D.J., and Kaufman, S.J. (2001). Enhanced expression of the $\alpha 7\beta 1$ integrin reduces muscular dystrophy and restores viability in dystrophic mice. *J. Cell Biol.* *152*, 1207–1218.
- Bushby, K.M. (1992). Genetic and clinical correlations of Xp21 muscular dystrophy. *J. Inherit. Metab. Dis.* *15*, 551–564.
- Buyse, G.M., Van Der Mieren, G., Erb, M., D'hooge, J., Herijgers, P., Verbeken, E., Jara, A., Van Den Bergh, A., Mertens, L., Courdier-Fruh, I., et al. (2009). Long-term blinded placebo-controlled study of SNT-MC17/idebenone in the dystrophin deficient mdx mouse: Cardiac protection and improved exercise performance. *Eur. Heart J.* *30*, 116–124.
- Buyse, G.M., Goemans, N., van den Hauwe, M., Thijs, D., de Groot, I.J.M., Schara, U., Ceulemans, B., Meier, T., and Mertens, L. (2011). Idebenone as a novel, therapeutic approach for Duchenne muscular dystrophy: Results from a 12 month, double-blind, randomized placebo-controlled trial. *Neuromuscul. Disord.* *21*, 396–405.
- Cacchiarelli, D., Martone, J., Girardi, E., Cesana, M., Incitti, T., Morlando, M., Nicoletti, C., Santini, T., Sthandier, O., Barberi, L., et al. (2010). MicroRNAs involved in molecular circuitries relevant for the duchenne muscular dystrophy pathogenesis are controlled by the dystrophin/nNOS pathway. *Cell Metab.* *12*, 341–351.
- Cai, B., Spencer, M.J., Nakamura, G., Tseng-Ong, L., and Tidball, J.G. (2000). Eosinophilia of dystrophin-deficient muscle is promoted by perforin-mediated cytotoxicity by T cell effectors. *Am. J. Pathol.* *156*, 1789–1796.
- Camby, I., Le Mercier, M., Lefranc, F., and Kiss, R. (2006). Galectin-1: A small protein with major functions. *Glycobiology* *16*.
- Campbell C., McMillan H.J., Mah J.K., Tarnopolsky M., Selby K., McClure T., Wilson D.M., Sherman M.L., Escolar D. and Attie K.M. (2016) Myostatin inhibitor ACE-031 treatment of ambulatory boys with Duchenne muscular dystrophy: Results of a randomized, placebo-controlled clinical trial. *Muscle Nerve*. doi: 10.1002/mus.25268.
- Cao, B., Zheng, B., Jankowski, R.J., Kimura, S., Ikezawa, M., Deasy, B., Cummins, J., Epperly, M., Qu-Petersen, Z., and Huard, J. (2003). Muscle stem cells differentiate into haematopoietic lineages but retain myogenic potential. *Nat. Cell Biol.* *5*, 640–646.
- Cao, L., Han, G., Lin, C., Gu, B., Gao, X., Moulton, H.M., Seow, Y., and Yin, H. (2016). Fructose Promotes Uptake and Activity of Oligonucleotides With Different Chemistries in a Context-dependent Manner in mdx Mice. *Mol. Ther. Nucleic Acids* *5*, e329.
- Caplan, A. (1991). Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* *9*, 641–650.

- Capote, J., DiFranco, M., and Vergara, J.L. (2010). Excitation-contraction coupling alterations in mdx and utrophin/dystrophin double knockout mice: a comparative study. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *298*, C1077–C1086.
- Carpenter, J.L., Hoffman, E.P., Romanul, F.C., Kunkel, L.M., Rosales, R.K., Ma, N.S., Dasbach, J.J., Rae, J.F., Moore, F.M., and McAfee, M.B. (1989). Feline muscular dystrophy with dystrophin deficiency. *Am. J. Pathol.* *135*, 909–919.
- Castillo-Cardiel G., López-Echaury A.C., Saucedo-Ortiz J.A., Fuentes-Orozco C., Michel-Espinoza L.R., Irusteta-Jiménez L., Salazar-Parra M. and González-Ojeda A. (2016) Bone regeneration in mandibular fractures after the application of autologous mesenchymal stem cells, a randomized clinical trial. *Dent Traumatol.* doi: 10.1111/edt.12303.
- Catani, M.V., Savini, I., Duranti, G., Caporossi, D., Ceci, R., Sabatini, S., and Avigliano, L. (2004). Nuclear factor KB and activating protein 1 are involved in differentiation-related resistance to oxidative stress in skeletal muscle cells. *Free Radic. Biol. Med.* *37*, 1024–1036.
- Cedeno-Laurent, F., and Dimitroff, C.J. (2012). Galectin-1 research in T cell immunity: Past, present and future. *Clin Immunol* *142*, 107–116.
- Cerri, D.G., Rodrigues, L.C., Stowell, S.R., Araujo, D.D., Coelho, M.C., Oliveira, S.R., Bizario, J.C.S., Cummings, R.D., Dias-Baruffi, M., and Costa, M.C.R. (2008). Degeneration of dystrophic or injured skeletal muscles induces high expression of Galectin-1. *Glycobiology* *18*, 842–850.
- Chamberlain, J.S., Metzger, J., Reyes, M., Townsend, D., and Faulkner, J.A. (2007). Dystrophin-deficient mdx mice display a reduced life span and are susceptible to spontaneous rhabdomyosarcoma. *Faseb J* *21*, 2195–2204.
- Chambers, S.P., Dodd, a, Overall, R., Sirey, T., Lam, L.T., Morris, G.E., and Love, D.R. (2001). Dystrophin in adult zebrafish muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *286*, 478–483.
- Chang, N.C., Chevalier, F.P., and Rudnicki, M.A. (2016). Satellite Cells in Muscular Dystrophy - Lost in Polarity. *Trends Mol. Med.* *22*, 479–496.
- Chapdelaine, P., Pichavant, C., Rousseau, J., Pâques, F., and Tremblay, J.P. (2010). Meganucleases can restore the reading frame of a mutated dystrophin. *Gene Ther.* *17*, 846–858.
- Chazaud, B., Chrétien, F., and Gherardi, R.K. (2007). Les macrophages régulent les différentes phases de la régénération musculaire Abonnez-vous. *Med. Sci. (Paris)*. *23*, 794–795.
- Chen, C.W., Okada, M., Proto, J.D., Gao, X., Sekiya, N., Beckman, S.A., Corselli, M., Crisan, M., Saparov, A., Tobita, K., et al. (2013). Human pericytes for ischemic heart repair. *Stem Cells* *31*, 305–316.
- Chen, S., Fang, W., Ye, F., Liu, Y., Qian, J., Shan, S., Zhang, J., Chunhua, R., Liao, L., Lin, S., et al. (2004). Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* *94*, 92–95.
- Chirieleison, S.M., Feduska, J.M., Schugar, R.C., Askew, Y., Ph, D., and Deasy, B.M. (2012). Human Muscle-Derived Cell Populations Isolated by Differential Adhesion Rates : Phenotype and Contribution to Skeletal Muscle Regeneration in Mdx / SCID Mice. *Tissue Eng. Part A* *18*, 232–241.
- Christov, C., Chre, F., Abou-khalil, R., Bassez, G., Bassaglia, Y., Shinin, V., Tajbakhsh, S., Gherardi, R.K., and Marne, P.X. De (2007). Muscle Satellite Cells and Endothelial Cells : Close Neighbors and Privileged Partners. *18*, 1397–1409.

- Cioch, M., Jawniak, D., Wach, M., Mańko, J., Radomska, K., Borowska, H., Szczepanek, A., and Hus, M. (2016). Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Adults With Acute Myeloid Leukemia. *Transplant. Proc.* *48*, 1814–1817.
- Claflin, D.R., and Brooks, S. V (2008). Direct observation of failing fibers in muscles of dystrophic mice provides mechanistic insight into muscular dystrophy. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *294*, C651–C658.
- Cohen, N., and Muntoni, F. (2004). Multiple pathogenetic mechanisms in X linked dilated cardiomyopathy. *Heart* *90*, 835–841.
- Cohn, R.D., van Erp, C., Habashi, J.P., Soleimani, A.A., Klein, E., Lisi, M.T., Gamradt, M., ap Rhys, C.M., Holm, T.M., Bart, L., et al. (2007). Angiotensin II type 1 receptor blockade attenuates TGF- β - induced failure of muscle regeneration in multiple myopathic states. *Nat Med* *13*, 204–210.
- 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*, 165–172.
- 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.
- Comim, C.M., Mathia, G.B., Hoepers, A., Tuon, L., Kapczynski, F., Dal-Pizzol, F., Quevedo, J., and Rosa, M.I. (2015). Neurotrophins, cytokines, oxidative parameters and functionality in Progressive Muscular Dystrophies. *An. Acad. Bras. Cienc.* *87*, 1809–1818.
- Connolly, A.M., Keeling, R.M., Mehta, S., Pestronk, A., and Sanes, J.R. (2001). Three mouse models of muscular dystrophy: The natural history of strength and fatigue in dystrophin-, dystrophin/utrophin-, and laminin 2-deficient mice. *Neuromuscul. Disord.* *11*, 703–712.
- Connuck, D.M., Sleeper, L.A., Colan, S.D., Cox, G.F., Towbin, J.A., Lowe, A.M., Wilkinson, J.D., Orav, J.E., Cuniberti, L., Salbert, B.A., et al. (2008). Characteristics and Outcomes of Cardiomyopathy in Children with Duchenne or Becker Muscular Dystrophy: A Comparative Study from The Pediatric Cardiomyopathy Registry. *Am Hear. J* *155*, 998–1005.
- Consentius, C., Akyüz, L., Schmidt-Lucke, J. a., Tschöpe, C., Pinzur, L., Ofir, R., Reinke, P., Volk, H.-D., and Juelke, K. (2015). Mesenchymal stromal cells prevent allostimulation *in vivo* and control checkpoints of Th1 priming: Migration of human DC to lymph nodes and NK cell activation. *Stem Cells* *33*, 3087–3099.
- Cooper, B.J., Winand, N.J., Stedman, H., Valentine, B.A., Hoffman, E.P., Kunkel, L.M., Scott, M.O., Fischbeck, K.H., Kornegay, J.N., Avery, R.J., et al. (1988). The homologue of the Duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dogs. *Nature* *334*, 154–156.
- Corselli, M., Chen, C.W., Sun, B., Yap, S., Rubin, J.P., and Peault, B. (2012). The tunica adventitia of human arteries and veins as a source of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* *21*, 1299–1308.
- Cossu, G., and Bianco, P. (2003). Mesoangioblasts - Vascular progenitors for extravascular mesodermal tissues. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *13*, 537–542.
- Cossu, G., Tajbakhsh, S., and Buckingham, M. (1996). How is myogenesis initiated in the embryo? *Trends Genet* *12*, 218–223.
- Cossu, G., Previtali, S.C., Napolitano, S., Cicalese, M.P., Tedesco, F.S., Nicastro, F., Noviello, M., Roostalu, U., Natali Sora, M.G., Scarlato, M., et al. (2015). Intra-arterial transplantation of HLA-matched donor mesoangioblasts in Duchenne muscular

- dystrophy. *EMBO Mol. Med.* 7, 1513–1528.
- Coulson-Thomas, V.J., Coulson-Thomas, Y.M., Gesteira, T.F., and Kao, W.W.-Y. (2016). Extrinsic and intrinsic mechanisms by which mesenchymal stem cells suppress the immune system. *Ocul. Surf.* 14, 121–134.
- Cox, G.A., Cole, N.M., Matsumura, K., Phelps, S.F., Hauschka, S.D., Campbell, K.P., Faulkner, J.A., and Chamberlain, J.S. (1993). Overexpression of dystrophin in transgenic mdx mice eliminates dystrophic symptoms without toxicity. *Nature* 364, 725–729.
- Cozzi, F., Cerletti, M., Luvoni, G.C., Lombardo, R., Brambilla, P.G., Faverzani, S., Blasevich, F., Cornelio, F., Pozza, O., and Mora, M. (2001). Development of muscle pathology in canine X-linked muscular dystrophy. II. Quantitative characterization of histopathological progression during postnatal skeletal muscle development. *Acta Neuropathol* 101, 469–478.
- Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C.W., Corselli, M., Park, T.S., Andriolo, G., Sun, B., Zheng, B., Zhang, L., et al. (2008). A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs. *Cell Stem Cell* 3, 301–313.
- Crisan, M., Corselli, M., Chen, C.-W., and Péault, B. (2011). Multilineage stem cells in the adult: a perivascular legacy? *Organogenesis* 7, 101–104.
- Crop, M.J., Baan, C.C., Korevaar, S.S., Ijzermans, J.N.M., Weimar, W., and Hoogduijn, M.J. (2010). Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells induce explosive T-cell proliferation. *Stem Cells Dev.* 19, 1843–1853.
- Crosbie, R.H. (2001). NO vascular control in Duchenne muscular dystrophy. *Nat. Med.* 7, 27–29.
- Cui, C., Uyama, T., Miyado, K., Terai, M., Kyo, S., Kiyono, T., and Umezawa, A. (2007). Menstrual Blood-derived Cells Confer Human Dystrophin Expression in the Murine Model of Duchenne Muscular Dystrophy via Cell Fusion and Myogenic Transdifferentiation. *Mol. Biol. Cell* 18, 1586–1594.
- D’Angelo, M.G., Gandossini, S., Boneschi, F.M., Sciorati, C., Bonato, S., Brighina, E., Comi, G., Pietro, Turconi, A.C., Magri, F., Stefanoni, G., et al. (2012). Nitric oxide donor and non steroidal anti inflammatory drugs as a therapy for muscular dystrophies: Evidence from a safety study with pilot efficacy measures in adult dystrophic patients. *Pharmacol. Res.* 65, 472–479.
- da Silva Meirelles, L., Caplan, A.I., and Nardi, N.B. (2008). In Search of the In Vivo Identity of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* 26, 2287–2299.
- Daadi, M.M., Grueter, B.A., Malenka, R.C., Redmond, D.E., and Steinberg, G.K. (2012). Dopaminergic neurons from midbrain-specified human embryonic stem cell-derived neural stem cells engrafted in a monkey model of Parkinson’s disease. *PLoS One* 7.
- Danisovic, L., Varga, I., Polak, S., Bajcikova, B., Adamkov, M., and Vojtassak, J. (2011). Biological and morphological characterization of in vitro expanded human muscle-derived stem cells. *Tsitologija* 53, 482–487.
- Danko, I., Chapman, V., and Wolff, J. a (1992). The frequency of revertants in mdx mouse genetic models for Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr. Res.* 32, 128–131.
- Darabi, R., Pan, W., Bosnakovski, D., Baik, J., Kyba, M., and Perlingeiro, R.C.R. (2011). Functional Myogenic Engraftment from Mouse iPS Cells. *Stem Cell Rev. Reports* 7, 948–957.
- Darabi, R., Arpke, R.W., Irion, S., Dimos, J.T., Grskovic, M., Kyba, M., and Perlingeiro, R.C.R. (2012). Human ES- and iPS-derived myogenic progenitors restore dystrophin and improve contractility upon transplantation in dystrophic mice. *Cell Stem Cell*

- 10, 610–619.
- De Angelis, L., Berghella, L., Coletta, M., Lattanzi, L., Zanchi, M., Cusella-De Angelis, M.G., Ponzetto, C., and Cossu, G. (1999). Skeletal myogenic progenitors originating from embryonic dorsal aorta coexpress endothelial and myogenic markers and contribute to postnatal muscle growth and regeneration. *J. Cell Biol.* *147*, 869–878.
- De Bari, C., Dell’Accio, F., Tylzanowski, P., and Luyten, F. (2001). Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* *44*, 1928–1942.
- 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*, 909–918.
- Deasy, B., Gharaibeh, B., Pollett, J., Jones, M., Lucas, M., Kanda, Y., and Huard, J. (2005). Long-Term Self-Renewal of Postnatal Muscle-derived Stem Cells. *Mol. Biol. Cell* *16*, 3323–3333.
- 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.
- Decary, S., Ben Hamida, C., Mouly, V., Barbet, J.P., Hentati, F., and Butler-Browne, G.S. (2000). Shorter telomeres in dystrophic muscle consistent with extensive regeneration in young children. *Neuromuscul. Disord.* *10*, 113–120.
- Deconinck, N., and Dan, B. (2007). Pathophysiology of Duchenne Muscular Dystrophy: Current Hypotheses. *Pediatr. Neurol.* *36*, 1–7.
- Deconinck, A.E., Rafael, J.A., Skinner, J.A., Brown, S.C., Potter, A.C., Metzinger, L., Watt, D.J., Dickson, J.G., Tinsley, J.M., and Davies, K.E. (1997). Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* *90*, 717–727.
- Dell’Agnola, C., Wang, Z., Storb, R., Tapscott, S.J., Kuhr, C.S., Hauschka, S.D., Lee, R.S., Sale, G.E., Zellmer, E., Gisburne, S., et al. (2004). Hematopoietic stem cell transplantation does not restore dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy dogs. *Blood* *104*, 4311–4318.
- Dellavalle, a, Maroli, G., Covarello, D., Azzoni, E., Innocenzi, a, Perani, L., Antonini, S., Sambasivan, R., Brunelli, S., Tajbakhsh, S., et al. (2011). Pericytes resident in postnatal skeletal muscle differentiate into muscle fibres and generate satellite cells. *Nat. Commun.* *2*, 499.
- Dellavalle, A., Sampaolesi, M., Tonlorenzi, R., Tagliafico, E., Sacchetti, B., Perani, L., Innocenzi, A., Galvez, B.G., Messina, G., Morosetti, R., et al. (2007). Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat. Cell Biol.* *9*, 255–267.
- Demmers, M.W.H.J., Korevaar, S.S., Roemeling-van Rhijn, M., van den Bosch, T.P.P., Hoogduijn, M.J., Betjes, M.G.H., Weimar, W., Baan, C.C., and Rowshani, a T. (2015). Human renal tubular epithelial cells suppress alloreactive T cell proliferation. *Clin. Exp. Immunol.* *179*, 509–519.
- Deng, Y., Yi, S., Wang, G., Cheng, J., Zhang, Y., Chen, W., Tai, Y., Chen, S., Chen, G., Liu, W., et al. (2014). Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells Instruct Dendritic Cells to Acquire Tolerogenic Phenotypes Through the IL-6-Mediated Upregulation of SOCS1. *Stem Cells Dev.* *00*, 1–13.
- Dent, K.M., Dunn, D.M., Von Niederhausern, A.C., Aoyagi, A.T., Kerr, L., Bromberg, M.B., Hart, K.J., Tuohy, T., White, S., Den Dunnen, J.T., et al. (2005). Improved molecular

- diagnosis of dystrophinopathies in an unselected clinical cohort. *Am. J. Med. Genet.* *134 A*, 295–298.
- Denti, M.A., Incitti, T., Sthandier, O., Nicoletti, C., De Angelis, F.G., Rizzuto, E., Auricchio, A., Musarò, A., and Bozzoni, I. (2008). Long-term benefit of adeno-associated virus/antisense-mediated exon skipping in dystrophic mice. *Hum. Gene Ther.* *19*, 601–608.
- Dezawa, M. (2005). Bone Marrow Stromal Cells Generate Muscle Cells and Repair Muscle Degeneration. *Science* (80-.). *309*, 314–317.
- 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*, 2945–2952.
- DiMario, J.X., Uzman, A., and Strohman, R.C. (1991). Fiber regeneration is not persistent in dystrophic (mdx) mouse skeletal muscle. *Dev. Biol.* *148*, 314–321.
- Ding, K., Yang, Z., Xu, J.Z., Liu, W.Y., Zeng, Q., Hou, F., and Lin, S. (2015). Elastic hydrogel substrate supports robust expansion of murine myoblasts and enhances their engraftment. *Exp. Cell Res.* *337*, 111–119.
- Ding, Q., Lee, Y., Schaefer, E. a K., Peters, D.T., Veres, A., Kim, K., Kuperwasser, N., Motola, D.L., Torsten, B., Hendriks, W.T., et al. (2013). A TALEN genome editing system to generate human stem-cell based disease models. *Cell Stem Cell* *12*, 238–251.
- Djouad, F., Fritz, V., Apparailly, F., Louis-Plence, P., Bony, C., Sany, J., Jorgensen, C., and Noël, D. (2005). Reversal of the immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells by tumor necrosis factor alpha in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* *52*, 1595–1603.
- Djouad, F., Charbonnier, L.-M., Bouffi, C., Louis-Plence, P., Bony, C., Apparailly, F., Cantos, C., Jorgensen, C., and Noël, D. (2007). Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells* *25*, 2025–2032.
- Domen, J., Wagers, A., and Weissman, I. (2006). 2. Bone Marrow (Hematopoietic) Stem Cells. *Regen. Med.* 13–34.
- Douville, J., Beaulieu, R., and Balicki, D. (2009). ALDH1 as a functional marker of cancer stem and progenitor cells. *Stem Cells Dev.* *18*, 17–25.
- Doyle, M.J., Zhou, S., Tanaka, K.K., Pisconti, A., Farina, N.H., Sorrentino, B.P., and Olwin, B.B. (2011). Abcg2 labels multiple cell types in skeletal muscle and participates in muscle regeneration. *J. Cell Biol.* *195*, 147–163.
- Dumoncaux, J., Marie, S., Beley, C., Trollet, C., Vignaud, A., Ferry, A., Butler-Browne, G., and Garcia, L. (2010). Combination of myostatin pathway interference and dystrophin rescue enhances tetanic and specific force in dystrophic mdx mice. *Mol. Ther.* *18*, 881–887.
- Dumont, N.A., Wang, Y.X., von Maltzahn, J., Pasut, A., Bentzinger, C.F., Brun, C.E., and Rudnicki, M.A. (2015). Dystrophin expression in muscle stem cells regulates their polarity and asymmetric division. *Nat. Med.* *21*, 1455–1463.
- Eggenhofer, E., and Hoogduijn, M.J. (2012). Mesenchymal stem cell-educated macrophages. *Transplant. Res.* *1*, 12.
- Ehmsen, J., Poon, E., and Davies, K. (2002). The Dystrophin-Associated Protein Complex. *J. Cell Sci.* *115*, 2801–2803.
- 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*, 279–287.
- Emery, A.E. (1998). The muscular dystrophies. *BMJ* *317*, 991–995.

- Emery, A.E.H. (1991). Population frequencies of inherited neuromuscular diseases-A world survey. *Neuromuscul. Disord.* *1*, 19–29.
- Emery, A.E.H. (2002). The muscular dystrophies. *Lancet* *359*, 687–695.
- English, K., Tonlorenzi, R., Cossu, G., and Wood, K.J. (2013). Mesoangioblasts suppress T cell proliferation through IDO and PGE-2-dependent pathways. *Stem Cells Dev.* *22*, 512–523.
- Ervasti, J.M. (2007). Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* *1772*, 108–117.
- Ervasti, J.M., and Campbell, K.P. (1991). Membrane Organization of the Dystrophin-Glycoprotein. *Cell* *66*, 1121–1131.
- Escolar, D.M., Hache, L.P., Clemens, P.R., Cnaan, A., McDonald, C.M., Viswanathan, V., Kornberg, A.J., Bertorini, T.E., Nevo, Y., Lotze, T., et al. (2011). Randomized, blinded trial of weekend vs daily prednisone in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* *77*, 444–452.
- Fabb, S. a, Wells, D.J., Serpente, P., and Dickson, G. (2002). Adeno-associated virus vector gene transfer and sarcolemmal expression of a 144 kDa micro-dystrophin effectively restores the dystrophin-associated protein complex and inhibits myofibre degeneration in nude/mdx mice. *Hum. Mol. Genet.* *11*, 733–741.
- Falzarano, M.S., Scotton, C., Passarelli, C., and Ferlini, A. (2015). Duchenne muscular dystrophy: From diagnosis to therapy. *Molecules* *20*, 18168–18184.
- Farini, A., Meregalli, M., Belicchi, M., Battistelli, M., Parolini, D., D’Antona, G., Gavina, M., Ottoboni, L., Constantin, G., Bottinelli, R., et al. (2007). T and B lymphocyte depletion has a marked effect on the fibrosis of dystrophic skeletal muscles in the scid/mdx mouse. *J. Pathol.* *213*, 229–238.
- Farini, A., Razini, P., Erratico, S., Torrente, Y., and Meregalli, M. (2009). Cell based therapy for duchenne muscular dystrophy. *J. Cell. Physiol.* *221*, 526–534.
- Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, a, Cossu, G., and Mavilio, F. (1998). Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* *279*, 1528–1530.
- Ferrari, G., Stornaiuolo, A., and Mavilio, F. (2001). Failure to correct murine muscular dystrophy. *Nature* *411*, 1014–1015.
- Finkel, R.S., Flanigan, K.M., Wong, B., Bönnemann, C., Sampson, J., Sweeney, H.L., Reha, A., Northcutt, V.J., Elfring, G., Barth, J., et al. (2013). Phase 2a study of ataluren-mediated dystrophin production in patients with nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy. *PLoS One* *8*.
- Finsterer, J., and Stöllberger, C. (2003). The heart in human dystrophinopathies. *Cardiology* *99*, 1–19.
- Fisher, I., Abraham, D., Bouri, K., Hoffman, E.P., Muntoni, F., and Morgan, J. (2005). Prednisolone-induced changes in dystrophic skeletal muscle. *FASEB J.* *19*, 834–836.
- Flanigan, K.M., Voit, T., Rosales, Z.Q., Servais, L., Kraus, J.E., Wardell, C., Morgan, A., Dorricott, S., Nakielny, J., Quarcoo, N., et al. (2014). Pharmacokinetics and safety of single doses of drisapersen in non-ambulant subjects with Duchenne muscular dystrophy: Results of a double-blind randomized clinical trial. *Neuromuscul. Disord.* *24*, 16–24.
- Fletcher, S., Honeyman, K., Fall, A.M., Harding, P.L., Johnsen, R.D., and Wilton, S.D. (2006). Dystrophin expression in the mdx mouse after localised and systemic administration of a morpholino antisense oligonucleotide. *J. Gene Med.* *8*, 207–216.

- Ford, C., Hamerton, J., Barnes, D., and Loutit, J. (1956). Cytological identification of radiation-chimeras. *Nature* *177*, 452–454.
- Frank, N.Y., Kho, A.T., Schatton, T., Murphy, G.F., Molloy, M.J., Zhan, Q., Ramoni, M.F., Frank, M.H., Kohane, I.S., and Gussoni, E. (2006). Regulation of myogenic progenitor proliferation in human fetal skeletal muscle by BMP4 and its antagonist Gremlin. *J. Cell Biol.* *175*, 99–110.
- Fröhlich, T., Kemter, E., Flenkenthaler, F., Klymiuk, N., Otte, K.A., Blutke, A., Krause, S., Walter, M.C., Wanke, R., Wolf, E., et al. (2016). Progressive muscle proteome changes in a clinically relevant pig model of Duchenne muscular dystrophy. *Sci. Rep.* *6*, 33362.
- Fu, X., Wang, H., and Hu, P. (2015). Stem cell activation in skeletal muscle regeneration. *Cell. Mol. Life Sci.* *72*, 1663–1677.
- Fukada, S., Miyagoe-Suzuki, Y., Tsukihara, H., Yuasa, K., Higuchi, S., Ono, S., Tsujikawa, K., Takeda, S., and Yamamoto, H. (2002). Muscle regeneration by reconstitution with bone marrow or fetal liver cells from green fluorescent protein-gene transgenic mice. *J. Cell Sci.* *115*, 1285–1293.
- Galli, D., Innocenzi, A., Staszewsky, L., Zanetta, L., Sampaolesi, M., Bai, A., Martinoli, E., Carlo, E., Balconi, G., Fiordaliso, F., et al. (2005). Mesoangioblasts, vessel-associated multipotent stem cells, repair the infarcted heart by multiple cellular mechanisms: A comparison with bone marrow progenitors, fibroblasts, and endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *25*, 692–697.
- Galvez, B.G., Sampaolesi, M., Brunelli, S., Covarello, D., Gavina, M., Rossi, B., Costantin, G., Torrente, Y., and Cossu, G. (2006). Complete repair of dystrophic skeletal muscle by mesoangioblasts with enhanced migration ability. *J. Cell Biol.* *174*, 231–243.
- Galvez, B.G., Sampaolesi, M., Barbuti, a, Crespi, a, Covarello, D., Brunelli, S., Dellavalle, a, Crippa, S., Balconi, G., Cuccovillo, I., et al. (2008). Cardiac mesoangioblasts are committed, self-renewable progenitors, associated with small vessels of juvenile mouse ventricle. *Cell Death Differ.* *15*, 1417–1428.
- Gang, E., Bosnakovski, D., Figueiredo, C., Visser, J., and Perlingeiro, R. (2007). SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood* *109*, 1743–1751.
- Gang, E.J., Darabi, R., Bosnakovski, D., Xu, Z., Kamm, K.E., Kyba, M., and Perlingeiro, R.C.R. (2009). Engraftment of mesenchymal stem cells into dystrophin-deficient mice is not accompanied by functional recovery. *Exp. Cell Res.* *315*, 2624–2636.
- Gaschen, F., and Burgunder, J.M. (2001). Changes of skeletal muscle in young dystrophin-deficient cats: a morphological and morphometric study. *Acta Neuropathol.* *101*, 591–600.
- Gaschen, F., Hoffman, E., Gorospe, J.R., Uhl, E., Senior, D., Cardinet, G., and Pearce, L. (1992). Dystrophin deficiency causes lethal muscle hypertrophy in cats. *J. Neurol. Sci.* *110*, 149–159.
- 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*, 2857–2866.
- Germani, A., Di Carlo, A., Mangoni, A., Straino, S., Giacinti, C., Turrini, P., Biglioli, P., and Capogrossi, M.C. (2003). Vascular endothelial growth factor modulates skeletal myoblast function. *Am J Pathol.* *163*, 1417–1428.
- Gharaibeh, B., Lu, A., Tebbets, J., Zheng, B., Feduska, J., Crisan, M., Péault, B., Cummins, J., and Huard, J. (2008). Isolation of a slowly adhering cell fraction containing stem

- cells from murine skeletal muscle by the preplate technique. *Nat. Protoc.* *3*, 1501–1509.
- Gieseler, K., Grisoni, K., and Ségalat, L. (2000). Genetic suppression of phenotypes arising from mutations in dystrophin-related genes in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.* *10*, 1092–1097.
- Gissel, H. (2005). The role of Ca²⁺ in muscle cell damage. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1066*, 166–180.
- Glass, D.J. (2005). Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol* *37*, 1974–1984.
- Gnecchi, M., He, H., Noiseux, N., Liang, O.D., Zhang, L., Morello, F., Mu, H., Melo, L.G., Pratt, R.E., Ingwall, J.S., et al. (2006). Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J.* *20*, 661–669.
- Goemans, N., and Buyse, G. (2014). Current treatment and management of dystrophinopathies. *Curr. Treat. Options Neurol.* *16*.
- Goemans, N., Tulinius, M., van den Akker, J.T., Burm, B.E., Ekhardt, P.F., Heuvelmans, N., Holling, T., Janson, A.A., Platenburg, G.J., Sipkens, J.A., et al. (2011). Systemic Administration of PR0051 in Duchenne’s Muscular Dystrophy. *N Engl J Med* *364*, 1513–1522.
- Goemans, N.M., Tulinius, M., van den Hauwe, M., Kroksmark, A.-K., Buyse, G., Wilson, R.J., van Deutekom, J.C., de Kimpe, S.J., Loubakos, A., and Campion, G. (2016). Long-Term Efficacy, Safety, and Pharmacokinetics of Drisapersen in Duchenne Muscular Dystrophy: Results from an Open-Label Extension Study. *PLoS One* *11*, e0161955.
- Gonçalves, M.A.F. V, de Vries, A.A.F., Holkers, M., van de Watering, M.J.M., van der Velde, I., van Nierop, G.P., Valerio, D., and Knaän-Shanzer, S. (2006). Human mesenchymal stem cells ectopically expressing full-length dystrophin can complement Duchenne muscular dystrophy myotubes by cell fusion. *Hum. Mol. Genet.* *15*, 213–221.
- 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*, 1797–1806.
- Goudenege, S.S., Lebel, C., Huot, N.B., Dufour, C., Fujii, I., Gekas, J., Rousseau, J.J., and Tremblay, J.P. (2012). Myoblasts Derived From Normal hESCs and Dystrophic hiPSCs Efficiently Fuse With Existing Muscle Fibers Following Transplantation. *Mol. Ther.* *20*, 2153–2167.
- Goyenvalle, A., Vulin, A., Fougereuse, F., Leturcq, F., Kaplan, J.-C., Garcia, L., and Danos, O. (2004). Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science* *306*, 1796–1799.
- Goyenvalle, A., Babbs, A., van Ommen, G.-J.B., Garcia, L., and Davies, K.E. (2009). Enhanced exon-skipping induced by U7 snRNA carrying a splicing silencer sequence: Promising tool for DMD therapy. *Mol. Ther.* *17*, 1234–1240.
- Goyenvalle, A., Griffith, G., Babbs, A., Andaloussi, S. El, Ezzat, K., Avril, A., Dugovic, B., Chaussonot, R., Ferry, A., Voit, T., et al. (2015). Functional correction in mouse models of muscular dystrophy using exon-skipping tricyclo-DNA oligomers. *Nat. Med.* *21*, 270–275.
- Grady, R.M., Teng, H., Nichol, M.C., Cunningham, J.C., Wilkinson, R.S., and Sanest, J.R. (1997). Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin: A model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* *90*, 729–738.

- Grady, R.M., Grange, R.W., Lau, K.S., Maimone, M.M., Nichol, M.C., Stull, J.T., and Sanes, J.R. (1999). Role for alpha-dystrobrevin in the pathogenesis of dystrophin-dependent muscular dystrophies. *Nat Cell Biol* 1, 215–220.
- Greener, M.J., and Roberts, R.G. (2000). Conservation of components of the dystrophin complex in *Drosophila*. *FEBS Lett.* 482, 13–18.
- 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, 2263–2272.
- Gregorevic, P., Blankinship, M.J., Allen, J.M., Crawford, R.W., Meuse, L., Miller, D.G., Russell, D.W., and Chamberlain, J.S. (2004). Systemic delivery of genes to striated muscles using adeno-associated viral vectors. *Nat. Med.* 10, 828–834.
- Gregorevic, P., Allen, J.M., Minami, E., Blankinship, M.J., Haraguchi, M., Inn, E., Adams, M.E., Froehner, S.C., Murry, C.E., and Chamberlain, J.S. (2006). Systemic delivery of rAAV6-microdystrophin preserves muscle function and extends lifespan in a murine model of severe muscular dystrophy. *Nat. Med.* 12, 787–789.
- Griggs, R.C., Miller, J.P., Greenberg, C.R., Fehlings, D.L., Pestronk, A., Mendell, J.R., Moxley III, R.T., King, W., Kissel, J.T., Cwik, V., et al. (2016). Efficacy and safety of deflazacort vs prednisone and placebo for Duchenne muscular dystrophy. *Am. Acad. Neurol.* 87, 1–9.
- Grisoni, K., Gieseler, K., Mariol, M.C., Martin, E., Carre-Pierrat, M., Moulder, G., Barstead, R., and Ségalat, L. (2003). The *stn-1* syntrophin gene of *C. elegans* is functionally related to dystrophin and dystrobrevin. *J. Mol. Biol.* 332, 1037–1046.
- Guérette, B., Asselin, I., Skuk, D., Entman, M., and Tremblay, J.P. (1997). Control of inflammatory damage by anti-LFA-1: Increase success of myoblast transplantation. *Cell Transplant.* 6, 101–107.
- Guiraud, S., Squire, S.E., Edwards, B., Chen, H., Burns, D.T., Shah, N., Babbs, A., Davies, S.G., Wynne, G.M., Russell, A.J., et al. (2015). Second-generation compound for the modulation of utrophin in the therapy of DMD. *Hum. Mol. Genet.* 24, 4212–4224.
- Guo, C., Willem, M., Werner, A., Raivich, G., Emerson, M., Neyses, L., and Mayer, U. (2006). Absence of $\alpha 7$ integrin in dystrophin-deficient mice causes a myopathy similar to Duchenne muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 15, 989–998.
- Guo, J., Lin, G., Bao, C., Hu, Z., and Hu, M. (2007). Anti-inflammation role for mesenchymal stem cells transplantation in myocardial infarction. *Inflammation* 30, 97–104.
- Gussoni, E., Pavlath, G.K., Lanctot, A.M., Sharma, K.R., Miller, R.G., Steinman, L., and Blau, H.M. (1992). Normal dystrophin transcripts detected in Duchenne muscular dystrophy patients after myoblast transplantation. *Nature* 356, 435–438.
- Gussoni, E., Soneoka, Y., Strickland, C.D., Buzney, E.A., Khan, M.K., Flint, A.F., Kunkel, L.M., and Mulligan, R.C. (1999). Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401, 390–394.
- Gustafsson, M. V., Zheng, X., Pereira, T., Gradin, K., Jin, S., Lundkvist, J., Ruas, J.L., Poellinger, L., Lendahl, U., and Bondesson, M. (2005). Hypoxia requires Notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev. Cell* 9, 617–628.
- Gutierrez-Aranda, I., Ramos-Mejia, V., Bueno, C., Munoz-Lopez, M., Real, P.J., M??cia, A., Sanchez, L., Ligerio, G., Garcia-Perez, J.L., and Menendez, P. (2010). Human induced pluripotent stem cells develop teratoma more efficiently and faster than human embryonic stem cells regardless the site of injection. *Stem Cells* 28, 1568–1570.
- Guttridge, D.C., Mayo, M.W., Madrid, L. V, Wang, C.Y., and Baldwin, a S. (2000). NF-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and

- cachexia. *Science* (80-.). *289*, 2363–2366.
- Guyon, J.R., Mosley, A.N., Zhou, Y., O'Brien, K.F., Sheng, X., Chiang, K., Davidson, A.J., Volinski, J.M., Zon, L.I., and Kunkel, L.M. (2003). The dystrophin associated protein complex in zebrafish. *Hum. Mol. Genet.* *12*, 601–615.
- Hafner, P., Bonati, U., Erne, B., Schmid, M., Rubino, D., Pohlman, U., Peters, T., Rutz, E., Frank, S., Neuhaus, C., et al. (2016). Improved muscle function in duchenne muscular dystrophy through l-arginine and metformin: An investigator-initiated, open-label, single-center, proof-of-concept-study. *PLoS One* *11*, 1–19.
- Hamada, K., Taguchi, A., Kotake, M., Aita, S., Murakami, S., Takayama, K., Yakushiji, F., and Hayashi, Y. (2015). Structure–Activity Relationship Studies of 3-epi-Deoxynegamycin Derivatives as Potent Readthrough Drug Candidates. *ACS Med. Chem. Lett.* 150515135318002.
- Han, K.H., Ro, H., Hong, J.H., Lee, E.M., Cho, B., Yeom, H.J., Kim, M.-G., Oh, K.-H., Ahn, C., and Yang, J. (2011). Immunosuppressive mechanisms of embryonic stem cells and mesenchymal stem cells in alloimmune response. *Transpl. Immunol.* *25*, 7–15.
- Haraguchi, Y., Shimizu, T., Yamato, M., and Okano, T. (2012). Concise review: cell therapy and tissue engineering for cardiovascular disease. *Stem Cells Transl. Med.* *1*, 136–141.
- Hare, J.M., Fishman, J.E., Gerstenblith, G., DiFede Velazquez, D.L., Zambrano, J.P., Suncion, V.Y., Tracy, M., Ghersin, E., Johnston, P. V, Brinker, J.A., et al. (2012). Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow–derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial. *Jama* *308*, 2369–2379.
- Harper, S.Q., Hauser, M.A., DelloRusso, C., Duan, D., Crawford, R.W., Phelps, S.F., Harper, H. a, Robinson, A.S., Engelhardt, J.F., Brooks, S. V, et al. (2002). Modular flexibility of dystrophin: implications for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Nat. Med.* *8*, 253–261.
- Hatzistergos, K.E., Quevedo, H., Oskouei, B.N., Hu, Q., Feigenbaum, G.S., Margitich, I.S., Mazhari, R., Boyle, A.J., Zambrano, J.P., Rodriguez, J.E., et al. (2010). Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation. *Circ. Res.* *107*, 913–922.
- Hawke, T., and Garry, D. (2001). Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* *91*, 534–551.
- Heemskerk, H., de Winter, C., van Kuik, P., Heuvelmans, N., Sabatelli, P., Rimessi, P., Braghetta, P., van Ommen, G.-J.B., de Kimpe, S., Ferlini, A., et al. (2010). Preclinical PK and PD studies on 2'-O-methyl-phosphorothioate RNA antisense oligonucleotides in the mdx mouse model. *Mol. Ther.* *18*, 1210–1217.
- Heier, C.R., Damsker, J.M., Yu, Q., Dillingham, B.C., Huynh, T., Van der Meulen, J.H., Sali, A., Miller, B.K., Phadke, A., Scheffer, L., et al. (2013). VBP15, a novel anti-inflammatory and membrane-stabilizer, improves muscular dystrophy without side effects. *EMBO Mol. Med.* *5*, 1569–1585.
- Higuchi, M., Honda, T., Proske, R.J., and Yeh, E.T. (1998). Regulation of reactive oxygen species-induced apoptosis and necrosis by caspase 3-like proteases. *Oncogene* *17*, 2753–2760.
- Hockemeyer, D., Wang, H., Kiani, S., Lai, C.S., Gao, Q., John, P., Cost, G.J., Zhang, L., Santiago, Y., Miller, J.C., et al. (2012). Genetic engineering of human ES and iPS cells using TALE nucleases. *Nat Biotechnol* *29*, 731–734.
- Hoffman, E.P., Brown, R.H., and Kunkel, L.M. (1987). Dystrophin: The protein product of the duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* *51*, 919–928.

- 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, 422–426.
- Huard, J., Verreault, S., Roy, R., Tremblay, M., and Tremblay, J.P. (1994). High efficiency of muscle regeneration after human myoblast clone transplantation in SCID mice. *J. Clin. Invest.* 93, 586–599.
- Huntington N.D. and Di Santo J.P. (2008) Humanized immune system (HIS) mice as a tool to study human NK cell development. *Curr Top Microbiol Immunol.* 324, 109–124.
- Ichim, T.E., Alexandrescu, D.T., Solano, F., Lara, F., Champion, R.D.N., Paris, E., Woods, E.J., Murphy, M.P., Dasanu, C.A., Patel, A.N., et al. (2010). Mesenchymal stem cells as anti-inflammatories: Implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Cell. Immunol.* 260, 75–82.
- Im, W.B., Phelps, S.F., Copen, E.H., Adams, E.G., Slightom, J.L., and Chamberlain, J.S. (1996). Differential expression of dystrophin isoforms in strains of mdx mice with different mutations. *Hum. Mol. Genet.* 5, 1149–1153.
- Isaac, C., Wright, A., Usas, A., Li, H., Tang, Y., Mu, X., Greco, N., Dong, Q., Vo, N., Kang, J., et al. (2013). Dystrophin and utrophin “double knockout” dystrophic mice exhibit a spectrum of degenerative musculoskeletal abnormalities. *J. Orthop. Res.* 31, 343–349.
- Itagaki, Y., Saida, K., and Iwamura, K. (1995). Regenerative capacity of mdx mouse muscles after repeated applications of myo-necrotic bupivacaine. *Acta Neuropathol.* 89, 380–384.
- Ito, H., Hallauer, P.L., Hastings, K.E.M., and Tremblay, J.P. (1998). Prior culture with concanavalin a increases intramuscular migration of transplanted myoblast. *Muscle and Nerve* 21, 291–297.
- Iwańczak, F., Stawarski, A., Potyrała, M., Siedlecka-Dawidko, J., and Agrawal, G.S. (2000). Early symptoms of Duchenne muscular dystrophy - Description of cases of an 18-month-old and an 8-year-old patient. *Med. Sci. Monit.* 6, 592–595.
- Jacobson, S., Heuts, F., Juarez, J., Hultcrantz, M., Korsgren, O., Svensson, M., Rottenberg, M., and Flodström-Tullberg, M. (2010). Alloreactivity but failure to reject human islet transplants by humanized balb/c/Rag2^{-/-}gc^{-/-} mice. *Scand. J. Immunol.* 71, 83–90.
- Jankowski, R., Deasy, B., and Huard, J. (2002a). Muscle-derived stem cells. *Gene Ther.* 9, 642–647.
- Jankowski, R.J., Haluszczak, C., Trucco, M., and 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.
- Jankowski, R.J., Deasy, B.M., Cao, B., Gates, C., and Huard, J. (2002b). The role of CD34 expression and cellular fusion in the regeneration capacity of myogenic progenitor cells. *J. Cell Sci.* 115, 4361–4374.
- Janssen, P.M.L., Hiranandani, N., Mays, T. a, and Rafael-Fortney, J. a (2005). Utrophin deficiency worsens cardiac contractile dysfunction present in dystrophin-deficient mdx mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 289, H2373–H2378.
- Jean, E., Laoudj-Chenivresse, D., Notarnicola, C., Rouger, K., Serratrice, N., Bonniou, A., Gay, S., Bacou, F., Duret, C., and Carnac, G. (2011). Aldehyde dehydrogenase activity promotes survival of human muscle precursor cells. *J. Cell. Mol. Med.* 15, 119–133.

- Jearawiriyapaisarn, N., Moulton, H.M., Buckley, B., Roberts, J., Fucharoen, S., Iversen, P.L., and Kole, R. (2008). Sustained Dystrophin Expression Induced by Peptide-conjugated Morpholino Oligomers in the Muscles of mdx Mice. *Mol. Ther.* *16*, 1624–1629.
- Jefferies, J.L., Eidem, B.W., Belmont, J.W., Craigen, W.J., Ware, S.M., Fernbach, S.D., Neish, S.R., Smith, E.O.B., and Towbin, J.A. (2005). Genetic predictors and remodeling of dilated cardiomyopathy in muscular dystrophy. *Circulation* *112*, 2799–2804.
- Jirka, S.M.G., Tanganyika-de Winter, C.L., Boertje-van der Meulen, J.W., van Putten, M., Hiller, M., Vermue, R., de Visser, P.C., and Aartsma-Rus, A. (2015). Evaluation of 2'-Deoxy-2'-fluoro Antisense Oligonucleotides for Exon Skipping in Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol. Ther. Nucleic Acids* *4*, e265.
- Jones, B.J., Brooke, G., Atkinson, K., and McTaggart, S.J. (2007). Immunosuppression by placental indoleamine 2,3-dioxygenase: a role for mesenchymal stem cells. *Placenta* *28*, 1174–1181.
- Karantalis, V., Schulman, I., Balkan, W., and Hare, J. (2015). Allogeneic Cell Therapy: A New Paradigm in Therapeutics Vasileios. *Circ Res* *116*, 12–15.
- 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.
- Katare, R., Riu, F., Mitchell, K., Gubernator, M., Campagnolo, P., Cui, Y., Fortunato, O., Avolio, E., Cesselli, D., Beltrami, A.P., et al. (2011). Transplantation of human pericyte progenitor cells improves the repair of infarcted heart through activation of an angiogenic program involving micro-RNA-132. *Circ. Res.* *109*, 894–906.
- Kayali, R., Ku, J.M., Khitrov, G., Jung, M.E., Prikhodko, O., and Bertoni, C. (2012). Read-through compound 13 restores dystrophin expression and improves muscle function in the MDX mouse model for duchenne muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* *21*, 4007–4020.
- Kazuki, Y., Hiratsuka, M., Takiguchi, M., Osaki, M., Kajitani, N., Hoshiya, H., Hiramatsu, K., Yoshino, T., Kazuki, K., Ishihara, C., et al. (2010). Complete genetic correction of ips cells from Duchenne muscular dystrophy. *Mol. Ther.* *18*, 386–393.
- Kemaladewi, D.U., Hoogaars, W.M.H., van Heiningen, S.H., Terlouw, S., de Gorter, D.J.J., den Dunnen, J.T., van Ommen, G.J.B., Aartsma-Rus, A., ten Dijke, P., and 't Hoen, P.A.C. (2011). Dual exon skipping in myostatin and dystrophin for Duchenne muscular dystrophy. *BMC Med. Genomics* *4*, 36.
- Kerkis, I., Kerkis, A., Dozortsev, D., Stukart-Parsons, G.C.G.C., Massironi, S.M.G., Pereira, L. V, Caplan, A.I., Cerruti, H.F., Gomes Massironi, S.M., Pereira, L. V, et al. (2006). Isolation and Characterization of a Population of Immature Dental Pulp Stem Cells Expressing OCT-4 and Other Embryonic Stem Cell Markers. *Cells. Tissues. Organs* *184*, 105–116.
- Kerkis, I., Ambrosio, C.E., Kerkis, A., Martins, D.S., Zucconi, E., Fonseca, S.A.S., Cabral, R.M., Maranduba, C.M.C., Gaiad, T.P., Morini, A.C., et al. (2008). Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: Local or systemic? *J. Transl. Med.* *6*, 35.
- Khurana, T.S., and Davies, K.E. (2003). Pharmacological strategies for muscular dystrophy. *Nat. Rev. Drug Discov.* *2*, 379–390.
- Kim, J., and Hematti, P. (2009). Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. *Exp. Hematol.* *37*, 1445–1453.
- Kimura, E., Li, S., Gregorevic, P., Fall, B.M., and Chamberlain, J.S. (2010). Dystrophin

- delivery to muscles of mdx mice using lentiviral vectors leads to myogenic progenitor targeting and stable gene expression. *Mol. Ther.* *18*, 206–213.
- Kinali, M., Arechavala-Gomez, V., Feng, L., Cirak, S., Hunt, D., Adkin, C., Guglieri, M., Ashton, E., Abbs, S., Nihoyannopoulos, P., et al. (2009). Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy: a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of-concept study. *Lancet Neurol.* *8*, 918–928.
- Kinnaird, T., Burnett, E.S., Shou, M., Lee, C.W., Barr, S., Fuchs, S., and Epstein, S.E. (2004). Local Delivery of Marrow-Derived Stromal Cells Augments Collateral Perfusion Through Paracrine Mechanisms. *Circulation* *109*, 1543–1549.
- Kirschner, J., Schessl, J., Schara, U., Reitter, B., Stettner, G.M., Hobbiebrunken, E., Wilichowski, E., Bernert, G., Weiss, S., Stehling, F., et al. (2010). Treatment of Duchenne muscular dystrophy with ciclosporin A: A randomised, double-blind, placebo-controlled multicentre trial. *Lancet Neurol.* *9*, 1053–1059.
- Kirschstein, R., and Skirboll, L. (2001). Stem cells: scientific progress and future directions. *Natl. Institutes Heal.* *222*.
- Kleopa, K.A., Drousiotou, A., Mavrikiou, E., Ormiston, A., and Kyriakides, T. (2006). Naturally occurring utrophin correlates with disease severity in Duchenne muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* *15*, 1623–1628.
- Klietsch, R., Ervasti, J.M., Arnold, W., Campbell, K.P., and Jorgensen, A.O. (1993). Dystrophin-glycoprotein complex and laminin colocalize to the sarcolemma and transverse tubules of cardiac muscle. *Circ Res* *72*, 349–360.
- Klymiuk, N., Blutke, A., Graf, A., Krause, S., Burkhardt, K., Wuensch, A., Krebs, S., Kessler, B., Zakhartchenko, V., Kurome, M., et al. (2013). Dystrophin-deficient pigs provide new insights into the hierarchy of physiological derangements of dystrophic muscle. *Hum. Mol. Genet.* *22*, 4368–4382.
- Kobinger, G.P., Louboutin, J.-P., Barton, E.R., Sweeney, H.L., and Wilson, J.M. (2003). Correction of the dystrophic phenotype by in vivo targeting of muscle progenitor cells. *Hum. Gene Ther.* *14*, 1441–1449.
- Koch, T.G., Berg, L.C., and Betts, D.H. (2009). Current and future regenerative medicine - principles, concepts, and therapeutic use of stem cell therapy and tissue engineering in equine medicine. *Can. Vet. J.* *50*, 155–165.
- Koenig, M., Hoffman, E.P., Bertelson, C.J., Monaco, A.P., Feener, C., and Kunkel, L.M. (1987). Complete cloning of the duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* *50*, 509–517.
- Koenig, M., Monaco, A.P., and Kunkel, L.M. (1988). The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* *53*, 219–228.
- Koenig, M., Beggs, A.H., Moyer, M., Scherpf, S., Heindrich, K., Bettecken, T., Meng, G., Müller, C.R., Lindlöf, M., and Kaariainen, H. (1989). The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am. J. Hum. Genet.* *45*, 498–506.
- Kole, R., and Krieg, A.M. (2015). Exon skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *87*, 104–107.
- Koo, T., Okada, T., Athanasopoulos, T., Foster, H., Takeda, S., and Dickson, G. (2011). Long-term functional adeno-associated virus- microdystrophin expression in the dystrophic CXMDj dog. *J. Gene Med.* *13*, 497–506.
- Kornegay, J.N., Tuler, S.M., Miller, D.M., and Levesque, D.C. (1988). Muscular dystrophy in a litter of golden retriever dogs. *Muscle Nerve* *11*, 1056–1064.

- Kornegay, J.N., Bogan, D.J., Bogan, J.R., Childers, M.K., Cundiff, D.D., Petroski, G.F., and Schueler, R.O. (1999). Contraction force generated by tarsal joint flexion and extension in dogs with golden retriever muscular dystrophy. *J. Neurol. Sci.* *166*, 115–121.
- Kornegay, J.N., Cundiff, D.D., Bogan, D.J., Bogan, J.R., and Okamura, C.S. (2003). The cranial sartorius muscle undergoes true hypertrophy in dogs with golden retriever muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* *13*, 493–500.
- Kornegay, J.N., Li, J., Bogan, J.R., Bogan, D.J., Chen, C., Zheng, H., Wang, B., Qiao, C., Howard, J.F., and Xiao, X. (2010). Widespread muscle expression of an AAV9 human mini-dystrophin vector after intravenous injection in neonatal dystrophin-deficient dogs. *Mol. Ther.* *18*, 1501–1508.
- Kottlors, M., and Kirschner, J. (2010). Elevated satellite cell number in Duchenne muscular dystrophy. *Cell Tissue Res.* *340*, 541–548.
- Kozakowska, M., Pietraszek-Gremplewicz, K., Jozkowicz, A., and Dulak, J. (2016). The role of oxidative stress in skeletal muscle injury and regeneration: focus on antioxidant enzymes. *J. Muscle Res. Cell Motil.* *36*, 1–17.
- Krampera, M., Cosmi, L., Angeli, R., Pasini, A., Liotta, F., Andreini, A., Santarlasci, V., Mazzinghi, B., Pizzolo, G., Vinante, F., et al. (2006). Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* *24*, 386–398.
- Kuang, S., Kuroda, K., Le Grand, F., and Rudnicki, M. (2007). Asymmetric Self-Renewal and Commitment of Satellite Stem Cells in Muscle. *Cell* *129*, 999–1010.
- Kuhr, C.S., Lupu, M., and Storb, R. (2007). Hematopoietic Cell Transplantation Directly into Dystrophic Muscle Fails to Reconstitute Satellite Cells and Myofibers. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *13*, 886–888.
- Kumar V., Abbas A.K. and Fausto N. (2005) Cellular adaptations, cell injury and cell death. *In "Robbins and Cotran Pathologic basis of disease"* (V Kumar, AK Abbas and N Fausto, Eds), pp. 3-46. Elsevier Saunders, Philadelphia
- 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.
- Lanfossi, M., Cozzi, F., Bugini, D., Colombo, S., Scarpa, P., Morandi, L., Galbiati, S., Cornelio, F., Pozza, O., and Mora, M. (1999). Development of muscle pathology in canine X-linked muscular dystrophy. I. Delayed postnatal maturation of affected and normal muscle as revealed by myosin isoform analysis and utrophin expression. *Acta Neuropathol.* *97*, 127–138.
- Lapidos, K.A., Chen, Y., Earley, J., Heydemann, A., Huber, J., Chien, M., Ma, A., and McNally, E. (2004). Transplanted hematopoietic stem cells demonstrate impaired sarcoglycan expression after engraftment into cardiac and skeletal muscle. *J Clin Invest* *114*, 1577–1585.
- Larcher, T. (2012). Thérapie cellulaire de la dystrophie musculaire de Duchenne. Efficacité de l'administration systémique de cellules souches musculaires (MuStem) allogéniques dans le modèle canin GRMD.
- Larcher, T., Lafoux, A., Tesson, L., Remy, S.V., Thepenier, V., François, V., Guiner, C. Le, Goubin, H., Dutilleul, M.V., Guigand, L., et al. (2014). Characterization of dystrophin deficient rats: A new model for duchenne muscular dystrophy. *PLoS One* *9*.
- Lardenois, A., Jagot, S., Lagarrigue, M., Guével, B., Ledevin, M., Larcher, T., Dubreil, L., Pineau, C., Rouger, K., and Guével, L. (2016). Quantitative proteome profiling of

- dystrophic dog skeletal muscle reveals a stabilized muscular architecture and protection against oxidative stress after systemic delivery of MuStem cells. *Proteomics* 16, 2028–2042.
- Larocca, R.A., Moraes-Vieira, P.M., Bassi, E.J., Semedo, P., de Almeida, D.C., da Silva, M.B., Thornley, T., Pacheco-Silva, A., and Câmara, N.O.S. (2013). Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells increase skin allograft survival and inhibit Th-17 immune response. *PLoS One* 8, e76396.
- Lavasani, M., Lu, A., Thompson, S., Robbins, P., Huard, J., and Niedernhofer, L. (2013). Isolation of Muscle-Derived Stem/Progenitor Cells based on adhesion characteristics to collagen-coated surfaces. *Methods Mol Biol* 976, 53–65.
- Law, P.K., Goodwin, T.G., and Wang, M.G. (1988). Normal myoblast injections provide genetic treatment for murine dystrophy. *Muscle Nerve* 11, 525–533.
- Lawler, J.M. (2011). Exacerbation of pathology by oxidative stress in respiratory and locomotor muscles with Duchenne muscular dystrophy. *J. Physiol.* 589, 2161–2170.
- Le Blanc, K., Tammki, L., Sundberg, B., Haynesworth, S.E., and Ringden, O. (2003). Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic response independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol* 57, 11–20.
- Le Blanc, K., Rasmusson, I., Sundberg, B., Götherström, C., Hassan, M., Uzunel, M., and Ringdén, O. (2004). Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet (London, England)* 363, 1439–1441.
- Le Guiner, C., Montus, M., Servais, L., Cherel, Y., Francois, V., Thibaud, J.-L., Wary, C., Matot, B., Larcher, T., Guigand, L., et al. (2014). Forelimb treatment in a large cohort of dystrophic dogs supports delivery of a recombinant AAV for exon skipping in Duchenne patients. *Mol. Ther.* 22, 1923–1935.
- Le Rumeur, E., Winder, S.J., and Hubert, J.F. (2010). Dystrophin: More than just the sum of its parts. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1804, 1713–1722.
- Lee H.J., Kang K.S., Kang S.Y., Kim H.S., Park S.J., Lee S.Y., Kim K.D., Lee H.C., Park J.K., Paik W.Y. et al. (2016) Immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood. *J Vet Sci.* 3, 289-97
- 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, 1085–1099.
- Lee, S.M., Lee, S.C., and Kim, S.-J. (2014). Contribution of human adipose tissue-derived stem cells and the secretome to the skin allograft survival in mice. *J. Surg. Res.* 188, 280–289.
- Lefaucheur, J.P., Pastoret, C., and Sebille, A. (1995). Phenotype of dystrophinopathy in old mdx mice. *Anat. Rec.* 242, 70–76.
- Leturcq, F., and Tuffery-Giraud, S. (2015). Aspects génétiques et moléculaires des dystrophinopathies. *Arch. Pédiatrie* 22, S12S3–S12S11.
- Li, C., Li, G., Liu, M., Zhou, T., and Zhou, H. (2016). Paracrine effect of inflammatory cytokine-activated bone marrow mesenchymal stem cells and its role in osteoblast function. *J. Biosci. Bioeng.* 121, 213–219.
- Li, D., Yue, Y., and Duan, D. (2008). Preservation of muscle force in Mdx3cv mice correlates with low-level expression of a near full-length dystrophin protein. *Am.*

- J. Pathol. 172, 1332–1341.
- Li, H., Mittal, A., Makonchuk, D.Y., Bhatnagar, S., and Kumar, A. (2009). Matrix metalloproteinase-9 inhibition ameliorates pathogenesis and improves skeletal muscle regeneration in muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 18, 2584–2598.
- Li, H.L., Fujimoto, N., Sasakawa, N., Shirai, S., Ohkame, T., Sakuma, T., Tanaka, M., Amano, N., Watanabe, A., Sakurai, H., et al. (2015). Precise correction of the dystrophin gene in duchenne muscular dystrophy patient induced pluripotent stem cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem Cell Reports* 4, 143–154.
- Li, Y., Foster, W., Deasy, B.M., Chan, Y., Prisk, V., Tang, Y., Cummins, J., and Huard, J. (2004). Transforming growth factor-beta1 induces the differentiation of myogenic cells into fibrotic cells in injured skeletal muscle: a key event in muscle fibrogenesis. *Am. J. Pathol.* 164, 1007–1019.
- Liu, S., Yuan, M., Hou, K., Zhang, L., Zheng, X., Zhao, B., Sui, X., Xu, W., Lu, S., and Guo, Q. (2012a). Immune characterization of mesenchymal stem cells in human umbilical cord Wharton's jelly and derived cartilage cells. *Cell. Immunol.* 278, 35–44.
- Liu, W., Wen, Y., Bi, P., Lai, X., Liu, X.S., Liu, X., and Kuang, S. (2012b). Hypoxia promotes satellite cell self-renewal and enhances the efficiency of myoblast transplantation. *Development* 139, 2857–2865.
- Liu, Y., Yan, X., Sun, Z., Chen, B., Han, Q., Li, J., and Zhao, R.C. (2007). Flk-1+ adipose-derived mesenchymal stem cells differentiate into skeletal muscle satellite cells and ameliorate muscular dystrophy in mdx mice. *Stem Cells Dev* 16, 695–706.
- Lu, L., Liu, Y., Yang, S., Zhao, Q., Wang, X., Gong, W., Han, Z., Xu, Z., Lu, Y., Liu, D., et al. (2006). Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica* 91, 1017–1026.
- Lund, T.C., Grange, R.W., and Lowe, D.A. (2007). Telomere shortening in diaphragm and tibialis anterior muscles of aged mdx mice. *Muscle and Nerve* 36, 387–390.
- Luz, M.A.M., Marques, M.J., and Santo Neto, H. (2002). Impaired regeneration of dystrophin-deficient muscle fibers is caused by exhaustion of myogenic cells. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 35, 691–695.
- 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. *111*, 71–79.
- Malerba, A., Sharp, P.S., Graham, I.R., Arechavala-Gomez, V., Foster, K., Muntoni, F., Wells, D.J., and Dickson, G. (2011). Chronic systemic therapy with low-dose morpholino oligomers ameliorates the pathology and normalizes locomotor behavior in mdx mice. *Mol. Ther.* 19, 345–354.
- Malerba, A., Kang, J.K., McClorey, G., Saleh, A.F., Popplewell, L., Gait, M.J., Wood, M.J., and Dickson, G. (2012). Dual Myostatin and Dystrophin Exon Skipping by Morpholino Nucleic Acid Oligomers Conjugated to a Cell-penetrating Peptide Is a Promising Therapeutic Strategy for the Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 1, e62.
- Malik, V., Rodino-Klapac, L.R., Viollet, L., Wall, C., King, W., Al-Dahhak, R., Lewis, S., Shilling, C.J., Kota, J., Serrano-Munuera, C., et al. (2010). Gentamicin-induced readthrough of stop codons in Duchenne muscular dystrophy. *Ann. Neurol.* 67, 771–780.
- Mallouk, N., Jacquemond, V., and Allard, B. (2000). Elevated subsarcolemmal Ca²⁺ in mdx mouse skeletal muscle fibers detected with Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 4950–4955.

- Mansouri, A., and Gruss, P. (1998). Pax3 and Pax7 are expressed in commissural neurons and restrict ventral neuronal identity in the spinal cord. *Mech. Dev.* 78, 171–178.
- Manzur, A.Y., Kuntzer, T., Pike, M., and Swan, A. (2008). Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy. *Cochrane Database Syst Rev* CD003725.
- Markham, L.W., Kinnett, K., Wong, B.L., Woodrow Benson, D., and Cripe, L.H. (2008). Corticosteroid treatment retards development of ventricular dysfunction in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* 18, 365–370.
- Martin, E.A., Barresi, R., Byrne, B.J., Tsimerinov, E.I., Scott, B.L., Walker, A.E., Gurudevan, S. V, Anene, F., Elashoff, R.M., Thomas, G.D., et al. (2012). Tadalafil alleviates muscle ischemia in patients with Becker muscular dystrophy. *Sci. Transl. Med.* 4, 162ra155.
- Mason, C., and Dunnill, P. (2009). Assessing the value of autologous and allogeneic cells for regenerative medicine. *Regen. Med.* 4, 835–853.
- Massagué, J., Cheifetz, S., Endo, T., and Nadal-Ginard, B. (1986). Type beta transforming growth factor is an inhibitor of myogenic differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 8206–8210.
- Mauro, A. (1961). Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9, 493–495.
- McAdam, L.C., Mayo, A.L., Alman, B. a, and Biggar, W.D. (2012). The Canadian experience with long-term deflazacort treatment in Duchenne muscular dystrophy. *Acta Myol.* 31, 16–20.
- 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.
- 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, 1341–1346.
- 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, 806–814.
- Megoney, L.A., Kablar, B., Garrett, K., Anderson, J.E., and Rudnicki, M. a (1996). MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. *Genes Dev.* 10, 1173–1183.
- Megoney, L.A., Kablar, B., Perry, R.L., Ying, C., May, L., and Rudnicki, M.A. (1999). Severe cardiomyopathy in mice lacking dystrophin and MyoD. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 220–225.
- Melief, S.M., Schrama, E., Brugman, M.H., Tiemessen, M.M., Hoogduijn, M.J., Fibbe, W.E., and Roelofs, H. (2013). Multipotent stromal cells induce human regulatory T cells through a novel pathway involving skewing of monocytes toward anti-inflammatory macrophages. *Stem Cells* 31, 1980–1991.
- Mendell, J.R., Kissel, J.T., Amato, a a, King, W., Signore, L., Prior, T.W., Sahenk, Z., Benson, S., McAndrew, P.E., and Rice, R. (1995). Myoblast transfer in the treatment of Duchenne’s muscular dystrophy. *N. Engl. J. Med.* 333, 832–838.
- Mendell, J.R., Goemans, N., Lowes, L.P., Alfano, L.N., Berry, K., Shao, J., Kaye, E.M., and Mercuri, E. (2016). Longitudinal effect of eteplirsen versus historical control on ambulation in Duchenne muscular dystrophy. *Ann. Neurol.* 79, 257–271.
- Meng, J., Muntoni, F., and Morgan, J.E. (2011a). Stem cells to treat muscular dystrophies - Where are we? *Neuromuscul. Disord.* 21, 4–12.
- Meng, J., Adkin, C.F., Xu, S., Muntoni, F., and Morgan, J.E. (2011b). Contribution of human

- muscle-derived cells to skeletal muscle regeneration in dystrophic host mice. *PLoS One* 6, e17454.
- Meng, J., Chun, S., Asfahani, R., Lochmüller, H., Muntoni, F., and Morgan, J. (2014). Human Skeletal Muscle-derived CD133+ Cells Form Functional Satellite Cells After Intramuscular Transplantation in Immunodeficient Host Mice. *Mol. Ther.* 22, 1008–1017.
- Meng, J., Bencze, M., Asfahani, R., Muntoni, F., and Morgan, J.E. (2015). The effect of the muscle environment on the regenerative capacity of human skeletal muscle stem cells. *Skelet. Muscle* 5, 11.
- Meng, J., Counsell, J.R., Reza, M., Laval, S.H., Danos, O., Thrasher, A., Lochmueller, H., Muntoni, F., Morgan, J.E., Lochmüller, H., et al. (2016). Autologous skeletal muscle derived cells expressing a novel functional dystrophin provide a potential therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *Sci. Rep.* 6, 19750.
- Meregalli, M., Farini, A., and Torrente, Y. (2008). Combining stem cells and exon skipping strategy to treat muscular dystrophy. *Expert Opin Biol Ther* 8, 1051–1061.
- Meregalli, M., Farini, A., Colleoni, F., Cassinelli, L., and Torrente, Y. (2012). The role of stem cells in muscular dystrophies. *Curr. Gene Ther.* 12, 192–205.
- Messina, S., Bitto, A., Aguenouz, M., Minutoli, L., Monici, M.C., Altavilla, D., Squadrito, F., and Vita, G. (2006). Nuclear factor kappa-B blockade reduces skeletal muscle degeneration and enhances muscle function in Mdx mice. *Exp. Neurol.* 198, 234–241.
- Mezey, E., Chandross, K., Harta, G., Maki, R., and McKercher, S. (2000). Turning Blood into Brain: Cells Bearing Neuronal Antigens Generated in Vivo from Bone Marrow. *Science* (80-.). 290, 1779–1782.
- Michaluk, P., Kolodziej, L., Mioduszewska, B., Wilczynski, G.M., Dzwonek, J., Jaworski, J., Gorecki, D.C., Ottersen, O.P., and Kaczmarek, L. (2007). B-Dystroglycan as a target for MMP-9, in response to enhanced neuronal activity. *J. Biol. Chem.* 282, 16036–16041.
- Miglietta, D., De Palma, C., Sciorati, C., Vergani, B., Pisa, V., Villa, A., Ongini, E., and Clementi, E. (2015). Naproxinod shows significant advantages over naproxen in the mdx model of Duchenne Muscular Dystrophy. *Orphanet J. Rare Dis.* 10, 101.
- Miller, R.G., Sharma, K.R., Pavlath, G.K., Gussoni, E., Mynhier, M., Yu, P., Lanctot, A.M., Greco, C.M., Steinman, L., and Blau, H.M. (1997). Myoblast implantation in Duchenne muscular dystrophy: The San Francisco study. *Muscle and Nerve* 20, 469–478.
- Minasi, M.G., Riminucci, M., De Angelis, L., Borello, U., Berarducci, B., Innocenzi, A., Caprioli, A., Sirabella, D., Baiocchi, M., De Maria, R., et al. (2002). The meso-angioblast: a multipotent, self-renewing cell that originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues. *Development* 129, 2773–2783.
- Minetti, G.C., Colussi, C., Adami, R., Serra, C., Mozzetta, C., Parente, V., Fortuni, S., Straino, S., Sampaolesi, M., Di Padova, M., et al. (2006). Functional and morphological recovery of dystrophic muscles in mice treated with deacetylase inhibitors. *Nat. Med.* 12, 1147–1150.
- Miskew Nichols, B., Aoki, Y., Kuraoka, M., Lee, J.J.A., Takeda, S., and Yokota, T. (2016). Multi-exon Skipping Using Cocktail Antisense Oligonucleotides in the Canine X-linked Muscular Dystrophy. *J. Vis. Exp.* 1–15.
- Mitchell, K.J., Pannerec, A., Cadot, B., Parlakian, A., Besson, V., Gomes, E.R., Marazzi, G., and Sassoon, D.A. (2010). Identification and characterization of a non-satellite cell muscle resident progenitor during postnatal development. *Nat. Cell Biol.* 12,

257–266.

- Miura, P., and Jasmin, B.J. (2006). Utrophin upregulation for treating Duchenne or Becker muscular dystrophy: How close are we? *Trends Mol. Med.* *12*, 122–129.
- Miyatake, M., Miike, T., Zhao, J. en, Yoshioka, K., Uchino, M., and Usuku, G. (1989). Possible systemic smooth muscle layer dysfunction due to a deficiency of dystrophin in Duchenne muscular dystrophy. *J. Neurol. Sci.* *93*, 11–17.
- Mizuno, Y., Nonaka, I., Hirai, S., and Ozawa, E. (1993). Reciprocal expression of dystrophin and utrophin in muscles of Duchenne muscular dystrophy patients, female DMD-carriers and control subjects. *J. Neurol. Sci.* *119*, 43–52.
- Moat, S.J., Bradley, D.M., Salmon, R., Clarke, A., and Hartley, L. (2013). Newborn bloodspot screening for Duchenne muscular dystrophy: 21 years experience in Wales (UK). *Eur. J. Hum. Genet.* *21*, 1049–1053.
- Moise, N.S., Valentine, B.A., Brown, C.A., Erb, H.N., Beck, K.A., Cooper, B.J., and Gilmour, R.F. (1991). Duchenne's cardiomyopathy in a canine model: electrocardiographic and echocardiographic studies. *J. Am. Coll. Cardiol.* *17*, 812–820.
- Monaco, A.P., Bertelson, C.J., Liechti-Gallati, S., Moser, H., and Kunkel, L.M. (1988). An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics* *2*, 90–95.
- Montanaro, F., Liadaki, K., Schienda, J., Flint, A., Gussoni, E., and Kunkel, L.M. (2004). Demystifying SP cell purification: Viability, yield, and phenotype are defined by isolation parameters. *Exp. Cell Res.* *298*, 144–154.
- Montespan, F., Deschaseaux, F., Sensébé, L., Carosella, E.D., and Rouas-Freiss, N. (2014). Osteodifferentiated mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue express HLA-G and display immunomodulatory properties in Hla-mismatched settings: Implications in bone repair therapy. *J. Immunol. Res.* *2014*.
- Morandi, L., Bernasconi, P., Gebbia, M., Mora, M., Crosti, F., Mantegazza, R., and Cornelio, F. (1995). Lack of mRNA and dystrophine expression in DMD patients three months after myoblast transfer. *Neuromuscul. Disord.* *5*, 291–295.
- Morgan, J.E., and Partridge, T.A. (2003). Muscle satellite cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *35*, 1151–1156.
- Morgan, J.E., and Zammit, P.S. (2010). Direct effects of the pathogenic mutation on satellite cell function in muscular dystrophy. *Exp. Cell Res.* *316*, 3100–3108.
- Morgan, J., Rouche, A., Bausero, P., Houssani, A., Gross, J., Fiszman, M.Y., and Alameddine, H.S. (2010). MMP-9 overexpression improves myogenic cell migration and engraftment. *Muscle and Nerve* *42*, 584–595.
- 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*, 16995–17000.
- Moss, F.P., and Leblond, C.P. (1970). Nature of dividing nuclei in skeletal muscle of growing rats. *J. Cell Biol.* *44*, 459–462.
- Motohashi, N., Uezumi, A., Yada, E., Fukada, S., Fukushima, K., Imaizumi, K., Miyagoe-Suzuki, Y., and Takeda, S. (2008). Muscle CD31(-) CD45(-) side population cells promote muscle regeneration by stimulating proliferation and migration of myoblasts. *Am. J. Pathol.* *173*, 781–791.
- 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.
- Murray, P.J., and Wynn, T.A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 723–737.
- Najar, M., Rouas, R., Raicevic, G., Boufker, H.I., Lewalle, P., Meuleman, N., Bron, D., Tounougouz, M., Martiat, P., and Lagneaux, L. (2009). Mesenchymal stromal cells promote or suppress the proliferation of T lymphocytes from cord blood and peripheral blood: the importance of low cell ratio and role of interleukin-6. *Cytotherapy* 11, 570–583.
- Nakamura, A., and Takeda, S. (2011). Mammalian models of duchenne muscular dystrophy: Pathological characteristics and therapeutic applications. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011.
- Nakamura, A., Yoshida, K., Ueda, H., Takeda, S., and Ikeda, S. (2005). Up-regulation of mitogen activated protein kinases in mdx skeletal muscle following chronic treadmill exercise. *Biochim. Biophys. Acta* 1740, 326–331.
- Nakamura, K., Fujii, W., Tsuboi, M., Tanihata, J., Teramoto, N., Takeuchi, S., Naito, K., Yamanouchi, K., and Nishihara, M. (2014). Generation of muscular dystrophy model rats with a CRISPR/Cas system. *Sci. Rep.* 4, 5635.
- Nakatani, M., Takehara, Y., Sugino, H., Matsumoto, M., Hashimoto, O., Hasegawa, Y., Murakami, T., Uezumi, A., Takeda, S., Noji, S., et al. (2008). Transgenic expression of a myostatin inhibitor derived from follistatin increases skeletal muscle mass and ameliorates dystrophic pathology in mdx mice. *FASEB J.* 22, 477–487.
- Negrone, E., Butler-Browne, G.S., and Mouly, V. (2006). Myogenic stem cells: regeneration and cell therapy in human skeletal muscle. *Pathol. Biol. (Paris)*. 54, 100–108.
- Negrone, E., Riederer, I., Chaouch, S., Belicchi, M., Razini, P., Di Santo, J., Torrente, Y., Butler-Browne, G.S., and Mouly, V. (2009). In vivo myogenic potential of human CD133+ muscle-derived stem cells: a quantitative study. *Mol. Ther.* 17, 1771–1778.
- Negrone, E., Gidaro, T., Bigot, A., Butler-Browne, G.S., Mouly, V., and Trollet, C. (2015). Invited review: Stem cells and muscle diseases: Advances in cell therapy strategies. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 41, 270–287.
- Nelson, C., Hakim, C., Ousterout, D., Thakore, P., Moreb, E., Castellanos Rivera, R., Madhavan, S., Pan, X., Ran, A., Yan, W., et al. (2016). In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science*. 351, 403–407.
- Nelson, M.D., Rader, F., Tang, X., Tavyev, J., Nelson, S.F., Miceli, M.C., Elashoff, R.M., Sweeney, H.L., and Victor, R.G. (2014). PDE5 inhibition alleviates functional muscle ischemia in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 82, 2085–2091.
- 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, 100–108.
- 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, 154–163.
- Nitahara-Kasahara, Y., Hayashita-Kinoh, H., Ohshima-Hosoyama, S., Okada, H., Wada-Maeda, M., Nakamura, A., Okada, T., and Takeda, S. (2012). Long-term Engraftment of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells That Differentiate to Form Myogenic Cells in Dogs With Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol. Ther.* 20, 168–177.

- Noviello, M., Tedesco, F.S., Bondanza, A., Tonlorenzi, R., Rosaria Carbone, M., Gerli, M.F.M., Markt, S., Napolitano, S., Cicalese, M.P., Ciceri, F., et al. (2014). Inflammation Converts Human Mesoangioblasts Into Targets of Alloreactive Immune Responses: Implications for Allogeneic Cell Therapy of DMD. *Mol. Ther.* *22*, 1342–1352.
- Nowell, P.C., Cole, L.J., Habermeyer, J.G., and Roan, P. (1956). Growth and Continued Function of Rat Marrow Cells in X-irradiated Mice. *Cancer Res* *16*, 258–261.
- Olguin, H.C., Yang, Z., Tapscott, S.J., and Olwin, B.B. (2007). Reciprocal inhibition between Pax7 and muscle regulatory factors modulates myogenic cell fate determination. *J. Cell Biol.* *177*, 769–779.
- Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Limana, F., Jakoniuk, I., Quaini, F., Nadal-Ginard, B., Bodine, D.M., Leri, A., and Anversa, P. (2001). Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 10344–10349.
- 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*, 1130–1141.
- 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*, 3430–3439.
- Ousterout, D.G., Perez-Pinera, P., Thakore, P.I., Kabadi, A.M., Brown, M.T., Qin, X., Fedrigo, O., Mouly, V., Tremblay, J.P., and Gersbach, C.A. (2013). Reading frame correction by targeted genome editing restores dystrophin expression in cells from duchenne muscular dystrophy patients. *Mol. Ther.* *21*, 1718–1726.
- Ousterout, D.G., Kabadi, A.M., Thakore, P.I., Perez-Pinera, P., Brown, M.T., Majoros, W.H., Reddy, T.E., and Gersbach, C.A. (2015). Correction of dystrophin expression in cells from Duchenne muscular dystrophy patients through genomic excision of exon 51 by zinc finger nucleases. *Mol. Ther.* *23*, 523–532.
- Özsarlak, Ö., Schepens, E., Parizel, P.M., Van Goethem, J.W., Vanhoenacker, F., De Schepper, A.M., and Martin, J.J. (2001). Hereditary neuromuscular diseases. *Eur. J. Radiol.* *40*, 184–197.
- Palmieri, B., Tremblay, J.P., and Daniele, L. (2010). Past, present and future of myoblast transplantation in the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr. Transplant.* *14*, 813–819.
- Pannérec, A., Formicola, L., Besson, V., Marazzi, G., and Sassoon, D. a (2013). Defining skeletal muscle resident progenitors and their cell fate potentials. *Development* *140*, 2879–2891.
- Partridge, T.A., Morgan, J.E., Coulton, G.R., Hoffman, E.P., and Kunkel, L.M. (1989). Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts. *Nature* *337*, 176–179.
- Passerini, L., Bernasconi, P., Baggi, F., Confalonieri, P., Cozzi, F., Cornelio, F., and Mantegazza, R. (2002). Fibrogenic cytokines and extent of fibrosis in muscle of dogs with X-linked golden retriever muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* *12*, 828–835.
- Pastoret, C., and Sebille, A. (1995). Mdx Mice Show Progressive Weakness and Muscle Deterioration With Age. *J. Neurol. Sci.* *129*, 97–105.
- 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*, 1264–1274.

- Péault, B., Rudnicki, M., Torrente, Y., Cossu, G., Tremblay, J.P., Partridge, T., Gussoni, E., Kunkel, L.M., and Huard, J. (2007). Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy. *Mol. Ther.* *15*, 867–877.
- Péladeau, C., Ahmed, A., Amirouche, A., Crawford Parks, T.E., Bronicki, L.M., Ljubicic, V., Renaud, J.-M., and Jasmin, B.J. (2016). Combinatorial Therapeutic Activation with Heparin and AICAR Stimulates Additive Effects on Utrophin A Expression in Dystrophic Muscles. *Hum. Mol. Genet.* *25*, 24–43.
- Pelatti, M. V., Gomes, J.P.A., Vieira, N.M.S., Cangussu, E., Landini, V., Andrade, T., Sartori, M., Petrus, L., and Zatz, M. (2016). Transplantation of Human Adipose Mesenchymal Stem Cells in Non-Immunosuppressed GRMD Dogs is a Safe Procedure. *Stem Cell Rev. Reports* *12*, 448–453.
- Pelosi, L., Berardinelli, M.G., Forcina, L., Spelta, E., Rizzuto, E., Nicoletti, C., Camilli, C., Testa, E., Catizone, A., De Benedetti, F., et al. (2015). Increased levels of interleukin-6 exacerbate the dystrophic phenotype in mdx mice. *Hum. Mol. Genet.* *24*, 6041–6053.
- Périé, S., Trollet, C., Mouly, V., Vanneaux, V., Mamchaoui, K., Bouazza, B., Marolleau, J.P., Laforêt, P., Chapon, F., Eymard, B., et al. (2014). Autologous myoblast transplantation for oculopharyngeal muscular dystrophy: a phase I/IIa clinical study. *Mol. Ther.* *22*, 219–225.
- Petersen, B.E. (1999). Bone Marrow as a Potential Source of Hepatic Oval Cells. *Science*. *284*, 1168–1170.
- 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*, 3710–3714.
- Pichavant, C., Aartsma-Rus, A., Clemens, P.R., Davies, K.E., Dickson, G., Takeda, S., Wilton, S.D., Wolff, J. a, Wooddell, C.I., Xiao, X., et al. (2011). Current status of pharmaceutical and genetic therapeutic approaches to treat DMD. *Mol. Ther.* *19*, 830–840.
- Pisani, D.F., Clement, N., Loubat, A., Plaisant, M., Sacconi, S., Kurzenne, J.Y., Desnuelle, C., Dani, C., and Dechesne, C.A. (2010). Hierarchization of myogenic and adipogenic progenitors within human skeletal muscle. *Stem Cells* *28*, 2182–2194.
- Pisciotta, A., Riccio, M., Carnevale, G., Lu, A., De Biasi, S., Gibellini, L., La Sala, G.B., Bruzzesi, G., Ferrari, A., Huard, J., et al. (2015). Stem cells isolated from human dental pulp and amniotic fluid improve skeletal muscle histopathology in mdx/SCID mice. *Stem Cell Res. Ther.* *6*, 156.
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D. (1999). Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science* (80-.). *284*, 143–147.
- Pons, F., Robert, A., Marini, J.F., and Léger, J.J. (1994). Does utrophin expression in muscles of mdx mice during postnatal development functionally compensate for dystrophin deficiency? *J. Neurol. Sci.* *122*, 162–170.
- Popplewell, L., Koo, T., Leclerc, X., Duclert, A., Mamchaoui, K., Gouble, A., Mouly, V., Voit, T., Pâques, F., Cédronne, F., et al. (2013). Gene correction of a duchenne muscular dystrophy mutation by meganuclease-enhanced exon knock-in. *Hum. Gene Ther.* *24*, 692–701.
- Pozzobon, M., Piccoli, M., Ditadi, A., Bollini, S., Destro, R., André-Schmutz, I., Masiero, L., Lenzini, E., Zanesco, L., Petrelli, L., et al. (2009). Mesenchymal stromal cells can be derived from bone marrow CD133+ cells: implications for therapy. *Stem Cells Dev.* *18*, 497–510.

- Prior, T., and Bridgeman, S. (2005). Duchenne muscular dystrophy. *JMD* 7, 317–326.
- Prockop, D.J. (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 276, 71–74.
- Przybyt, E., Krenning, G., Brinker, M.G.L., and Harmsen, M.C. (2013). Adipose stromal cells primed with hypoxia and inflammation enhance cardiomyocyte proliferation rate in vitro through STAT3 and Erk1/2. *J. Transl. Med.* 11, 39.
- Qu, Z., Balkir, L., van Deutekom, J.C., Robbins, P.D., Pruchnic, R., and Huard, J. (1998). Development of approaches to improve cell survival in myoblast transfer therapy. *J. Cell Biol.* 142, 1257–1267.
- Qu-Petersen, Z., Deasy, B., Jankowski, R., Ikezawa, M., Cummins, J., Pruchnic, R., Mytinger, J., Cao, B., Gates, C., Wernig, A., et al. (2002). Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *J. Cell Biol.* 157, 851–864.
- Rando, T. (2001). The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 24, 1575–1594.
- Raymackers, J.M., Debaix, H., Colson-Van Schoor, M., De Backer, F., Tajeddine, N., Schwaller, B., Gailly, P., and Gillis, J.M. (2003). Consequence of parvalbumin deficiency in the mdx mouse: Histological, biochemical and mechanical phenotype of a new double mutant. *Neuromuscul. Disord.* 13, 376–387.
- Rebolledo, D.L., Kim, M.J., Whitehead, N.P., Adams, M.E., and Froehner, S.C. (2016). Sarcolemmal targeting of nNOS?? improves contractile function of mdx muscle. *Hum. Mol. Genet.* 25, 158–166.
- Reddy, B.Y., Xu, D.S., and Hantash, B.M. (2012). Mesenchymal stem cells as immunomodulator therapies for immune-mediated systemic dermatoses. *Stem Cells Dev.* 21, 352–362.
- Reeves, E., Hoffman, E., Naharaju, K., Damsker, J., and McCall, J. (2013). VBP15: Preclinical characterization of a novel anti-inflammatory delta 9,11 steroid. *Bioorg Med Chem* 21, 2241–2249.
- Relaix, F., Weng, X., Marazzi, G., Yang, E., Copeland, N., Jenkins, N., Spence, S.E., and Sassoon, D. (1996). Pw1, a Novel Zinc Finger Gene Implicated in the Myogenic and Neuronal Lineages. *Dev. Biol.* 177, 383–396.
- Ricotti, V., Ridout, D.A., Scott, E., Quinlivan, R., Robb, S.A., Manzur, A.Y., and Muntoni, F. (2013). Long-term benefits and adverse effects of intermittent versus daily glucocorticoids in boys with Duchenne muscular dystrophy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 84, 698–705.
- Ricotti, V., Spinty, S., Roper, H., Hughes, I., Tejura, B., Robinson, N., Layton, G., Davies, K., Muntoni, F., and Tinsley, J. (2016). Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of SMT C1100, a 2-Arylbenzoxazole Utrophin Modulator, following Single- and Multiple-Dose Administration to Pediatric Patients with Duchenne Muscular Dystrophy. *PLoS One* 11, e0152840.
- Rider, D.A., Nalathamby, T., Nurcombe, V., and Cool, S.M. (2007). Selection using the alpha-1 integrin (CD49a) enhances the multipotentiality of the mesenchymal stem cell population from heterogeneous bone marrow stromal cells. *J. Mol. Histol.* 38, 449–458.
- Riederer, I., Negroni, E., Bencze, M., Wolff, A., Aamiri, A., Di Santo, J.P., Silva-Barbosa, S.D., Butler-Browne, G., Savino, W., and Mouly, V. (2012). Slowing down differentiation of engrafted human myoblasts into immunodeficient mice correlates with increased proliferation and migration. *Mol. Ther.* 20, 146–154.

- Roberts, N.W., Holley-Cuthrell, J., Gonzalez-Vega, M., Mull, A.J., and Heydemann, A. (2015). Biochemical and functional comparisons of mdx and Sgcg^{-/-} muscular dystrophy mouse models. *Biomed Res. Int.* 2015.
- Roberts, R.G., Coffey, a J., Bobrow, M., and Bentley, D.R. (1993). Exon structure of the human dystrophin gene. *Genomics* 16, 536–538.
- Robriquet, F., Lardenois, A., Babarit, C., Larcher, T., Dubreil, L., Leroux, I., Zuber, C., Ledevin, M., Deschamps, J.Y., Fromes, Y., et al. (2015). Differential gene expression profiling of dystrophic dog muscle after MuStem cell transplantation. *PLoS One* 10, 1–24.
- Robriquet, F., Babarit, C., Larcher, T., Dubreil, L., Ledevin, M., Goubin, H., Rouger, K., Guével, L., Emery, A., Dubowitz, V., et al. (2016). Identification in GRMD dog muscle of critical miRNAs involved in pathophysiology and effects associated with MuStem cell transplantation. *BMC Musculoskelet. Disord.* 17, 209.
- Rodino-Klapac, L.R., Janssen, P.M.L., Shontz, K.M., Canan, B., Montgomery, C.L., Griffin, D., Heller, K., Schmelzer, L., Handy, C., Clark, K.R., et al. (2013). Micro-dystrophin and follistatin co-delivery restores muscle function in aged DMD model. *Hum. Mol. Genet.* 22, 4929–4937.
- Rodriguez, A.-M.M., Pisani, D., Dechesne, C.A., Turc-Carel, C., Kurzenne, J.-Y.Y., Wdziekonski, B., Villageois, A., Bagnis, C., Breitmayer, J.-P.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, 1397–1405.
- Rosado, M.M., Bernardo, M.E., Scarsella, M., Conforti, A., Giorda, E., Biagini, S., Cascioli, S., Rossi, F., Guzzo, I., Vivarelli, M., et al. (2014). Inhibition of B-cell proliferation and antibody production by mesenchymal stromal cells is mediated by T cells. *Stem Cells Dev.* 0, 1–11.
- Rossi, C.A., Flaibani, M., Blaauw, B., Pozzobon, M., Figallo, E., Reggiani, C., Vitiello, L., Elvassore, N., and De Coppi, P. (2011). In vivo tissue engineering of functional skeletal muscle by freshly isolated satellite cells embedded in a photopolymerizable hydrogel. *FASEB J.* 1–9.
- Roubeix, C. (2014). Intérêt des cellules souches mésenchymateuses dans la thérapie du glaucome. Université Pierre et Marie Curie.
- Rouger, K., Fornasari, B., Armengol, V., Jouvion, G., Leroux, I., Dubreil, L., Feron, M., Guevel, L., and Cherel, Y. (2007). Progenitor cell isolation from muscle-derived cells based on adhesion properties. *J Histochem Cytochem* 55, 607–618.
- Rouger, K., Larcher, T., Dubreil, L., Deschamps, J.-Y., Le Guiner, C., Jouvion, G., Delorme, B., Lieubeau, B., Carlus, M., Fornasari, B., et al. (2011). Systemic delivery of allogenic muscle stem cells induces long-term muscle repair and clinical efficacy in duchenne muscular dystrophy dogs. *Am. J. Pathol.* 179, 2501–2518.
- Rousseau, J., Chapdelaine, P., Boisvert, S., Almeida, L., Corbeil, J., Montpetit, A., and Tremblay, J. (2011). Gene transfer into guinea pig cochlea using adeno-associated virus vectors. *J. Gene Med.* 13, 522–537.
- Ryan, J.M., Barry, F., Murphy, J.M., and Mahon, B.P. (2007). Interferon- γ does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clin. Exp. Immunol.* 149, 353–363.
- 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, 1209–1214.
- Sacco, A., Mourkioti, F., Tran, R., Choi, J., Llewellyn, M., Kraft, P., Shkreli, M., Delp, S.,

- Pomerantz, J.H., Artandi, S.E., et al. (2010). Short telemers and stem cell exhaustion model in mdx mice. *Cell* *143*, 1059–1071.
- Sakuma, K., Nakao, R., Aoi, W., Inashima, S., Fujikawa, T., Hirata, M., Sano, M., and Yasuhara, M. (2005). Cyclosporin A treatment upregulates Id1 and Smad3 expression and delays skeletal muscle regeneration. *Acta Neuropathol.* *110*, 269–280.
- 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* (80-.). *301*, 487–492.
- Sampaolesi, M., Blot, S., D'Antona, G., Granger, N., Tonlorenzi, R., Innocenzi, A., Mognol, P., Thibaud, J.-L., Galvez, B.G., Barthélémy, I., et al. (2006). Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature* *444*, 574–579.
- Sander, M., Chavoshan, B., Harris, S. a, Iannaccone, S.T., Stull, J.T., Thomas, G.D., and Victor, R.G. (2000). Functional muscle ischemia in neuronal nitric oxide synthase-deficient skeletal muscle of children with Duchenne muscular dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 13818–13823.
- Sandiford, S. De, Kennedy, K.A., Xie, X., Pickering, J.G., and Li, S.S. (2014). Dual Oxidase Maturation factor 1 (DUOXA1) overexpression increases reactive oxygen species production and inhibits murine muscle satellite cell differentiation. *Cell Commun. Signal.* *12*, 5.
- Sandri, M., Podhorska-Okolow, M., Geromel, V., Rizzi, C., Arslan, P., Franceschi, C., and Carraro, U. (1997). Exercise induces myonuclear ubiquitination and apoptosis in dystrophin-deficient muscle of mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *56*, 45–57.
- 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*, 1769–1778.
- Schatzberg, S.J., Olby, N.J., Breen, M., Anderson, L.V.B., Langford, C.F., Dickens, H.F., Wilton, S.D., Zeiss, C.J., Binns, M.M., Kornegay, J.N., et al. (1999). Molecular analysis of a spontaneous dystrophin “knockout” dog. *Neuromuscul. Disord.* *9*, 289–295.
- Schwarzkopf, M., Coletti, D., Sassoon, D., and Marazzi, G. (2006). pathway Muscle cachexia is regulated by a p53 – PW1 / Peg3-dependent pathway. *Genes Dev.* *20*, 3440–3452.
- Sciorati, C., Miglietta, D., Buono, R., Pisa, V., Cattaneo, D., Azzoni, E., Brunelli, S., and Clementi, E. (2011). A dual acting compound releasing nitric oxide (NO) and ibuprofen, NCX 320, shows significant therapeutic effects in a mouse model of muscular dystrophy. *Pharmacol. Res.* *64*, 210–217.
- Seale, P., and Rudnicki, M.A. (2000). A New Look at the Origin, Function, and “Stem-Cell” Status of Muscle Satellite Cells. *Dev. Biol.* *218*, 115–124.
- Seale, P., Ishibashi, J., Scim??, A., and Rudnicki, M.A. (2004). Pax7 is necessary and sufficient for the myogenic specification of CD45+:Sca1+ stem cells from injured muscle. *PLoS Biol.* *2*.
- Sekiya, N., Tobita, K., Beckman, S., Okada, M., Gharaibeh, B., Sawa, Y., Kormos, R.L., and Huard, J. (2013). Muscle-derived stem cell sheets support pump function and prevent cardiac arrhythmias in a model of chronic myocardial infarction. *Mol. Ther.* *21*, 662–669.

- Selmani Z., Naji A., Gaiffe E., Obert L., Tiberghien P., Rouas-Freiss N., Carosella E.D. and Deschaseaux F. (2009) HLA-G is a crucial immunosuppressive molecule secreted by adult human mesenchymal stem cells. *Transplantation*. *87*, S62-6.
- Selsby, J.T., Ross, J.W., Nonneman, D., and Hollinger, K. (2015). Porcine Models of Muscular Dystrophy. *ILAR J.* *56*, 116–126.
- Shang, Y.-C., Wang, S.-H., Xiong, F., Peng, F.-N., Liu, Z.-S., Geng, J., and Zhang, C. (2016). Activation of Wnt3a signaling promotes myogenic differentiation of mesenchymal stem cells in mdx mice. *Acta Pharmacol. Sin.* *37*, 1–9.
- Sharp, N.J.H., 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*, 115–121.
- Shelton, G.D., and Engvall, E. (2005). Canine and feline models of human inherited muscle diseases. *Neuromuscul. Disord.* *15*, 127–138.
- 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*, 543–554.
- Shi, X., and Garry, D.J. (2006). Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev.* *20*, 1692–1708.
- Shi, M., Ishikawa, M., Kamei, N., Nakasa, T., Adachi, N., Deie, M., Asahara, T., and Ochi, M. (2009). Acceleration of skeletal muscle regeneration in a rat skeletal muscle injury model by local injection of human peripheral blood-derived CD133-positive cells. *Stem Cells* *27*, 949–960.
- Shiba, N., Miyazaki, D., Yoshizawa, T., Fukushima, K., Shiba, Y., Inaba, Y., Imamura, M., Takeda, S., Koike, K., and Nakamura, A. (2015). Differential roles of MMP-9 in early and late stages of dystrophic muscles in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Biochem. Biophys. Acta* *1852*, 2170–2182.
- Shim, J.Y., and Kim, T.S. (2003). Relationship between utrophin and regenerating muscle fibers in duchenne muscular dystrophy. *Yonsei Med. J.* *44*, 15–23.
- Shimatsu, Y., Katagiri, K., Furuta, T., Nakura, M., Tanioka, Y., Yuasa, K., Tomohiro, M., Kornegay, J.N., Nonaka, I., and Takeda, S. (2003). Canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMDJ). *Exp. Anim.* *52*, 93–97.
- Shin, J.-H., Pan, X., Hakim, C.H., Yang, H.T., Yue, Y., Zhang, K., Terjung, R.L., and Duan, D. (2013). Microdystrophin Ameliorates Muscular Dystrophy in the Canine Model of Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol. Ther.* *21*, 750–757.
- Simmons, P.J., and Torok-Storb, B. (1991). Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* *78*, 55–62.
- Singer, N.G., and Caplan, A.I. (2011). Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annu. Rev. Pathol.* *6*, 457–478.
- Sishi, B.J.N., and Engelbrecht, A.M. (2011). Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) inactivates the PI3-kinase/PKB pathway and induces atrophy and apoptosis in L6 myotubes. *Cytokine* *54*, 173–184.
- Sitzia, C., Farini, A., Jardim, L., Razini, P., Belicchi, M., Cassinelli, L., Villa, C., Erratico, S., Parolini, D., Bella, P., et al. (2016). Adaptive immune response impairs the efficacy of autologous transplantation of engineered stem cells in dystrophic dogs. *Mol. Ther.* [*Epub ahead*].
- Skuk, D., Roy, B., Goulet, M., Chapdelaine, P., Bouchard, J.P., Roy, R., Dugr??, F.J., Lachance, J.G., Desch??nes, L., Senay, H., et al. (2004). Dystrophin expression in myofibers of

- Duchenne muscular dystrophy patients following intramuscular injections of normal myogenic cells. *Mol. Ther.* 9, 475–482.
- Skuk, D., Goulet, M., Roy, B., Piette, V., Côté, 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.
- Smith, D.M. (2012). Assessing commercial opportunities for autologous and allogeneic cell-based products. *Regen. Med.* 7, 721–732.
- 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, 2497–2507.
- Spencer, M.J., Walsh, C.M., Dorshkind, K.A., Rodriguez, E.M., and Tidball, J.G. (1997). Myonuclear apoptosis in dystrophic mdx muscle occurs by perforin-mediated cytotoxicity. *J. Clin. Invest.* 99, 2745–2751.
- Spradling, A., Drummond-Barbosa, D., and Kai, T. (2001). Stem cells find their niche. *Nature* 414, 98–104.
- Stedman, H.H., Sweeney, H.L., Shrager, J.B., Maguire, H.C., Panettieri, R. a, Petrof, B., Narusawa, M., Leferovich, J.M., Sladky, J.T., and Kelly, a M. (1991). The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 352, 536–539.
- Storms, R.W., Trujillo, A.P., Springer, J.B., Shah, L., Colvin, O.M., Ludeman, S.M., and Smith, C. (1999). Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 9118–9123.
- Svobodova, E., Krulova, M., Zajicova, A., Pokorna, K., Prochazkova, J., Trosan, P., and Holan, V. (2012). The role of mouse mesenchymal stem cells in differentiation of naive T-cells into anti-inflammatory regulatory T-cell or proinflammatory helper T-cell 17 population. *Stem Cells Dev.* 21, 901–910.
- Tabebordbar, M., Zhu, K., Cheng, J.K.W., Chew, W.L., Widrick, J.J., Yan, W.X., Maesner, C., Wu, E.Y., Xiao, R., Ran, F.A., et al. (2016). In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. *Science* (80-.). 351, 407–411.
- Tagliafico, E. (2004). TGF/BMP activate the smooth muscle/bone differentiation programs in mesoangioblasts. *J. Cell Sci.* 117, 4377–4388.
- Taguchi, A., Nishiguchi, S., Shiozuka, M., Nomoto, T., Ina, M., Nojima, S., Matsuda, R., Nonomura, Y., Kiso, Y., Yamazaki, Y., et al. (2012). Negamycin analogue with readthrough-promoting activity as a potential drug candidate for Duchenne muscular dystrophy. *ACS Med. Chem. Lett.* 3, 118–122.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* 131, 861–872.
- Tamaki, T., Akatsuka, A., Ando, K., Nakamura, Y., Matsuzawa, H., Hotta, T., Roy, R.R., and Reggie Edgerton, V. (2002). Identification of myogenic-endothelial progenitor cells in the interstitial spaces of skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 157, 571–577.
- Tamaki, T., Akatsuka, A., Okada, Y., Matsuzaki, Y., Okano, H., and Kimura, M. (2003). Growth and differentiation potential of main- and side-population cells derived from murine skeletal muscle. *Exp. Cell Res.* 291, 83–90.

- Tamaki, T., Uchiyama, Y., Okada, Y., Ishikawa, T., Sato, M., Akatsuka, A., and Asahara, T. (2005). Functional recovery of damaged skeletal muscle through synchronized vasculogenesis, myogenesis, and neurogenesis by muscle-derived stem cells. *Circulation* 112, 2857–2866.
- Tamaki, T., Okada, Y., Uchiyama, Y., Tono, K., Masuda, M., Wada, M., Hoshi, A., and Akatsuka, A. (2007). Synchronized reconstitution of muscle fibers, peripheral nerves and blood vessels by murine skeletal muscle-derived CD34-/45- cells. *Histochem. Cell Biol.* 128, 349–360.
- Tamaki, T., Akatsuka, A., Okada, Y., Uchiyama, Y., Tono, K., Wada, M., Hoshi, A., Iwaguro, H., Iwasaki, H., Oyamada, A., et al. (2008). Cardiomyocyte formation by skeletal muscle-derived multi-myogenic stem cells after transplantation into infarcted myocardium. *PLoS One* 3, e1789.
- Tamma, R., Annese, T., Capogrosso, R.F., Cozzoli, A., Benagiano, V., Sblendorio, V., Ruggieri, S., Crivellato, E., Specchia, G., Ribatti, D., et al. (2013). Effects of prednisolone on the dystrophin-associated proteins in the blood-brain barrier and skeletal muscle of dystrophic mdx mice. *Lab. Invest.* 93, 592–610.
- Tanabe, Y., Esaki, K., and Nomura, T. (1986). Skeletal muscle pathology in X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) mouse. *Acta Neuropathol.* 69, 91–95.
- Tedesco, F.S., Dellavalle, A., Diaz-manera, J., Messina, G., and Cossu, G. (2010). Review series Repairing skeletal muscle : regenerative potential of skeletal muscle stem cells. *J Clin Invest* 120, 11–19.
- Tedesco, F.S., Hoshiya, H., D'Antona, G., Gerli, M.F.M., Messina, G., Antonini, S., Tonlorenzi, R., Benedetti, S., Berghella, L., Torrente, Y., et al. (2011). Stem cell-mediated transfer of a human artificial chromosome ameliorates muscular dystrophy. *Sci. Transl. Med.* 3, 96ra78.
- Tedesco, F.S., Gerli, M.F.M., Perani, L., Benedetti, S., Ungaro, F., Cassano, M., Antonini, S., Tagliafico, E., Artusi, V., Longa, E., et al. (2012). Transplantation of genetically corrected human iPSC-derived progenitors in mice with limb-girdle muscular dystrophy. *Sci. Transl. Med.* 4, 140ra89.
- ten Dam, K., de Groot, I.J.M., Noordam, C., van Alfen, N., Hendriks, J.C.M., and Sie, L.T.L. (2012). Normal height and weight in a series of ambulant Duchenne muscular dystrophy patients using the 10 day on/10 day off prednisone regimen. *Neuromuscul. Disord.* 22, 500–504.
- Tidball, J.G., Albrecht, D.E., Lokensgard, B.E., and Spencer, M.J. (1995). Apoptosis precedes necrosis of dystrophin-deficient muscle. *J. Cell Sci.* 108, 2197–2204.
- Tinsley, J.M., Fairclough, R.J., Storer, R., Wilkes, F.J., Potter, A.C., Squire, S.E., Powell, D.S., Cozzoli, A., Capogrosso, R.F., Lambert, A., et al. (2011). Daily treatment with SMT1100, a novel small molecule utrophin upregulator, dramatically reduces the dystrophic symptoms in the mdx mouse. *PLoS One* 6.
- Tomita S., Li R.K., Weisel R.D., Mickle D.A., Kim E.J., Sakai T. and Jia Z.Q. (1999) Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation.* 100, II247-56.
- Torrente, Y., Tremblay, J.P., Pisati, F., Belicchi, M., Rossi, B., Sironi, M., Fortunato, F., El Fahime, M., D'Angelo, M.G., Caron, N.J., et al. (2001). Intraarterial injection of muscle-derived CD34+Sca-1+ stem cells restores dystrophin in mdx mice. *J. Cell Biol.* 152, 335–348.
- Torrente, Y., 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*, 511–520.
- Torrente, Y., Belicchi, M., Sampaolesi, M., Pisati, F., Meregalli, M., Antona, G.D., Tonlorenzi, R., Porretti, L., Gavina, M., Mamchaoui, K., et al. (2004). Human circulating AC133 + stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle. *J Clin Invest* *114*, 182–195.
- Torrente Y., Belicchi M., Marchesi C., D'Antona G., Cogiமானian F., Pisati F., Gavina M., Giordano R., Tonlorenzi R., Fagiolari G., et al. (2007) Autologous transplantation of muscle-derived CD133+ stem cells in Duchenne muscle patients. *Cell Transplant.* *16*, 563-77.
- Toth, K.G., McKay, B.R., de Lisio, M., Little, J.P., Tarnopolsky, M.A., and Parise, G. (2011). IL-6 induced STAT3 signalling is associated with the proliferation of human muscle satellite cells following acute muscle damage. *PLoS One* *6*.
- Towbin, J.A. (1998). The role of cytoskeletal proteins in cardiomyopathies. *Curr. Opin. Cell Biol.* *10*, 131–139.
- Tse, W.T., Pendleton, J.D., Beyer, W.M., Egalka, M.C., and Guinan, E.C. (2003). Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* *75*, 389–397.
- Tu, Z., Li, Q., Bu, H., and Lin, F. (2010). Mesenchymal stem cells inhibit complement activation by secreting factor H. *Stem Cells Dev.* *19*, 1803–1809.
- Turgeman, T., Hagai, Y., Huebner, K., Jassal, D.S., Anderson, J.E., Genin, O., Nagler, A., Halevy, O., and Pines, M. (2008). Prevention of muscle fibrosis and improvement in muscle performance in the mdx mouse by halofuginone. *Neuromuscul. Disord.* *18*, 857–868.
- Tyler, K.L. (2003). Origins and early descriptions of “Duchenne muscular dystrophy”. *Muscle Nerve* *28*, 402–422.
- Uchida, N., and Weissman, I.L. (1992). Searching for hematopoietic stem cells: evidence that Thy-1.1^{lo} Lin⁻ Sca-1⁺ cells are the only stem cells in C57BL/Ka-Thy-1.1 bone marrow. *J. Exp. Med.* *175*, 175–184.
- Uezumi, A., Ojima, K., Fukada, S.-I., Ikemoto, M., Masuda, S., Miyagoe-Suzuki, Y., and Takeda, S. (2006). Functional heterogeneity of side population cells in skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *341*, 864–873.
- Urish, K.L., Vella, J.B., Okada, M., Deasy, B.M., Tobita, K., Keller, B.B., Cao, B., Piganelli, J.D., and Huard, J. (2009). Antioxidant Levels Represent a Major Determinant in the Regenerative Capacity of Muscle Stem Cells. *Mol. Biol. Cell* *20*, 509–520.
- Vainzof, M., Moreira, E.S., Ferraz, G., Passos-Bueno, M.R., Marie, S.K., and Zatz, M. (1999). Further evidence for the organisation of the four sarcoglycans proteins within the dystrophin-glycoprotein complex. *Eur. J. Hum. Genet.* *7*, 251–254.
- Valadares, M.C., Gomes, J.P., Castello, G., Assoni, a, Pellati, M., Bueno, C., Corselli, M., Silva, H., Bartolini, P., Vainzof, M., et al. (2014). Human adipose tissue derived pericytes increase life span in *Utrn* (tm1Ked) *Dmd* (mdx) /J mice. *Stem Cell Rev.* *10*, 830–840.
- Valentine, B.A., Cooper, B.J., Cummings, J.F., and deLahunta, A. (1986). Progressive muscular dystrophy in a golden retriever dog: light microscope and ultrastructural features at 4 and 8 months. *Acta Neuropathol* *71*, 301–310.
- Valentine, B.A., Cooper, B.J., Cummings, J.F., and de Lahunta, A. (1990). Canine X-linked muscular dystrophy: Morphologic lesions. *J. Neurol. Sci.* *97*, 1–23.

- Valentine BA and McGavin MD. (2007) Skeletal muscle. In "Pathologic basis of veterinary disease" (MD McGavin and JF Zachary, Eds), pp. 973-1039. Mosby Elsevier, Saint Louis
- Vallese, D., Negroni, E., Duguez, S., Ferry, A., Trollet, C., Aamiri, A., Vosshenrich, C. a J., Füchtbauer, E.-M., Di Santo, J.P., Vitiello, L., et al. (2013). The Rag2-Il2rb-Dmd mouse: a novel dystrophic and immunodeficient model to assess innovating therapeutic strategies for muscular dystrophies. *Mol. Ther.* 21, 1950–1957.
- van Deutekom, J.C., Janson, A.A., Ginjaar, I.B., Frankhuizen, W.S., Aartsma-Rus, A., Bremmer-Bout, M., den Dunnen, J.T., Koop, K., van der Kooi, A.J., Goemans, N.M., et al. (2007). Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N. Engl. J. Med.* 357, 2677–2686.
- van Lent A.U., Centlivre M., Nagasawa M., Karrich J.J., Pouw S.M., Weijer K., Spits H., Blom B. and Legrand N. (2010) In vivo modulation of gene expression by lentiviral transduction in "human immune system" Rag2-/- gamma c -/- mice. *Methods Mol Biol.* 595, 87-115.
- Van Ry, P.M., Wuebbles, R.D., Key, M., and Burkin, D.J. (2015). Galectin-1 Protein Therapy Prevents Pathology and Improves Muscle Function in the mdx Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol. Ther.* 23, 1285–1297.
- Vandebrouck, A., Sabourin, J., Rivet, J., Balghi, H., Sebille, S., Kitzis, A., Raymond, G., Cognard, C., Bourmeyster, N., and Constantin, B. (2007). Regulation of capacitative calcium entries by alpha1-syntrophin: association of TRPC1 with dystrophin complex and the PDZ domain of alpha1-syntrophin. *FASEB J.* 21, 608–617.
- Vandebrouck, C., Martin, D., Schoor, M.C. Van, Debaix, H., and Gailly, P. (2002). Involvement of TRPC in the abnormal calcium influx observed in dystrophic (mdx) mouse skeletal muscle fibers. *J. Cell Biol.* 158, 1089–1096.
- Vaucher, K., Marolleau, J.-P., Schmid, M., Khattar, P., Chapel, A., Catelain, C., Lecourt, S., Larghéro, J., Fiszman, M., and Vilquin, J.-T. (2009). Aldehyde dehydrogenase activity identifies a population of human skeletal muscle cells with high myogenic capacities. *Mol. Ther.* 17, 1948–1958.
- Vella, J.B., Thompson, S.D., Bucsek, M.J., Song, M., and Huard, J. (2011). Murine and human myogenic cells identified by elevated aldehyde dehydrogenase activity: implications for muscle regeneration and repair. *PLoS One* 6, e29226.
- Verfaillie, C.M. (2002). Hematopoietic stem cells for transplantation. *Nat. Immunol.* 3, 314–317.
- Vieira, N.M., Brandalise, V., Zucconi, E., Jazedje, T., Secco, M., Nunes, V. a, Strauss, B.E., Vainzof, M., and Zatz, M. (2008a). Human multipotent adipose-derived stem cells restore dystrophin expression of Duchenne skeletal-muscle cells in vitro. *Biol. Cell* 100, 231–241.
- Vieira, N.M., Bueno, C.R., Brandalise, V., Moraes, L. V., Zucconi, E., Secco, M., Suzuki, M.F., Camargo, M.M., Bartolini, P., Brum, P.C., et al. (2008b). *SJL* Dystrophic Mice Express a Significant Amount of Human Muscle Proteins Following Systemic Delivery of Human Adipose-Derived Stromal Cells Without Immunosuppression. *Stem Cells* 26, 2391–2398.
- Vieira, N.M., Valadares, M., Zucconi, E., Secco, M., Bueno Junior, C.R., Brandalise, V., Assoni, A., Gomes, J., Landini, V., Andrade, T., et al. (2012). Human adipose-derived mesenchymal stromal cells injected systemically Into GRMD dogs without immunosuppression are able to reach the host muscle and express human dystrophin. *Cell Transplant.* 21, 1407–1417.

- Villalta, S.A., Nguyen, H.X., Deng, B., Gotoh, T., and Tidball, J.G. (2009). Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* *18*, 482–496.
- Villalta, S.A., Rinaldi, C., Deng, B., Liu, G., Fedor, B., and Tidball, J.G. (2011). Interleukin-10 reduces the pathology of mdx muscular dystrophy by deactivating M1 macrophages and modulating macrophage phenotype. *Hum. Mol. Genet.* *20*, 790–805.
- Villalta, S.A., Rosenberg, A.S., and Bluestone, J.A. (2015). The immune system in Duchenne muscular dystrophy: Friend or foe. *Rare Dis. (Austin, Tex.)* *3*, e1010966.
- Vilquin, J.T., Brussee, V., Asselin, I., Kinoshita, I., Gingras, M., and Tremblay, J.P. (1998). Evidence of mdx mouse skeletal muscle fragility in vivo by eccentric running exercise. *Muscle and Nerve* *21*, 567–576.
- Visser, J.W., Bauman, J.G., Mulder, A.H., Eliason, J.F., and de Leeuw, A.M. (1984). Isolation of murine pluripotent hemopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* *159*, 1576–1590.
- Vulin, A., Barthelemy, I., Goyenvalle, A.A., Thibaud, J.-L., Beley, C., Griffith, G., Benchaour, R., le Hir, M.M., Unterfinger, Y., Lorain, S.S., et al. (2012). Muscle Function Recovery in Golden Retriever Muscular Dystrophy After AAV1-U7 Exon Skipping. *Mol. Ther.* *20*, 2120–2133.
- Wagner, K.R. (2008). Approaching a New Age in Duchenne Muscular Dystrophy Treatment. *Neurotherapeutics* *5*, 583–591.
- Wagner, K.R., Hamed, S., Hadley, D.W., Gropman, A.L., Burstein, A.H., Escolar, D.M., Hoffman, E.P., and Fischbeck, K.H. (2001). Gentamicin treatment of Duchenne and Becker muscular dystrophy due to nonsense mutations. *Ann Neurol* *49*, 706–711.
- Wagner, K.R., Fleckenstein, J.L., Amato, A.A., Barohn, R.J., Bushby, K., Escolar, D.M., Flanigan, K.M., Pestronk, A., Tawil, R., Wolfe, G.I., et al. (2008). A phase I/II trial of MYO-029 in adult subjects with muscular dystrophy. *Ann. Neurol.* *63*, 561–571.
- Wang, Y.X., and Rudnicki, M.A. (2012). Satellite cells, the engines of muscle repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 127–133.
- Waterman, R.S., Tomchuck, S.L., Henkle, S.L., and Betancourt, A.M. (2010). A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: Polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One* *5*.
- Watt, F.M., and Hogan, B.L. (2000). Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* *287*, 1427–1430.
- Wehling, M., Spencer, M.J., and Tidball, J.G. (2001). A nitric oxide synthase transgene ameliorates muscular dystrophy in mdx mice. *J. Cell Biol.* *155*, 123–131.
- Wehling-henricks, M., Sokolow, S., Lee, J.J., Myung, K.H., Villalta, S.A., and Tidball, J.G. (2008). Major basic protein-1 promotes fibrosis of dystrophic muscle and attenuates the cellular immune response in muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* *17*, 2280–2292.
- Wei, Y., Li, Y., Chen, C., Stoelzel, K., Kaufmann, A.M., and Albers, A.E. (2011). Human skeletal muscle-derived stem cells retain stem cell properties after expansion in myosphere culture. *Exp. Cell Res.* *317*, 1016–1027.
- Welch, E.M., Barton, E.R., Zhuo, J., Tomizawa, Y., Friesen, W.J., Trifillis, P., Paushkin, S., Patel, M., Trotta, C.R., Hwang, S., et al. (2007). PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* *447*, 87–91.
- Westerdahl, D.E., Chang, D.H., Hamilton, M.A., Nakamura, M., and Henry, T.D. (2016). Allogeneic mesenchymal precursor cells (MPCs): an innovative approach to

- treating advanced heart failure. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2598, 1–7.
- Westerman, K. a, Penrose, A., Yang, Z., Allen, P.D., and Vacanti, C. a (2010). Adult muscle “stem” cells can be sustained in culture as free-floating myospheres. *Exp. Cell Res.* 316, 1966–1976.
- Whitehead, N.P., Pham, C., Gervasio, O.L., and Allen, D.G. (2008). N-Acetylcysteine ameliorates skeletal muscle pathophysiology in mdx mice. *J. Physiol.* 586, 2003–2014.
- Wilson, A., and Trumpp, A. (2006). Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 93–106.
- Wilton, S. (2007). PTC124, nonsense mutations and Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* 17, 719–720.
- 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, 329–335.
- Winitzky, 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, 0662–0671.
- Wulff, K., Hermann, F., Wapenaar, M., and Wehnert, M. (1989). [Anesthesia in patients with Duchenne muscular dystrophy]. *J Neurol* 236, 470–473.
- Wynn, T. (2008). Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 242, 199–210.
- Xu, L., Park, K.H., Zhao, L., Xu, J., El Refaey, M., Gao, Y., Zhu, H., Ma, J., and Han, R. (2016). CRISPR-mediated Genome Editing Restores Dystrophin Expression and Function in mdx Mice. *Mol. Ther.* 24, 564–569.
- Xu, X., Wilschut, K.J., Kouklis, G., Tian, H., Hesse, R., Garland, C., Sbitany, H., Hansen, S., Seth, R., Knott, P.D., et al. (2015). Human Satellite Cell Transplantation and Regeneration from Diverse Skeletal Muscles. *Stem Cell Reports* 5, 419–434.
- Yaden, B.C., Wang, Y.X., Wilson, J.M., Culver, A.E., Milner, A., Datta-Mannan, A., Shetler, P., Croy, J.E., Dai, G., and Krishnan, V. (2014). Inhibition of activin a ameliorates skeletal muscle injury and rescues contractile properties by inducing efficient remodeling in female mice. *Am. J. Pathol.* 184, 1152–1166.
- Yang, J., Li, S.Y., Li, Y.Q., Cao, J.Q., Feng, S.W., Wang, Y.Y., Zhan, Y.X., Yu, C.S., Chen, F., Li, J., et al. (2013). MLPA-based genotype-phenotype analysis in 1053 Chinese patients with DMD/BMD. *BMC Med. Genet.* 14, 29.
- Yang, Q., Tang, Y., Imbrogno, K., Lu, a, Proto, J.D., Chen, a, Guo, F., Fu, F.H., Huard, J., and Wang, B. (2012). AAV-based shRNA silencing of NF-κB ameliorates muscle pathologies in mdx mice. *Gene Ther.* 1196–1204.
- Yin, A.H., Miraglia, S., Zanjani, E.D., meida-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, 5002–5012.
- Yin, H., Price, F., and Rudnicki, M. a (2013). Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol. Rev.* 93, 23–67.
- Ylöstalo, J.H., Bartosh, T.J., Coble, K., and Prockop, D.J. (2012). Human mesenchymal stem/stromal cells cultured as spheroids are self-activated to produce prostaglandin E2 that directs stimulated macrophages into an anti-inflammatory phenotype. *Stem Cells* 30, 2283–2296.
- Yokota, T., Lu, Q.L., Partridge, T., Kobayashi, M., Nakamura, A., Takeda, S., and Hoffman, E. (2009). Efficacy of systemic morpholino exon-skipping in duchenne dystrophy dogs. *Ann. Neurol.* 65, 667–676.

- Yokota, T., Nakamura, A., Nagata, T., Saito, T., Kobayashi, M., Aoki, Y., Echigoya, Y., Partridge, T., Hoffman, E.P., and Takeda, S. (2012). Extensive and prolonged restoration of dystrophin expression with vivo-morpholino-mediated multiple exon skipping in dystrophic dogs. *Nucleic Acid Ther.* 22, 306–315.
- Yoon, Y.S., Wecker, A., Heyd, L., Park, J.S., Tkebuchava, T., Kusano, K., Hanley, A., Scadova, H., Qin, G., Cha, D.H., et al. (2005). Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. *J. Clin. Invest.* 115, 326–338.
- Young, J.E., and Goldstein, L.S.B. (2012). Alzheimer's disease in a dish: Promises and challenges of human stem cell models. *Hum. Mol. Genet.* 21.
- Yugeta, N., Urasawa, N., Fujii, Y., Yoshimura, M., Yuasa, K., Wada, M.R., Nakura, M., Shimatsu, Y., Tomohiro, M., Takahashi, A., et al. (2006). Cardiac involvement in Beagle-based canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMDJ): electrocardiographic, echocardiographic, and morphologic studies. *BMC Cardiovasc. Disord.* 6, 47.
- Yuko, S.M., Yoko, A., Norio, M., Nandkishore, R.B., Michael, G.B., and Atsushi, A. (2015). Pregnancy-induced amelioration of muscular dystrophy phenotype in mdx mice via muscle membrane stabilization effect of glucocorticoid. *PLoS One* 10, 1–19.
- Zammit, P.S., Golding, J.P., Nagata, Y., Hudon, V., Partridge, T.A., and Beauchamp, J.R. (2004). Muscle satellite cells adopt divergent fates: A mechanism for self-renewal? *J. Cell Biol.* 166, 347–357.
- Zannettino, A., Paton, S., Arthur, A., Khor, F., Itescu, S., Gimble, J., and Gronthos, S. (2007). Multipotential Human Adipose-Derived Stromal Stem Cells Exhibit a Perivascular Phenotype In Vitro and In Vivo. *J. Cell. Physiol.* 214, 413–421.
- Zhang, G., Shang, B., Yang, P., Cao, Z., Pan, Y., and Zhou, Q. (2012). Induced Pluripotent Stem Cell Consensus Genes: Implication for the Risk of Tumorigenesis and Cancers in Induced Pluripotent Stem Cell Therapy. *Stem Cells Dev.* 21, 955–964.
- Zhao, G., Miao, H., Li, X., Chen, S., Hu, Y., Wang, Z., and Hou, Y. (2016). TGF- β 3-induced miR-494 inhibits macrophage polarization via suppressing PGE2 secretion in mesenchymal stem cells. *FEBS Lett.* 590, 1602–1613.
- Zheng, B., Cao, B., Crisan, M., Sun, B., Li, G., Logar, A., Yap, S., Pollett, J.B., Drowley, L., Cassino, T., et al. (2007). Prospective identification of myogenic endothelial cells in human skeletal muscle. *Nat. Biotechnol.* 25, 1025–1034.
- Zhou, 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, 1028–1034.
- Zimmerman, A., Clemens, P.R., Tesi-Rocha, C., Connolly, A., Iannaccone, S.T., Kuntz, N., Arrieta, A., Hache, L., Henricson, E., Hu, F., et al. (2011). Liquid formulation of pentoxifylline is a poorly tolerated treatment for duchenne dystrophy. *Muscle and Nerve* 44, 170–173.
- Zucconi, E., Vieira, N.M., Bueno, C.R., Secco, M., Jazedje, T., Costa Valadares, M., Fussae Suzuki, M., Bartolini, P., Vainzof, M., and Zatz, M. (2011). Preclinical studies with umbilical cord mesenchymal stromal cells in different animal models for muscular dystrophy. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, 715251.
- Zuk, P., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D., Huang, J., Mizuno, H., Alfonso, Z., Fraser, J., Benhaim, P., and Hedrick, M. (2002). Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Mol. Biol. Cell* 13, 4279–4295.

Sites internet

Anderson P. (2016) *FDA Declines Approval for Drisapersen in DMD*. [en ligne]. Disponible sur : <http://www.medscape.com/viewarticle/857406> [Consulté le 02 Novembre 2016]

PTC THERAPEUTICS (2016) *PTC Receives Refuse to File Letter from FDA for Translarna™ (ataluren)*. [en ligne]. Disponible sur : <http://www.prnewswire.com/news-releases/ptc-receives-refuse-to-file-letter-from-fda-for-translarna-ataluren-300224506.html> [Consulté le 02 Novembre 2016]

ELI LILLY AND COMPAGNY (2016) *A Study of Tadalafil for Duchenne Muscular Dystrophy* [en ligne]. Disponible sur : <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01865084> [Consulté le 02 Novembre 2016].

EUROSTEMCELL (2015) *Europe approves Holoclar®, the first stem cell-based medicinal product*. [en ligne]. Disponible sur : <http://www.eurostemcell.org/story/europe-approves-holoclar-first-stem-cell-based-medicinal-product> [Consulté le 18 Août 2016].

TIGENIX (2016) *TiGenix sollicite l'AMM du Cx601 auprès de l'EMA pour le traitement des fistules périanales complexes chez les patients atteints de la maladie de Crohn*. [en ligne]. Disponible sur : <https://www.google.fr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0ahUKEwi15vPji7LOAhWGJhoKHQaFDfwQFggcMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.tigenix.com%2Fnl%2Fdownload%2F%3Fs%3D6oDpSEVNkfbGfZARi7bRC9JHFSNMUDOT9auRhxxl1F5Dk4dTWU6Zg6nOhr%252FRNgSzuM%252F85BSRRAw6aIGs5btwaA%253D%253D&u sg=AFQjCNF--xwCRq4mIsWPSIUZoeJoSThbRQ&sig2=FOAxLqi7LKnz7gC7J4H0gg> [Consulté le 08 Août 2016].

VILLA MEDICA (2016) *Cell Therapy History & Principle* [en ligne]. Disponible sur : <http://www.villa-medica.com/cell-therapy/cell-therapy-history-principle/> [Consulté le 08 Août 2016].

Thèse de Doctorat

Judith LORANT

Cellules souches adultes MuStem : phénotype, myogénicité, immunomodulation et contexte immunologique d'administration *in vivo*

Adult stem cells named MuStem: phenotype, myogenicity, immunomodulation and immunological context of *in vivo* delivery

Résumé

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une pathologie récessive liée au chromosome X qui résulte d'une mutation sur le gène de la dystrophine aboutissant à l'absence complète de la protéine. Elle correspond à la plus fréquente des dystrophies musculaires et reste aujourd'hui sans traitement curatif. L'UMR a fait la preuve de concept de l'administration systémique d'une population de cellules souches adultes résidentes du muscle, les cellules MuStem canines chez le chien dystrophinopathe, modèle cliniquement pertinent de la DMD. L'objectif de la thèse a consisté à caractériser la population humaine (hMuStem) en terme de phénotype, myogénicité, immunomodulation et de contexte immunologique d'administration *in vivo*. La population hMuStem se compose de progéniteurs myogéniques précoces d'origine mésenchymateuse-périvasculaire. Elle se définit par une forte capacité proliférative, une oligopotence et une participation à la régénération musculaire après administration dans un muscle lésé. Elles présentent des propriétés immunomodulatrices en interagissant avec l'immunité adaptative et innée par inhibition de la prolifération lymphocytaire et du complément via un ensemble de molécules de surface et/ou de facteurs sécrétés. Enfin, un traitement immunosuppresseur restreint à la période d'injection *in vivo* de la population allogénique s'avère nécessaire mais suffisant pour éviter une réaction immunitaire de l'hôte. L'ensemble de ces résultats aboutit à une meilleure compréhension de l'identité et des modalités d'action de la population MuStem.

Mots clés

Dystrophie musculaire de Duchenne, Thérapie cellulaire, Cellules souches adultes, Immunomodulation, Greffe allogénique

Abstract

Duchenne Muscular Dystrophy is a X-linked recessive disorder that results from mutation in the dystrophin gene leading to a total lack of the protein. It is the most frequent muscular dystrophy with no curative treatment. The lab made a proof of concept of the systemic delivery of a muscle-derived adult stem cell population called MuStem cells in dystrophic dog, the clinically relevant DMD model. The aim of my Ph.D. was to characterize the human population (hMuStem) in terms of phenotype, myogenicity, immunomodulation and immunological context of *in vivo* delivery. hMuStem cell population is composed of myogenic progenitors with mesenchymal/perivascular imprint. It exhibits a high proliferative capacity, an oligopotency and a participation to muscle regeneration after transplantation into injured muscle. It displays immunomodulatory properties by interacting with adaptive and innate immunity with inhibition of lymphocyte proliferation and complement thanks to expression of surface molecules and/or secreted factors. At last, an immunosuppressive regimen restricted to the allogeneic injection period is necessary but sufficient to avoid host immune response. Collectively, these results allow a better understanding of identity and action modalities of MuStem cell population.

Key Words

Duchenne Muscular Dystrophy, Cell therapy, Adult stem cells, Immunomodulation, Allogeneic graft