



HAL
open science

Approches de thérapies cellulaires et géniques dans le contexte des maladies musculaires squelettiques et cardiaques

Jean-Thomas Vilquin

► **To cite this version:**

Jean-Thomas Vilquin. Approches de thérapies cellulaires et géniques dans le contexte des maladies musculaires squelettiques et cardiaques. Biologie cellulaire. Université Pierre et Marie Curie (Paris 6), Sorbonne Universités, 2013. tel-03824567

HAL Id: tel-03824567

<https://hal.science/tel-03824567>

Submitted on 23 Nov 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Mémoire présenté par

M. Jean-Thomas Vilquin

**Habilitation à Diriger des Recherches,
Secteur Médecine**

Université Pierre et Marie Curie, Paris.

19 Décembre 2013

**« Approches de thérapies cellulaires et géniques dans le contexte des
maladies musculaires squelettiques et cardiaques »**

Sommaire

A - Curriculum Vitae

1. Coordonnées	5
2. Parcours académique et scientifique	5
3. Publications	5
3.1. Articles à comité de lecture	5
3.2. Proceedings à comité de lecture	10
3.3. Revues sans comité	11
3.4. Chapitres d'ouvrages	11
3.5. Brevets	12
3.6. Tableau de répartition des publications	12
4. Communications	12
4.1. Communications orales aux Congrès internationaux (invité)	12
4.2. Autres communications en congrès internationaux	14
4.3. Communications orales aux symposiums, séminaires	17
4.4. Autres communications aux symposiums, séminaires	20

B - Participation à l'encadrement de jeunes chercheurs

1. Encadrement de jeunes chercheurs	23
2. Supervision de collaborateurs	24
3. Participation à des jurys d'examens	25
4. Cours, enseignements	25
5. Administration, encadrement, organisation, diffusion de la recherche	27
5.1. Commissions	27
5.2. Diffusion scientifique	27
5.3. Organisation de conférences, workshops...	27
5.4. Participation à des programmes, animations	28
5.5. Autres expertises	28
6. Valorisations, contrats	29
6.1. Contrats, subventions	29
6.2. Brevets	30
6.3. Essais cliniques	31

C - Travaux de Recherche personnels placés dans leur contexte, principaux résultats et originalité.

Introduction	32
1. Production de cellules, méthodes, types cellulaires	32

1.1. Cultures de cellules musculaires murines	33
1.2. Cultures de cellules humaines à grande échelle	33
1.3. Caractérisation de cellules et de progéniteurs d'origine musculaire	34
1.3.1. Etat des lieux	34
1.3.2. Nouvelles populations de type mésenchymateux	35
1.3.3. Potentialité ostéogénique ou chondrogénique	37
1.3.4. Identification de progéniteurs exprimant l'aldéhyde déshydrogénase	38
1.4. Etudes de cellules musculaires normales et pathologiques : DMFSH	40
1.5. Identification de progéniteurs cardiaques Islet1+ dans le coeur de souris.	41
2. Approches thérapeutiques expérimentales : preuves de concept en thérapie cellulaire dans deux groupes de dystrophie musculaire	43
2.1. Thérapie cellulaire dans des modèles de DMD	43
2.2. Thérapie cellulaire dans des modèles de DMC	45
2.2.1. Présentation clinique, histologique, génétique, modèles animaux	45
2.2.2. Caractérisation de la pathologie musculaire par imagerie RMN	47
2.2.3. Approche expérimentale de thérapie cellulaire	48
2.3. Modélisation pathologique par transfert cellulaire : le cas de la DM1	49
2.4. Imagerie de transplantation cellulaire par résonance magnétique nucléaire	49
3. Approches thérapeutiques expérimentales : preuves de concept en thérapie génique dans deux groupes de dystrophie musculaire	52
3.1. Introduction	52
3.2. Utilisation de vecteurs adénoviraux et problèmes immunologiques	52
3.3. Evaluation de l'efficacité de l'électrotransfert <i>in vivo</i>	53
3.4. Evaluation d'autres vecteurs non viraux	55
4. Approches thérapeutiques expérimentales : preuves de concept en thérapie cellulaire autologue et ectopique de l'insuffisance cardiaque	56
4.1. Introduction	56
4.2. Transplantation de myoblastes en situation post-ischémique	58
4.3. Transplantation de myoblastes dans un modèle de cardiomyopathie dilatée	61
4.4. Comparaison de l'efficacité des myoblastes à d'autres types cellulaires.	61
4.5. Analyse de la mortalité cellulaire	62
5. Essais cliniques	63
5.1. Problématique du changement d'échelle et de la logistique	63
5.2. Essai clinique de phase I pour l'insuffisance cardiaque post-ischémique	63
5.3. Essai clinique de phase II « MAGIC »	65
5.4. Essai clinique de phase I pour la DMFSH	66
5.4.1. Situation clinique de l'utilisation des myoblastes	66
5.4.2. Mise en place de l'essai clinique	67
5.5. Essai clinique de phase I pour la DMOP	68
6. Création d'une start-up et structure de valorisation	68

D - Projet de Recherche

1. Introduction	70
-----------------	----

2. Caractérisations <i>in vitro</i> de cellules d'origine musculaire.	71
3. Approches <i>in vivo</i> de thérapie cellulaire musculaire squelettique	74
4. Approches <i>in vivo</i> de thérapie cellulaire cardiaque	76
4.1. Cellules souches embryonnaires murines	77
4.2. Cellules ALDH+	78
5. Approches expérimentales de thérapie cellulaire ostéogénique	78
5.1. Principe	78
5.2. Contexte des recherches	79
5.3 Premiers résultats et perspectives	80
6. Perspectives ouvertes par le diplôme	82
Références bibliographiques	
83	
E - Copies des diplômes nécessaires à l'inscription	
100	
F - Propositions des rapporteurs	104
Résumé en Anglais	105
Copies des 5 publications les plus représentatives	106

A- Curriculum Vitae

1. Coordonnées

Jean-Thomas VILQUIN

Né le 27/10/64

Doctorat en Pharmacie, Doctorat en Sciences de la Vie
Chargé de Recherches (CR1) au CNRS

Numéro d'agent : 00004074

Détaché à l'Unité mixte UPMC/AIM UMRS974,
CNRS UMR7215, INSERM U974

Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Bâtiment Babinski

47 Boulevard de l'Hôpital

75651 Paris Cedex 13

Tel: 01 42 16 57 14 - Fax: 01 42 16 57 00

e-mail : jt.vilquin@institut-myologie.org

2. Parcours académique et scientifique

- 1982-1987 : Diplôme de Pharmacien obtenu à l'Université Louis Pasteur de Strasbourg, Major.
- 1987-1988 : DEA en Pharmacologie et Pharmacochimie à l'Université Louis Pasteur de Strasbourg et UV d'Immunologie fondamentale.
- 1988-1992 : Thèse de Sciences à l'Université Louis Pasteur de Strasbourg (« Contribution à la connaissance, au traitement et au diagnostic de la Myasthenia gravis »), Mention très Honorable, Boursier MRT.
- 1990-1991 : Moniteur de l'Enseignement Supérieur, Biologie Cellulaire, Université Louis Pasteur de Strasbourg.
- 1991-1992 : Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche en microbiologie, Faculté de Médecine et Pharmacie de Dijon (Enseignement), Faculté de Pharmacie de Strasbourg (Recherche).
- 1993-1996 : Stage post-doctoral (40 mois), Québec, Canada (thérapie génique et cellulaire à l'aide de modèles animaux de dystrophies musculaires, équipe du Pr. Jacques Tremblay), (AFM).
- 1996-1999 : Stage post-doctoral (3 ans), Unité INSERM153 (devenue INSERM523, INSERM582, INSERM974), Paris, France (Thérapie cellulaire et génique dans les modèles de dystrophies musculaires et d'insuffisance cardiaque, Direction Pr. Michel Fardeau, Dr. Ketty Schwartz, Dr. Pascale Guicheney, Pr. Thomas Voit).
- Présentation aux concours de recrutements du CNRS (CR1), et admission en 1999.
- Admissible au Grade de DR2 du CNRS (Avril 2011).

3. Publications.

3.1. Articles à comité de lecture.

1. Khattar P, Friedrich FW, Bonne G, Carrier L, Eschenhagen T, Schwartz K, Fiszman MY, Vilquin JT. Two distinct populations of Islet-1-expressing cells in the hearts of different murine strains. *Stem Cells Development* 2010; In Press. IF 4.1
2. Sacconi S, Vilquin JT, Fabbri G, Angeletti B, Salviati L, Casarin A, Plaisant M, Delplace S, Butker-Browne G, Marolleau JP, Larghero J, Tupler R & Desnuelle C. Selective muscle

- involvement in facioscapulohumeral muscular dystrophy correlates with overexpression of FRG1 and ANT1 in differentiating myoblasts. *Neuromuscular Disorders*, In Revision. IF 2.97
3. Lecourt S, Marolleau JP, Fromigué O, Vauchez K, Andriamanalijaona R, Ternaux B, Lacassagne MN, Robert I, Boumédiène K, Chéreau F, Marie P, Larghero J, Fiszman M, Vilquin JT. Characterization of distinct mesenchymal-like cell populations from human skeletal muscle in situ and *in vitro*. *Experimental Cell research* 2010; 316, 2513-2526. IF 3.60
 4. Vauchez K, Marolleau JP, Schmid M, Khatrar P, Chapel A, Catelain C, Lecourt S, Larghero J, Fiszman M, Vilquin JT. Aldehyde dehydrogenase activity identifies a population of human skeletal muscle cells with high myogenic capacities. *Molecular Therapy* 2009 ; 17 (11) : 1948-1958. IF 6.24
 5. Baligand C, Vauchez K, Fiszman MY, Vilquin JT, Carlier PG. Discrepancies between the fate of myoblast xenograft in mouse leg muscles and NMR label persistency after loading with Gd-DTPA or SPIOs. *Gene Therapy* 2009; 16 (6), 734-745. IF 4.83
 6. Praud C, Vauchez K, Lombes A, Fiszman M, Vilquin J-T. Myoblast xenotransplantation as a tool to evaluate the appropriateness of nanoparticulate versus cellular trackers. *Cell Transplantation* 2008 ; 17(9) : 1035-1043. IF 5.1
 7. Menasché P, Alfieri O, Janssens S, McKenna W, Reichenspurner H, Trinquart L, Vilquin JT, Marolleau JP, Seymour B, Larghero J, Lake S, Chatellier G, Solomon S, Desnos M, Hagege AA. The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation* 2008 Mar 4;117(9):1189-1200. IF 14.81
 8. Andriamanalijaona R, Duval E, Raoudi R, Lecourt L, Vilquin JT, Marolleau JP, Pujol JP, Galera P, Boumédiène K. Differentiation potential of human muscle-derived cells towards chondrogenic phenotype in alginate beads culture. *Osteoarthritis Cartilage* 2008, 16 (12): 1509-1518. IF 4.21
 9. Le Ricousse-Roussanne S, Larghero J, Zini JM, Barateau V, Foubert P, Uzan G, Liu X, Lacassagne MN, Ternaux B, Robert I, Benbunan M, Vilquin JT, Vauchez K, Tobelem G, Marolleau JP. Ex vivo generation of mature and functional human smooth muscle cells differentiated from skeletal myoblasts. *Exp Cell Res* 2007, 313-317, 1337-1346. IF 3.6
 10. Hagege AA, Marolleau JP, Vilquin JT, Alheritiere A, Peyrard S, Duboc D, Abergel E, Messas E, Mousseaux E, Schwartz K, Desnos M, Menasche P. Skeletal myoblast transplantation in ischemic heart failure: long-term follow-up of the first phase I cohort of patients. *Circulation*. 2006 Jul 4;114(1 Suppl):I108-13. IF 14.81
 11. Messas E, Bel A, Morichetti MC, Carrion C, Handschumacher MD, Peyrard S, Vilquin JT, Desnos M, Bruneval P, Carpentier A, Menasche P, Levine RA, Hagege AA. Autologous myoblast transplantation for chronic ischemic mitral regurgitation. *J Am Coll Cardiol*. 2006 May 16;47(10):2086-93. IF 9.20
 12. Brasselet C, Morichetti MC, Messas E, Carrion C, Bissery A, Bruneval P, Vilquin JT, Lafont A, Hagege AA, Menasche P, Desnos M. Skeletal myoblast transplantation through a catheter-based coronary sinus approach: an effective means of improving function of infarcted myocardium. *Eur Heart J*. 2005 ; 26 : 1551-1556. IF 7.34
 13. Maurel A, Azarnoush K, Sabbah¹ L, Vignier N, Le Lorc'h M, Mandet C, Garcin I, Carrion C, Bissery A, Fiszman M, Bruneval P, Hagege A, Carpentier A, Vilquin JT and Menasché P. Can Cold or Heat Shock Improve Skeletal Myoblast Engraftment in Infarcted Myocardium? *Transplantation* 2005; 80(5): 660-665. IF 3.87
 14. Vilquin JT, Marolleau JP, Sacconi S, Garcin I, Lacassagne MN, Robert I, Ternaux B, Bouazza B, Larghero J, Desnuelle C. Normal growth and regenerating ability of myoblasts

- from unaffected muscles of facioscapulohumeral muscular dystrophy patients. *Gene Therapy* 2005; 12(22): 1651-1662. IF 4.83
15. Agbulut O, Vandervelde S, Al Attar N, Larghero J, Ghostine S, Leobon B, Robidel E, Borsani P, Le Lorc'h M, Bissery A, Chomienne C, Bruneval P, Marolleau JP, Vilquin JT, Hagege A, Samuel JL, Menasche P. Comparison of human skeletal myoblasts and bone marrow-derived CD133+ progenitors for the repair of infarcted myocardium. *J Am Coll Cardiol*. 2004 Jul 21;44(2):458-63. IF 9.20
 16. Pouly J, Hagege AA, Vilquin JT, Bissery A, Rouche A, Bruneval P, Duboc D, Desnos M, Fiszman M, Fromes Y, Menasche P. Does the functional efficacy of skeletal myoblast transplantation extend to nonischemic cardiomyopathy? *Circulation*. 2004 Sep 21;110(12):1626-31. IF 14.81
 17. Léobon B, Garcin I, Menasche P, Vilquin JT, Audinat E, Charpak S. Myoblasts transplanted in infarcted myocardium remain electromechanically isolated. *PNAS* 2003, 100 : 7808-7811. IF 10.23
 18. Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, Desnos M, Abergel E, Scorsin M, Pouzet B, Sarateanu S, Schwartz K, Marolleau JP, Duboc D. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003, 41: 1078-1083. IF 11.63
 19. Alattar N, Carrion C, Ghostine S, Garcin I, Vilquin JT, Hagege AA, Menasche P. Long-term (1 year) Results of Autologous Skeletal Myoblast Transplantation in Rat. Functional Assessment by Echocardiography and Pressure-Volume Loops. *Cardiovascular Research* 2003, 58: 42-48. IF 5.28
 20. Paturneau-Jouas M, Parzy E, Vidal G, Carlier PG, Wary C, Vilquin JT, de Kerviler E, Schwartz K, Leroy-Willig A. Electrotransfer at MR imaging: tool for optimization of gene transfer protocols--feasibility study in mice. *Radiology*. 2003 Sep;228(3):768-75. IF 5.37
 21. Hagege A, Carrion C, Menasché P, Vilquin JT, Duboc D, Marolleau JP, Desnos M, Bruneval P. Viability and differentiation of autologous skeletal myoblast grafts in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet* 2003, 361 : 491-492. IF 23.40
 22. Besse S, Allamand V, Vilquin J-T, Li Z, Poirier C, Vignier N, Hori H, Guénet JL, Guicheney P. Spontaneous dystrophy caused by a retrotransposal insertion in the mouse laminin $\alpha 2$ chain gene. *Neuromuscular Disorders* 2003, 13: 216-22. IF 2.97
 23. Guo LT, Zhang XU, Kuang W, Xu H, Liu LA, Vilquin J-T, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Ruegg M, Wewer MU, Engvall E. Laminin $\alpha 2$ deficiency and muscular dystrophy; genotype-phenotype correlation in mutant mice. *Neuromuscular Disorders* 2003, 13: 207-215. IF 2.97
 24. Pitard B, Pollard H, Agbulut O, Lambert O, Vilquin JT, Cherel Y, Abadie J, Samuel JL, Rigaud JL, Menoret S, Anegon I, Escande D. A non-ionic amphiphile agent promotes gene delivery *in vivo* to skeletal and cardiac muscles. *Human Gene Therapy* 2002; 13 (14), 1767-1775. IF 4.07
 25. Ghostine S, Carrion C, Guarita Souza LC, Richard P, Bruneval P, Vilquin J-T, Pouzet B, Schwartz K, Ménasche P, Hagege AA. Long term efficacy of myoblast transplantation on regional structure and function after myocardial infarction. *Circulation* 2002; 106, I-131-I-136. IF 14.81
 26. Hagege AA, Vilquin JT, Bruneval P, Menasche P. Regeneration of the myocardium: a new role in the treatment of ischemic heart disease? *Hypertension*. 2001 Dec 1;38(6):1413-5. IF 6.33
 27. Pouzet B, Ghostine S, Vilquin JT, Garcin I, Scorsin M, Hagege AA, Duboc D, Schwartz K, Menasche P. Is skeletal myoblast transplantation clinically relevant in the era of angiotensin-converting enzyme inhibitors? *Circulation*. 2001 Sep 18;104(12 Suppl 1):I223-8. IF 14.81

28. Vilquin JT, Kennel PF, Paturneau-Jouas M, Chapdelaine P, Boissel N, Delaere P, Tremblay JP, Scherman D, Fiszman MY, Schwartz K. Electrotransfer of naked DNA in the skeletal muscles of animal models of muscular dystrophies. *Gene Ther.* 2001 Jul;8(14):1097-107. IF 4.83
29. Pouzet B, Vilquin JT, Hagege AA, Scorsin M, Messas E, Fiszman M, Schwartz K, Menasche P. Factors affecting functional outcome after autologous skeletal myoblast transplantation. *Ann Thorac Surg.* 2001 Mar;71(3):844-50; discussion 850-1. IF 2.22
30. Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, Schwartz K, Vilquin JT, Marolleau JP. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet.* 2001 Jan 27;357(9252):279-80. IF 23.40
31. Pouzet B, Vilquin JT, Hagege AA, Scorsin M, Messas E, Fiszman M, Schwartz K, Menasche P. Intramyocardial transplantation of autologous myoblasts: can tissue processing be optimized? *Circulation.* 2000 Nov 7;102(19 Suppl 3):III210-5. IF 14.81
32. Chapdelaine P, Moisset PA, Campeau P, Asselin I, Vilquin JT, Tremblay JP. Functional EGFP-dystrophin fusion proteins for gene therapy vector development. *Protein Eng.* 2000 Sep;13(9):611-5. IF 2.67
33. Tardif-de Gery S, Vilquin JT, Carlier P, Raynaud J, Wary C, Schwartz K, Leroy-Willig A. Muscular transverse relaxation time measurement by magnetic resonance imaging at 4 tesla in normal and dystrophic dy/dy and dy(2j)/dy(2j) mice. *Neuromuscul Disord.* 2000 Oct;10(7):507-13. IF 2.97
34. Scorsin M, Hagege A, Vilquin JT, Fiszman M, Marotte F, Samuel JL, Rappaport L, Schwartz K, Menasche P. Comparison of the effects of fetal cardiomyocyte and skeletal myoblast transplantation on postinfarction left ventricular function. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2000 Jun;119(6):1169-75. IF 3.72
35. Vilquin JT, Vignier N, Tremblay JP, Engvall E, Schwartz K, Fiszman M. Identification of homozygous and heterozygous dy2J mice by PCR. *Neuromuscul Disord.* 2000 Jan;10(1):59-62. IF 2.97
36. Kuang W, Xu H, Vilquin JT, Engvall E. Activation of the lama2 gene in muscle regeneration: abortive regeneration in laminin alpha2-deficiency. *Lab Invest.* 1999 Dec;79(12):1601-13. IF 3.85
37. Vilquin JT, Guerette B, Puymirat J, Yaffe D, Tome FM, Fardeau M, Fiszman M, Schwartz K, Tremblay JP. Myoblast transplantations lead to the expression of the laminin alpha 2 chain in normal and dystrophic (dy/dy) mouse muscles. *Gene Ther.* 1999 May;6(5):792-800. IF 4.83
38. Skuk D, Furling D, Bouchard JP, Goulet M, Roy B, Lacroix Y, Vilquin JT, Tremblay JP, Puymirat J. Transplantation of human myoblasts in SCID mice as a potential muscular model for myotonic dystrophy. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1999 Sep;58(9):921-31. IF 4.47
39. Ito H, Vilquin JT, Skuk D, Roy B, Goulet M, Lille S, Dugre FJ, Asselin I, Roy R, Fardeau M, Tremblay JP. Myoblast transplantation in non-dystrophic dog. *Neuromuscul Disord.* 1998 Apr;8(2):95-110. IF 2.97
40. Vilquin JT, Brussee V, Asselin I, Kinoshita I, Gingras M, Tremblay JP. Evidence of mdx mouse skeletal muscle fragility *in vivo* by eccentric running exercise. *Muscle Nerve.* 1998 May;21(5):567-76. IF 2.45
41. Kinoshita I, Vilquin JT, Asselin I, Chamberlain J, Tremblay JP. Transplantation of myoblasts from a transgenic mouse overexpressing dystrophin produced only a relatively small increase of dystrophin-positive membrane. *Muscle Nerve.* 1998 Jan;21(1):91-103. IF 2.45

42. Guerette B, Vilquin JT, Gingras M, Gravel C, Wood KJ, Tremblay JP. Prevention of immune reactions triggered by first-generation adenoviral vectors by monoclonal antibodies and CTLA4Ig. *Hum Gene Ther.* 1996 Aug 1;7(12):1455-63. 4.07
43. Guerette B, Tremblay G, Vilquin JT, Asselin I, Gingras M, Roy R, Tremblay JP. Interferon-gamma mRNA expression following alloincompatible myoblast transplantation is inhibited by FK506. *Muscle Nerve.* 1996 Jul;19(7):829-35. IF 2.45
44. Kinoshita I, Vilquin JT, Roy T, Tremblay JP. Successive injections in mdx mice of myoblasts grown with bFGF. *Neuromuscul Disord.* 1996 May;6(3):187-93. 2.97
45. Vilquin JT, Kinoshita I, Roy B, Goulet M, Engvall E, Tome F, Fardeau M, Tremblay JP. Partial laminin alpha2 chain restoration in alpha2 chain-deficient dy/dy mouse by primary muscle cell culture transplantation. *J Cell Biol.* 1996 Apr;133(1):185-97. 14.28
46. Kinoshita I, Vilquin JT, Tremblay JP. Mechanism of increasing dystrophin-positive myofibers by myoblast transplantation: study using mdx/beta-galactosidase transgenic mice. *Acta Neuropathol (Berl).* 1996;91(5):489-93. 2.52
47. Vilquin JT, Kinoshita I, Roy R, Tremblay JP. Cyclophosphamide immunosuppression does not permit successful myoblast allotransplantation in mouse. *Neuromuscul Disord.* 1995 Nov;5(6):511-7. 2.97
48. Vilquin JT, Guerette B, Kinoshita I, Roy B, Goulet M, Gravel C, Roy R, Tremblay JP. FK506 immunosuppression to control the immune reactions triggered by first-generation adenovirus-mediated gene transfer. *Hum Gene Ther.* 1995 Nov;6(11):1391-401. 4.07
49. Vilquin JT, Wagner E, Kinoshita I, Roy R, Tremblay JP. Successful histocompatible myoblast transplantation in dystrophin-deficient mdx mouse despite the production of antibodies against dystrophin. *J Cell Biol.* 1995 Nov;131(4):975-88. 14.28
50. Kinoshita I, Vilquin JT, Gravel C, Roy R, Tremblay JP. Myoblast allotransplantation in primates. *Muscle Nerve.* 1995 Oct;18(10):1217-8. IF 2.45
51. Asselin I, Tremblay M, Vilquin JT, Guerette B, Roy R, Tremblay JP. Quantification of normal dystrophin mRNA following myoblast transplantation in mdx mice. *Muscle Nerve.* 1995 Sep;18(9):980-6. IF 2.45
52. Kinoshita I, Vilquin JT, Tremblay JP. Pretreatment of myoblast cultures with basic fibroblast growth factor increases the efficacy of their transplantation in mdx mice. *Muscle Nerve.* 1995 Aug;18(8):834-41. IF 2.45
53. Kennel PF, Vilquin JT, Braun S, Fonteneau P, Warter JM, Poindron P. Myasthenia gravis: comparative autoantibody assays using human muscle, TE671, and glucocorticoid-treated TE671 cells as sources of antigen. *Clin Immunol Immunopathol.* 1995 Mar;74(3):293-6. 3.20
54. Vilquin JT, Asselin I, Guerette B, Kinoshita I, Roy R, Tremblay JP. Successful myoblast allotransplantation in mdx mice using rapamycin. *Transplantation.* 1995 Feb 15;59(3):422-6. 3.87
55. Guerette B, Asselin I, Vilquin JT, Roy R, Tremblay JP. Lymphocyte infiltration following allo- and xenomyoblast transplantation in mdx mice. *Muscle Nerve.* 1995 Jan;18(1):39-51. IF 2.45
56. Kinoshita I, Vilquin JT, Guerette B, Asselin I, Roy R, Tremblay JP. Very efficient myoblast allotransplantation in mice under FK506 immunosuppression. *Muscle Nerve.* 1994 Dec;17(12):1407-15. IF 2.45
57. Vilquin JT, Braun S, Labouret P, Tranchant C, Hartmann D, Lombard Y, Goetz J, Urlacher A, Wihlm JM, Warter JM, Poindron P. Establishment and characterization of B-like lymphoblastoid cell lines by long-term culture of primary explants from human myasthenic thymus. *Thymus.* 1993 Feb;21(1):25-42. IF Not Available

58. Vilquin JT, Braun S, Labouret P, Zuber G, Tranchant C, Poindron P, Warter JM. Specific effect of corticoids on acetylcholine receptor expression in rat skeletal muscle cell cultures. *J Neurosci Res*. 1992 Feb;31(2):285-93. I.F. 3.23
59. Braun S, Tranchant C, Vilquin JT, Labouret P, Warter JM, Poindron P. Stimulating effects of prednisolone on acetylcholine receptor expression and myogenesis in primary culture of newborn rat muscle cells. *J Neurol Sci*. 1989 Sep;92(2-3):119-31. I.F. 2.03

3.2. Proceedings à comité de lecture.

1. Negroni E, Vallese D, Vilquin JT, Butler-Browne G, Mouly V, Trollet C. Current advances in cell therapy strategies for muscular dystrophies. *Expert Opin Biol Ther*. 2011 Feb;11(2):157-76. IF: 3.2
2. Vilquin JT, Rosset P. Mesenchymal stem cells in bone and cartilage repair : current status. *Future Medicine – Regenerative Medicine* 2006 July ; 1 (4) : 589-604. IF 2.78
3. Vilquin JT, Marolleau JP, Schwartz K. Cell transplantation for the treatment of heart failure. *Drug Discovery Today : therapeutic strategies* 2006 ; 3 (2) : 271-278. I.F. 7.15
4. Vilquin JT. Myoblast transplantation: clinical trials and perspectives. Mini-review. *Acta Myol*. 2005 Oct;24(2):119-27. Review.
5. Desnuelle C, Sacconi S, Marolleau JP, Larghero J, Vilquin JT. The possible place of autologous cell therapy in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Bull Acad Natl Med*. 2005 Apr;189(4):697-713; discussion 713-4. French.
6. Vilquin JT, Marolleau JP, Hagege A, Menasche P, Fiszman M, Schwartz K. Cell transplantation for post-ischemic heart failure. *Arch Malad Cœur Vaiss* 2002, 95 : 1219-1225.
7. Skuk D, Vilquin JT, Tremblay JP. Experimental and therapeutic approaches to muscle dystrophies. *Current Opinion in Neurology* 2002; 15 (5), 563-569. I.F. 3.9.
8. JT Vilquin, JP Marolleau, B Pouzet, I Garcin, C Carrion, B Ternaux, I Robert, MN Lacassagne, M Scorsin, A Hagège, M Desnos, D Duboc, M Fiszman, K Schwartz, P Menasché. Transplantation of adult skeletal muscle cells in the heart. *Acta Myologica* 2001 ; XX :145-150.
9. M Paturneau-Jouas, E Parzy, G Vidal, P Bozin, JT Vilquin, C Wary, P Carlier, K Schwartz, A Leroy-Willig. Electroporation-mediated delivery of a magnetic resonance imaging contrast agent into muscle to visualize electrotransfer. *Acta Myologica* 2001 ; XX : 174-178.
10. Menasche P, Hagege A, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, Schwartz K, Vilquin JT, Marolleau JP. [Autologous skeletal myoblast transplantation for cardiac insufficiency. First clinical case]. *Arch Mal Coeur Vaiss*. 2001 Mar;94(3):180-2. French.
11. Fardeau M, Tome FM, Vilquin JT, Guicheney P. Congenital muscular dystrophies. A short review of the recent progresses. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl*. 1999;50:335-40. Review.
12. Vilquin JT, Asselin I, Guérette B, Kinoshita I, Lille S, Roy R, Tremblay JP. Myoblast allotransplantation in mice: degree of success varies depending on the efficacy of various immunosuppressive treatments. *Transplant Proc*. 1994 Dec;26(6):3372-3.
13. Guérette B, Asselin I, Vilquin JT, Roy R, Tremblay JP. Lymphocyte infiltration following allo- and xenomyoblast transplantation in mice. *Transplant Proc*. 1994 Dec;26(6):3461-2.
14. Kinoshita I, Vilquin JT, Guérette B, Asselin I, Roy R, Lille S, Tremblay JP. Immunosuppression with FK 506 insures good success of myoblast transplantation in MDX mice. *Transplant Proc*. 1994 Dec;26(6):3518.

15. Asselin I, Tremblay M, Vilquin JT, Guérette B, Tremblay JP. Polymerase chain reaction-based assay to assess the success of myoblast transplantation in mdx mice. *Transplant Proc.* 1994 Dec;26(6):3389.
16. Kennel P, Vilquin JT, Fonteneau P, Tranchant C, Poindron P, Warter JM. [Value of TE671 cells in the detection of anti-acetylcholine receptor antibodies]. *Rev Neurol (Paris)*. 1993;149(12):771-5. French.

3.3. Publications dans des revues sans comité.

1. Vauchez K, Catelain C, Vilquin JT. [Aldehyde Dehydrogenase and stem cells : detecting the functional activity to perform an efficient selection]. *Med Sci (Paris)*, Mai 2011, Soumis (Français).
2. Vilquin JT. Actualités pré-cliniques. Trois brèves. *Les Cahiers de Myologie* (2011). 4, 34-35.
3. Vilquin JT. Actualités pré-cliniques. Trois brèves. *Les Cahiers de Myologie* (2010). 3, 35-36.
4. Vilquin JT. Actualités pré-cliniques. Trois brèves. *Les Cahiers de Myologie* (2010). 2, 33-34.
5. Vilquin JT. Actualités pré-cliniques. Trois brèves. *Les Cahiers de Myologie* (2009). 1, 36-37.
6. Vilquin JT. Place des cellules souches dans le traitement des cardiopathies. *Médecine de la Reproduction, Gynécologie Endocrinologie* 2009 ; 11(1) : 71-83.
7. Vilquin JT, Marolleau JP. Cell transplantation in heart failure management. *Med Sci (Paris)*. 2004 Jun-Jul;20(6-7):651-62.
8. Schwartz K, Vilquin JT. Building the translational highway : toward new partnerships between academia and the private sector. *Nature Medicine* 2003, 9 : 493-495 (Commentary).
9. Pouzet B, Vilquin JT, Menasche P. Myocardial implantation of muscle cells. *Presse Med.* 2002 ;31 (33):1569-76.
10. Pouzet B, Hagege AA, Vilquin JT, Desnos M, Duboc D, Marolleau JP, Menasche P. [Transplantation of autologous skeletal myoblasts in ischemic cardiac insufficiency]. *J Soc Biol.* 2001;195(1):47-9. Review. French.
11. Tremblay JP, Vilquin JT. [Transplantation of normal or genetically modified myoblasts for the treatment of hereditary or acquired diseases]. *J Soc Biol.* 2001;195(1):29-37. Review. French.
12. Vilquin JT, Scorsin M, Hagege AA, Menasche P, Fiszman M, Schwartz K. Transplantation de cellules musculaires dans le myocarde. *Réalités Cardiologiques* 1999; 143:31-36.
13. Partridge T, Beauchamp J, Morgan J, Tremblay JP, Huard J, Watt D, Wernig A, Irintchev A, Grounds M, Springer ML, Bartlett RJ, Mendell J, Vilquin JT, Bower JJ. Meeting of the Cell Transplantation Society in Miami. *Cell Transplant.* 1997 Mar-Apr;6(2):195-8. Review.

3.4. Chapitres d'ouvrages.

1. Pouzet B, Vilquin JT, Menasché P. Thérapie cellulaire. In: Biologie et pathologie du cœur et des vaisseaux, Editeur Groupe de Réflexions en Recherche Cardiovasculaire, Flammarion Médecine-Sciences, Paris, 571-580, 2002.

2. Vilquin JT, Menasché P. Thérapie cellulaire. In: Biologie et pathologie du cœur et des vaisseaux, Editeur Groupe de Réflexions en Recherche Cardiovasculaire, Flammarion Médecine-Sciences, Paris, 581-596, 2008.

3.5. Brevets.

1. Roy R, Tremblay JP, Guerette B, Vilquin JT. Methods of restoring a functional protein in a tissue by cell transplantation – Procédé pour reconstituer une protéine fonctionnelle dans un tissu par transplantation de cellules. Dépôt PCT 29/03/1996 (PCT/CA96/00191), phase internationale 09/10/1997 (WO97/36602), phase nationale Canada 18/01/1999 (2.260.808, Int.Cl. 6A61K39/395 - 6A61K35/34).
2. Vilquin JT, Marolleau JP, Tremblay JP, Robert I, Ternaux B. Procédé d'obtention de populations cellulaires d'origine musculaire et utilisations. Premier dépôt en France le 7 Juin 2000 (N° 007304) et aux USA le 16 Octobre 2000, sous l'égide de l'AP-HP, de l'INSERM et de l'AFM.
3. Vilquin JT, Marolleau JP, Tremblay JP, Robert I, Ternaux B. Method for obtaining characterised muscle-derived cell populations and uses. Version PCT N° 2001/094555 (WO/2001/094555), dépôt le 13/12/2001, et phase nationale N° PCT/FR2001/001768. Déposants : Assistance Publique, AFM, Inserm. Validation Office Européen des Brevets le 18 Novembre 2009, N° EP 01943584.1
4. Vilquin JT, Vauchez K and Marolleau JP inventors. Muscle Cells having myogenic potentials. Dépôt européen le 23/12/2008, N° Dépôt : 08291236.1 Déposant(s) Inserm, Genzyme SA. Publication number : 2 206 774, 14 Juillet 2010.

3.6. Tableau de répartition des publications.

Niveau des revues	Nombre de signatures en premier ou dernier auteur	Nombre de signatures dans un autre rang d'auteur	Facteur d'impact des revues concernées
A	9	20	3.72-23.40
A/B	2	1	3.60-6.24
B	5	20	2.22-7.34
B/C	1	2	2.67-3.87
C	2	7	0.38-2.03
Non indexées	7	2	0-2.80

4. Communications.

4.1. Communications orales à des congrès internationaux (invité).

1. Vilquin JT. Myoblast transplantation in heart failure: the MAGIC study. 5th International meeting of Myology, Marseille, Mai 2008.
2. JT Vilquin, P Menasché, A Hagège, J Larghero, JP Marolleau, K Schwartz. Cell Therapy and Heart Failure. Keystone Symposia, Cardiac Development and Disease/Cardiovascular Disease, Jan 22 - Jan 27, 2007, Denver, CO.
3. Jean-Thomas Vilquin, Sabrina Sacconi, Jean-Pierre Marolleau, Brigitte Ternaux, Marie-Noëlle Lacassagne, Isabelle Robert, Isabelle Garcin, Belaïd Bouazza, Jim Di Santo, Jérôme Larghero, Claude Desnuelle. Myoblast transplantation in Fascio-Scapulo-Humeral Muscular Dystrophy. Joint Congress of the Cell transplant Society, September

- 15-20, 2007, Minneapolis, MN.
4. JT Vilquin. "Which cell for myogenesis and how to characterise it? Focus on skeletal myoblast". 11th International LDD&R Local Drug Delivery meeting and cardiovascular course on Radiation & molecular strategies, February 3-5, 2005, Geneva, Switzerland.
 5. JT Vilquin, JP Marolleau, A Hagège, B Pouzet, M Scorsin, C Carrion, I Garcin, B Ternaux, I Robert, MN Lacassagne, J Larghero, D Duboc, M Desnos, M Fiszman, B Seymour, F Chéreau, K Schwartz, P Menasché. Myoblast transplantation for heart failure. Myology 2005, May 9-13, 2005, Nantes, France.
 6. JT Vilquin, B Ternaux, MN Lacassagne, I Robert, I Garcin, C Carrion, J Larghero, B Pouzet, S Sacconi, F Chéreau, D Duboc, M Fiszman, C Desnuelle, M Desnos, A Hagège, P Menasché, JP Marolleau, K Schwartz. Cell Therapy for Neuromuscular and Cardiac Disorders. Eurogenethy Ivth International Congress, 20-22 June 2005, Cachan, Paris.
 7. JT. Vilquin. Myoblast transplantation for heart failure. 7th Congress of the mediterranean Society of myology, 27-30 May 2004, Kusadasi, Turkey.
 8. JT Vilquin, JP Marolleau, M Scorsin, B Pouzet, B Leobon, J Pouly, N Al Attar, A Maurel, A Hagège, M Desnos, M Fiszman, K Schwartz, P Menasché. Factors affecting functional outcome after skeletal myoblast transplantation. 22-24 October 2004, Padova, Italy.
 9. JT Vilquin, JP Marolleau, AA Hagège, B Pouzet, M Desnos, D Duboc, M Fiszman, K Schwartz, P Menasché. Transplantation of adult skeletal muscle cells in the heart : results of the first phase I clinical trial. VIth Congress of the Cell Transplant Society, Atlanta 2-5 Mars 2003.
 10. JT Vilquin. Transplantation of Adult Myogenic Cells in the Heart : Pre-Clinical and Clinical Results. FASEB Summer Research Conferences : Skeletal Muscle Satellite Cells. Tucson 27-31 July 2003.
 11. JT. Vilquin. Myoblast Transfer: Current Status in Post-Ischemic Heart Failure. EMC 2003, Montpellier, 6-10 Septembre 2003.
 12. JT. Vilquin. Myoblast Transplantation for Heart Failure and Myopathies: from Basic Research to Large-Scale Clinical Developments. First CORDIA convention, Vienne 2-4 December 2003.
 13. JT Vilquin. Cell transplantation into the infarcted myocardium. What cells : myoblasts, cardiomyocytes, or embryonic stem cells ? European Society of Cardiology Congress 2002, Berlin, 31 August – 4 September 2002.
 14. Vilquin JT, Schwartz K. The potential of skeletal muscle precursor cells. European Society of Gene Therapy meeting 2002, Antibes, France, 13-16 Octobre 2002.
 15. Vilquin J.-T., M. Scorsin, A. Hagège, I. Garcin, M. Fiszman, K. Schwartz, and P. Menasché. Myoblast transplantation after myocardial infarction in rat. Submitted for the Fourth International Congress of the Cell Transplant Society, Montreux, March 21-24, 1999.
 16. Vilquin J.-T., U. Wewer, D. Yaffe, F.M.S. Tome, K. Schwartz, M.Y. Fiszman, and M. Fardeau. Laminin-2 restoration in dy/dy and dy^{2J}/dy^{2J} mouse models. Third Congress of the World Muscle Society, Naples, May 29-30, 1998.
 17. Vilquin J.-T., B. Roy, M. Goulet, M. Fardeau, F. Tome, E. Engvall and J.P. Tremblay. Partial laminin-2 restoration by primary muscle cell culture transplantation in dystrophic (dy/dy) mouse. Third International Congress of the Cell Transplant Society, Miami Beach, September 29-October 2, 1996.
 18. Vilquin J.-T., I. Asselin, B. Guérette, I. Kinoshita, R. Roy and J.P. Tremblay. Rapamycin can improve myoblast transplantation in dystrophic mdx/mdx mice. Second International Congress of the Cell Transplant Society, 1-4 Mai 1994, Minneapolis.

19. Vilquin J.-T., P. Kennel, B. Bergaentzle, H. Lery, P. Fonteneau, C. Tranchant, J.-M. Warter and P. Poindron. Measurement of auto-antiacetylcholine receptor antibodies in myasthenic patients, using mass production of acetylcholine receptors from TE671 cells. 3rd Meeting of the European Neurological Society, Lausanne, 27 Juin- 1er Juillet 1992.
20. Vilquin J.-T., S. Braun, Y. Lombard, D. Hartmann, P. Labouret, S. Dumont, J. Goetz, J.-M. Wihlm, J.-M. Warter and P. Poindron. Obtaining B-like lymphoblastoid cell lines from human hyperplastic myasthenic thymuses. 10th International Conference on Lymphatic Tissues and Germinal Centres, Compiègne, 1-15 Juillet 1990.
21. Vilquin J.-T., S. Braun, C. Tranchant, P. Labouret, J.-M. Warter and P. Poindron. Effect of different classes of steroids on myogenesis of cultured muscle cells. 2nd European Conference on Myasthenia Gravis, Tremezzo, 12-14 Juin 1989.

4.2. Autres communications à des congrès internationaux.

1. Vauchez K, Marolleau JP, Schmid M, Khattar P, Chapel A, Catelain C, Lecourt S, Larghero J, Fiszman M, Vilquin JT. Aldehyde dehydrogenase is expressed by distinct populations of muscle progenitors. 3rd International Congress on Myology, Lille, May 9-13, 2011.
2. Praud C, Vauchez K, Zongo P, Fiszman M, Vilquin JT. Kinetics, yield and fate of human myoblast implantation into immunodeficient SCID mice. 3rd International Congress on Myology, Lille, May 9-13, 2011.
3. Catelain C, Riveron S, Mougenot N, Jacquet A, Papadopoulos A, Vauchez K, Pucéat M, Bonne G, Fiszman M, Vilquin JT. Embryonic Stem cell transplantation in the *Lmna*^{H2222P/H2222P} mouse model of dilated cardiomyopathy. 3rd International Congress on Myology, Lille, May 9-13, 2011.
4. Vauchez K, Marolleau JP, Schmid M, Khattar P, Chapel A, Catelain C, Lecourt S, Larghero J, Fiszman M, Vilquin JT. Aldehyde dehydrogenase activity identifies distinct populations of progenitors within human skeletal muscle World Muscle Society, Genève, 9–12 Septembre 2009.
5. Homage to Ketty Schwartz: from cardiac remodelling to biotherapies, Paris, 29 Novembre 2008.
6. Lecourt S, Marolleau JP, Fromigie O, Vauchez K, Ternaux B, Lacassagne MN, Robert I, Praud C, Andriamanalijaoana R, Boumediene K, Cherau F, Marie P, Larghero J, Fiszman M, Vilquin JT. Mesenchymal-like cell populations in human skeletal muscle. 2nd International Congress on Myology (Myology 2008), Marseille, May 26-30, 2008.
7. Khattar P, Catelain C, Schwartz K, Fiszman M, Bonne G, Vilquin JT. Islet-1 cardiac progenitors detection in mouse. 2nd International Congress on Myology (Myology 2008), Marseille, May 26-30, 2008.
8. Vauchez K, Baligand C, Vilquin JT, Fiszman M, Carlier P. Monitoring cell transplantation protocols by ³H-NMR imaging : which class of contrast agent ? 2nd International Congress on Myology (Myology 2008), Marseille, May 26-30, 2008.
9. S. Sacconi, JT Vilquin, JP Marolleau, J Larghero, C Desnuelle. Myoblasts from Affected and Unaffected Muscles of Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy (FSHD) Patients Display Differences in Morphology, Proliferation and *In vitro* Differentiation Ability. 57th Annual Meeting of American Academy of Neurology - April, 9-16, 2005, Miami, USA.
10. S. Sacconi, J.T. Vilquin, J. Larghero, J.P. Marolleau, C. Desnuelle. Myoblasts from affected and unaffected muscles of facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) patients display differences in morphology, proliferation and *in vitro* differentiation ability. Fifteenth Meeting of the European Neurological Society. June 20, 2005, Vienna,

Austria.

11. S. Sacconi, L. Corbel, S. Delplace, J.T. Vilquin, C. Desnuelle, J. Larghero, J.P. Marolleau. Myoblasts from affected and unaffected muscles of facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) patients display differences in morphology, proliferation and *in vitro* differentiation ability. New cell therapy perspectives. Xth International Congress of the World Muscle Society, Iguassu Falls, Brazil, 28/09 – 01/10 2005.
12. E Messas, A Bel, M Cortes Morichetti, C Carrion, M Handschumacher, JT Vilquin, M Desnos, P Bruneval, P Menasché, A Carpentier, RA Levine, AA Hagege. Can Autologous Myoblast Transplantation Decrease Chronic Ischemic Mitral Regurgitation? JACC March 2004, p. 14A, Poster 1059-16.
13. S Sacconi, JT Vilquin, JP Marolleau, J Larghero, C Desnuelle. Myoblasts from Unaffected Muscle of Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy Patients Demonstrate no Alteration in Proliferation, Differentiation and *in vivo* Regenerating Ability when Compared to Controls. Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy, FSHD International Research Consortium Research Workshop Meeting 2004, ASHG, Toronto, Canada, October 26, 2004.
14. Agbulut, S van der Velde, S Ghostine, J Larghero, N Al Attar, B Leobon, E Robidel, A Bissery, C Chomienne, P Bruneval, JP Marolleau, JT Vilquin, AA Hagege, JL Samuel, P Menasche. Which cell type for regeneration of chronically infarcted myocardium : a face-to-face comparison of skeletal myoblasts and bone marrow hematopoietic stem cells. American Heart Association, 2004.
15. C Brasselet; C Carrion; M Morichetti; E Messas; P Bruneval; JT Vilquin; A Lafont; AA Hagege; P Menasché; M Desnos. Skeletal myoblast transplantation through coronary sinus approach: an efficient and less invasive combination in the setting of infarcted myocardium. American Heart Association, 2004.
16. Carrion C, Garcin I, Pouzet B, Ghostine S, Fiszman M, Ménasché P, Schwartz K, Vilquin JT. Skeletal myoblasts transplantation into infarcted myocardium : a study in a rat and a sheep model. European Society of Gene Therapy meeting 2002, Antibes, France, 13-16 Octobre. P
17. Menasché P, Hagege AA, Vilquin JT, Desnos M, Abergel E, Bruneval P, Schwartz K, Marolleau JP, Duboc D. Transplantation of autologous skeletal myoblasts in patients with severe left ventricular dysfunction : a medium-term appraisal. Congrès American Heart Association, Chicago, 2002.
18. Leobon B, Garcin I, Vilquin JT, Menasché P, Audinat E, Charpak S. Do engrafted skeletal myoblasts contract in infarcted myocardium ? Congrès American Heart Association, Chicago, 2002.
19. Paturneau-Jouas M, Parzy E, Vidal G, Carlier P, Wary C, Vilquin J-T, Schwartz K, Leroy-Willig A: Magnetic resonance imaging-based method to improve and survey gene electrotransfer protocols. 6th International Congress of the World Muscle Society, Snowbird, Utah, USA, 5-8 Septembre, Neuromusc Disord, 11(6-7):Abstract T.P.2.6, 2001.
20. Bruneval P, Heudes D, Said G, Carrion C, Vilquin J-T, Guarita Souza LC, Pouzet B, Schwartz K, Ménasché P, Hagege A: Skeletal myoblast transplantation in a sheep model of myocardial infarction: morphological assessment of myoblast engraftment. VIIth Annual Meeting of Association for European Cardiovascular Pathology, Amsterdam, Pays-Bas, 3-5 Octobre, 2001.
21. Garcin I, Carrion C, Pouzet B, Duboc D, Hagege AA, Fiszman M, Ménasché P, Schwartz K, Vilquin J-T: The fate of skeletal myoblasts transplantation into infarcted rat myocardium. 74th Scientific Sessions of the American Heart Association, Anaheim, CA, 2001.

22. Ghostine S, Guarita Souza LC, Carrion C, Richard P, Bruneval P, Vilquin J-T, Pouzet B, Schwartz K, Ménasché P, Hagège AA: Skeletal myoblast transplantation decreases fibrosis and improves regional function of infarcted myocardial areas. 74th Scientific Sessions of the American Heart Association, Anaheim, CA, 2001.
23. Ménasché P, Vilquin J-T, Desnos M, Duboc D, Hagège AA, Pouzet B, Scorsin M, Schwartz K, Marolleau J-P: Early results of autologous skeletal myoblast transplantation in patients with severe ischemic heart failure. 74th Scientific Sessions of the American Heart Association, Anaheim, CA, 2001.
24. Pouzet B, Ghostine S, Elattar N, Hagège AA, Duboc D, Desnos M, Schwartz K, Vilquin J-T, Ménasché P: Long term functional results of autologous skeletal myoblast transplantation in rats. 74th Scientific Sessions of the American Heart Association, Anaheim, CA, 2001.
25. Pouzet B, Vilquin J-T, Messas E, Scorsin M, Fiszman M, Hagège AA, Schwartz K, Ménasché P: Factors affecting functional outcome following autologous skeletal myoblast transplantation. 36th Annual Meeting, Society of Thoracic Surgeons, Fort Lauderdale, 2000.
26. Besse S, Vilquin J-T, Li Z, Poirier C, Vignier N, Guénet J-L, Guicheney P: A new spontaneous model for congenital muscular dystrophy, the dypas/dypas mouse. Myology 2000, Nice, France, 27-31 Mars, 2000.
27. de Géry S, Vilquin J-T, Carlier P, Raynaud JS, Wary C, Schwartz K, Leroy-Willig A: Muscular T2 relaxation time measurement by MRI at 4T in normal and dystrophic dy/dy and dy^{2j}/dy^{2j} mice. Myology 2000, Nice, France, 27-31 Mars, 2000.
28. Moisset P-A, Skuk D, Vilquin J-T, Ito H, Asselin I, Roy B, Goulet M, Tremblay JP: Transplantation of SV40 large T antigen-immortalized Myoblasts. Myology 2000, Nice, France, 27-31 Mars, 2000.
29. Ontell MP, Washabaugh CH, Tajbakhsh S, Vilquin J-T, Butler-Browne G, Ontell M: Technique for evaluation of muscle maturation and regeneration in MYF-5^{-/-} mice that die at birth.. Myology 2000, Nice, France, 27-31 Mars, 2000.
30. Parzy E, Fromes Y, Pouzet B, Vilquin J-T, Giacomini E, Wary C, Leroy-Willig A, Carlier PG: Robust and ultrafast cardiac NMR imaging using single-shot fast spin echo imaging: applications to the study of cardiac anatomy and function and to myocardium tissue characterization in small mammals. Myology 2000, Nice, France, 27-31 Mars, 2000.
31. Paturneau-Jouas M, Vilquin J-T, Prudhon B, Kennel P, Alameddine H, Schwartz K, Fiszman M: Gene electrotransfer in normal mouse and mdx mutant diaphragm. Myology 2000, Nice, France, 27-31 Mars, 2000.
32. Pouzet B, Ghostine S, Vilquin J-T, Garcin I, Scorsin M, Hagège AA, Duboc D, Schwartz K, Ménasché P: Is skeletal myoblast transplantation clinically relevant in the era of angiotensin-converting enzyme inhibitors? 73rd Scientific Sessions of the American Heart Association, New-Orleans, 2000.
33. de Géry S., J.-T. Vilquin, P.G. Carlier, J.-S. Raynaud, C. Wary, and A. Leroy-Willig. *In vivo* muscular T2 measurement at 4 Tesla in normal and dystrophic dy and dy^{2j} mice. International Society for Magnetic Resonance in Medicine, Philadelphia, May 22-28, 1999.
34. Fromes Y., J.-T. Vilquin, A. Salmon, H. Collin, K. Schwartz, and M.Y. Fiszman. Vector-dependent transgene expression after *in vivo* gene transfer into the heart. 2nd Congress of the American Society of Gene Therapy, Washington DC, June 9-13, 1999.
35. Pouzet B., J.-T. Vilquin, E. Messas, M. Scorsin, A. Hagège, M. Fiszman, K. Schwartz, and P. Menasché. Intramyocardial transplantation of autologous myoblasts: can tissue processing be optimized? 72nd Congress of the American Heart Association, 1999.

36. Rajnoch C., J.-T. Vilquin, J.-C. Chachques, M.Y. Fiszman, K. Schwartz, and A. Carpentier. Cellular cardiomyoplasty: present and future. Onzième Congrès International de la Société Française de Cardiologie, Nice Acropolis, 17-20 Juin 1998.
37. Scorsin M., A. Hagège, J.-T. Vilquin, I. Garcin, M. Fiszman, F. Marotte, J.-L. Samuel, L. Rappaport, K. Schwartz, and P. Menasché. Can transplantation of skeletal myoblasts improve function of infarcted myocardium? 71st Congress of the American Heart Association, Dallas, November 8-11, 1998.
38. Fardeau M., F.M.S. Tomé, J.-T. Vilquin, and P. Guicheney. Congenital muscular dystrophies. Meeting of the Mediterranean Society of Myology, Nicosie, Chypre, 11-14 Juin 1997.
39. Vilquin J.-T., E. Wagner, I. Kinoshita, R. Roy and J.P. Tremblay. MHC-compatible myoblast transplantation: lack of effect of donor-recipient dystrophin disparity. The 14th Annual Scientific Meeting of the American Society of Transplant Physicians, Chicago (Illinois), 14-17 Mai 1995.
40. Kinoshita I., J.-T. Vilquin, B. Guérette, I. Asselin, R. Roy, S. Lille and J.P. Tremblay. Immunosuppression with FK506 insured good success of myoblast transplantation in mdx mice. Ibidem.
41. Asselin I., M. Tremblay, J.-T. Vilquin, R. Roy and J.P. Tremblay. A PCR-based assay to assess the success of myoblast transplantation in mdx mice. Ibidem.
42. Tremblay J.P., I. Kinoshita, J.-T. Vilquin, J. Huard, B. Guérette, I. Asselin and R. Roy. Success of myoblast transplantation in immunodeficient or adequately immunosuppressed mice. Ibidem.
43. Guérette B., R. Roy, I. Asselin, J.-T. Vilquin and J.P. Tremblay. Cellular infiltration and evidence of rejection following myoblast transplantation in mice. Ibidem.
44. Tremblay J.P., R. Roy, I. Kinoshita, J.-T. Vilquin, J. Huard, B. Guérette and I. Asselin. Success of myoblast transplantation in immunodeficient mice or following immunosuppression with rapamycin or FK506. The VIIIth International Congress on Neuromuscular Diseases, Kyoto, July 1994.
45. Vernet Der Garabedian B., A. Cardona, J.-M. Schmidt, S. Braun, J.-T. Vilquin, G. Goldstein, T. Audhya, J.-F. Bach and E. Morel. Thymopoietin as a pathogenic effector in Myasthenia gravis. Ibidem.
46. Braun S., J.-T. Vilquin, P. Labouret, C. Tranchant, J.-M. Warter and P. Poindron. Lymphoblastoid cell lines derived from thymus of human myasthenics. Ibidem.
47. Tranchant C., S. Braun, J.-T. Vilquin, P. Labouret, P. Poindron and J.-M. Warter. Effects of glucocorticoids on myogenesis *in vitro*. Ibidem
48. Schmidt J.M., C. Taupin, S. Braun, J.-T. Vilquin, C. Tranchant, P. Labouret, P. Poindron and J.-M. Warter. Electrodiagnosis of experimental myasthenia gravis. Ibidem.

4.3. Présentations orales invitées à des symposiums, workshops, séminaires (Anglais, Français).

1. Vilquin JT. Cell therapies in cardiac and skeletal muscles. First Russian-French Spring School of Myology, Saint Petersburg, 15-20 May 2010.
2. Vilquin JT, Khattar P, Gueneau L, Catelain C, Vauchez K, Riveron S, Carrier L, Bonne G, Fiszman M. Cardiac progenitors. Genetics of the involvement of Islet1 gene in cardiac diseases Cardiac Islet1 progenitors follow-up in murine hearts. 7th CaPTTA workshop, Paris, 10 Avril 2009.
3. Vauchez K, Marolleau JP, Schmid M, Khattar P, Chapel A, Catelain C, Lecourt S, Larghero J, Fiszman M, Vilquin JT. Aldehyde dehydrogenase activity identifies distinct

- populations of progenitors within human skeletal muscle. 8th Franco–Japanese Workshop on Muscular Dystrophies, Paris, 3–4 Juillet 2009.
4. Vilquin JT. Thérapie cellulaire et ingénierie tissulaire cardiaque. GRIT, Paris, Avril 2008.
 5. Vilquin JT. Mesenchymal stem cells and muscle repair. 2nd International Workshop on MSC for regenerative medicine and immune regulation, Tours, Mai 2008.
 6. Vilquin JT. Cardiac Islet1 progenitors follow-up in murine hearts. 6th CaPTTA workshop, Paris, Mai 2008.
 7. Vilquin JT. MYORES Symposium. Clinical applications of Cell Therapy in muscular disorders, Cracovie, 12–15 Octobre 2008.
 8. Vilquin JT. Greffe de myoblastes dans le traitement des myopathies. 5ème Symposium Romand de Transplantation, Pragens, 12 Novembre 2008.
 9. JT. Vilquin. Cell therapy in cardiology: state of the art. Methodological and technical aspects in myoblast transplantation. Laval University, March 3rd 2007, Quebec, CA.
 10. JT Vilquin. Cell therapy and heart failure: state of the art. Second franco-japanese translational research initiative, Paris, May 29th 2007.
 11. JT. Vilquin, M. Fiszman, P. Khattar, G. Bonne, K. Schwartz. Cardioblasts in cardiomyopathy related to neuromuscular diseases. CaPTAA symposium Boston, December 2007.
 12. JT. Vilquin. Mesenchymal stem cells in bone and cartilage repair: current status. Genostem symposium, Barcelone, February 2007.
 13. JT. Vilquin. Mesenchymal stem cells in bone and cartilage repair: current status. Genostem symposium, Montpellier, November 2007.
 14. JT Vilquin. Cellular and tissular engineering: myoblast transfer in muscle regeneration. Growth, characterization and preparation in view of clinical trials. Laval University, March 3rd 2006, Quebec, CA .
 15. JT Vilquin. Travaux fondamentaux en thérapie cellulaire cardiaque et liens vers la clinique. Printemps de la Cardiologie, GRRC, SFC, FFC, Toulouse, Mai 2006.
 16. JT. Vilquin, S. Lecourt, J. Larghéro, JP. Marolleau. Mesenchymal-like cells in human muscle tissue. Genostem symposium, Porto, February 2006.
 17. JT Vilquin, JP Marolleau, S Sacconi, I Garcin, MN Lacassagne, I Robert, B Ternaux, B Bouazza, J Larghero, C Desnuelle³. Comparison of growth and regenerating ability of myoblasts from unaffected muscles of facioscapulohumeral muscular dystrophy patients and from controls. 6th French-Japanese Workshop, Paris, France, 1-2 July 2005.
 18. JT. Vilquin. Cultures de cellules musculaires et régénération cardiaque Journée Biotech de l'AMIPS, Nouvelles thérapeutiques, thérapie cellulaire et thérapie génique, Paris, 8 février 2005.
 19. JT Vilquin. Characterization and therapeutic potentials of muscle progenitor cells..Journée Inter-IFR Cellules souches, Paris, 30 mai 2005.
 20. JT. Vilquin. Cellules souches et muscle squelettique. 2ème Colloque National des Cellules Souches, de l'IFR 26. Nantes 9-10 Juin 2005.
 21. JT Vilquin, JP Marolleau, B Pouzet, C Carrion, I Garcin, B Ternaux, I Robert, MN Lacassagne, A Hagège, D Duboc, M Desnos, P Menasché, M Fiszman, K Schwartz. Transplantation of adult skeletal muscle cells in the heart: the first phase I clinical trial. Sino-France Symposium on Stem Cells. 10-17 Janvier 2004, Shanghai, Chine.
 22. JT. Vilquin. Skeletal myoblasts for cardiomyogenesis. Munich Symposium New Frontiers in Cardiology, May 20-21 2004? Munich, Germany.
 23. JT Vilquin. Des cellules dédifférenciées ou l'émergence des potentialités. Association des Professeurs de Biologie et Géologie (APBG), Paris, Palais des congrès, 12 Novembre 2004.

24. JT Vilquin, JP Marolleau, B Ternaux, I Robert, MN Lacassagne, B Pouzet, C Carrion, I Garcin, AAHagège, M Desnos, D Duboc, J Tremblay, M Fiszman, K Schwartz, P Menasché. Thérapie cellulaire pour l'insuffisance cardiaque post-ischémique. Institut Paris-Sud Cytokines, Hôpital Bécclère, 16 janvier 2003.
25. JT Vilquin, JP Marolleau, B Ternaux, I Robert, MN Lacassagne, B Pouzet, C Carrion, I Garcin, AAHagège, M Desnos, D Duboc, J Tremblay, M Fiszman, K Schwartz, P Menasché. Thérapie cellulaire pour l'insuffisance cardiaque post-ischémique. Rendez-Vous Santé de l'Inserm, La Mutualité, 13 janvier 2003.
26. JT Vilquin. Thérapies cellulaires de l'insuffisance cardiaque post-ischémique. Mini-colloque MEDLIL « Thérapie cellulaire » organisé par l'IFR 114, Lille, 10 Avril 2003.
27. JT Vilquin. Thérapies cellulaires de l'insuffisance cardiaque post-ischémique. Journée thématique « Thérapie cellulaire » IFR31, Institut Louis Bugnard, Toulouse Rangueil, 11 Avril 2003.
28. JT Vilquin, I Garcin, C Carrion, M Fiszman, K Schwartz, A Hagège, M Desnos, P Bruneval, D Duboc, B Pouzet, S Ghostine, P Menasché. Aspects fondamentaux de la thérapie cellulaire. XIIèmes journées européennes de la Société Française de Cardiologie, Paris 16-19 Janvier 2002, Abstract C 216, Arch Mal Cœur Vaiss 2002 ; 95, III-69.
29. JT Vilquin, JP Marolleau, K Schwartz, P Menasché. Muscle cells for the myocardium. Atelier INSERM 133 : Cell therapy : from conception to *in vivo* administration. La Roche Posay 24-25 Janvier 2002.
30. JT Vilquin, JP Marolleau, B Pouzet, I Garcin, C Carrion, B Ternaux, I Robert, MN Lacassagne, A Hagège, M Desnos, D Duboc, M Fiszman, K Schwartz, P Menasché. Muscle stem cells for the myocardium. Ateliers du GRRC : Thérapies géniques et cellulaires, cardiaques et vasculaires. Versailles, 28-29 Janvier 2002.
31. Vilquin JT Transfert des myoblastes : avenue thérapeutique pour le traitement des myopathies et de l'insuffisance cardiaque post-ischémique. Séminaire du service central de Biochimie, Hopital Pitié-Salpêtrière, Paris, 31 Janvier 2002.
32. Vilquin JT Transfert des myoblastes : avenue thérapeutique pour le traitement des myopathies et de l'insuffisance cardiaque post-ischémique. Séminaire de l'IFR de Neurologie, Nice, 13 Mars 2002.
33. Vilquin JT Cellule musculaire squelettique : outil de thérapie cellulaire, cible de thérapie génique. Exemples de la greffe de myoblaste dans le myocarde ischémié et de l'électroporation *in vivo*. Séminaires de l'Unité INSERM 533, Nantes, 22 Mars 2002.
34. JT Vilquin. Cellule musculaire squelettique : outil de thérapie cellulaire, cible de thérapie génique. Séminaires du Généthon, Evry, 10 Avril 2002.
35. JT Vilquin. Transplantation of adult skeletal muscle cells in the heart. AFM-VLM joint meeting : cystic fibrosis and neuromuscular diseases : perspectives from cell therapy. Paris, April 25th-27th 2002.
36. JT Vilquin. Thérapie cellulaire autologue et insuffisance cardiaque. VIIIème Journée Annuelle Est-Transplant. Nancy, 12 Octobre 2002.
37. Vilquin JT. Nouvelles thérapies des maladies cardiovasculaires : cellules autologues et insuffisance cardiaque. Journée INSERM de formation à la santé : les maladies cardiovasculaires. Maison de la Chimie, Paris, 6 Novembre 2002. O.
38. Vilquin J-T, Marolleau J-P, Pouzet B, Garcin I, Carrion C, Ternaux B, Robert I, Lacassagne M-N, Hagège A, Desnos M, Duboc D, Fiszman M, Schwartz K, Ménasché P: Transplantation of adult skeletal muscle cells in the heart. 4^{ème} Colloque Franco-Japonais sur les Dystrophies Musculaires: progrès vers la thérapie [A la Mémoire de Kiichi Arahata], Paris, France, 15-16 Juin, 2001.
39. JT Vilquin, JP Marolleau, B Pouzet, I Garcin, C Carrion, B Ternaux, I Robert, MN Lacassagne, A Hagège, M Desnos, D Duboc, M Fiszman, K Schwartz, P Menasché.

- Autogreffe de myoblastes comme traitement de l'infarctus du myocarde. Troisième Journée d'Actualités en Assistance Médicale à la Procréation, Hôpital Tenon, Paris, 6 Octobre 2001.
40. Vilquin JT. Transplantation de myoblastes : avenue thérapeutique possible pour l'insuffisance cardiaque post-ischémique. Séminaire de l'UMR 7000 CNRS, Paris, 14 Novembre 2001.
 41. Vilquin J.-T. Myoblast transplantation into myocardium. IVth Workshop on DMD gene therapy, Paris, April 26-27, 1999.
 42. Vilquin J.-T., S. Besse, N. Vignier, C. Poirier, E. Engvall, P. Guicheney, M. Fiszman and K. Schwartz. Advances in animal models and gene complementation strategies for congenital muscular dystrophies. Third Franco-Japanese Workshop, Tokyo, May 29-30, 1999.
 43. Vilquin J.-T., H. Ito, I. Asselin, F. Loechel, J.P. Tremblay, FMS Tomé, and M. Fardeau. Experiences with Gene Therapy. Australian Neuromuscular Research Institute symposium on Gene Therapy and Neuromuscular Disorders, Perth, August 28, 1998.
 44. Vilquin J.-T. Laminin-2 restoration in the dystrophic dy/dy mouse. MDA/AFM DMD Gene Therapy workshop, Tucson, 30-31 Mai 1997.
 45. Vilquin J.-T., U. Wewer, D. Yaffe, F.M.S. Tome, J.P. Tremblay, and M. Fardeau. Laminin-2 restoration in dy/dy mouse by cell transplantation and direct gene transfer. Second French-Japanese workshop "Muscular dystrophies : towards gene therapy", Paris, France, 20-21 Octobre 1997.
 46. Vilquin J.-T., B. Roy, M. Goulet, E. Engvall, F.M.S. Tome, M. Fardeau and J.P. Tremblay. *In vivo* laminin-2 restoration by muscle cell transplantations in dystrophic (dy/dy) mouse. New Challenges in Neuromuscular Disorders, London, Wednesday 25-Friday 27 September 1996. Best young researcher Award.
 47. Vilquin J.-T., J. Huard, I. Asselin, B. Guérette et J.P. Tremblay. Utilisation de différents protocoles d'immunosuppression pour le contrôle du rejet de greffe de myoblastes chez la souris. 5ème colloque national sur les maladies neuromusculaires, Strasbourg, 21-25 Juin 1993. Poster 142.
 48. Vilquin J.-T., P. Labouret, P. Kennel, H. Lery, B. Bergaentzle, P. Fonteneau, C. Tranchant, J.-M. Warter et P. Poindron. Production en masse de récepteurs de l'acétylcholine de cellules TE671 ; leur utilisation pour le dosage des anticorps anti-récepteurs dans la myasthénie. 1er Colloque de la Société des Neurosciences, Strasbourg, 4-7 Mai 1992
 49. Vilquin J.-T., B. Bergaentzle, H. Lery, J.-Y. Desmottes, P.F. Kennel, J.-M. Warter et P. Poindron. Production de cellules TE 671 sur microporteurs et extraction du récepteur cholinergique nicotinique. 4ème Colloque National sur les Maladies Neuromusculaires, Montpellier, 24-28 Juin 1991
 50. Vilquin J.-T., S. Braun, J.-M. Warter et P. Poindron. Quelques mécanismes d'action possibles des glucocorticoïdes sur la myogénèse *in vitro*. Ibidem.
 51. 3 Vernet Der Garabedian B., A. Cardona, J.-M. Schmidt, S. Braun, J.-T. Vilquin, G. Goldstein, T. Audhya, E. Morel and J.-F. Bach. Thymopoietin, a thymic hormone as cofactor of pathogenic antibodies in myasthenia gravis. Ibidem.

4.4. Autres communications à des symposiums, workshops, séminaires.

1. Vauchez K, Vilquin JT. Aldehyde dehydrogenase activity identifies distinct populations of progenitors within human skeletal muscle. Journée scientifique de l'IFR 14, Paris, 12 Mars 2009.

2. Vauchez K, Vilquin JT. Identification and characterization of new myogenic progenitors expressing high levels of aldehyde dehydrogenase. 1st French–German Scientific symposium, Hambourg, 23–24 Mars 2009.
3. Karine Vauchez, Céline Baligand, Jean-Thomas Vilquin, Marc Fiszman, Pierre Carlier. H-NMR imaging non-invasive monitoring of human myoblasts loaded with contrast agents and transplanted into immunocompetent mice. International Workshop on Cell migration, Evry, 1-2 February 2007.
4. Karine Vauchez, Céline Baligand, Jean-Thomas Vilquin, Marc Fiszman, Pierre Carlier. Monitoring myoblast transplantation protocols by 1H-NMR imaging: which class of contrast agent? MOLEDA Summer School, 16 - 22 September 2007, Evry-Maison Alfort-Paris, France.
5. C.Desnuelle, JT. Vilquin, JP. Marolleau. Capacités régénératives du muscle squelettique issu de patients atteints de dystrophie facio scapulo humerale (FSHD). Journées de la société Française de Myologie, Caen, 10 Octobre 2003.
6. Paturneau-Jouas M, Parzy E, Vidal G, Vilquin J-T, Carlier P, Wary C, Schwartz K, Leroy-Willig A: Magnetic resonance imaging as a tool for optimization and survey of gene electrotransfer protocols. 4^{ème} Colloque Franco-Japonais sur les Dystrophies Musculaires: progrès vers la thérapie [A la Mémoire de Kiichi Arahata], Paris, France, 15-16 Juin, 2001
7. Parzy E, Fromes Y, Pouzet B, Vilquin J-T, Giacomini E, Wary C, Leroy-Willig A, Carlier PG: Ultrafast Cardiac NMR imaging of small mammals using single-shot fast spin echo imaging. 17^{ème} Congrès du GRRC 'Biologie et Pathologie du Cœur et des Vaisseaux', Saint-Malo, France, 17-19 Avril, 2000.
8. Pouzet B, Vilquin J-T, Messas E, Scorsin M, Hagège AA, Fiszman M, Schwartz K, Menasché P: Etude fonctionnelle par échocardiographie des effets de la transplantation intramyocardique de myoblastes squelettiques autologues dans le traitement de la cardiomyopathie ischémique. Académie Nationale de Chirurgie, Paris, France, 17 Mai, 2000.
9. Pouzet B, Vilquin J-T, Hagège AA, Scorsin M, Messas E, Fiszman M, Schwartz K, Menasché P: Paramètres influençant l'évolution de la fonction ventriculaire gauche évaluée par échocardiographie après transplantation de myoblastes squelettiques autologues. Société de Chirurgie Thoracique et Cardio-Vasculaire de Langue Française "Chirurgie 2000", Paris, 26-28 Juin, 2000.
10. Menasché P, Hagège A, Vilquin J-T, Scorsin M, Pouzet B, Duboc D, Desnos M, Merlet P, Marolleau J-P, Schwartz K, Guérot C, Weber S, Bloch G: Transplantation de cellules musculaires autologues dans l'insuffisance cardiaque ischémique : premier cas chez l'homme. Journées des Groupes de Travail de la Société Française de Cardiologie, Paris, France, 20-21 Octobre, 2000.
11. Rajnoch C., J.-T. Vilquin, J.-C. Chachques, M.Y. Fiszman, K. Schwartz, and A. Carpentier. Cellular cardiomyoplasty: present and future. International Workshop on Dynamic Cardiomyoplasty, Padova, January 17-18, 1998.
12. Tardif-de Géry S., J.-T. Vilquin, J.-S. Raynaud, C. Wary, E. de Kerviler, K. Schwartz, and A. Leroy-Willig. Mesure en IRM a haut champ du temps de relaxation T2 musculaire de souris dystrophiques dy et dy^{2J}. Journées Françaises de Radiologie, Paris, 28 Octobre 1998.
13. Puymirat J., J.-T. Vilquin, and J.P. Tremblay. Transplantation of myotonic dystrophy myoblasts as a potential muscular model for myotonic dystrophy. Première conférence internationale AFM/MDA du consortium sur la dystrophie myotonique de Steinert, Paris, 30 Juin-1er Juillet 1997.

14. Fardeau M., F.M.S. Tomé, J.-T. Vilquin, and P. Guicheney. Congenital muscular dystrophies. XIVème Congrès international de Neurophysiologie Clinique, Florence, Italie, 25-27 Août 1997.
15. Fardeau M., F.M.S. Tomé, J.-T. Vilquin, and P. Guicheney. Congenital muscular dystrophies. Symposium on Muscular dystrophies in the World Congress of Neurology, Buenos Aires, Argentine, 14-18 Septembre 1997.
16. Tremblay J.P., J.-T. Vilquin, B. Guérette, F. Celestin, D. Skuk, and R. Roy. Principaux problèmes qui ont limité la transplantation de myoblastes et quelques solutions. 6ème Colloque sur les maladies neuromusculaires, Versailles 21-25 Octobre 1996.
17. Guérette B., J.-T. Vilquin, C. Gravel, K. Wood, and J.P. Tremblay. Traitements immunosuppresseurs pour contrôler les réactions immunes dirigées contre les vecteurs adénoviraux de première génération. Ibidem.
18. Vilquin J.-T., I. Kinoshita, E. Engvall, F. Tome, M. Fardeau, and J.P. Tremblay. Complémentation génique par transplantation cellulaire dans deux modèles animaux entraînant une restauration de dystrophine en souris mdx et de mérosine en souris dy. Ibidem
19. Bouchard J.-P., J.P. Tremblay, F. Malouin, R. Roy, I. Kinoshita, J.-T. Vilquin, J. Huard, B. Guérette and I. Asselin. Myoblast transplantation in immunologically favorable situations. 29ème Assemblée du Congrès Canadien des Sciences Neurologiques. St. John's, 27-30 Juin 1994.
20. Tremblay J.P., J. Huard, R. Roy, J.-P. Bouchard, M. Fardeau, J.-T. Vilquin, B. Guérette, I. Asselin, F. Malouin et C. Richards. Problèmes immunologiques associés à la transplantation de myoblastes chez la souris et l'homme. 5ème colloque national sur les maladies neuromusculaires, Strasbourg, 21-25 Juin 1993.
21. Kennel P., J.-T. Vilquin, C. Tranchant, P. Poindron, J.-M. Warter et P. Fonteneau. Utilisation des cellules TE 671 pour la détection des anticorps dirigés contre le récepteur de l'acétylcholine. Ibidem.
22. Kotzyba-Hibert F., P. Kessler , J.-T. Vilquin , P. Kennel., S. Braun, V. Snetkov , K. Takeda , P. Poindron , M. Goeldner et C. Hirth. Le récepteur cholinergique nicotinique : analyse dynamique et structurale du site de liaison de l'acétylcholine à l'aide de nouvelles sondes agonistes photosensibles. Ibidem.

B- Participation à l'encadrement de la recherche

1. Encadrement de jeunes chercheurs

Durant les études doctorales : 1988-1992

Nom	Prénom	Année	Niveau	Publications	Diplôme obtenu
Bergaentzle	Benoît	1989-1990	Etudiant 2 ^e cycle	Thèse Etat	Doctorat Etat Pharmacie
Hauss	Béatrice	1989-1990	Etudiante 2 ^e cycle	Thèse Etat	Doctorat Etat Pharmacie
Kennel	Philippe	1990-1991	DEA	3	DEA
Lery	Hugues	1989-1990	Etudiant 2 ^e cycle	Thèse Etat	Doctorat Etat Pharmacie
Zuber	Guy	1990-1991	Etudiant 2 ^e cycle	1	Maîtrise

Durant le stage de recherche post-doctorale (Canada) : 1993-1996

Nom	Prénom	Année	Niveau	Publications	Diplôme obtenu
Asselin	Isabelle	1993-1995	Master	13	Master Sciences
Guérette	Benoît	1993-1996	Doctorat	12	Doctorat Sciences

Durant le second stage post-doctoral et depuis le recrutement par le CNRS : 1997-2010

Nom	Prénom	Année	Niveau	Publications	Diplôme obtenu
Carrion	Claire	1999-2000	Maîtrise	6	DEESS
Garcin	Isabelle	1997-1998	Maîtrise	5	DEESS
Ghostine	Said	2001-2002	Maîtrise	4	DEA
Lecourt	Séverine	2004-2007	Maîtrise	3	Eq. DEA EPHE
Petit	Céline	2006	Licence	Maîtrise	ISBS
Pouly	Julia	2002-2004	Doctorat	1	Non (en cours)
Pouzet	Bruno	1998-2002	Doctorat	9	DEA+Doctorat Sciences
Rajnoch	Charissa	1997-2001	Doctorat	0	Doctorat Sciences EPHE
Sacconi	Sabrina	2003-2008	DEA	1	DEA+Doctorat Sciences
Tardif-De Gery	Sabine	1997-1998	Maîtrise	1	DEA
Vaucheze	Karine	2005-2009	Doctorat	5	Doctorat Sciences

2. Supervision de collaborateurs dans le cadre de projets de recherche (chercheurs, ingénieurs, techniciens...)

Nom	Prénom	Année	Fonction	Salaire (origine)	Publications (+ en cours)
Besse	Sylvie	1998-2000	Post-doctorante	AFM	1
Carrion	Claire	2001-2003	Ingénieur d'Etudes	AFM	6
Catelain	Cyril	2007-2010	Post-doctorant	Fondation Leducq	1(+1)
Garcin	Isabelle	2000-2004	Ingénieur d'Etudes	Genzyme / AFM	5
Khattar	Patricia	2005-2009	Ingénieur d'Etudes	Fondation Leducq	2(+1)
Lecourt	Séverine	2004-2007	Ingénieur d'Etudes	FP6 Genostem	3
Maurel	Agnès	2002-2003	Post-doctorante	AFM	1
Ouattara	Jasmine	2008-2010	Ingénieur d'Etudes	ANR	0(+1)
Praud	Christophe	2005-2007	Post-doctorant	AFM / FP6 Genostem	1(+1)
Riveron	Stéphanie	2009-2010	Assistante Ingénieur	Fondation Leducq	0(+1)
Vauchez	Karine	2009-2010	Doctorante, Post-doctorante	CIFRE Genzyme, AFM	5(+2)

3. Participation à des jurys d'examen à divers titres :

Nom	Prénom	Année	Diplôme postulé	Université	Fonction
Al Haddad	Samir	2007	Doctorat Etat Pharmacie	Rennes	Examineur
Brocheriou	Valérie	1999	Doctorat en Sciences	Paris 6	Examineur
Carrion	Claire	2000	DEESS	Paris 12	Maître de Stage
Chazaud	Bénédicte	2004	HDR	Paris 12	Examineur
Duval	Elise	2009	Doctorat en Sciences	Caen	Examineur
Escriou	Catherine	2004	Doctorat en Sciences	Paris 12	Examineur
Garcin	Isabelle	1998	DEESS	Paris 12	Maître de Stage
Lecourt	Séverine	2008	EPHE Eq. Master	Paris 6	Maître de Stage
Martin-Touaux	Elsa	2003	Doctorat en Sciences	Paris 5	Examineur
Mauduit-Haond	Céline	2005	Doctorat en Sciences	Paris 11	Examineur
Mills	Philippe	2007	Doctorat en Sciences	Québec (Canada)	Rapporteur *
Pouly	Julia	2003	Doctorat Etat Médecine	Rouen	Maître de Stage
Pouzet	Bruno	2002	Doctorat en Sciences	Paris 11	Examineur, co-Maître
Prudhon	Bernard	2005	EPHE Eq. Master	Paris 6	Examineur
Quenneville	Simon	2006	Doctorat en Sciences	Québec (Canada)	Rapporteur *
Rajnoch	Charissa	2007	Doctorat EPHE	Paris 6	Examineur
Rodriguez	Anne-Marie	2008	HDR	Paris 12	Examineur
Sacconi	Sabrina	2008	Doctorat en Sciences	Nice	Examineur
Scorsin	Marcio	2000	Doctorat en Sciences	Paris	Examineur
Tardif De Gery	Sabine	1997	DEA	Paris 12	Co-Maître de stage
Vachez	Karine	2009	Doctorat en Sciences	Paris 7	Examineur, co-directeur

* : Thèses canadiennes. Une personne titulaire de PhD peut être Rapporteur dans un jury Canadien. Il n'est pas fait de distinction entre Rapporteur et Examineur.

4. Cours, enseignements

- 1990-1991 : Moniteur de l'Enseignement Supérieur en Biologie Cellulaire et Pharmacologie, Faculté de Pharmacie, Strasbourg, France. Tuteur : Professeur Jean-Claude

Stoclet (Strasbourg). Responsables des enseignements : Professeurs Jean-Claude Stoclet (Pharmacologie) et Jean-Jacques Befort (Biologie cellulaire).

- 1991-1992 : Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER) en Microbiologie Générale, Faculté de Pharmacie, Dijon, France. Responsable : Professeur André Rousset. Les Travaux pratiques de Microbiologie générale ont été mis en place à cette occasion.

- Ecoles doctorales le plus souvent liées aux enseignements dispensés : ED223, ED273, ED394, ED402, ED425. Disciplines : Thérapie cellulaire et thérapie génique, biotechnologies. Cours d'une durée de 1 à 2h. Niveau: 1^{er}, 2^{ème} et 3^{ème} cycles. (10 à 20h par an) :

1. DIU de Myologie, Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris VI (responsables : Michel Fardeau, Bruno Eymard) (1h).
2. Ecole d'été « Summer School of Myology », Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris VI (responsables : Michel Fardeau, Andoni Urtizberea) (1h).
3. LMD M2 Master Sciences Biologiques et Médicales “ Transfert de gènes: bases expérimentales et applications physiopathologiques ”, module “ Applications thérapeutiques ”, Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris VI (responsables : Bertrand Bellier, François Lemoine) (1h30).
4. Master BCPP : Biologie Cellulaire et Physio Pathologie, UE Cellules souches et Différenciation cellulaire, spécialité Biologie, Bio-morphologie et Bio-ingénierie du système squelettique, Paris VI (responsables : Sylvie Babajko, Pierre Marie) (2h).
5. DIU Immunologie et Biothérapies, « Mise en œuvre d'essais de biothérapies : de la conception au passage clinique », Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris VI (responsables : François Lemoine, Gilbert Faure) (3h).
6. Master de Génomique Industrielle, Hôpital Saint Antoine. Cours sur la thérapie cellulaire (1h30).
7. DU « Thérapie Cellulaire » (module biothérapies), Centre Hayem, Hôpital Saint Louis, Paris VII (responsable : Christine Dosquet) (1h).
8. Master “ Thérapeutiques Biotechnologiques ”, Hôpital Saint Louis, Paris VII. Module de Thérapie cellulaire (responsables : Christine Dosquet, Jérôme Larghero) (1h30).
9. UE de thérapie cellulaire : « outils de biotechnologies appliqués aux transplantations : Modèles expérimentaux », Module de cardiologie et chirurgie cardiaque, Hôpital Beclerc, Paris Sud XI (responsable : Dominique Franco) (1h).
10. UE Thérapies Cellulaires et Biothérapies, (Biologie cellulaire, Physiologie et Pathologie du myocarde), Faculté Xavier Bichat, Paris (responsable : Jérôme Larghero) (2h).
11. Master Biothérapies Tissulaires, Cellulaires et Géniques, Universités Paris XII, Evry, Paris XIII, Créteil (Master “ Bases fondamentales des nouvelles thérapies cellulaires et moléculaires ”), Hôpital Henri Mondor (responsable : Bénédicte Chazaud) (2h).
12. Master M2 de Biotechnologie « Produits de Santé issus des Biotechnologies », Faculté de Pharmacie, Chatenay Malabry (responsable : Eric Morel) (2h).
13. Master Thérapie cellulaire et Affaires Réglementaires, Faculté de Pharmacie, Chatenay-Malabry (1h).
14. Master Génie des Matériaux et Procédés, Module de Physio-pathologie cardiovasculaire, IFSBM, Institut Gustave Roussy, Villejuif (responsable : Mme David-Duflho) (1h30).
15. Master 2 Recherche : Physiopathologie et Pharmacologie Cardiovasculaires, Facultés de Médecine et Pharmacie, Dijon (responsable : Catherine Vergely) (2h).
16. Master M2 Thérapie cellulaire, Angers (responsable : Jean-Pierre Marolleau) (1h).
17. Masters Sciences de la vie et de la santé, et Biologie Santé, « Relation hôte-greffon et Ingénierie cellulaire, tissulaire et génique ». UE : Outils de biotechnologies appliqués aux

transplantations : modèles expérimentaux, EFS Besançon (responsable : Luc Sensébé) (1h30).

5. Administration, encadrement, organisation, diffusion de la recherche

5.1. Commissions :

- Ancien membre de la commission « Développement des Thérapeutiques » de l'Association Française contre les Myopathies (2001-2003).
- Membre de la commission d'évaluation des appels d'offres " Cellules souches thérapeutiques " mise en place par l'INSERM dans le cadre des développements des biotechnologies (2001-2003).
- Membre de la commission scientifique du réseau « Genhomme » (2003).
- Membre de la commission " Thérapie cellulaire et thérapie génique " de l'Association Française contre les Myopathies (2003-2006). Reviewer occasionnel de demandes de fonds soumises au Téléthon Italien.
- Membre du comité de surveillance de l'essai clinique « MIG-HD » (Investigateur principal Anne-Catherine Bachoud-Lévi) (2004-)
- Membre de la commission « Cœur, obésité, Diabète » au sein de l'ANR (2005).
- Membre du comité de pilotage du fonds d'amorçage mis en place par l'Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (2005-).
- Membre de la commission « Cellules souches » de l'AFM (2006-2009).
- Membre de la commission « Physiologie » au sein de l'ANR (2006-2008).
- Membre de la Commission « Thérapie cellulaire et thérapie génique » de l'AFM (2010-2012).
- Membre du conseil scientifique d'attribution d'une subvention de la FRM (2008) (thérapie cellulaire, transplantation).

5.2. Diffusion scientifique :

- Conseiller scientifique pour l'élaboration de la revue «Cellules souches : thérapies du futur» diffusée par l'INSERM dans la série « Repères », Mars 2002.
- Participation à des revues de diffusion pour grand public (Vaincre les Myopathies, INSERM Actualités, Le Nouvel Observateur, Le Monde, Actualités Santé, Science et Vie, Science et Vie Junior, Les Echos...).
- Participation invitée au Téléthon (2000, 2001, 2002, 2003, 2004, 2008) et au Café du Gène.
- Grand Témoin aux Transversales Paris Santé, sur la thérapie cellulaire, Mai 2007.

5.3. Organisations de conférences, workshops...

- Participation aux ateliers du GRRC: Thérapies géniques et cellulaires, cardiaques et vasculaires Versailles, Janvier 2002.
- Participation à l'atelier de formation INSERM 133 : « Cell therapy : from conception to *in vivo* administration » La Roche Posay, Janvier 2002.
- Participation aux ateliers du GRRC: Thérapies géniques et cellulaires, cardiaques et vasculaires Versailles, Janvier 2002.
- Participation à l'atelier de formation INSERM 133 : " Cell therapy : from conception to *in vivo* administration " La Roche Posay, Janvier 2002.

- Participation au colloque conjoint AFM-VLM “cystic fibrosis and neuromuscular diseases : perspectives from cell therapy”, Avril 2002. Co-organisateur scientifique.
- Membre du conseil scientifique et d’organisation des colloques “Cellules souches”, organisés par l’Inserm en Octobre 2001 (Seillac), Mai 2003 (Les Ardons), Novembre 2004 (Seillac). Responsable de l’animation de trois groupes (Cellules musculaires en 2001, Cellules mésenchymateuses en 2003, Essais cliniques en 2004).
- Organisation de deux réunions du WorkPackage 7 (responsable de ce groupe), partie intégrante du programme Genostem (contrat Européen Intégré, FP6), dédié au transfert des connaissances vers les applications cliniques (2005, 2006).
- Co-organisation d’une journée scientifique, dédiée à la mémoire du Dr. Ketty Schwartz, ancienne Directrice de l’Unité et Directrice de la Recherche, 29 Novembre 2008.

5.4. Participation aux programmes, et animation :

- Coordination scientifique du projet AFM-INSERM “Caractérisation, sélection, production et conservation de cellules musculaires squelettiques humaines. Utilisation en recherche et dans des protocoles pré-cliniques et cliniques de thérapie cellulaire à visée cardiaque et musculaire” (2001-2004).
- Participation au projet CaPTAA (Cardiac Progenitors Trans Atlantic Alliance) soutenu par la Fondation Leducq : collaboration franco-américaine d’une durée de 5 ans et étendue une année supplémentaire (projet N°7 «Cardioblasts and cardiomyopathy of neuromuscular diseases») (2005-2010).
- Membre du Bureau Exécutif du Projet Européen GENOSTEM (contrat intégré, FP6), membre du groupe de travail N°1 et responsable du groupe de travail N°7 (perspectives cliniques), organisation de deux réunions du WorkPackage 7 (responsable de ce groupe) (2004-2008).
- Participant au programme Inserm PRO-A (2005-2007).
- Participation au projet MYOCELLOS, déposé et accepté dans le cadre de l’appel d’offre ANR-RIB (partenaire N°2) (2008-2011).

5.5. Autres expertises :

- Analyses d’articles scientifiques : Rapporteur pour plusieurs journaux spécialisés (Acta Neuropathologica, American Journal of Transplantation, Annals of Neurology, Cell Transplantation, Circulation, European Heart Journal, Gene Therapy, Journal of Endovascular Therapy, Journal of Molecular and Cellular Cardiology, Molecular Therapy, Muscle Nerve, Neuromuscular Disorders, PloSOne, Stem Cell Research, Tissue Engineering, Transplantation).
- Rapporteur externe, ponctuel, pour des demandes de financements (ANR RIB, ANR RPIB, AFM, Téléthon Italien, Jesse Journey, Université de Bretagne, Fiocruz Brésil, UPMC, DIM-Stempole).
- Membre de l’ASGCT (American Society of Gene and Cell Therapy), de la CTS (Cell Transplant Society), de la WMS (World Muscle Society).
- A l’Unité, j’ai été nommé Secrétaire du Conseil d’Unité (4 réunions par an), et suis chargé de préparer les séances et d’en rendre compte (depuis 2006).

6. Valorisation, contrats

6.1. Contrats, subventions :

- Contrat de la Communauté Européenne (N° QLG1-1999-00870) 1999: A clinical, pathological, biochemical and genetic resolution of the group of congenital muscular dystrophies. Acronyme GENRE (GENetic RESolution of Congenital Muscular Dystrophies).
 - Appel d'offres conjoint AFM-INSERM 2000 « Cellules souches thérapeutiques ». Coordinateur scientifique. Caractérisation, sélection, production et conservation de cellules musculaires squelettiques humaines. Utilisation en recherche et dans des protocoles pré-cliniques et cliniques de thérapie cellulaire à visée cardiaque et musculaire.
 - Participation au projet GENOSTEM « Adult mesenchymal stem cells engineering for connective tissue disorders. From the bench to the bed side ». (Key action 1.2.4-3 Integrated Project Genostem, contract No. 503161, FP6). Membre du bureau scientifique, participant du groupe de travail 1, et responsable du groupe de travail 7. 2004-2008.
 - Programme National de Recherches sur les maladies Ostéo-articulaires (PRO-A, No. A04069FS). 2004: C. Jorgensen/ J.T. Vilquin: Mesenchymal Stem cells (MSCs), chondrogenesis and osteogenesis: Application of MSCs to animal models of osteoarthritis (OA) and bone defect.
 - Programme National de Recherches sur les Maladies Cardiovasculaires. 2004: G. Bonne/ J.T. Vilquin: Laminopathy of cardiac muscle: dilated cardiomyopathy associated with conduction defect disease due to Lamin A/C gene mutations. Physiopathology and therapeutic approaches using murin and drosophila animal models.
 - Participation au projet CaPTAA (Cardiac Progenitors Trans Atlantic Alliance) soutenu par la Fondation Leducq : collaboration franco-américaine d'une durée de 5 ans et étendue une année supplémentaire (projet N°7 « Cardioblasts and cardiomyopathy of neuromuscular diseases ») (2005-2010). J'ai été « associate member » dans ce projet.
 - Obtention d'un contrat de thèse de type CIFRE pour une étudiante en Doctorat, en partenariat Inserm-Genzyme SA (2005-2008). Salaire doctoral pour 3 ans. Ce travail a fait l'objet d'une soutenance de thèse (Mlle. Karine Vauchez).
 - Participation au projet MYOCELLOS, dans le cadre de l'appel d'offre ANR-RIB (partenaire N°2) (2008-2011).
 - Contrats de l'AFM dans le cadre des appels d'offre « thérapie cellulaire et thérapie génique » et « Développements des thérapeutiques ». Les premiers contrats ont été obtenus sous couvert de mes patrons, alors que j'étais chercheur pots-doctoral (non titulaire) au Canada puis en France (1993-1999). Puis de nombreux contrats ont été obtenus dans le cadre de collaborations nécessitant la réunion d'expertises techniques ou conceptuelles (cardiologie, chirurgie cardiaque, neurologie, physiologie, imagerie RMN...).
- o 1994-1995: J. Tremblay/J.T. Vilquin: Immunomodulations in cell therapies: contrats de recherche post-doctoraux à l'étranger.
 - o 1998 : M. Fardeau/J.T. Vilquin: The role of muscle fibrosis on gene complementation issues in dy/dy and dy^{2J}/dy^{2J} mouse models
 - o 1999: M. Fisman/J.T. Vilquin: Direct gene transfer by electroporation *in vivo*: investigations in animal models of muscular dystrophies. (2y)
 - o 1999: P. Menasché/J.T. Vilquin: Myoblast Transplantation into the Cardiac Muscle
 - o 2000: P. Menasché/J.T. Vilquin: Myoblast Transplantation into the Cardiac Muscle
 - o 2001 : JB Michel / JT Vilquin : Cell therapy in prevention of ventricular remodeling in rat with myocardial infarction.

- 2002: Y. Fromes/ J.T. Vilquin: Autologous skeletal myoblast transplantation in an animal model of sarcoglycanopathy with dilated cardiomyopathy
- 2002: M. Fiszman/J.T. Vilquin: Gene transfer by electroporation *in vivo* and cell transplantation : functional and histological investigations in animal models of congenital muscular dystrophy.
- 2002: C. Fardeau/ J.T. Vilquin: Approach for the management of ptosis by cell transplantation : histological studies of the levator palpebrae superioris and feasibility of myoblast transplantation in animal models.
- 2003: P. Meansché/ J.T. Vilquin: Development of a dual-marker system for quantitative studies of myoblast survival and proliferation after transplantation, and improvement of these parameters.
- 2003: C. Desnuelle/ J.T. Vilquin: Culture of myoblasts from FSHD patients with a low number of D4Z4 repeats. A tool to clarify the pathophysiology of FSHD and develop cell therapy.
- 2004: C. Desnuelle/ J.T. Vilquin : Dynamic gene expression profile of normal and FSHD myoblasts during *in vitro* differentiation.
- 2005 : C. Desnuelle / J.T. Vilquin : Comparative *in vitro* and *in vivo* study of three different biomaterials and their association with growth factors in view of improving myoblast transfert cell therapy.
- 2005: P. Carlier / J.T. Vilquin : *In vitro* and vivo monitoring of muscle precursor cells labelled with contrast agents using NMR imaging.
- 2006: J.T. Vilquin : Human muscle-derived cells : production, characterization, differentiation and use in cell transplantation.
- 2007-2008 : J.T. Vilquin/ C. Catelain : Cardiac cell therapy in a mouse model of laminopathy carrying H222P-Lmna mutation

6.2. Brevets :

- Vilquin JT, Marolleau JP, Tremblay JP, Robert I, Ternaux B. Procédé d'obtention de populations cellulaires d'origine musculaire et utilisations. Brevet déposé en France le 7 Juin 2000 (N° 007304) et aux USA le 16 Octobre 2000, sous l'égide de l'AP-HP, de l'INSERM et de l'AFM. Extension PCT déposée le 7 Juin 2001. Co-inventeur.
- Continuation des phases réglementaires relatives aux dépôts et à la défense d'un brevet : Vilquin JT, Marolleau JP, Tremblay JP, Robert I, Ternaux B. Procédé d'obtention de populations cellulaires d'origine musculaire et utilisations. Brevet déposé en France le 7 Juin 2000 (N° 007304) et aux USA le 16 Octobre 2000. Déposants : AP-HP, INSERM, AFM. Extensions PCT déposées le 7 Juin 2001 (N° WO/2001/094555). Examens (favorables) en Australie, au Canada, pour l'Europe (brevet accepté par le Bureau Européen en Juin 2009, N° EP 01943584.1). Rôle : inventeur.
- Vilquin JT, Vauchez K and Marolleau JP. Muscle Cells having myogenic potentials. Dépôt européen le 23/12/2008, N° Dépôt : 08291236.1 Déposant(s) INSERM, Genzyme SA. Rôle : inventeur.
- Activité de consultance pour la société MYOSIX. A pour objet la préparation de cellules musculaires squelettiques pour des développements thérapeutiques dans les contextes de l'insuffisance cardiaque post-ischémique et des myopathies. Consultance occasionnelle (bénévole) pour la société Myosix SA, dont j'ai été un des fondateurs.

6.3. Essais cliniques :

- Subvention de PHRC : “ Evaluation de la greffe de myoblastes squelettiques dans le traitement de l’insuffisance cardiaque ischémique ” (Numéro 1923/30-11-01). CCPPRB de Paris Cochin. Avis favorable du 18 Décembre 2001. Coordinateur Professeur Philippe Menasché. Promoteur AP-HP. Essai de Phase I. Essai terminé en 2002.
- Evaluation de la greffe de myoblastes squelettiques dans le traitement de l'insuffisance cardiaque ischémique (essai MAGIC). Coordinateur Professeur Philippe Menasché. Avis favorable du CCPPRB de Paris-Cochin, N° 1923 du 28 Janvier 2003. Essai de Phase II, recrutement multicentrique, international, essai randomisé en double aveugle, contre placebo. Essai terminé en 2006.
- Collaboration avec la société Genzyme Biosurgery pour la mise en route de l’essai clinique de phase II international et randomisé (harmonisation des procédés de culture et des procédures réglementaires et de contrôle qualité).
- Aspects qualitatifs et quantitatifs de la prolifération ex-vivo et de la réimplantation animale de myoblastes issus de patients atteints de dystrophie musculaire : étude préliminaire de faisabilité d'une thérapie cellulaire autologue. Coordonnateur Pr. Claude Desnuelle. Avis favorable du CCPPRB de Nice, N° 01-039, en date du 5 Mars 2002. Phase terminée fin 2003.
- Etude de faisabilité et sécurité d'une thérapie cellulaire autologue pour la dystrophie musculaire facio-scapulo-humérale par greffe de myoblastes. Coordinateur Pr. Claude Desnuelle. Avis favorable du CCPPRB de Nice, N° 01-039. Essai de Phase I, en cours.

C- Mémoire : Travaux de Recherche personnels placés dans leur contexte, principaux résultats et originalité.

Introduction.

Diplômé de la Faculté de Pharmacie, et plus particulièrement intéressé par les nouveaux concepts thérapeutiques, les maladies orphelines, la biologie cellulaire et l'immunologie, j'ai souhaité très tôt orienter ma carrière vers la recherche et le développement. Mes aspirations correspondaient à l'époque à de nouvelles possibilités offertes par l'Association Française contre les Myopathies, au lendemain des premiers succès du Téléthon français. Compréhension de la biologie cellulaire et de la physiologie musculaires, évaluation d'approches de thérapie cellulaire et de thérapie génique figuraient à l'ordre du jour, outre la cartographie génétique à grande échelle des maladies musculaires.

Mon parcours a comporté plusieurs thématiques et plusieurs étapes, évoluant en fonction des mises en œuvre ou découvertes qui ont consisté, globalement, en l'étude des cultures et des cellules d'origines musculaires, en l'établissement de preuves de concepts en thérapie cellulaire *in vitro* et *in vivo*, en l'étude de méthodologies de transfert de gènes, en la mise au point technique d'un certain nombre d'outils, et en la participation active au développement de plusieurs essais cliniques de thérapie cellulaire.

La synthèse des travaux est donc présentée en grands chapitres thématiques, qui représentent : (1) les études et productions des cellules musculaires *in vitro* ; (2) les approches expérimentales en thérapie cellulaire des dystrophies musculaires ; (3) les approches expérimentales en thérapie génique des dystrophies musculaires ; (4) les approches expérimentales en thérapie cellulaire des insuffisances cardiaques ; (5) la mise au point et le déroulement de plusieurs essais cliniques de thérapie cellulaire autologue ; (6) la création d'une structure de valorisation (start-up).

Cette synthèse est suivie d'une présentation de perspectives, qui reprennent et étendent les travaux en cours. Il s'agit : (1) de la caractérisation de nouveaux progéniteurs d'origine musculaire ; (2) des approches expérimentales en thérapie cellulaire des dystrophies musculaires ; (3) des approches expérimentales en thérapie cellulaire des cardiopathies ; (4) des approches expérimentales de thérapie cellulaire à visée ostéogénique.

Les numéros indiqués en gras correspondent aux références bibliographiques, classées par ordre alphabétique.

Les numéros en gras, précédés de l'indication « RP » en gras, correspondent aux publications dont j'ai été co-auteur, et qui sont listées séparément. Ceci permet de situer plus rapidement la part de mon implication dans les domaines présentés.

1. Production de cellules, recherches sur les méthodes. Recherche sur les types cellulaires.

Une meilleure compréhension du développement des muscles squelettiques, de leur homéostasie, de la physiopathologie, et le développement harmonieux de nouvelles stratégies thérapeutiques, nécessitent une analyse extensive des différents compartiments constituant ce tissu.

1.1. Cultures de cellules murines

Durant mes études doctorales, puis post-doctorales, j'ai acquis l'expérience de la culture primaire de cellules musculaires murines. Dans un premier temps, les cultures de cellules de Rat nouveau-né (**4 ; 167 ; 168**) ont été utilisées pour étudier la différenciation myogénique *in vitro*, et sa modulation par des agents pharmacologiques notamment utilisés couramment dans le traitement de la myasthénie et de certaines dystrophies musculaires (les corticoïdes et la famille des stéroïdes ; **RP9 ; RP28 ; RP59**). Dans un second temps, des cultures de cellules de Souris nouveau-né ont été produites pour les études de transplantation cellulaire dans les modèles animaux murins, et des quantités importantes de cellules étaient requises, ce qui nécessitait déjà une standardisation **RP28 ; RP29 ; RP31 ; RP62 ; RP64**). Puis les cultures ont été développées pour un usage extensif, chez le Rat (**RP46 ; RP47**).

Ces expériences en culture cellulaire, la nécessité de standardisation de ce produit biologique, les manipulations de milieux, d'enzymes, de facteurs de croissance, d'hormones, m'ont été utiles lors de la mise au point d'une méthodologie de production des cellules adaptée aux grands modèles (**RP8 ; RP13 ; RP22 ; RP26 ; RP41**), en particulier à l'espèce humaine.

1.2. Cultures de cellules humaines à grande échelle

Comme il apparaîtra au fil de ce mémoire, la preuve de concept et l'efficacité d'approches de thérapies cellulaires autologues par transfert de myoblastes ont été démontrées dans des modèles animaux pré-cliniques de pathologies musculaires et cardiaques. Il a donc été nécessaire d'opérer une transposition, à plus grande échelle, de méthodes de cultures permettant d'obtenir des produits de thérapie cellulaire répondant aux normes cliniques des agences réglementaires (AFSSAPS, FDA et équivalents européens). J'ai procédé à cette recherche translationnelle, en m'appuyant sur l'expérience acquise en France et au Canada, en décortiquant étape par étape les méthodologies d'extraction, de caractérisation, d'expansion, de récolte des cellules musculaires humaines, puis en substituant les produits utilisés par des produits agréés par les agences réglementaires, en proposant et validant une méthodologie globale auprès de ces agences, et en proposant et remplissant les premiers cahiers des charges concernant la production et le contrôle de la qualité.

Cette méthodologie, qui englobe la technique de dissociation enzymatique, le mode de caractérisation des cellules, les modalités d'expansion, les substrats et réactifs utilisés, un milieu de culture optimisé (**66**), permet d'obtenir plusieurs centaines de millions de cellules (voire plusieurs milliards), d'un haut degré de pureté (généralement supérieur à 80%), dans un laps de temps assez court (2 à 3 semaines), à partir de biopsies musculaires (fraîches ou congelées) de poids allant de quelques dizaines de milligrammes à plusieurs grammes. Cette méthodologie a fait l'objet d'une protection par brevet, à présent validé en France, en Australie, en Europe (Office européen des brevets), en examen dans d'autres pays (**RP78 ; RP79**).

Cette méthodologie permet la production de cellules dans le cadre de l'établissement de nouvelles preuves de concept en thérapie cellulaire. Standardisée et reproductible, mais encore ouverte, elle a fait l'objet de transfert de technologies auprès de laboratoires académiques et privés, et elle a été mise en œuvre pour la production par des laboratoires de thérapie cellulaire de plus de 130 cultures cellulaires autologues utilisées dans les essais cliniques (**RP19-21 ; RP37-40 ; RP68**). La méthodologie permet bien sûr de produire des cellules utilisées pour la recherche de mécanismes biologiques ou physiopathologiques

(production de cellules issues de patients présentant des maladies musculaires). Sur la même base, avec quelques variations, la méthodologie a permis de produire des cellules musculaires en quantités pour les études de thérapie cellulaire menées dans les grands modèles animaux (Mouton, Chien) (**RP8** ; **RP13** ; **RP41**). La plate-forme a été mise à la disposition de la communauté scientifique, et c'est dans ce cadre qu'elle a été utilisée pour les essais de thérapie cellulaire de dystrophies musculaires.

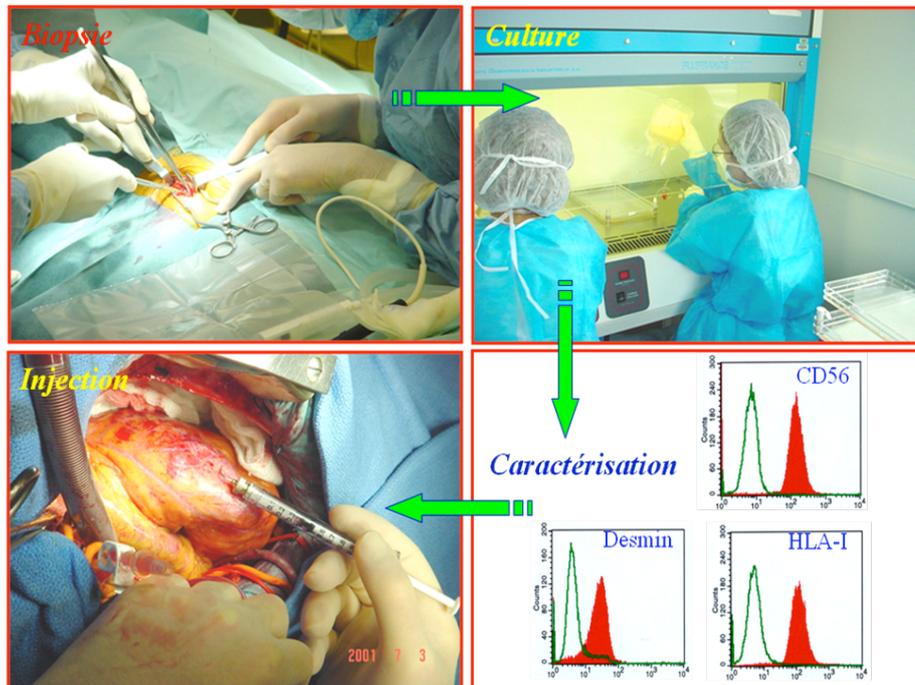


Figure 1. Préparation et utilisation du produit de thérapie cellulaire dans le cadre global de la plate-forme de production de myoblastes humains pour utilisations cliniques. Une biopsie musculaire est réalisée sous anesthésie locale à l'aplomb du muscle vaste externe, au bloc opératoire (en haut à gauche). Après éminçage, la biopsie est dissociée par des enzymes et les cellules sont mises en culture, puis subissent des phases d'expansions, en conditions GMP (salles blanches) (en haut à droite). Les cultures subissent de nombreux contrôles de qualité biologique et microbiologique, aux phases d'expansions et en phase finale d'assemblage du produit de thérapie cellulaire. Notamment, ici, les marqueurs de surface sont recherchés et quantifiés (CD56, HLA-1) (en bas à droite). Le produit de thérapie cellulaire est transmis stérilement aux praticiens chargés de l'administration. Ici (en bas à gauche), injection dans les zones infarctées d'un myocarde humain au décours d'un pontage.

1.3. Caractérisation de cellules et de progéniteurs d'origine musculaire.

1.3.1. Etat des lieux

Le compartiment régénératif du tissu musculaire squelettique adulte est principalement constitué des cellules satellites, qui sont situées sous la lame basale en état de quiescence (97). Ces cellules sont impliquées dans la régénération du muscle lors d'un dommage mécanique, chimique, ou lors des épisodes dégénératifs liés à certaines formes de dystrophies musculaires. Dans ces cas, les cellules satellites sont activées par des signaux émanant des fibres lésées, des matrices voisines, ou des partenaires telles que les cellules endothéliales et inflammatoires (32), et elles prolifèrent (la majorité d'entre elles prend l'appellation

fonctionnelle de myoblastes), et participent à la réparation en fusionnant soit avec les fibres lésées, soit entre elles pour former de nouvelles fibres (8 ; 14 ; 34 ; 122 ; 126 ; 127 ; 129 ; 157 ; 159 ; 174). Le muscle squelettique contient également de nombreux types cellulaires, encore peu décrits dans ce tissu, tels que des cellules endothéliales, des cellules de type mésenchymateux, des cellules de type hématopoïétique, des péricytes et/ou des mésangioblastes, des cellules dites myo-endothéliales, des cellules dites « SP » (Side population) (9 ; 29 ; 37 ; 38 ; 42 ; 81 ; 82 ; 113 ; 124 ; 145 ; 149 ; 160 ; 171 ; 172 ; 176). Plusieurs de ces types cellulaires participent, parfois sous condition, à la régénération musculaire, surtout en situation de dommage aigu.

Du fait de différences inter-espèces liées aux épitopes antigéniques, aux fonctions des protéines, à la difficulté d'obtention de matériel biologique en quantité et de qualité suffisantes, le contenu du tissu musculaire spécifiquement humain est actuellement mal connu (160 ; 171 ; 172). Nous avons donc entrepris des analyses histologiques et phénotypiques de ce tissu *ex vivo* et en culture cellulaire, et identifié plusieurs populations et sous-populations de cellules d'origine musculaire, situées dans différents compartiments. Nous avons identifié des cellules partageant des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des cellules souches mésenchymateuses (RP34). Puis, nous avons identifié une nouvelle catégorie de progéniteurs, sur la base de l'expression de l'aldéhyde déshydrogénase (RP55; RP80). Enfin, l'exploration de nouvelles voies de différenciation présentant un potentiel thérapeutique nous a amenés à explorer le potentiel ostéogénique de cellules d'origine musculaire (voir section II des perspectives).

1.3.2. Caractérisation de nouvelles populations de cellules musculaires squelettiques de type mésenchymateux.

Nous avons réalisé une étude en quatre étapes (RP34). D'abord, nous avons réalisé une étude histologique, *in situ* (sur coupe de tissu) afin d'identifier des marqueurs extracellulaires. Ensuite, en tirant avantage de la méthodologie de culture standardisée que nous avons mise au point dans le cadre de la préparation d'essais cliniques, nous avons identifié les principales populations émergentes durant le processus de culture. Puis, nous avons suivi les cinétiques d'évolution des populations principales. Enfin, nous avons sélectionné des sous-populations dont nous avons comparé les marqueurs et les propriétés fonctionnelles *in vitro*.

Des études d'immunohistofluorescence nous ont indiqué que tous les marqueurs classiques des cellules mésenchymateuses, et d'autres marqueurs non mésenchymateux (endothéliaux en particulier) sont exprimés sur les cellules présentes au sein du tissu, en particulier dans l'endomysium (CD 10, 13, 15, 29, 34, 44, 47, 49, 56, 62, 73, 90, 105, 106, 146). Les cellules satellites, identifiées par leur marqueur (CD56), n'expriment pas, ou extrêmement occasionnellement, de marqueurs mésenchymateux (Figure 2 ci-dessous).

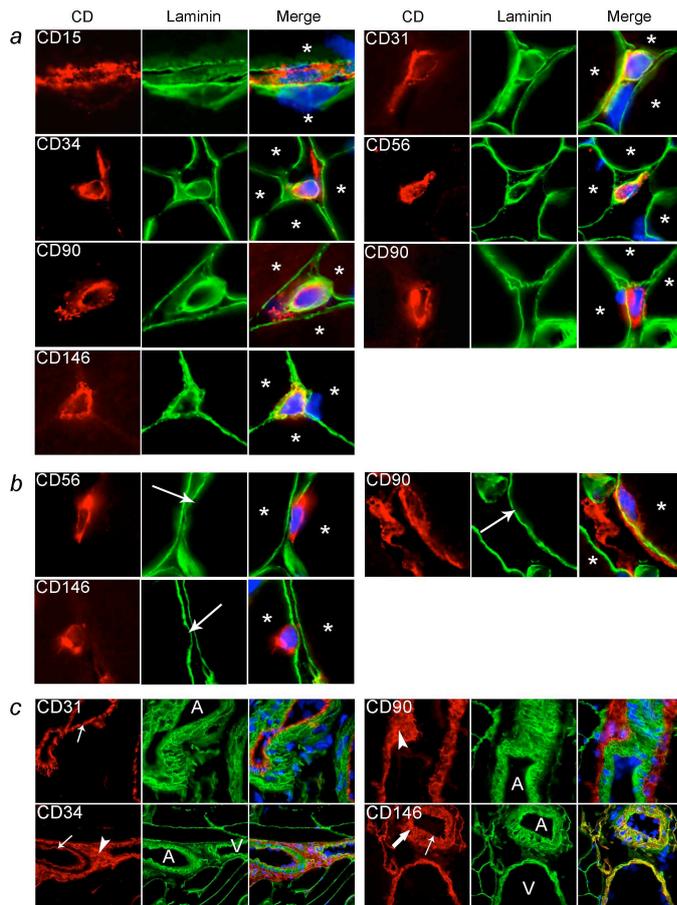


Figure 2. Phénotypage des cellules *in situ* (coupes histologiques). Les marqueurs extracellulaires sont en rouge, la laminine en vert (elle délimite les membranes des fibres musculaires, dont l'intérieur est identifié par des étoiles). Les noyaux sont en bleu. a : La plupart des cellules sont dans l'endomysium. b : Les CD56+ sont en position satellite, de même que quelques CD90+ et CD146+. c : Certains types cellulaires entrent aussi dans la composition des vaisseaux (A, Artérioles, V, Veinules). Intima : flèche. Media : flèche ouverte. Adventice : tête de flèche. Magnification : 100X (a, b), 40X (c).

Après dissociation enzymatique des biopsies musculaires et récolte des cellules mononucléées, un suivi de l'expression des marqueurs a été réalisé. Dans des conditions de culture myogéniques, deux populations majoritaires émergent en quelques jours, les cellules CD56+ et les cellules CD15+, et dominent rapidement une troisième population, initialement majoritaire, les cellules CD34+ qui disparaissent en une semaine. La population CD15+, initialement absente, émerge progressivement à partir des cellules CD34+ et des cellules CD56+, dans une fenêtre temporelle étroite. Par la suite, les deux marqueurs deviennent exclusifs d'un type cellulaire (la co-expression disparaît). Ces résultats suggèrent que certaines cellules satellites (CD56) présentent, pendant une certaine fenêtre de temps en culture, une bipotentialité (8 ; 126).

En parallèle, nous avons observé la disparition rapide du phénotype CD34+ dans nos conditions de cultures. Cependant, nous avons observé la différenciation d'une partie de cette population en cellules exprimant le CD15. Ces cellules sont capables de former des adipocytes *in vitro* dans un milieu de différenciation *ad hoc*. Nos résultats suggèrent donc une origine cellulaire (cellules CD34+) pour au moins une fraction des cellules adipoblastiques originaires du tissu musculaire squelettique (37 ; 126). D'ailleurs, nous avons observé que la déplétion initiale des cellules CD34+ par un tri immunomagnétique, après dissociation des biopsies, permettait d'obtenir des cultures contenant de plus fortes proportions de cellules myogéniques (CD56+, formation de myotubes). A la différence de ce qui est observé chez la Souris, la fraction myogénique du muscle squelettique humain est donc essentiellement contenue parmi les populations CD34- (RP34 et brevet RP79).

Les deux populations CD56+ et CD15+ peuvent être séparées par tri immunomagnétique. Dans ces conditions, ces populations expriment en culture l'ensemble des marqueurs des cellules mésenchymateuses, tout en gardant cependant une certaine hétérogénéité. Placées dans des conditions de différenciation spécifiques, les cellules CD56+ expriment les capacités myogénique, chondrogénique, ostéogénique, mais pas adipogénique. En revanche, dans les mêmes conditions, les cellules CD15+ expriment les capacités adipogénique, chondrogénique et ostéogénique (mais pas myogénique). Les cellules CD56+ sont également capables de se différencier en cellules musculaires lisses dans des conditions angiogéniques (**RP33**).

Le clonage manuel des cellules confirme, sur la base de l'expression de marqueurs et protéines spécifiques, les différences fondamentales entre les deux lignages CD56+ et CD15+. Ces marquages nous indiquent que les cellules produites ne sont vraisemblablement pas des péricytes, ni des mésangioblastes, des cellules SP ou myo-endothéliales (**9 ; 42 ; 124 ; 176**).

Ces résultats illustrent la variété considérable des cellules d'origine musculaire, et la nature mésenchymateuse d'une grande partie d'entre elles. Ils illustrent également l'émergence et l'existence de potentialités de différenciation soit communes, soit restreintes, au sein des lignages principaux, dans des conditions définies. Ils permettent de proposer des premières propositions de hiérarchisations entre populations cellulaires. Ces cellules d'origine musculaire ne peuvent être qualifiées de "cellules souches mésenchymateuses" à part entière, puisque certains critères de celles-ci ne leur sont pas applicables *stricto sensu* (**44**).

1.3.3. Caractérisation de cellules à potentialité ostéogénique ou chondrogénique.

Alors que la capacité myogénique des cellules d'origine musculaire a été le premier point d'investigation naturel, d'autres capacités de différenciation ont été explorées à l'aide de milieux dédiés. *In vitro*, des capacités ostéogéniques, chondrogéniques, adipogéniques, ont été observées, et constituent normalement des traits typiques des cellules souches mésenchymateuses (**86 ; 94 ; 126 ; 171 ; 172**). Nous avons tout d'abord exploré les capacités chondrogéniques des cellules d'origine musculaire. L'exploration des capacités ostéogéniques est en cours et est présentée sous une section des Perspectives.

Cette collaboration concernant la chondrogénèse s'est faite dans le cadre du réseau européen GENOSTEM, qui avait pour vocation l'étude et l'utilisation des cellules souches mésenchymateuses. Les cellules produites au laboratoire ont été transférées au laboratoire dirigé par les Drs. Pujol et Boumédiène (Caen) pour l'analyse des capacités de différenciation des deux populations dérivées du muscle squelettique humain, les cellules CD56+ et CD56-. La différenciation était induite par culture en billes d'alginate, sous l'effet éventuel du facteur TGFβ1. Les cultures ont été menées sur des termes moyens (1 à 21 jours) et ont été étudiées par des techniques histologiques (coupes de billes ensemencées) et de biologie moléculaire (RT-PCR, western blot, liaison et mobilité électrophorétiques). Nous avons observé la différenciation chondrogénique des deux populations dans ce substrat, même en absence de facteurs de croissance. L'association de TGFβ1 augmente cette différenciation, et maintient les cellules dans ce phénotype tout en inhibant la différenciation terminale susceptible de mener à la formation de tissu osseux (diminution de l'expression de collagène I, de collagène X, de Cbfa1). Cet effet était plus particulièrement mis en évidence dans le cas de la population CD56-. Ces résultats ont été publiés (**RP3**).

1.3.4. Identification de progéniteurs exprimant l'aldéhyde déshydrogénase.

Les aldéhyde déshydrogénases (ALDH) constituent une importante famille d'enzymes intracellulaires impliquées dans l'oxydation des aldéhydes aliphatiques et aromatiques dans les acides correspondants, et sont considérées comme des enzymes détoxifiantes à l'égard de toxines d'origines internes ou externes. Parmi elles, l'ALDH1A1 est cytosolique, de distribution ubiquitaire, et impliquée dans la détoxification de certains agents anti-cancéreux, ainsi que dans le métabolisme de l'acide rétinolique (136; 170). Des analogues de substrats fluorescents ont été développés, qui permettent l'identification des cellules qui l'expriment par les techniques classiques de microscopie et de cytométrie de flux. Les cellules ALDH⁺, caractérisées par une forte expression et un petit diamètre cellulaire, ont été identifiées en premier lieu dans la moelle osseuse, le sang périphérique, le sang de cordon (31 ; 51 ; 69 ; 70 ; 79 ; 118 ; 140). Ces cellules sont rares mais présentent des capacités de reconstitution hématopoïétique extrêmement puissantes *in vitro* et *in vivo* (69 ; 70 ; 88). Des cellules ALDH⁺ ont également été décrites parmi les progéniteurs endothéliaux, les cellules épithéliales mammaires, certains progéniteurs neuraux, des fractions dérivées de cultures de tissu adipeux (36).

Au laboratoire, nous avons recherché la présence éventuelle de ces progéniteurs dans le tissu musculaire squelettique humain. Après les avoir effectivement mises en évidence, nous avons appelé ces cellules exprimant l'ALDH, et d'origine musculaire, des SMALD. Ces cellules, caractérisées par un petit diamètre, représentent 2 à 4% du contenu en cellules mononucléées obtenues par dissociation enzymatique classique. Elles présentent des caractéristiques phénotypiques (taille, intensité de marquage) comparables à celles des cellules d'origine médullaire. Deux sous-populations sont définies par l'expression, ou l'absence d'expression, du marqueur CD34. Les cellules SMALD/34⁺ représentent environ les deux tiers des cellules SMALD. Au temps initial de la dissociation, les cellules SMALD n'expriment pas les marqueurs d'engagement de l'angiogénèse (CD31), de l'hématopoïèse (CD45), de la myogénèse (CD56). Certaines cellules SMALD expriment les antigènes CD90, CD44, CD105, certaines SMALD/34⁺ expriment un marqueur de péricytes (CD140b). Les cellules SMALD restent donc relativement hétérogènes.

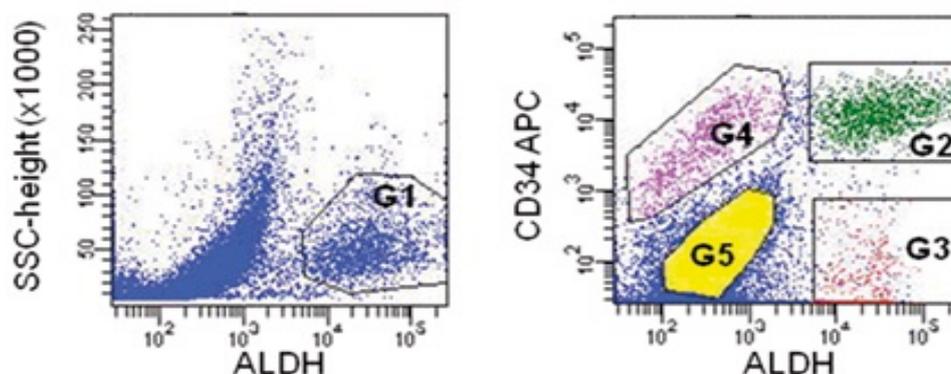


Figure 3. Caractérisation des cellules ALDH⁺ par cytométrie de flux. Après dissociation enzymatique de la biopsie musculaire, les cellules sont incubées en présence d'Aldéfluor et d'un anti-CD34 couplé à l'APC (allophycocyanine). Le déplacement de fluorescence identifie la population ALDH⁺ (G1). Les sous-populations sont identifiées comme suit. G2: ALDH⁺/34⁺; G3: ALDH⁺/34⁻; G4: ALDH⁻/34⁺; G5: ALDH⁻/34⁻.

Les deux sous-populations 34+ et 34- présentent des capacités fonctionnelles différentes *in vitro*. Placées dans des milieux de différenciation *ad hoc*, les cellules dérivées des SMALD/34+ initiales, *in vitro*, se différencient en cellules adipogéniques, ostéogéniques, mais pas myogéniques. Au contraire, les cellules dérivées des SMALD/34- se différencient en cellules myogéniques ou ostéogéniques, mais pas adipogéniques.

Les deux sous-populations ont été étudiées sous l'angle de leur différenciation *in vivo*. Immédiatement après extraction et sélection par cytométrie de flux, les cellules ont été injectées dans les muscles de souris immunodéficientes, préalablement irradiées localement, et ayant subi une dégénérescence musculaire localisée. Les cellules SMALD/34+ ne se sont pas implantées dans les muscles squelettiques, ont majoritairement disparu ou sont restées dans l'endomysium. Au contraire, les cellules SMALD/34- ont proliféré après injection, et ont participé à la régénération musculaire avec une très bonne efficacité (Figure 5).

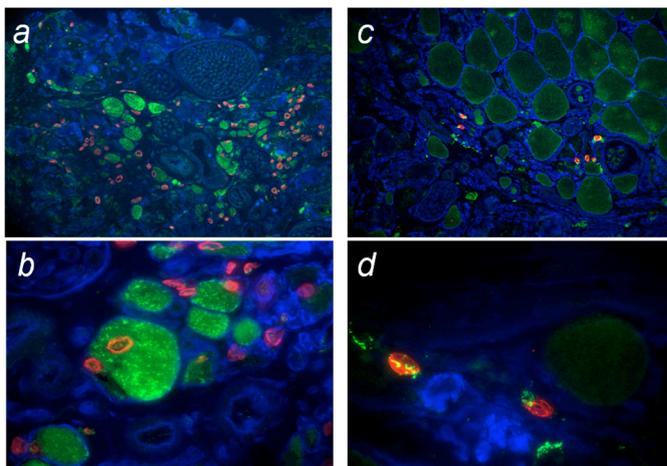


Figure 4. Capacités de régénération musculaire des cellules SMALD. Les noyaux humains sont en rouge, les mitochondries humaines en vert, la laminine en bleu délimite les fibres musculaires et nerveuses. La population SMALD/34- prolifère et participe à la régénération (a,b), tandis que la population SMALD/34+ disparaît ou demeure dans l'endomysium (c, d).
Magnification : 25X (a, c), 63X (b, d).

Nous avons comparé les SMALD avec les cellules ALDH+ provenant d'autres tissus, ainsi qu'avec les autres types de cellules d'origine musculaire. Les analyses bibliographiques suggèrent que les populations de cellules ALDH+, chez l'Homme, diffèrent en composition en fonction du tissu d'origine, et pourraient présenter différentes capacités. Les SMALD/34- ne seraient pas non plus des cellules satellites, ni des péricytes (à moins qu'elles n'en soient les précurseurs), ni des cellules myoendothéliales, ni des cellules SP.

Il est particulièrement intéressant de noter que la proportion de cellules myogéniques qu'il est possible de produire, dans des conditions standardisées, à partir d'une biopsie donnée, dépend de la proportion initiale de cellules SMALD/34- au sein de la biopsie. Cette proportion a valeur informative et prédictive, et change d'ailleurs selon le tissu musculaire d'origine. Cette observation suggère notamment que la population initiale de cellules SMALD/34- présente au sein d'une biopsie contribue de manière importante à la production de cellules myogéniques : celle-ci ne relèverait plus simplement de la présence initiale des cellules satellites.

La caractérisation des cellules ALDH+ d'origine musculaire a fait l'objet d'une demande de brevet, déposée sous l'égide de l'Inserm et de la société Genzyme SAS (**RP80**). En effet, ce travail a fait partie des recherches doctorales menées par Mlle Karine Vauchez sous ma supervision, et dans le cadre d'un partenariat CIFRE. L'étude des cellules ALDH+ d'origine musculaire se poursuit et est présentée sous la section des Perspectives.

1.4. Etudes de cellules musculaires normales et pathologiques : le cas de la Dystrophie Musculaire Facio-Scapulo-Humérale

La méthodologie de production de cellules humaines en grandes quantités, et de qualité standardisée, a permis d'envisager le développement d'essais pré-cliniques et cliniques de certaines formes de dystrophies musculaires. Dans cette perspective, elle a permis l'analyse biologique (et physiopathologique) des cellules de patients présentant ces dystrophies.

La dystrophie musculaire facioscapulohumérale (DFSH) est une maladie neuromusculaire caractérisée par une distribution régionale typique, une faiblesse progressive des muscles de la face et de la ceinture scapulaire, qui s'étend souvent à la musculature des membres inférieurs. Les patients DFSH présentent donc un tableau composé de muscles atteints et non atteints (91). La maladie est transmise de manière autosomale dominante, et est liée à la délétion de répétitions, appelées D4Z4, situées à proximité du télomère du chromosome 4q. 30% des cas cependant surviennent *de novo* (92 ; 144 ; 155). Le mécanisme pathogénique de la maladie est encore mal connu. La réduction de la taille de la région D4Z4, en association avec un haplotype A, provoquerait une ouverture de la chromatine et induirait l'expression d'un plus grand nombre de gènes centromériques (57), et l'expression de protéine Dux4 toxique. Par ailleurs, des études d'expression génétique et l'observation *in vitro* d'une myogénèse anormale ont suggéré que des déficits à certains stades spécifiques de la myogénèse pourraient être impliqués dans la pathogénie de la maladie (12 ; 162 ; 163). L'implication récente du gène FAT1 dans la pathogénèse de certaines formes n'est pas encore publiée.

La DFSH étant une pathologie musculaire d'atteinte sélective, et non accessible aux approches classiques de thérapie génique, nous avons entrepris de proposer l'injection de myoblastes autologues, prélevés dans un muscle cliniquement non atteint et démultipliés en culture, dans un muscle candidat atteint cliniquement par la maladie. Dans ce schéma, les myoblastes transposés contiennent toujours les gènes morbides, cependant les cellules prélevées en territoire non atteint possèdent des capacités régénératives qui ont été perdues progressivement dans le territoire atteint. Ce schéma mise donc sur la régénération localisée du tissu musculaire, même si à terme celui-ci subira le lent processus de dégradation pathologique. Le travail que nous avons mené s'est décomposé naturellement en deux étapes successives : étude pré-clinique, puis essai clinique de phase I. L'étude clinique sera discutée au chapitre spécifique des essais cliniques. L'étude pré-clinique, décrite ci-dessous, visait à éprouver l'hypothèse selon laquelle les myoblastes issus de muscles non cliniquement atteints présentaient des capacités de prolifération et différenciation suffisantes pour envisager leur transfert dans un muscle atteint.

Plusieurs études ont été réalisées concernant les possibilités de croissance et l'évolution *in vitro* de cellules musculaires squelettiques à partir de biopsies musculaires prélevées chez des patients atteints de dystrophies musculaires (17 ; 40 ; 56 ; 158). Un article faisait état de l'observation de figures de sénescence (phénotype nécrotique et vacuolaire) en culture (162). Néanmoins, l'origine anatomique du prélèvement musculaire et le degré d'atteinte de ce muscle, les conditions de culture, n'étaient pas précisés. Notre étude pré-clinique visait donc à évaluer la faisabilité globale de production de cellules musculaires, en conditions cliniques, à partir de biopsies musculaires prélevées sur des patients atteints de dystrophie FSH, et à évaluer la qualité des cellules ainsi produites. Nous avons évalué : les cinétiques et rendements, le temps nécessaire à l'obtention de cultures en masse ; le phénotype des cellules (morphologie, marqueurs extra- et intra-cellulaires tels que CD56 et desmine), la proportion de ces cellules au sein de la culture, l'évolution de cette proportion au cours du temps et au fil

des expansions ; la qualité microbiologique des cultures aux différents stades de production ; la fonctionnalité des cellules *in vitro* par étude de leur capacité à former des myotubes ; la fonctionnalité des cellules *in vivo* par étude de leur capacité à former des fibres musculaires humaines dans des souris immunodéficientes.

Nous avons obtenu des myoblastes à partir de biopsies musculaires de patients présentant un nombre de répétitions D4Z4 compris entre 6 et 10. Ces cellules présentent une morphologie normale, une capacité de prolifération et de différenciation normales. Ces résultats nous ont permis de préparer un essai clinique de phase I (voir chapitre A-5). Ces résultats ont été publiés (RP11 ; RP68).

Il n'a pas été possible dans le cadre de cette première étude de comparer les propriétés de myoblastes préparés à partir de deux biopsies réalisées chez le même patient en territoire affecté et en territoire non affecté. Une seconde étude a donc été réalisée. Nous avons caractérisé des myoblastes obtenus par la banque de tissu (BTR) de l'AFM (*res nullus* d'opérations d'omopexie), à partir de muscles atteints et non-atteints de patients FSH, présentant un bas nombre de répétitions (de 3 à 5), représentatif d'un éventail complet de la maladie. Les caractéristiques biologiques et moléculaires de ces cellules ont été évaluées et comparées à celles de myoblastes DFSH obtenus lors de notre étude précédente et à celles de myoblastes contrôles issus de sujets sains. Outre les paramètres précédents, nous avons évalué le phénotype des cellules à des stades consécutifs de différenciation et l'expression de protéines spécifiques, la longueur des télomères à différents stades de l'expansion cellulaire, et l'expression de gènes localisés à proximité de la région D4Z4 (*ANT1*, *FRG1*, *FRG2*).

En résumé, les myoblastes préparés à partir de biopsies provenant de muscles affectés cliniquement présentent différentes alterations. En particulier, ils présentent fréquemment un phénotype vacuolaire-nécrotique, une réduction de la capacité de prolifération et un accroissement du temps de doublement, une différenciation altérée marquée par une diminution de l'indice de fusion. Curieusement, les myoblastes de patients présentent des longueurs de télomères normales aux passages successifs. Une publication est en préparation concernant ces cultures. De nombreux problèmes techniques liés à l'analyse d'expression de certains gènes en ont retardé la finalisation.

Enfin, nous avons mis en place une collaboration avec la plate-forme d'analyse du transcriptome de Nantes, dirigée par le Professeur Jean Léger. Ce laboratoire a développé la technique du micro-array à l'aide de puces dédiées à l'analyse du transcriptome musculaire (muscle squelettique, muscle cardiaque, puces appelées "Myochips"). Nous avons fourni des cellules de patients DFSH ainsi que de personnes non atteintes, à différents stades de différenciation, afin de connaître le profil d'expression génique de ces cellules musculaires en situation normale et pathologique. Le laboratoire de Nantes a testé l'expression d'environ 5000 gènes. L'étude des résultats est en cours.

1.5. Identification de progéniteurs cardiaques Islet1+ dans le cœur de souris.

Les approches de thérapie cellulaire, à visée de réparation du tissu cardiaque, ont été développées dès les années 90, et ciblaient essentiellement les cardiopathies post-ischémiques (voir section 3 ci-dessous). De nombreux types cellulaires ont été utilisés, et il est à présent admis que les cellules souches embryonnaires et les véritables progéniteurs cardiaques sont des types cellulaires assurant une réelle intégration cardiaque, histologique et électrophysiologique, voire une augmentation du volume du tissu fonctionnel. Dans le cadre

d'une collaboration transatlantique soutenue par la Fondation Leducq, nous avons développé un projet selon deux axes ayant pour objectifs (1) de caractériser, chez l'animal adulte, un nouveau type de progéniteur cardiaque identifié essentiellement aux stades fœtaux et embryonnaires ; et (2) d'évaluer l'intérêt thérapeutique éventuel de la greffe de cellules souches embryonnaires murines dans un modèle animal présentant une cardiomyopathie dilatée d'origine génétique (ce projet est en cours et développé dans la section des Perspectives).

Islet-1 est un facteur de transcription de la famille des LIM, identifié dans les tissus pancréatiques, neuraux et cardiaques (45 ; 49 ; 78 ; 120). Au niveau cardiaque, Islet-1 identifie des progéniteurs responsables de la formation embryonnaire du champ secondaire, mais également capables de former tous les lignages cardiaques (tissu contractile, tissu de conduction, système angiogénique) (21 ; 28 ; 59 ; 60 ; 84 ; 105 ; 141 ; 173). Pour envisager une utilisation thérapeutique autologue des cellules Islet-1+, il est nécessaire de savoir si ces cellules sont présentes en quantités suffisantes chez l'adulte, et dans des territoires accessibles à la chirurgie. Nous avons donc recherché ces cellules dans le tissu cardiaque de différentes souches de souris, des stades néo-nataux aux stades adultes (souches C57BL6/J, SVJ129, Balb/C, SJL, C3H). Le cas échéant, nous avons caractérisé les populations identifiées par l'utilisation de marqueurs complémentaires. Nous avons également comparé la présence et la localisation de ces cellules dans le modèle animal de cardiomyopathie développé au laboratoire, la souris *KI-Lmna*^{H222P} qui porte une mutation du gène des lamines A/C, qui est également utilisé pour notre approche thérapeutique *in vivo* (7 ; 55 ; 138).

Nous avons observé la présence et la localisation de cellules exprimant Islet-1 au sein de 1 ou 2 types de clusters, dépendamment de la souche animale, dans la partie supérieure du coeur, dans une région allant de 12 à 30% de la hauteur du myocarde en partant de sa base. Le nombre de ces cellules reste relativement stable jusqu'à l'âge de 3 à 4 mois, puis ces cellules disparaissent à l'horizon de 8 à 12 mois.

Le premier type de cluster est présent dans toutes les souches de souris. Il semble contenir des cellules originaires de la crête neurale, et participe à la formation de ganglions, exprimant des neurofilaments et des acétylcholinestérases (13).

Le second type de cluster n'est retrouvé que dans certaines souches de souris (SVJ129, Balb/C) et contient des cellules présentant une organisation sarcomérique de l'actine: ces cellules sont probablement des cardiomyocytes. Ce type disparaît plus précocément.

Enfin, le nombre et la localisation de ces cellules ne varient pas dans le modèle murin de cardiomyopathie.

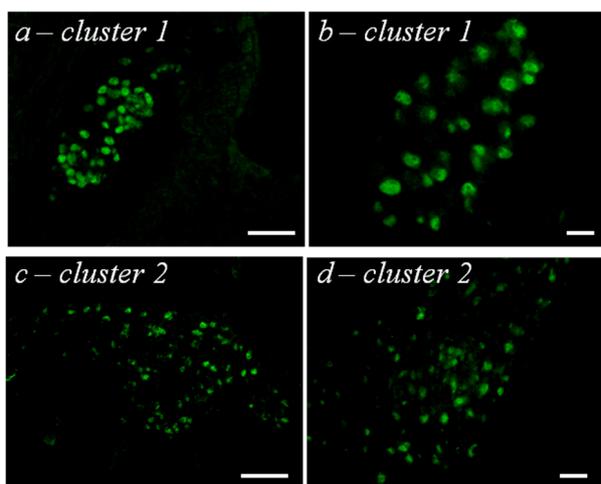


Figure 5. Clusters de cellules islet-1+ dans les coeurs de souris LMNA (129SVJ x C57Bl/6). Les clusters de type 1 (a, b) et 2 (c, d) sont localisés dans la partie haute du coeur. Ils diffèrent par la taille des noyaux, le nombre de cellules par cluster. Magnification: 25X (a, c); 40X (b, d).

Ces résultats soulignent notamment une certaine hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle de ces cellules exprimant Islet-1, qui sont rares de surcroît chez l'adulte (**RP24**). Nous ignorons si les différences liées à la souche de Souris ont une répercussion fonctionnelle (**11**). Du fait de leur faible nombre, de leur distribution principalement au sein du tissu myocardique, de leur hétérogénéité, les cellules Islet-1 n'apparaissent pas comme le candidat idéal immédiat pour la réparation tissulaire autologue (**117**). Pour cette raison, nous avons choisi de développer ces études de réparation tissulaire cardiaque à l'aide de cellules souches embryonnaires de souris, pré-différenciées en culture (cette partie est développée dans la section des Perspectives).

2. Approches thérapeutiques expérimentales : preuves de concept en thérapie cellulaire dans deux groupes de dystrophie musculaire

La transplantation cellulaire exploite le potentiel naturel de restauration porté par la cellule musculaire. Les myoblastes possèdent la capacité intrinsèque de fusionner et ces cellules, par leur aptitude à proliférer, présentent une capacité à reconstituer durablement et de manière organisée un tissu lésé et à introduire, le cas échéant, des copies du gène sain dans le tissu injecté (**3 ; 5 ; 35 ; 75 ; 76**). Les cellules du donneur apportent donc un potentiel régénératif et, selon la situation, un génôme non morbide.

Après avoir suscité de grands enthousiasmes initiaux (**64 ; 74 ; 111 ; 150**), les approches de thérapie cellulaire ont buté sur plusieurs écueils, représentés par les problèmes d'administration, de diffusion et de migration des cellules, les problèmes d'immunogénicité et de rejet, et des rendements affaiblis par une mortalité immédiate très importante, en plus des difficultés techniques inhérentes à la standardisation et aux échelles de production des cellules (**131 ; 133 ; 135 ; 142 ; 145**). Mes études ont contribué à comprendre et améliorer les rendements de transplantation, à évaluer leur efficacité biochimique et fonctionnelle, à utiliser l'outil-même de la greffe cellulaire pour approfondir les connaissances en biologie et régénération musculaire, ainsi qu'en physiopathologie.

2.1. Thérapie cellulaire dans des modèles de la dystrophie musculaire de Duchenne.

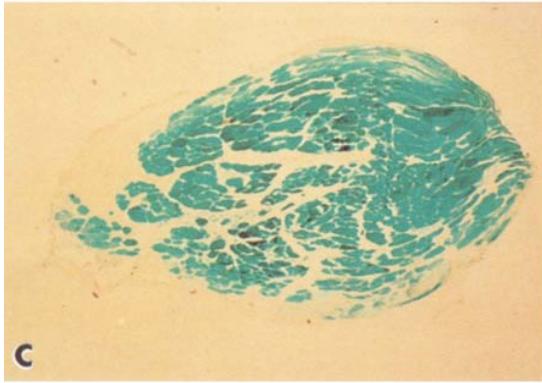
La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) a été la première maladie étiquetée sur le plan moléculaire par la technique de la génétique inverse. C'est une maladie rare liée au chromosome X, transmise maternellement dans deux tiers des cas, et due à une mutation spontanée dans un tiers des cas. Alors que les garçons sont atteints cliniquement, les filles sont généralement asymptomatiques. La maladie est due à des mutations du gène codant la dystrophine, l'une des plus grandes molécules connues (427 kDa), codée par un très gros gène (72 exons, 1.2×10^6 paires de bases, 1 centiMorgan) et présentant par conséquent une probabilité significative de mutations et réarrangements spontanés (**73**). La maladie se caractérise par une atteinte musculaire diffuse se manifestant dès la petite enfance (2-3 ans), progressant vers une dégénérescence progressive de la totalité de la musculature squelettique confinant au fauteuil roulant vers l'âge de 10-12 ans, contraignant aux chirurgies orthopédiques, à l'assistance respiratoire à l'adolescence. L'espérance de vie des patients excède très rarement la trentaine d'années, malgré des progrès considérables dans la prise en charge des multiples handicaps se développant progressivement. Le mécanisme physiopathologique de la DMD implique des déficits en dystrophine et une déplétion précoce des réserves myogéniques secondaire aux multiples cycles de dégénérescence et régénération du tissu musculaire (**26**). L'histologie musculaire montre une diminution importante du

nombre de fibres musculaires, la colonisation par des tissus fibreux et adipeux, de nombreux foyers inflammatoires. Les cellules survivantes sont peu nombreuses, ont épuisé leurs capacités répliquatives, et ne peuvent soutenir les multiples expansions nécessaires à la production d'un grand nombre de cellules sur une large échelle et leur utilisation clinique (17 ; 40 ; 158). Le variant allélique de la DMD est la dystrophie musculaire de Becker, cliniquement moins sévère, et dans laquelle les mutations de la dystrophine n'entraînent pas de décalage du cadre de lecture et permettent la production de molécules tronquées et partiellement fonctionnelles.

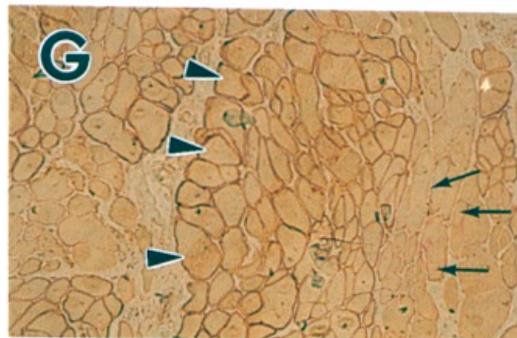
Il existe plusieurs modèles animaux de la DMD. La souris mdx (x-linked muscular dystrophy) (23 ; 128) et le chien GRMD (Golden retriever muscular dystrophy) (125) ont été les premiers identifiés, et les plus utilisés. La souris mdx présente un déficit d'expression de la dystrophine, du fait d'une mutation ponctuelle dans l'exon 21 introduisant un codon stop ; cependant, son état clinique reste satisfaisant, bien que l'examen histologique mette en évidence des anomalies des fibres musculaires (centronucléations, divisions internes, augmentation du diamètre, zones inflammatoires présentant des aspects de dégénérescence et régénération), en particulier après un pic correspondant au sevrage (3 semaines après la naissance). La fragilisation structurelle et métabolique des fibres déficientes entraîne leur perméabilisation, et la fuite de certains composés (enzymes telles que les créatine kinases: **RP60**) ou l'entrée intempestive de molécules (anticorps, albumine, calcium). En outre, du fait d'un phénomène moléculaire mal connu de réarrangement spontané d'épissage qui permet de sauter les exons mutés en conservant le cadre de lecture, un petit nombre de fibres musculaires, appelées « révertantes », exprime des formes tronquées de la dystrophine qui ne peuvent être identifiées que par des techniques fines de biologie moléculaire, ou l'utilisation d'un panel d'anticorps monoclonaux. La souris mdx a été très utilisée pour étudier les efficacités et mécanismes de restauration biochimique de la dystrophine selon différentes stratégies (111), mais n'a été que de peu d'utilité concernant l'étude de l'impact clinique de ces interventions. Le chien GRMD, en revanche, présente des signes cliniques marqués, graves et progressifs, avec de nombreuses variations inter-individuelles, de la forme humaine de la DMD. Cependant, la difficulté d'élevage de ces animaux, leur rareté, les coûts d'entretien, réservent généralement ce modèle aux études pré-cliniques avancées, lorsque les preuves de concept ont été faites dans de plus petits modèles ou qu'un changement d'échelle est rendu indispensable (124).

Très rapidement après la découverte du gène et de la protéine dystrophine, et la mise en évidence du modèle mdx, l'équipe de Terry Partridge a montré que la transplantation de cellules musculaires entraînait la fusion des myoblastes *in vivo* et la formation de nouvelles fibres et/ou de fibres hybrides exprimant la dystrophine (111). Ces résultats ont suscité de très grands espoirs auprès de la communauté des patients et des médecins. Des essais cliniques de transplantations de myoblastes chez l'Homme ont été mis en œuvre très rapidement mais n'ont cependant pas permis d'obtenir de restauration fonctionnelle durable (cette problématique est développée sous la section 5.4.1. concernant les essais cliniques).

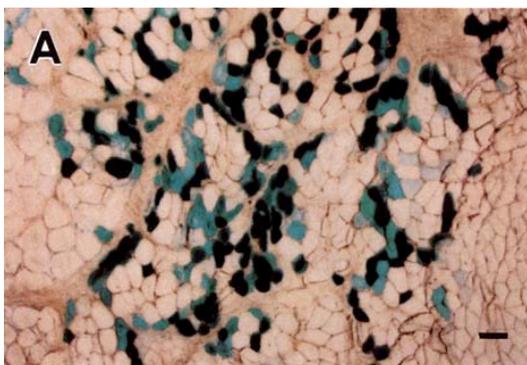
L'un des problèmes majeurs rencontrés au cours des expérimentations réside dans la réaction immunitaire du receveur contre les cellules du donneur lorsque celui-ci n'est pas parfaitement histocompatible (**RP14 ; RP15 ; RP16 ; RP27 ; RP28 ; RP56 ; RP57 ; RP62 ; RP64 ; RP65 ; RP74**). Au décours des transplantations cellulaires, les réactions inflammatoires sont responsables de la destruction d'un très fort pourcentage de cellules dans les heures et les jours suivant l'injection (**RP15 ; RP16**).



J'ai utilisé différents traitements immunosuppresseurs pour contourner cette difficulté et des transplantations ont été réalisées dans différents contextes de



De même, d'excellents résultats ont été obtenus en utilisant des combinaisons



Dans le but de développer une stratégie

compatibilité immunologique. Nous avons obtenu d'excellents résultats de transplantation en utilisant l'immunosuppresseur FK506 pour contrôler le rejet de greffes non compatibles.

Ci-contre (Figure 6), les souris ont été immunosupprimées quotidiennement par FK506 à dose de 2.5 mg/kg/j durant 1 mois. Des cellules musculaires allogéniques exprimant la b-gal ont été injectées dans le muscle Tibial antérieur après traitement à la notexine et irradiation.

Plus de 90% des fibres musculaires du receveur expriment localement la bêta-galactosidase.

donneur/receveur compatibles (RP56 ; RP57 ; RP64 ; RP74). Ci-contre (Figure 7), des cellules syngéniques ont été transplantées dans les muscles tibiaux antérieurs de souris mdx irradiés et traités par la notexine. Le rétablissement d'expression de dystrophine est observé de 1 à 9 mois après greffe (têtes de flèches). Les rendements de transplantation ont également été améliorés par l'utilisation de différents protocoles : traitements des cultures cellulaires avant la transplantation par des facteurs de croissance, prétraitements du muscle, injections successives (RP29 ; RP31).

de transplantation cellulaire dans des modèles animaux plus volumineux, des transplantations de myoblastes autologues ou hétérologues génétiquement modifiés ont été testées chez le Singe et le Chien. Nous avons été les premiers à présenter les résultats positifs de transplantation de myoblastes autologues ou hétérologues chez le Singe normal (Figure 8 ci-contre) et le Chien normal (RP22 ; RP26).

2.2. Thérapie cellulaire dans des modèles de la dystrophie musculaire congénitale à déficit en laminine.

2.2.1. Présentation clinique, histologique, génétique, et modèles animaux.

Les enfants atteints de dystrophie musculaire congénitale (DMC) présentent un déficit musculaire sévère et très précoce, associé à des rétractions très marquées et des déformations articulaires. Les DMC se révèlent par une hypotonie néo-natale, parfois sévère. Le retard du développement moteur est le plus souvent marqué et son évolution clinique est sévère dans

certains cas; le pronostic est essentiellement fonction de l'importance de l'atteinte respiratoire (RP12 ; 53 ; 112). Des altérations cérébrales ont été trouvées chez certains patients, alors que le développement intellectuel n'est pas touché. Les biopsies musculaires sont de type "dystrophique", présentant une variation de la taille des fibres musculaires, des nécroses et quelques éléments régénératifs, sans altérations ultrastructurales spécifiques, mais marquées par l'importance de l'augmentation du conjonctif endomysial.

Dans un nombre important de cas, on note l'absence de chaîne alpha2 de la laminine. Des déficiences totales et/ou partielles ont été identifiées. La laminine-2 (anciennement appelée "mérosine") est un hétérotrimère formé d'une chaîne lourde, appelée alpha2 (400 kDa) et de 2 chaînes légères, appelées beta1 et gamma1 (200 kDa chacune) (47, 85). C'est un constituant de la lame basale des cellules de Schwann, des cellules musculaires squelettiques (myotubes, fibres musculaires) et du trophoblaste (85). La laminine-2 intervient dans la stabilisation des myotubes formés par la fusion des myoblastes (83 ; 154). En parallèle, le gène responsable des DMC "mérosine-déficientes", préalablement localisé en position 6q22-23, est celui de la chaîne alpha2 de la laminine-2 (63 ; 67 ; 147 ; 148). L'ADNc qui lui correspond représente une séquence de 9,5 kb.

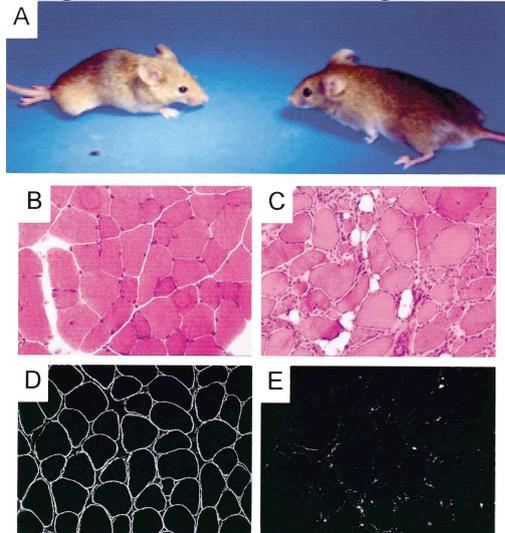
Il existe cinq modèles animaux des DMCs avec déficit en chaîne alpha2. Dans le but de mieux analyser ces modèles, j'ai développé: (1) une technique simple d'identification des allèles morbides dans le modèle dy^{2J}/dy^{2J} , (2) l'analyse de la morphologie musculaire par imagerie de résonance magnétique nucléaire.

La souris *dystrophia muscularis* dy/dy (102) et son variant allélique, la souris dy^{2J}/dy^{2J} (99 ; 100) sont les modèles spontanés classiques. La laminine-2 est absente du muscle squelettique et des nerfs périphériques de la souris dy/dy (19 ; 165). Le locus morbide dans ce modèle a été localisé sur le gène de la chaîne alpha2 de la laminine-2 de souris, sur le chromosome 10, mais le site de la mutation n'a pas encore été identifié. La souris dy/dy présente des signes marqués de dystrophie progressive à partir de l'âge de 3 semaines, et son espérance de vie dépasse rarement 6 mois. L'examen histologique des muscles met en évidence une réduction du nombre et une variation du diamètre des fibres musculaires, ainsi qu'une prolifération marquée du tissu conjonctif endomysial (102). La lame basale des cellules de Schwann présente des solutions de continuité et la myélinisation du système périphérique est déficiente à des degrés variables (19). Dans le modèle dy^{2J}/dy^{2J} , la chaîne alpha2 est exprimée sous la forme d'une protéine tronquée, la mutation affectant le domaine globulaire de cette chaîne (166). La souris dy^{2J}/dy^{2J} présente des signes cliniques plus modérés (100). La mutation est localisée dans un site d'épissage, ce qui provoque un saut d'exon sans décalage du cadre de lecture. La présence du nucléotide muté entraîne l'apparition d'un nouveau site de restriction pour l'enzyme NdeI. Le nombre et la taille des fragments obtenus par digestion a permis la mise au point d'une méthode rapide d'identification de l'allèle muté après une étape de PCR (RP73).

Les deux souris dy^{3K}/dy^{3K} (104) et dy^W/dy^W (83) ont été obtenues par invalidation du gène de la chaîne alpha2. Les souris présentent des signes très sévères de dystrophie musculaire, une durée de vie réduite à 5 semaines. A l'aide du modèle dy^W/dy^W , j'ai participé à l'étude de l'expression du gène de la chaîne alpha2 en conditions normales et pathologiques (83 ; RP18 ; RP32 ; RP62 ; RP64). Nous avons montré une forte expression du gène de la chaîne alpha2 au cours de la myogénèse, une régulation négative de cette expression après la conclusion de la myogénèse, et une importante activation de cette expression au cours de la régénération musculaire. En l'absence de chaîne alpha2, la formation des fibres musculaires

est abortive, ce qui contribue probablement au développement de la pathologie dans les modèles animaux dystrophiques.

La souris dy^{Pas1}/dy^{Pas1} est un nouveau mutant spontané que nous avons caractérisé en collaboration avec l'Unité de Génétique des Mammifères de l'Institut Pasteur. Un phénotype dystrophique est apparu spontanément dans une lignée de souris. Les animaux présentent des signes cliniques semblables à ceux des souris dy/dy avec de subtiles différences (Figure 9 ci-dessous, A ; la souris atteinte est à gauche, le contrôle à droite). L'atteinte faciale, en effet, semble plus modérée, mais l'atteinte des membres antérieurs est plus sévère et plus précoce. L'espérance de vie n'excède pas 3 mois.



A l'examen histologique, on note une réduction du nombre des fibres et une

grande variabilité de leur taille (C), et une forte réduction de l'expression de la chaîne alpha2 dans les tissus musculaires squelettiques (E) (B et D : contrôles). La cartographie par microsatellites et un test d'allélisme ont montré l'implication du gène de la chaîne alpha2 dans cette pathologie. L'analyse des cDNA de ces animaux a mis en évidence une insertion de plusieurs dizaines de bases entraînant un décalage du cadre de lecture. La mutation est une insertion d'une séquence de type protéine-A intracisternale (RP7). L'insertion de cette séquence introduit cependant un site d'épissage faible, qui permettrait la synthèse d'un certain nombre de molécules tronquées, en quantités trop faibles pour être détectées par Western-blot, mais dont on peut observer la présence à l'examen immunohistochimique.

2.2.2. Caractérisation de la pathologie musculaire par imagerie RMN.

L'évaluation fonctionnelle des complémentations géniques est une étape indispensable de la validation de ces approches. Le développement d'une approche non invasive est souhaitable, en particulier dans la perspective d'une transposition de ces techniques aux études cliniques humaines. L'Institut de Myologie dispose d'un spectromètre de résonance magnétique nucléaire à 4 Tesla, principalement destiné aux explorations humaines par imagerie et spectroscopie, mais permettant des études de microimagerie grâce à la valeur très élevée du champ magnétique. Un programme de visualisation et de mesure des masses musculaires des souris normales et dystrophiques a été développé en 1997 par les Drs. Anne Leroy-Willig et Sabine Tardif-de Géry, dans le but d'analyser les modèles animaux dystrophiques et leurs traitements. Ce développement a permis une étude quantitative des temps de relaxation T2 musculaires chez des souris dystrophiques et normales (RP54). L'analyse est faite par imagerie en écho de spin. Les coupes de 1 mm d'épaisseur, distantes de 1,5 à 3 mm permettent l'analyse comparative des deux membres postérieurs ou supérieurs, avec une résolution spatiale de 120 microns dans le plan. Nous avons mis en évidence une diminution importante des masses musculaires des souris dystrophiques par rapport aux souris normales. Nous avons observé un allongement du temps de relaxation transverse T2 dans les muscles des souris dy/dy et dy^{2J}/dy^{2J} . Cet index est très sensible aux modifications pathologiques et utilisé pour le suivi de maladies musculaires humaines. L'imagerie RMN a été également mise en œuvre

pour le suivi du transfert de plasmides (RP42), et le suivi des cellules transplantées (RP6) (voir ci-dessous).

2.2.3. Approche expérimentale de thérapie cellulaire.

J'ai étudié la restauration de la chaîne alpha2 de la laminine par transplantation de cellules musculaires dans ces souris, et d'abord montré que la transplantation de cultures primaires de cellules musculaires squelettiques restaurait localement l'expression de la chaîne alpha2 de la laminine *in vivo* (RP64). Puis j'ai montré, en utilisant des clones de cellules myogéniques, que les myoblastes font partie du groupe de cellules sécrétant la chaîne alpha2 de la laminine *in vivo*, les désignant ainsi comme de bons vecteurs potentiels pour la complémentation génique *in vivo*. Ces résultats indiquent également que la présence de la chaîne alpha2 de la laminine endogène n'est donc pas indispensable aux premières étapes de la myogénèse *in vivo* (RP62).

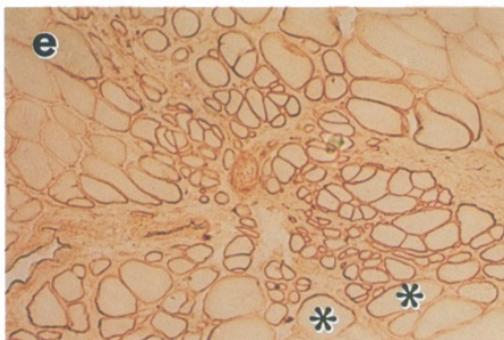


Figure 10. Transplantation syngénique de myoblastes issus de souris saines dans les muscles tibiaux antérieurs de modèle murin de la maladie (souris dy/dy) préalablement irradiés et endommagés par la notexine. Les foyers de cellules injectées expriment la chaîne alpha2 de la laminine (e, g), parfois essentiellement sur la face dirigée vers le centre du foyer (astérisques).

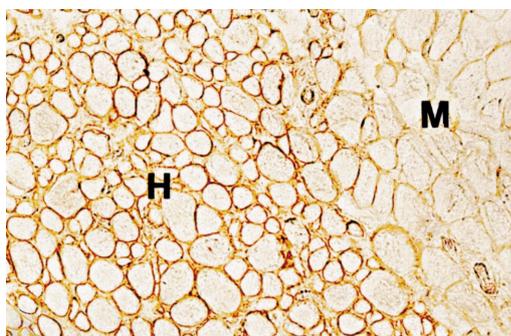
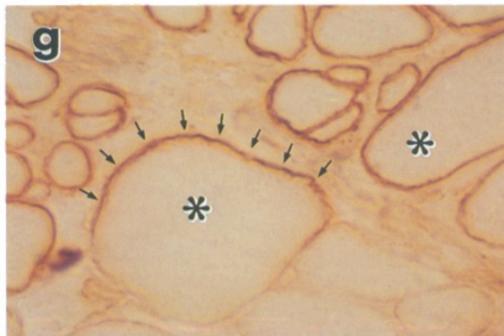


Figure 11. Des cellules musculaires humaines ont été transplantées dans les muscles tibiaux antérieurs de souris SCID immunodéficientes. La production de chaîne alpha 2 de la laminine humaine est mise en évidence à l'aide d'anticorps spécifiques de la protéine humaine (liseré brun, secteur H).

Ce travail a permis le dépôt d'une demande de brevet, au Canada, concernant la restauration de protéines extracellulaires par la transplantation de cellules myogéniques.

2.3. Modélisation pathologique par transfert cellulaire : le cas de la dystrophie myotonique de type 1.

La transplantation de myoblastes n'est pas seulement un concept thérapeutique. Parce que cette transplantation met en route le système de régénération musculaire, et devrait permettre, entre autres mécanismes régénératifs l'introduction de noyaux complets au sein de fibres musculaires matures, c'est un outil permettant l'étude de l'expression de gènes et de protéines musculaires et non musculaires. Cet outil permet par exemple d'identifier des populations myogéniques (ou autres populations d'intérêt ; voir par exemple la section 1.3.4. concernant l'identification des cellules ALDH+), de comparer les rendements myogéniques *in vivo* de populations de myoblastes issues de différentes sources normales ou pathologiques (voir par exemple la section 1.4. concernant les essais pré-cliniques développées dans le cadre de la DMFSH), d'analyser les conséquences de la restauration de protéines dans des modèles déficients, d'analyser les domaines d'expression musculaire de certaines protéines, ou de constituer *in vivo* des modèles d'études physiopathologiques (transfert de myoblastes fournis par des patients présentant des maladies caractérisées au sein de muscles sains).

Utilisant l'outil de la transplantation cellulaire, j'ai participé à l'étude de la distance de diffusion de la dystrophine par une technique de transplantation de cellules normales en souris *mdx/mdx*. Nous avons montré que le domaine de diffusion de la dystrophine à l'intérieur d'une fibre musculaire est limité à environ 300 µm. Cette étude souligne la nécessité d'identifier dans l'avenir une voie thérapeutique permettant d'obtenir une bonne diffusion des gènes de complémentation dans le tissu du receveur, que ces gènes soient apportés par des vecteurs cellulaires ou non cellulaires (RP25 ; RP30).

Utilisant cet outil conceptuel de modélisation physiopathologique, j'ai mise en place le transfert de cellules provenant de patients atteints de la dystrophie myotonique de Steinert (DM1), maladie autosomique dominante (56 ; 153), durant les derniers mois de mon séjour post-doctoral au Canada, sur une initiative du Pr. Jean-Pierre Bouchard. Le projet a été développé puis publié par d'autres chercheurs après mon départ, et a démontré la nature morbide du muscle hybride formé, au sein de la souris, par la fusion des myoblastes humains pathologiques (RP52).

2.4. Imagerie de transplantation cellulaire par résonance magnétique nucléaire.

Ce projet a été mené en collaboration avec le Laboratoire de RMN AFM-CEA, Institut de Myologie (Directeur du laboratoire : Dr. P. Carlier) et a donné lieu à deux publications (RP6 ; RP49).

L'objectif final de ce projet était de mettre au point et d'évaluer l'efficacité de l'approche de visualisation par RMN de myoblastes après transplantation (27 ; 87). Cette technique a donc été utilisée pour le suivi longitudinal de myoblastes injectés localement en intramusculaire (voir étude morphologique ci-dessus). Le développement de l'approche a nécessité la mise au point de conditions de charge de cellules et la mise au point d'un modèle de greffe cellulaire interprétable.

Nous avons sélectionné deux catégories d'agents de contraste : les nanoparticules de ferrites superparamagnétiques (SPIO) (24 ; 25), et le lanthanide complexé Gadolinium-DTPA (Gd-DTPA) (16). Ces composés sont utilisés en routine clinique (87). Les nanoparticules de

ferrites sont particulières, le lanthanide complexé est hydrosoluble. Nous avons procédé en plusieurs étapes.

Les cellules ont été chargées par incubation en présence de l'agent de contraste, après avoir sélectionné les concentrations optimales des agents *in vitro* et *in vivo*. Les protocoles d'imagerie et de quantification par RMN ont été validés. Les acquisitions ont été réalisées à l'aide d'un aimant Bruker Biospec de 4 Teslas, équipé d'un insert de gradient de 20 cm de diamètre (200 mT/m). Les images d'écho de spin en T1 ont été prises dans le plan axial, avec une résolution de 120x120µm.

En parallèle, nous avons mis au point et validé un modèle de greffe cellulaire xénogénique : des cellules humaines chargées ont été injectées à des souris C57BL6 immunocompétentes. Dans un tel modèle, les cellules sont rejetées dans un délai d'une semaine (75). Ce modèle devait nous permettre d'établir une corrélation entre la persistance des cellules, et la rémanence des agents de contraste au sein du muscle injecté. La présence des cellules était analysée sur coupes de tissus, par l'utilisation d'anticorps dirigés contre des protéines humaines (COX2, lamine A/C), et les particules de SPIO étaient mises en évidence, le cas échéant, par la coloration du bleu de Prusse. Ceci a permis de comparer la persistance de marqueurs biologiques et de marqueurs nanoparticulaires. Bien que les cellules aient été rejetées selon une cinétique classique dans ce modèle de greffe xénogénique, les nanoparticules étaient toujours présentes au site d'injection, suggérant que celles-ci avaient été recaptées par les phagocytes circulants ou tissulaires, ou par les cellules voisines du site d'injection. Cette mise au point histologique a été publiée (RP49).

Cette persistance était-elle de nature à interférer avec l'interprétation des résultats d'imagerie RMN ? Était-elle observée lors de l'utilisation d'agents hydrosolubles tels que le Gd-DTPA ? Dans un second temps, les cellules humaines chargées par les agents de contraste ont été injectées dans les muscles d'animaux immunocompétents, et suivies longitudinalement par imagerie de RMN. Les images ont révélé des contrastes d'hyper-intensité (Gd-DTPA) et d'hypo-intensité (SPIO) au jour 0. Le signal observé avec le SPIO a décru légèrement entre J0 et J11 mais est resté en phase de plateau, et était toujours aussi important à 3 mois. Le signal observé avec le Gd-DTPA a décru significativement pour disparaître à J11 ; en parallèle, les cellules ont été totalement rejetées à J6-J7. La coloration du bleu de Prusse, en revanche, a révélé la présence de SPIO recaptés au site d'injection initial par les cellules voisines et les phagocytes, pendant au moins 3 mois.

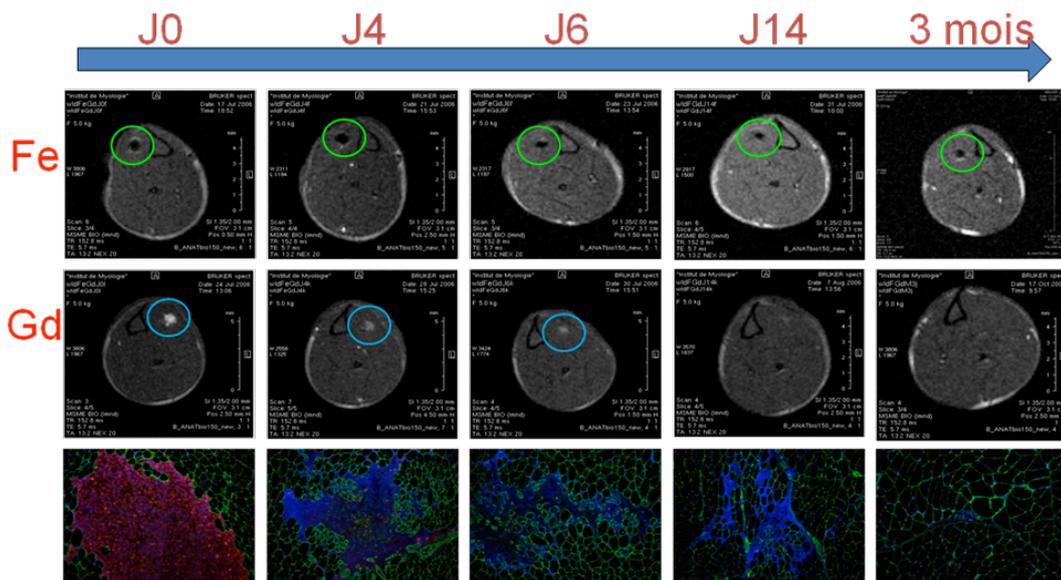


Figure 12. Suivi longitudinal des cellules chargées par des agents de contraste et greffées. La modification du signal RMN persiste tout au long du temps d'analyse (3 mois) dans le cas des particules de ferrites (Fe, cercle vert) et disparaît vers 10 jours dans le cas du composé soluble Gd-DTPA (Gd, cercle bleu). Les cellules humaines (marquage rouge des noyaux humains) sont rejetées en 6-7 jours dans ce contexte xénogénique.

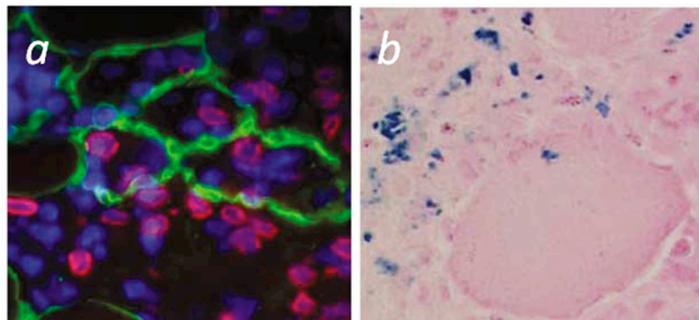


Figure 13. Intégration des cellules et/ou captage des nanoparticules. Durant les premiers jours suivant l'injection, des myoblastes fusionnent avec les fibres du receveur. Les nanoparticules de ferrites sont cependant identifiées dans l'endomysium après rejet des cellules greffées au jour 6, et à l'intérieur des fibres ayant intégré des myoblastes. a, noyau humain marqué en rouge, membrane des fibres musculaires marquée en vert, Jour 2. b, ferrites colorés par le Bleu de Prusse. Magnification : 100 X (a), 150 X (b).

L'utilisation des ferrites (SPIO), sous forme de nanoparticules, mène donc à la surestimation de la présence des cellules, et des rendements de transplantation (146). L'utilisation d'un tel marqueur est donc extrêmement délicate, en dehors d'une application très ponctuelle et limitée aux premiers jours de l'expérimentation. Le lanthanide Gd-DTPA présente une rémanence plus pertinente vis-à-vis de la persistance des cellules, sa disparition étant rapide, cependant cet agent est encore détectable au site de greffe après le rejet complet des cellules. Ce résultat pourrait être lié au transfert, par la fusion des myoblastes avec les fibres musculaires, de l'agent dans celles-ci.

En conclusion, les schémas de détection des agents de contraste sont différents après administration intramusculaire de cellules chargées, et la rémanence des deux catégories (soluble ou insoluble) excède le temps de survie des cellules injectées. Ceci doit inciter à la prudence dans l'interprétation des résultats de suivi *in vivo* de cellules marquées. Ces résultats, publiés, pourraient avoir une portée assez générale dans le domaine de la thérapie cellulaire, lorsqu'il s'agit de greffe cellulaire localisée (RP6).

3. Approches thérapeutiques expérimentales : preuves de concept en thérapie génique dans deux groupes de dystrophie musculaire

3.1. Introduction

Différentes approches dites « de thérapie génique » ont été développées dans le cadre de la recherche d'une thérapie efficace pour certaines formes de dystrophies musculaires (152). Avant que ne se développent les méthodologies actuelles visant à modifier les profils d'expression des gènes (saut d'exon, court-circuit des codons stop, trans-épissage, réparation ponctuelle par des endonucléases,...), la thérapie génique visait à introduire dans les cellules déficientes un ADN complémentaire codant pour une protéine fonctionnelle complète ou tronquée (121). Dans le cas de certaines dystrophies musculaires cependant (DMD, DMC déficiente en laminine), le gène complet à insérer dans un vecteur est de très grande taille (14 et 9.5 kb sans promoteur ni séquence de régulation, respectivement). L'utilisation de vecteurs viraux pose des problèmes liés à leur capacité d'empaquetage, à leur distribution, à leur capacité de diffusion, à leur pénétration et à leur immunogénicité (30 ; 151). Les vecteurs non viraux sont, eux, particulièrement attractifs, compte-tenu de leur facilité de production et de manipulation, de l'absence de limitation de taille du transgène, de l'absence d'immunogénicité propre du vecteur. L'approche de délivrance la plus simple consiste en l'injection intramusculaire directe d'ADN nu plasmidique (43 ; 164), mais est limitée par la faible efficacité de diffusion puis de transduction *in vivo*, qui ne permet pas d'atteindre les niveaux requis pour le développement d'un bénéfice fonctionnel. Des approches alternatives ont été développées (injection systémique artérielle ou veineuse, sous pression ou en présence de vasodilatateurs puissants) (22 ; 62 ; 68).

3.2. Utilisation de vecteurs adénoviraux et problèmes immunologiques.

J'ai étudié l'efficacité de transduction des adénovecteurs et leur immunogénicité *in vivo* à l'époque où ceux-ci ont été disponibles. Les vecteurs de première génération ont induit des réponses immunitaires dirigées contre les protéines virales de capsid, certaines protéines virales produites par les cellules transfectées, et les produits des gènes rapporteurs. Certains de ces problèmes ont été identifiés, puis ont pu être contrôlés par l'utilisation de l'immunosuppresseur FK506 et d'anticorps monoclonaux (RP17 ; RP61).

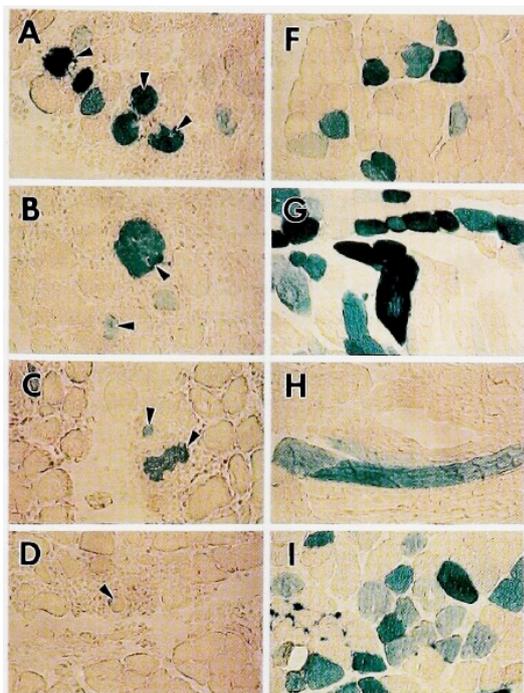


Figure 14. En l'absence d'immunosuppression, l'injection directe de vecteurs adénoviraux de première génération dans les muscles squelettiques entraîne des réactions immunologiques menant à la destruction des fibres et cellules transduites en moins de 2 semaines. Des réponses humorales et cellulaires sont formées. A-D : en absence d'immunosuppression 7 (A, B), 14 (C) et 21 (D) jours après injection. L'immunosuppression prévient le rejet (F-I) à 7, 14, 21 et 28 jours (F-I respectivement) (coupes transversales de muscles squelettiques).

3.3. Evaluation de l'efficacité de l'électrotransfert *in vivo*.

La méthodologie de l'électrotransfert *in vivo* a été adaptée à la transduction du muscle squelettique, de manière à obtenir une haute efficacité de transduction, associée à une haute reproductibilité (2 ; 95 ; 103). Nous avons testé l'efficacité de cette approche à l'aide des modèles *mdx/mdx*, *dy/dy*, *dy^{2J}/dy^{2J}*, et adressé certaines questions spécifiques aux modèles et aux protéines que l'on voulait voir exprimées (RP10 ; RP42 ; RP63).

En utilisant un plasmide optimisé contenant le transgène bêta-Gal sous contrôle d'un promoteur CMV (137), nous avons observé une très haute efficacité de transduction à court terme dans les modèles dystrophiques et non dystrophiques (Figure 15 ci-dessous). Cette première observation indiquait que la fibrose du muscle dystrophique ne semblait pas un obstacle majeur à la transduction provoquée par cette méthode. En l'absence d'immunosuppression, nous avons observé un rejet complet des fibres transduites, exprimant la protéine bêta-Gal, en moins de 3 semaines. Cependant, une immunosuppression transitoire (3 semaines de FK506) permet une persistance à moyen terme de l'expression de la protéine étrangère. Ces observations nous amènent à soulever, d'une manière générale, le problème des éventuelles réactions immunitaires développées par les patients contre des formes nouvelles de protéines thérapeutiques qui seraient introduites dans leur tissu musculaire (39 ; 98 ; 151). Nous ne pouvons prédire à l'heure actuelle la survenue et l'intensité de ces réactions, qui dépendront probablement de la nature de la protéine introduite (116).

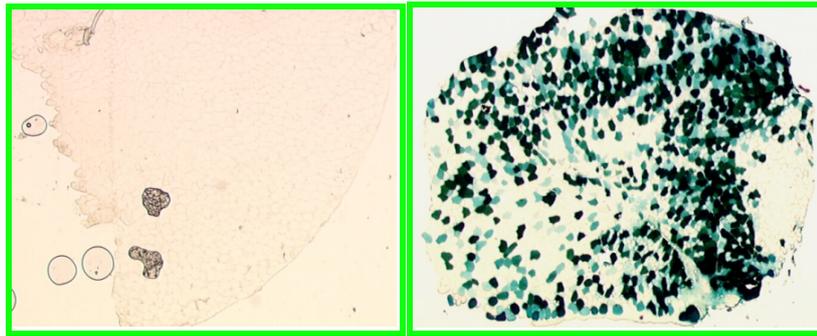


Figure 15. Un plasmide beta-Gal optimisé (« piCOR ») a été injecté dans les muscles tibiaux antérieurs de souris saines. En l'absence d'électrotransfert, quelques fibres expriment le gène rapporteur une semaine après injection (à gauche). Par contre, lorsque l'électrotransfert est pratiqué immédiatement après injection, le gène rapporteur est exprimé par environ 40% des fibres musculaires (à droite).

Nous avons observé la transduction de fibres musculaires de souris dystrophiques par des plasmides volumineux contenant les gènes de protéines absentes ou défectueuses : chaîne alpha2 de la laminine en souris *dy/dy*, chimère dystrophine-EGFP en souris *mdx/mdx*. L'expression correcte des protéines en position extra-membranaire (laminine-2) et sous-sarcolemmique (dystrophine) indiquait la pertinence fonctionnelle de leur expression *in vivo*. Le pourcentage des fibres exprimant ces protéines était cependant plus faible que celui des fibres exprimant la protéine bêta-Gal (voir Figure 16 ci-dessous). Cette différence pouvait tenir à la différence de taille, de nature et de localisation des protéines produites. Nous avons donc calculé la longueur des domaines d'expression de ces différentes protéines. Nous avons observé des longueurs de 1500 μm pour la bêta-Gal, environ 300 μm pour la dystrophine, et environ 500 μm pour la laminine-2. Ces résultats soulignent l'une des difficultés rencontrées par le transfert de gène dans le muscle squelettique, à savoir la diffusion segmentaire limitée des protéines transduites à l'intérieur des fibres musculaires. Ce problème est particulièrement aigu dans des situations où une restauration sur une longue distance d'une protéine structurale est recherchée, comme c'est le cas dans les dystrophies musculaires, et n'est pas spécifique de la méthodologie de l'électrotransfert.

L'expression des gènes rapporteurs est stable dans les animaux non dystrophiques, mais nous avons observé une baisse progressive du nombre de fibres transduites dans les modèles dystrophiques. Ces résultats soulignent la problématique de la stabilité des tissus musculaires dystrophiques. La persistance des fibres transduites dépendra donc de la nature évolutive des maladies (certaines d'entre elles étant caractérisées par des cycles continus de dégénérescence et régénérations), et du degré de correction apporté. De plus, les cellules satellites ne sont pas transduites par électrotransfert.

Le niveau de transduction des fibres devrait donc être encore amélioré si l'on recherche un bénéfice fonctionnel. La méthode d'électrotransfert verra ici se poser les problèmes de mise à l'échelle, concernant les volumes musculaires à traiter, les problèmes de douleur et de toxicité. La combinaison de la méthodologie d'électrotransfert avec d'autres approches pourrait être envisagée (injection sous pression douce, utilisation des ultrasons...).

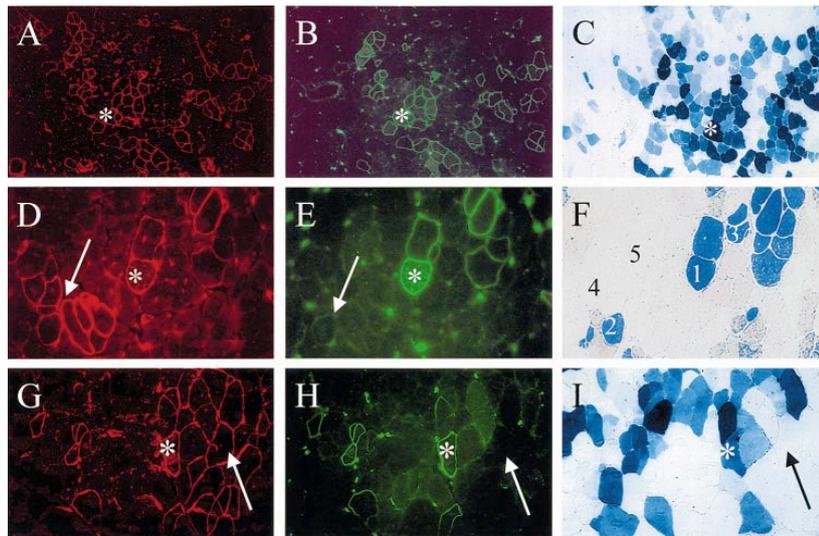


Figure 16. Transduction des muscles de souris par des plasmides codant une construction contenant la GFP et la dystrophine (A, B, D, E, G, H) ou la beta-galactosidase (C, F, I). Le nombre de fibres exprimant la GFP et la dystrophine est plus faible que le nombre de fibres exprimant la beta-galactosidase. La souris mdx contient aussi des fibres révertantes, exprimant naturellement des formes de la dystrophine (identifiées en rouge), qui ne sont pas co-localisées avec les fibres exprimant la construction GFP-dystrophine (comparer A et B, D et E, G et H).

En parallèle, nous avons participé à l'évaluation par imagerie RMN de l'efficacité et l'étendue des transfusions (**RP42**). Couplées à l'utilisation d'agents de contraste, ces méthodes permettent d'identifier la topographie des zones touchées par électroporation.

Nous avons finalement posé la question de la pertinence physiologique de ce concept thérapeutique par une évaluation fonctionnelle. Des techniques d'évaluation globale de la motricité, et des techniques d'évaluation de la force et de la résistance sur muscle isolé ont été mises en place en 2002-2003 au laboratoire Généthon par l'équipe de Françoise Fougerousse. Après avoir choisi le groupe musculaire d'intérêt pour les études d'impact de l'électroporation (utilisation d'une vingtaine d'animaux), nous avons traité des souris à l'aide de plasmide "thérapeutique" (chaîne alpha2 de la laminine-2 humaine), sous immunosuppression (un muscle reçoit le plasmide, le muscle contra-latéral reçoit une solution saline, les deux sont électroporés). Les animaux ont été analysés 4 semaines après ces injections. Malheureusement, aucun bénéfice fonctionnel n'a pu être observé.

3.4. Evaluation d'autres vecteurs non viraux.

Une collaboration avec l'Unité INSERM533 (Drs. Bruno Pitard et Denis Escande) a été mise en œuvre afin d'évaluer l'efficacité de vecteurs synthétiques non viraux: il s'agit des PEG (blocs de copolymères). Les résultats ont indiqué un niveau d'efficacité très intéressant dans les systèmes musculaires cardiaque et squelettique, comparable à celui obtenu par électroporation dans le muscle squelettique (**RP43**). Nous avons testé de manière systématique l'efficacité de ces nouveaux vecteurs à l'aide de transgènes rapporteurs et thérapeutiques dans le modèle animal dy^{2J}/dy^{2J} . Nous avons obtenu des résultats encourageants, supérieurs en rendement à ceux obtenus en l'absence de vecteurs (administration de plasmide nu), mais inférieurs à ceux obtenus dans ces modèles par électroporation.

4. Approches thérapeutiques expérimentales : preuves de concept en thérapie cellulaire autologue et ectopique de l'insuffisance cardiaque

4.1. Introduction

En 1998, j'ai commencé à développer, en collaboration avec des équipes de chirurgie cardio-vasculaire et de cardiologie, des approches thérapeutiques visant à la réparation tissulaire dans le contexte de l'ischémie myocardique.

L'insuffisance cardiaque représentera l'une des principales causes de morbidité et mortalité au 21^{ème} siècle. Le pronostic de cette maladie est sombre, puisqu'un patient sur cinq décèdera dans l'année suivant son diagnostic, et le taux de décès à 5 ans est de plus de 50% (**6 ; 15 ; 33 ; 139**). En France, environ 500 000 personnes présentent une insuffisance cardiaque, on dénombre environ 120 000 nouveaux cas et 32 000 décès chaque année, et les coûts représentent 1-2% du total des dépenses de santé (**41**). Les approches pharmacologiques (inhibiteurs de l'enzyme de conversion, bêta-bloquants...) ont considérablement amélioré ce pronostic, mais restent des traitements symptomatiques et les échappements ne sont pas rares. La transplantation cardiaque se voit principalement limitée par le nombre réduit de donneurs. L'une des causes principales de l'insuffisance cardiaque est l'ischémie myocardique. L'hypoxie puis la réponse inflammatoire entraînent la perte rapide et irréversible des cardiomyocytes adultes. Une cicatrice fibreuse akinétique remplace une portion entière de myocarde contractile, ce qui se répercute sur la fonction globale, puis le remodelage. Les mécanismes endogènes de régénération ne sont pas suffisants pour assurer la réparation de myocardes massivement endommagés, et cette constatation a amené de nombreuses équipes à tester le concept d'une repopulation des zones myocardiques lésées par des cellules du patient. Des revues extensives de la littérature ont été réalisées au fur et à mesure (**101 ; RP66 ; RP67 ; RP69-71 ; RP76**).

Les cardiomyopathies dilatées (CMD) peuvent également mener à une insuffisance cardiaque réfractaire progressive. Définies par la présence, souvent inexplicée, d'une dilatation des cavités ventriculaires associée à une altération de la fonction contractile du myocarde, elles représentent un problème majeur de santé publique. Elles constituent environ 50% des indications de transplantation cardiaque, et sont associées à des taux élevés de morts subites par arythmies ventriculaires. La mortalité est de 15 à 50% à 5 ans. L'origine génétique de ces maladies est établie dans un nombre croissant de cas. Les gènes identifiés à ce jour codent tous pour des protéines structurales du cytosquelette ou du sarcolemme (myosines, actines, troponine T, desmine, sarcoglycans, lamines, dystrophine). Enfin, certaines pathologies neuromusculaires sont associées à une atteinte cardiaque évoluant vers une forme de CMD accompagnée d'insuffisance grave, responsable en définitive du décès du patient myopathe.

Au début des années 90, plusieurs équipes ont développé des approches de thérapie cellulaire dans le but de parvenir à une réparation tissulaire localisée (**108**). De nombreux types cellulaires ont été testés. Leur utilité est limitée par différents impératifs : la caractérisation phénotypique, la facilité d'obtention, la capacité de production, les réelles capacités de différenciation, la souplesse d'administration, et l'acceptation physiologique et immunologique par l'organisme du receveur.

Les cardiomyocytes. Le transfert de cardiomyocytes fœtaux permet une reconstitution histologique et fonctionnelle de la zone nécrosée (**123**). Néanmoins, l'absence de capacité

proliférative de ces cellules à l'état adulte, et donc l'absence de source d'approvisionnement commode, restreint complètement leur intérêt dans des perspectives cliniques.

Les cellules souches cardiaques. Plusieurs équipes ont identifié indépendamment de petits nombres de cellules souches cardiaques, présentes dans le myocarde, et dont les phénotypes varient d'une étude à l'autre. Il s'agit de cellules dites « SP », « Sca1+ », ou « c-kit+ » (71 ; 110 ; 161 ; 175). Des mésangioblastes, cellules initialement décrites en position de péricytes vasculaires, ont été décrits au sein du tissu cardiaque (58). Rappelons que des cellules responsables de la cardiomyogénèse primitive ont été identifiées chez l'embryon et le jeune animal par l'expression du gène *Isl1+*, et peuvent être multipliées *in vitro* sur un substrat d'origine cardiaque, pour se différencier en cardiomyocytes fonctionnels (84). Notre laboratoire a étudié le nombre et la répartition de ces cellules au sein du tissu cardiaque murin adulte (voir section 1.5 ci-dessus). Mais si les cellules souches cardiaques représentent un grand intérêt sur le plan de la biologie cardiaque, leur obtention n'est pas aisée et leur expansion en culture entraîne la perte rapide de leurs capacités de différenciation. Elles ne sont donc pas encore arrivées au stade des développements cliniques.

Les cellules souches hématopoïétiques. Ces cellules progénitrices peuvent être obtenues en quantités importantes à partir de biopsies médullaires (crête iliaque) ou de sang périphérique. La rapidité de préparation et la relative facilité d'obtention ont motivé leur utilisation dans de nombreux protocoles. Cependant, plusieurs études ont maintenant établi la restriction de différenciation de ces cellules vers la voie hématopoïétique (107). Les bénéfices fonctionnels observés sont donc actuellement attribués à des mécanismes paracrines permettant soit une augmentation de l'angiogénèse locale, soit une survie des cardiomyocytes hibernants, soit un recrutement de cellules souches résidentes ou circulantes. Les bénéfices sont faibles, mais significatifs, ainsi qu'il ressort des résultats de méta-analyses (77 ; 89 ; 93). Le sang de cordon est également considéré actuellement comme une source potentielle intéressante (72).

Les cellules souches mésenchymateuses. Ces cellules forment une fraction très minoritaire du compartiment médullaire. Leur réel potentiel cardiomyogénique *in vitro* et *in vivo* est très controversé (119). Les obstacles à leur utilisation sont la formation de tissu osseux ectopique (169) et, par voie coronaire, le risque de micro-embolisation (156). Une fraction stromale du tissu adipeux, abondant et facile d'accès, contient également des cellules proches des cellules mésenchymateuses, présentant des capacités angiogéniques plus marquées (115).

Les cellules endothéliales. L'utilisation de précurseurs endothéliaux est proposée dans le but d'augmenter l'angiogénèse locale, de soutenir les cardiomyocytes hibernants, les cellules souches résidentes, ou éventuellement d'autres types cellulaires greffés en parallèle (48).

Les cellules souches embryonnaires. Ces cellules sont capables de se différencier en cardiomyocytes dans des conditions de mieux en mieux maîtrisées. Elles présentent des caractéristiques biochimiques et électrophysiologiques proches de celles de cardiomyocytes adultes (65). Sur le plan clinique, l'utilisation de ces cellules est actuellement limitée par plusieurs aspects : (1) la possibilité de séparer, avec un très haut rendement et une très haute spécificité, les cellules prédifférenciées, afin de parer à la formation de tissus tumoraux (109) ; (2) le caractère immunogène, controversé, des ces cellules, qu'elles soient utilisées en contexte xénogénique ou allogénique (109) ; (3) les considérations éthiques liées à l'obtention et à la préparation de lignées humaines ; (4) enfin, des controverses sur leur capacité de maturation terminale *in vivo* (80). Les cellules souches induites pluripotentes (cellules iPS) peuvent être obtenues par l'introduction d'une série de gènes à l'intérieur de cellules

somatiques adultes et présentent un grand nombre des caractéristiques des cellules souches embryonnaires, notamment la capacité de différenciation cardiomyogénique (96). Le développement de ces cellules en est à ses débuts mais les résultats sont prometteurs chez le Primate non-humain (18).

Tableau 1. Principaux types cellulaires utilisés.

Type cellulaire	Partisans	Détracteurs
Cardiomyocytes adultes	Restaurent histologie et fonction	Pas de croissance en culture
Cardiomyocytes fœtaux ou néonataux	Restaurent histologie et fonction	Problèmes immunologiques, logistiques, microbiologiques et éthiques
Cellules souches cardiaques	Restaurent histologie et fonction	Problèmes de caractérisation, sélection, amplification <i>ex vivo</i> , pertinence clinique
Myoblastes	Facilité d'obtention et expansion. Constituent un tissu vivant. Modifient le remodelage. Support de l'angiogénèse et de la contractilité??	Mécanisme d'action inconnu. Pas de couplage électromécanique, ni de transdifférenciation. Risque arythmogène?
Cellules endothéliales (médullaires ou périphériques)	Support de l'angiogénèse et de la perfusion. Activation de cardiomyocytes hibernants?	Caractérisation, production. Quelles voies d'administration, risque de resténose? Suffisantes à elles seules?
Cellules souches mésenchymateuses (médullaires, ou adipeuses)	Facilité d'obtention et d'expansion. Support de l'angiogénèse et de la cardiomyogénèse?	Caractérisation, efficacité de différenciation. Risque de différenciation indésirable?
Cellules souches hématopoïétiques	Soutien de l'angiogénèse	Caractérisation, et préparation à grande échelle. Absence de différenciation angiogénique et cardiaque
Sang de cordon	Relative facilité d'obtention. Soutien de l'angiogénèse ?	Quantité limitée. Allogénique. Différenciations controversées.
Cellules souches embryonnaires	Restaurent histologie et fonction. Large capacités d'expansion, constitution de banques généralistes allogéniques	Problèmes de sélection de précurseurs engagés spécifiques. Risque de différenciation indésirable, de tumorigénicité et d'instabilité biologique. Problèmes de sécurité microbiologique. Problèmes éthiques.
Cellules souches pluripotentes induites (iPS)	Source autologue, avantages des cellules embryonnaires	Capacités d'expansion et différenciation à confirmer
Cellules musculaires lisses	Formation de tissu vivant, modifient le remodelage.	Mécanisme d'action inconnu. Problème de source d'origine et d'expansion

4.2. Transplantation de myoblastes en situation post-ischémique.

Notre groupe de recherche, multidisciplinaire, s'est donc tourné vers l'utilisation de cellules musculaires d'origine squelettique. Les multiples objectifs des approches de thérapie

cellulaire sont les suivants : (1) remplacer le tissu cicatriciel par un tissu vivant possédant des propriétés plus élastiques; (2) restreindre le remodelage ; (3) restaurer une contractilité myocardique; (4) augmenter l'angiogénèse locale; (5) recruter, le cas échéant, des cellules souches cardiaques. Les approches autologues ont été choisies pour s'affranchir des problèmes de rejets immunologiques.

Dans des modèles d'insuffisance cardiaque post-ischémique du petit animal, nous avons démontré l'amélioration durable de la fonction cardiaque après injection de cellules musculaires squelettiques dans la zone infarctée. Cette amélioration a été mise en évidence à la fois par des études non invasives (échocardiographie) (RP45-48 ; RP51) et par les études hémodynamiques invasives (courbes pression-volume) (RP2). En parallèle, nous avons démontré le développement, sur le plan histologique, d'un tissu musculaire squelettique au sein de la zone cicatricielle injectée (RP46 ; RP47 ; RP51). Nous avons montré que l'amplitude de l'amélioration fonctionnelle était liée à l'importance initiale de l'infarctus, ainsi qu'au nombre de cellules injectées (RP47). Les études fonctionnelles et histologiques, menées sur de longues périodes (plus d'un an après la greffe), nous ont permis d'observer la persistance du bénéfice fonctionnel, mais aussi la persistance du tissu musculaire squelettique au sein de la zone injectée (RP2).

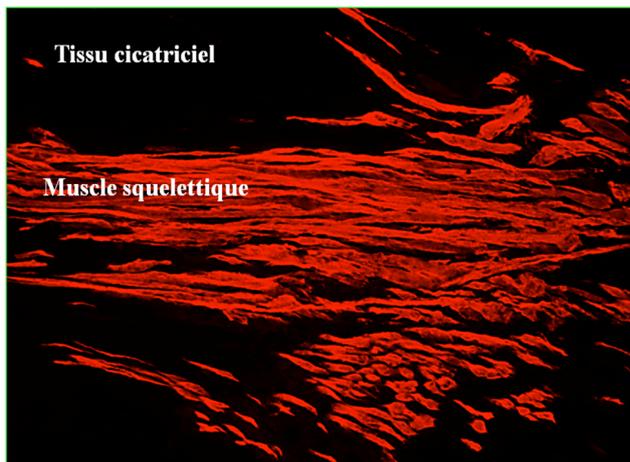


Figure 17. La translocation de myoblastes autologues (cultures primaires) en zone infarctée du myocarde chez le Rat se traduit par la formation de tissu musculaire squelettique *in situ*, mis en évidence par l'expression de marqueurs spécifiques (ici une isoforme rapide de la chaîne lourde de la myosine) un mois après la greffe.

A court terme après translocation, les fibres musculaires formées expriment d'abord des marqueurs embryonnaires et néonataux. Rapidement, on observe ensuite une expression de plusieurs isoformes de chaînes lourdes de la myosine, souvent au sein d'une même fibre musculaire. Cette expression traduit une maturation tissulaire, dont nous ne connaissons pas la signification physiologique dans cet environnement cicatriciel. Avec le temps, le nombre de fibres squelettiques présentes au sein de la zone injectée semble décroître sensiblement, et la proportion de fibres exprimant au moins l'isoforme lente augmente progressivement. Le phénotype oxydatif semble donc privilégié dans ce tissu néoformé, localisé au sein d'un tissu cardiaque dont le métabolisme est oxydatif.

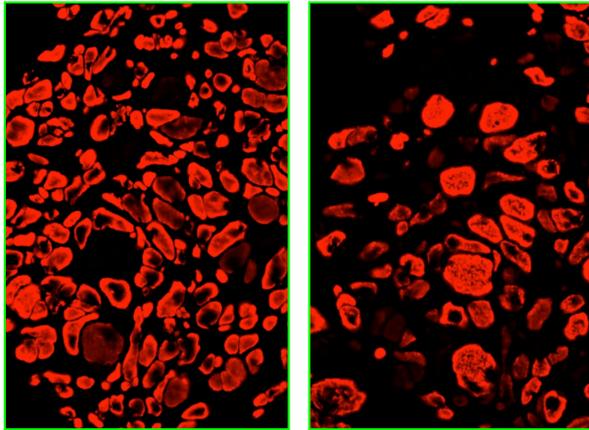


Figure 18. Plusieurs isoformes des chaînes lourdes de myosine peuvent être identifiées après injection intracardiaque de myoblastes autologues. Les cellules exprimant l'isoforme rapide sont majoritaires initialement (image de gauche) mais les isoformes lentes peuvent être exprimées soit seules soit en association (image de droite).

La recherche réalisée sur les petits animaux a été étendue aux gros animaux dans une perspective d'application clinique. Ainsi, nous avons développé une technique de culture en masse de cellules musculaires squelettiques de Mouton, ce qui nous a permis d'évaluer l'effet de la transplantation intramyocardique de ces cellules sur différents paramètres fonctionnels, puis de démontrer l'amélioration régionale durable de la contractilité en zone injectée. Chez ces gros animaux, des modifications du remodelage cicatriciel ont été observées après greffe cellulaire, et pourraient être à l'origine d'une partie du bénéfice fonctionnel, en modifiant les propriétés physiques du tissu cicatriciel (élasticité, souplesse, résistance à l'étirement...) (Figure 19). Ces modifications pourraient être importantes, puisqu'elles sont capables d'empêcher le remodelage post-infarctus menant à la régurgitation mitrale dans un modèle ovin (**RP41**). Les approches de transplantation ont été initialement réalisées par voie sous-épicaudique sous contrôle de la vue, puis à l'aide de cathéters sophistiqués, empruntant la voie nettement moins invasive du sinus coronaire veineux (**RP8**).

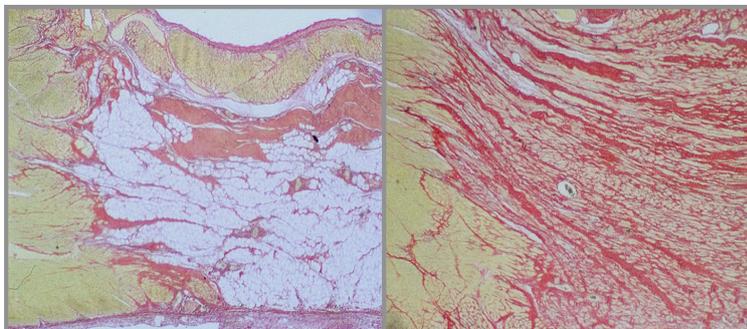


Figure 19. La greffe de myoblastes autologues en zone infarctée, chez le Mouton, entraîne une modification du remodelage. La zone d'infarctus subit une infiltration fibro-adipeuse sans traitement (à gauche), mais présente une structure plus organisée, cellularisée, et contient davantage de collagène et d'élastine lorsque des cellules ont été injectées (à droite). Coloration au Rouge Sirius, 2 mois après injection.

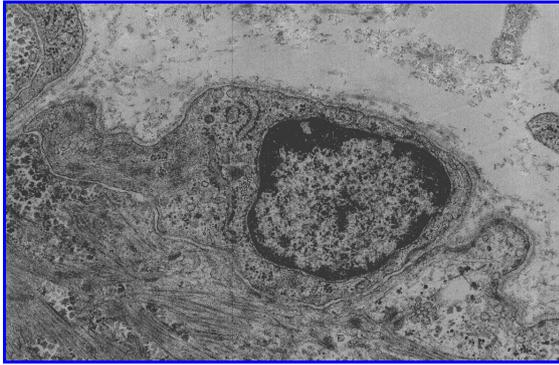


Figure 20. La pérennisation des cellules musculaires squelettiques peut être observée plusieurs mois après injection, puisque certaines cellules adoptent la position et les capacités des cellules satellites musculaires (**RP13**). Ici, une cellule satellite est accolée à une fibre musculaire néo-formée, 4 mois après injection dans un cœur de Mouton infarci.

Les mécanismes d'action amenant ces bénéfices fonctionnels sont encore relativement hypothétiques. En effet, nous avons d'abord démontré l'absence de couplage entre le tissu musculaire squelettique et le tissu musculaire cardiaque (**RP35**). La première hypothèse est celle d'une limitation du remodelage ventriculaire gauche, par contention de la paroi infarctée liée au volume de tissu formé, limitant la dilatation ventriculaire (**RP13 ; 52 ; 143**). Dans le cas particulier des myoblastes, la formation de tissu musculaire squelettique changerait localement les propriétés physiques de la cicatrice. Le second mécanisme fait intervenir une sécrétion de facteurs de croissance et de cytokines par les cellules greffées (**54 ; 61 ; 114**). La transplantation de cellules induirait donc des modifications locales se traduisant par une meilleure préservation ventriculaire gauche. L'efficacité de la transplantation peut être augmentée par l'addition de facteurs de croissance ou de détermination, tels que le HIF1alpha (**10**).

4.3. Transplantation de myoblastes dans un modèle de cardiomyopathie dilatée

Le hamster syrien (CHF147) fournit un modèle intéressant de dystrophie musculaire autosomique récessive associée à une cardiopathie, dont la pénétrance est de 100%. Ces animaux présentent une délétion génomique sur l'extrémité 5' du gène delta-sarcoglycan et constituent un modèle génétique pour une forme de dystrophie musculaire des ceintures (Limb Girdle Muscular Dystrophy, LGMD2F). Ce déficit est responsable de la perte d'intégrité du complexe protéique de la dystrophine et de ses protéines associées (sarcoglycanes alpha-, bêta- et gamma-). La dégénérescence myocardique est d'apparition progressive, entre les 60 et 120èmes jours. L'insuffisance cardiaque est habituellement la cause du décès, toujours précoce.

Des cultures primaires autologues ont été préparées et injectées sous contrôle visuel. La fonction cardiaque des animaux a été évaluée et quantifiée par échocardiographie. Les fonctions hémodynamiques les plus précises ont été obtenues par approche invasive (courbes pression-volumes). Un mois après les injections intramyocardiques, une amélioration significative de la fraction de raccourcissement des animaux traités par la greffe de myoblastes a été observée par rapport au groupe contrôle. Celle-ci s'accompagne d'une amélioration de la relaxation et de l'inotropisme des cœurs greffés, alors que la dilatation ventriculaire reste stable (**RP44**).

4.4. Comparaison de l'efficacité des myoblastes à d'autres types cellulaires.

D'autres types cellulaires pourraient constituer des candidats intéressants pour la greffe intramyocardique, de par leur facilité d'obtention, ou leurs qualités complémentaires. En particulier, les cellules médullaires et parmi elles les cellules souches hématopoïétiques ont

été proposées pour leur potentiel de néovascularisation *in vivo*. Des cellules médullaires humaines sélectionnées par l'expression de l'antigène AC133, ont été transplantées dans un modèle d'infarctus du myocarde de Rat immunodéficient. Une amélioration fonctionnelle discrète a été observée, mais en l'absence de développement de structures cellulaires humaines. Cette amélioration est restée inférieure à celle obtenue à l'aide de myoblastes (RP1).

4.5. Analyse de la mortalité cellulaire

Un des enjeux majeurs de la transplantation de myoblastes réside dans l'amélioration de la survie des cellules greffées. La survie des myoblastes greffés a été évaluée par un système de double marquage. Des myoblastes mâles exprimant la β -galactosidase (β -gal) ont été greffés dans des cœurs hôtes femelles afin de générer deux marqueurs directs : la protéine β -gal et le chromosome Y. L'expression de la protéine β -gal, introduite par transfert de gène grâce à un vecteur adénoviral, signe les processus précoces de mort cellulaire puisque le nombre final de copies est indépendant de la division cellulaire. Au contraire, le chromosome Y détermine le nombre total de noyaux dérivant du transplant initial. Par cette méthode, l'efficacité potentielle de stratégies pouvant améliorer la viabilité des cellules implantées a été également évaluée. Ainsi, la pertinence d'un traitement préalable par choc thermique, connu pour induire l'expression de diverses protéines chaperonnes dont celle des protéines de la famille des Heat Shock Protéines (HSP) impliquées dans des processus de protection cellulaires et tissulaires, a été envisagée. Globalement, la mort cellulaire faisant suite à l'implantation est importante (90%). La mortalité est réduite par l'induction des HSP, soit directement (choc thermique court) soit par la congélation et la décongélation (douces) des cellules. Nous avons observé une prolifération des cellules survivantes après injection, suivie de leur différenciation (RP36). Il faut noter qu'après injection, en particulier dans le cœur, une proportion variable de cellules est expulsée mécaniquement du tissu, ce qui peut biaiser les conclusions des analyses de survie (46).

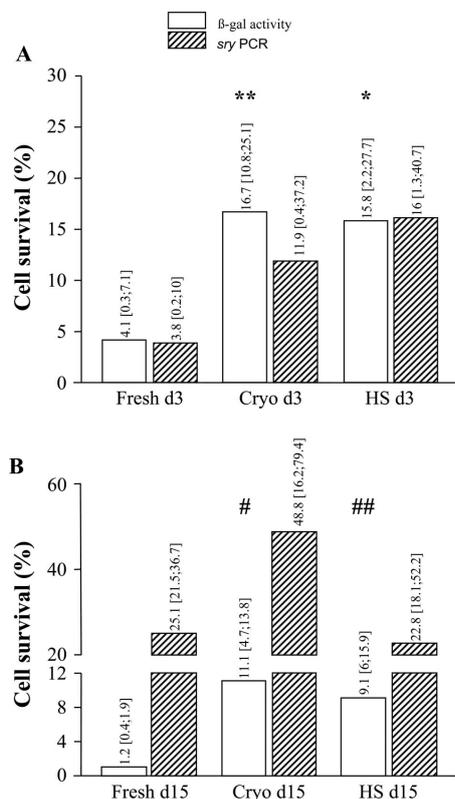


Figure 21. Disparition, survie, prolifération cellulaires.

Trois jours après injection des cellules (partie A), en l'absence de prétraitement, un grand nombre de cellules a disparu. Cependant, les chocs thermiques (chauffage, congélation) atténuent la disparition des cellules.

Deux semaines après injection (partie B), en l'absence de traitement le nombre de cellules initial a décru fortement (traduit par l'expression de la beta-galactosidase) mais le nombre de cellules résultantes a augmenté, signant une prolifération (traduite par l'augmentation du nombre de copies du chromosome Y). La mort cellulaire initiale a été moins importante après traitement thermique, mais la prolifération a été relativement plus réduite.

5. Essais cliniques.

5.1. Problématique du changement d'échelle et de la logistique

La mise en œuvre d'essais cliniques, en thérapie cellulaire, est une tâche complexe et repose sur la définition de deux catégories principales : d'une part les bases scientifiques et la conception de la partie clinique, d'autre part la production et le contrôle de qualité du produit de thérapie cellulaire. La transition qui s'opère à partir de premiers résultats expérimentaux jusqu'à la réalisation d'un essai chez l'Homme suit un schéma général: (1) définir une indication médicale très précise, soutenue par les besoins des patients et des cliniciens ; (2) établir ou confirmer la preuve de concept, la faisabilité, la sécurité dans des modèles animaux ; (3) définir les besoins quantitatifs et qualitatifs en termes de produit de thérapie cellulaire, rassembler les données biologiques et cliniques en agrément avec les agences réglementaires ; (4) soumettre les protocoles aux comités d'éthique ; (5) obtenir des soutiens financiers et définir les statuts des propriétés intellectuelles ultérieures ; (6) valider les centres opérationnels, démarrer l'essai et inclure les patients ; (7) assurer le suivi des patients, rassembler les résultats et assurer leur interprétation, proposer des conclusions, fermer l'essai, assurer la dissémination de l'information.

Il est recommandé de collaborer étroitement avec les agences réglementaires, qui ont une très grande expertise du fait de leur supervision d'un grand nombre d'essais. Le succès d'un essai dépend grandement des interactions entre les groupes et les spécialistes qui doivent travailler ensemble. Il est important de garantir de bons circuits de communication et de coordination entre les acteurs, et de savoir les motiver. Le rôle de l'investigateur principal, ou du chef de projet, est donc crucial sous bien des aspects.

J'ai rempli plusieurs rôles dans la mise en place d'essais cliniques de thérapie cellulaire. J'ai validé ou participé à la validation des preuves de concept dans différents modèles animaux (Rat, Souris, Mouton) des approches proposées. J'ai mis au point une procédure standardisée de production de cellules musculaires humaines, de haute pureté, de qualité clinique, comprenant les étapes de contrôle et validation du produit. J'ai rédigé les premiers cahiers des charges et d'assurance qualité, puis participé à leurs mises à jour au fil des essais. J'ai assuré la formation initiale des personnels en charge de la production routinière des cellules, en France et aux Etats-Unis. J'ai validé les conditions biologiques et les circuits logistiques afférant à la récolte des biopsies musculaires, à leur transfert au laboratoire de thérapie cellulaire, puis à l'expédition du produit fini vers le centre de greffe. J'ai participé aux discussions avec les agences réglementaires à différentes étapes. J'ai contribué à la diffusion scientifique internationale des résultats pré-cliniques et cliniques.

5.2. Conception, étapes de mise en place et résultats d'un essai clinique de phase I en vue du traitement de l'insuffisance cardiaque post-ischémique par transplantation de myoblastes autologues.

Quelle que soit l'espèce animale, le modèle d'infarcissement et la méthode d'analyse fonctionnelle, la transplantation de cellules musculaires squelettiques adultes autologues améliore la fonction du coeur défaillant. Ceci a amené notre groupe à proposer le développement d'un essai clinique de Phase I (Faisabilité, Sécurité), sous la promotion de l'Assistance Publique-Hôpitaux de Paris. La technique de production à grande échelle de cellules musculaires adultes autologues humaines, de qualité clinique, a été mise au point à l'Hôpital Saint Louis et validée par les autorités de régulation après examen des résultats des

études pré-cliniques. Après examen par le CCPPRB de l'Hôpital Cochin, l'essai clinique a été autorisé en Mai 2000.

L'essai clinique a débuté par l'inclusion du premier patient en Juin 2000. Dix patients au total ont été inclus dans cet essai, qui s'est terminé sur un bilan très positif. Il s'agissait là du premier essai mondial. Les patients présentaient une fraction d'éjection initiale inférieure à 35%, une zone ischémisée, akinétique et non viable ne pouvant bénéficier efficacement d'une revascularisation (pontage) réalisée en parallèle pour améliorer la condition perfusionnelle d'autres territoires myocardiques. En moyenne, 871 millions de cellules (86% de myoblastes) ont été produites dans un délai moyen de 16 jours et implantées en une trentaine de sites. Les patients n'ont pas développé de complications post-opératoires immédiates, en revanche 4 d'entre eux ont présenté des troubles du rythme (tachycardies ventriculaires soutenues) et ont reçu un défibrillateur automatique. Onze mois après l'intervention, le score clinique des patients s'était amélioré (passage du stade 2.7 au stade 1.6 selon la classification NYHA) et la fraction d'éjection était passée de 24% à 32%.

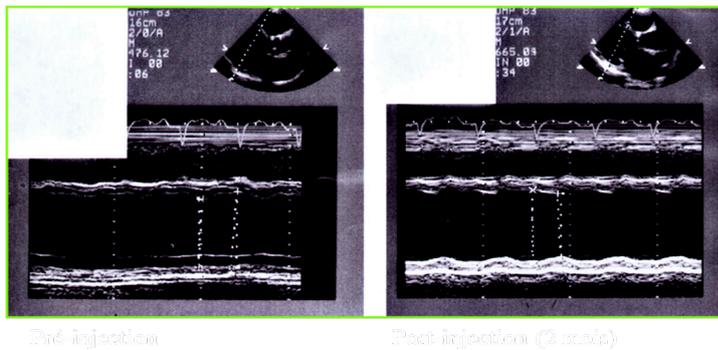


Figure 22. L'analyse échographique montrait une amélioration de la contractilité de 63% des segments injectés chez le premier patient (pré-opératoire à gauche, deux mois après intervention à droite).

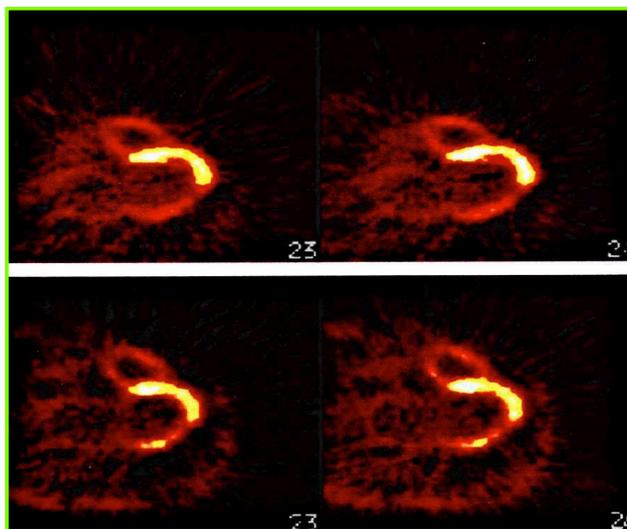


Figure 23. L'analyse PET-Scan révélait une amélioration locale de la viabilité cellulaire et de la perfusion (RP20 ; RP21 ; RP38-40).

Images du haut : avant greffe. Images du bas : deux mois après greffe. La coloration jaune est proportionnelle à l'intensité de la consommation de glucose et à la perfusion locale.

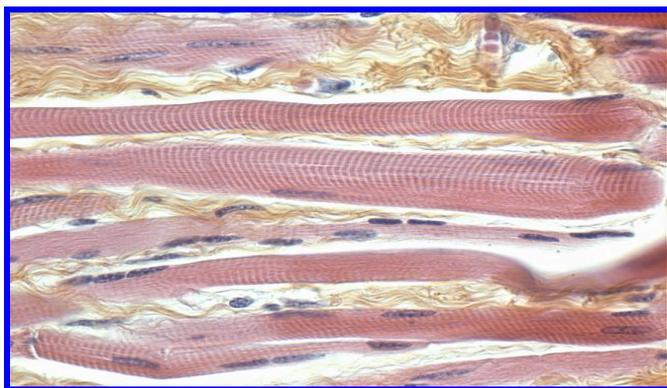


Figure 24. L'un des patients décédait 17,5 mois après l'intervention, et une biopsie cardiaque permettait de mettre en évidence des structures musculaires squelettiques, plurinucléées, peu nombreuses mais bien différenciées, au sein de la zone infarctée (RP19).

Ces résultats très encourageants ont justifié la mise en place d'un essai randomisé, multicentrique, en vue de confirmer ou d'infirmer une efficacité fonctionnelle et un bénéfice clinique.

5.3. Conception, mise en place et résultats de l'essai clinique de phase II en vue du traitement de l'insuffisance cardiaque post-ischémique par transplantation de myoblastes autologues « MAGIC » (Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiopathy »).

Globalement, les premières études ont permis de tirer des conclusions quand à la faisabilité et à la sécurité des procédures. Le point délicat concernant la sécurité réside dans le risque accru d'incidence des arythmies ventriculaires, notamment dans les temps précoces après injection. Ces événements pourraient être dus à la formation d'amas cellulaires isolés électriquement, réfractaires, par rapport aux cardiomyocytes avoisinants, responsables d'un ralentissement des vitesses de conduction et de la création de circuits de réentrée. Chez l'Homme, la situation est encore compliquée par le terrain arythmogène que représente l'insuffisance cardiaque, et la variabilité topographique des zones d'infarctus.

Nous avons donc mis en place en 2002 un essai multicentrique, randomisé, en double aveugle, contrôlé par placebo, incluant une escalade de doses. Il s'agit de l'essai MAGIC (Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy). Les 97 patients ont subi une biopsie musculaire, puis, trois semaines plus tard, l'injection de cellules (400 ou 800 millions) ou de placebo, au coeur et en bordure de la cicatrice d'infarctus. Les patients ont tous bénéficié de l'implantation d'un défibrillateur. Les critères d'évaluation primaires ont été la sécurité (survenue d'évènements cardiaques majeurs, arythmies ventriculaires durant les six premiers mois de suivi), et l'efficacité (modifications des fonctions ventriculaires gauches analysées par échocardiographie). Six mois après transplantation cellulaire, les données concernant la sécurité n'ont pas mis en évidence de différence significative entre les groupes. Cependant, le transfert de myoblastes n'a pas augmenté les fonctions globales ou régionales comparativement au placebo, et l'essai a été arrêté prématurément pour cette raison (il n'apparaissait pas possible de le poursuivre pour des raisons déontologiques). En revanche, la plus forte dose de cellules produit un renversement significatif du remodelage ventriculaire gauche, un effet observé lors de l'analyse des objectifs secondaires. Cet effet soutient l'hypothèse d'un mécanisme d'action paracrine de ces cellules au sein de la cicatrice fibreuse. Si cet effet bénéfique sur le remodelage et les volumes ventriculaires persiste, celui-ci pourrait se traduire par une amélioration du pronostic de la maladie. Le petit nombre de données actuellement disponibles empêche cependant de tirer des conclusions définitives. Les résultats de cet essai ont été publiés sous la supervision du Professeur Philippe Menasché en 2008 (RP37).

En conclusion, la faisabilité technique de la thérapie cellulaire cardiaque est aujourd'hui établie et, globalement, l'expérience clinique montre une bonne tolérance aux transferts intra myocardiques de cellules. L'efficacité, en revanche, paraît marginale ce qui est compréhensible compte tenu du caractère encore balbutiant de cette nouvelle approche thérapeutique. Ces essais cliniques initiaux ont permis de mieux identifier les problèmes majeurs à résoudre : type cellulaire, source tissulaire, optimisation des rendements de production et définition de dose optimale, amélioration des techniques de transfert cellulaire, développement parallèle de l'imagerie des cellules greffées, et amélioration de leur survie. Un lien permanent entre laboratoire et hôpital permettra à la thérapie cellulaire de progresser et c'est cette approche qu'il faut encourager. Ces échanges sont d'autant plus évidents, et facilités, que les qualités personnelles des relations entre les acteurs sont bonnes. Cela a été le cas dans cette première expérience, scientifique et humaine, liée à la biothérapie.

5.4. Conception et mise en place d'un essai clinique de phase I en vue du traitement de la dystrophie musculaire facio-scapulo-humérale par transplantation de myoblastes autologues.

5.4.1. Situation clinique de l'utilisation des myoblastes dans les maladies neuromusculaires.

L'injection intramusculaire de myoblastes de culture est un traitement expérimental, qui a été considéré dans le cas de myopathies généralisées telles que la Dystrophie musculaire de Duchenne (DMD). Ayant épuisé leurs capacités régénératives, les myoblastes autologues des patients ne peuvent être utilisés, et les approches de transplantation de myoblastes ont été considérées dans un contexte hétérologue. Le transfert de cellules d'un donneur non atteint permet la suppléance par des génômes non morbides (rétablissement de l'expression de dystrophine normale) et apporte un potentiel régénératif musculaire frais. Chez le petit animal, la transplantation de myoblastes permet un certain degré de régénération musculaire ainsi que la restauration d'expression de protéines dans des modèles déficients (75 ; 111 ; RP64 ; RP74). Les essais cliniques réalisés précédemment par 7 équipes dans le cadre des dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker ont présenté des succès très mitigés (revues en 145 ; RP75). Au total, 76 patients atteints de dystrophie musculaire de Duchenne et 6 atteints de dystrophie musculaire de Becker ont reçu des myoblastes squelettiques issus de donneurs. Pour leur grande majorité, ces essais ont donc été menés de manière hétérologue, et la compatibilité immunologique totale n'a été rencontrée qu'à une seule occasion (74 ; 150). Plusieurs paramètres pourraient expliquer les mauvais résultats observés. Les protocoles ont employé des traitements immunosuppresseurs différents (cyclophosphamide, glucocorticoïdes, ciclosporine). Des quantités variables de cellules ont été produites et injectées. Différents protocoles d'injection ont été utilisés: injections simples ou multiples, uniques ou répétées, dans différents territoires musculaires (biceps, extenseurs carpiens, tibiaux antérieurs, vastes internes et externes, muscles inter-costaux). Aucun effet secondaire n'a été rapporté en termes d'infection ou de carcinogenèse. Des études de transplantations de cellules musculaires squelettiques hétérologues transduites *ex vivo* (transgène de la bêta-galactosidase) ont été réalisées chez le primate non humain immunosupprimé et ont permis par la suite d'identifier les obstacles précédemment rencontrés, et de proposer des solutions en vue d'améliorer les résultats de transplantation (133-135). Ces études ont permis la réalisation d'un nouvel essai clinique de phase I. La combinaison de trois paramètres (immunosuppression ; grand nombre de cellules ; sites rapprochés) permet de s'affranchir d'une certaine façon des problèmes majeurs rencontrés jusqu'ici dans la greffe de myoblastes (rejet immunologique ; mort cellulaire importante ; migration des cellules très faible). A

l'issue de ces transplantations, des résultats très encourageants ont été rapportés. En effet, au site d'injection, de 7 à 26% des fibres musculaires expriment la dystrophine du donneur (caractérisée au plan moléculaire et antigénique) et les protéines associées (130 ; 132).

Si son efficacité systémique n'est donc pas établie, en revanche la transplantation de myoblastes entraîne régulièrement la formation de tissu musculaire squelettique au site d'injection. Pour cette raison, cette approche présente un intérêt potentiel pour la réparation tissulaire localisée. C'est cet intérêt qui a été mis à profit lors du développement des approches de thérapie cellulaire de l'insuffisance cardiaque post-ischémique (voir ci-dessus), mais également dans le contexte du traitement palliatif de certaines pathologies musculaires localisées. Dans ce dernier cas, les myoblastes sont prélevés dans des muscles non affectés cliniquement par la maladie, cultivés, puis transférés dans le muscle cliniquement atteint afin d'en améliorer les capacités régénératives.

Dans un contexte de greffe autologue, deux problèmes sont écartés (ou minimisés) d'emblée. Sauf potentielle sensibilisation à la présence d'antigènes exogènes liés aux conditions de culture (qui reste à démontrer), le receveur, qui est aussi le donneur, ne développe et ne subit pas de rejet immunologique contre les cellules greffées. Sauf possible contamination par un produit exogène en cours de préparation du produit de thérapie cellulaire, le problème de la sécurité virale (contamination croisée donneur-receveur) ne se pose pas.

5.4.2. Mise en place de l'essai clinique.

Les résultats des études des capacités prolifératives et régénératives, rapportés au chapitre A1 (RP68) et menés dans le cadre d'un essai de faisabilité d'une approche de thérapie cellulaire de la DMFSH, nous ont semblé suffisamment encourageants pour envisager le passage direct à un essai clinique visant cette fois-ci à réimplanter chez le patient lui-même ses propres cellules, après amplification, afin d'augmenter le potentiel régénératif musculaire localement. L'objectif principal de l'essai clinique est d'en tester la faisabilité et la tolérance clinique et biologique. En objectifs secondaires sont analysés : 1) l'effet sur la trophicité locale par l'évaluation du ratio signal graisseux/signal musculaire sur IRM en séquence T1 ; (2) l'effet sur la fonction par l'évaluation quantifiée de la force et de la fatigue musculaire ; (3) les possibilités d'évaluation fonctionnelle métabolique des tissus néoformés *in situ* par ¹⁸FDG-PET Scan.

Après avis et autorisation du CCPPRB local (Faculté de Nice), les dossiers clinique et de préparation des cellules, que j'ai actualisés en y incorporant notamment les données pré-cliniques *in vitro* et *in vivo*, et les exigences logistiques liées aux transferts des biopsies musculaires et des cellules entre Paris et Nice, ont été déposés à l'AFSSAPS pour avis et autorisation. Un avis favorable, sans demande de révision, a été obtenu le 5 Octobre 2005.

Trois groupes de 3 patients ont été inclus depuis cette date et un quatrième groupe est en cours de finalisation. Cependant, à présent que ce travail est passé dans une phase de réalisation clinique, et contrairement à ce qui s'était passé lors de la réalisation des essais cliniques entrepris dans le cadre de l'insuffisance cardiaque, les praticiens ne m'ont pas associé au suivi de cet essai après l'inclusion du premier patient (Automne 2006).

5.5. Essai clinique de phase I en vue du traitement de la dystrophie musculaire oculo-pharyngée par transplantation de myoblastes autologues.

Pour mémoire, indiquons également que la méthodologie et la plate-forme de production de myoblastes humains de grade clinique sont également utilisées pour la réalisation d'un essai clinique de greffe de myoblastes autologues chez des patients atteints de dystrophie musculaire oculo-pharyngée (DMOP), selon une démarche semblable à celle développée pour la DMFSH.

La DMOP est une maladie rare à début tardif, caractérisée par une distribution localisée typique. Les patients présentent une chute des paupières (ptose du muscle levator palpebrae), puis une dysphagie et des difficultés de déglutition liées à la fibrose progressive du muscle crico-pharyngé. Cette maladie autosomale est associée à l'expansion de triplets (GCG) dans le gène PABP (chromosome 4q11) entraînant l'accumulation intranucléaires d'oligomères et de filaments caractéristiques. La dysphagie compromet l'espérance de vie et une myotomie est pratiquée couramment, bien que de bénéfice transitoire (1 ; 20). Un groupe a proposé de réaliser le transfert de myoblastes prélevés en des territoires non affectés cliniquement (muscles vaste externe ou sterno-cléido-mastoïdien), puis cultivés, vers le muscle cricopharyngien affecté afin d'en améliorer la compliance ou la contractilité (106). Après validation des capacités prolifératives (*in vitro*) et myogéniques (*in vivo*) des cellules issues des territoires non atteints cliniquement, un essai de phase I visant à évaluer la faisabilité, la tolérance et la sécurité de l'approche a été lancé. La plate-forme de production des myoblastes humains, et les cahiers de charges de production et contrôle qualité, ont servi à réaliser les produits de thérapie cellulaire.

6. Création d'une start-up et structure de valorisation

Au début des années 2000, le caractère pionnier des greffes de myoblastes, en particulier dans l'indication de l'insuffisance cardiaque post-ischémique, correspondait à une demande médicale et sociale forte, et ouvrait des perspectives de développement considérables. Il fallait envisager, en effet, de valider les premiers résultats par des essais cliniques d'envergure, et de mettre au point des méthodologies de production de cellules humaines à plus large échelle. Dans le même temps, la mise à disposition d'une plateforme de production de cellules musculaires humaines permettait d'entrevoir de nouveaux développements concernant l'étude de la biologie de ces cellules, et la mise au point d'essais cliniques concernant des pathologies musculaires, ou des pathologies nécessitant une réparation musculaire localisée (citons par exemple les incontinences sphinctériennes masculines et féminines).

Pour leur mise en place, ces structures nécessitaient des soutiens, que l'Etat et les Institutions de Santé n'avaient pas forcément vocation à nous fournir. Adossés à la propriété intellectuelle représentée par le brevet méthodologique dont j'étais l'auteur (RP78 ; RP79) et dont une licence pouvait être concédée par les Institutions, nous avons fondé une « jeune pousse » (start-up) de biotechnologie destinée à la valorisation des recherches sur la culture et la transplantation des cellules musculaires humaines, appelée « Myosix ».

A défaut de soutiens financiers nationaux suffisants, la société s'est placée sous le contrôle de la société de biotechnologie Genzyme SA, cinquième compagnie mondiale dans ce domaine, et qui a pris en charge les frais de mise en œuvre de l'essai MAGIC.

Ancien co-fondateur, j'ai exercé une fonction de consultance scientifique durant la période nécessaire aux transferts de technologie. Cette activité a été arrêtée à l'arrêt de l'essai clinique MAGIC (début 2006). La société a employé deux personnes à temps plein, et s'est tournée vers la prestation de services (production à façon de cellules musculaires squelettiques pour des équipes publiques ou privées), en plus de réaliser une modeste activité de recherche et développement en thérapie cellulaire. Cependant, à l'occasion de la prise de contrôle de la société Genzyme par la Société Sanofi, il a été mis un terme aux activités de Myosix.

D- Projet de Recherche

1. Introduction.

Le développement d'approches de thérapie cellulaire est complexe, mais se met en place au niveau mondial. Les potentiels des marchés économiques sont importants, tant concernant les maladies rares que fréquentes, et les besoins médicaux sont insatisfaits. L'essor de ces approches est relativement récent, si l'on considère séparément les greffes de cellules hématopoïétiques qui sont d'utilisation clinique fréquente. Sur le plan médical, la thérapie cellulaire est encore à ses balbutiements, et participera probablement aux approches de médecine régénérative, dans des approches de réparations tissulaires, en association avec des substrats, des matrices, des outils d'ingénierie tissulaire. Mais ce domaine a beaucoup progressé en moins de 20 ans. La thérapie cellulaire, en combinaison éventuelle avec des méthodologies de thérapie génique ou d'interventions sur les expressions géniques, a pris son envol et les problèmes biologiques qui sont posés ne sont plus ignorés.

La thérapie cellulaire fait partie des stratégies étudiées pour le traitement de pathologies musculaires squelettiques et/ou cardiaques, telles que l'insuffisance cardiaque ou certaines myopathies. Dans ces deux domaines, les résultats précliniques encourageants ont justifié la mise en place d'essais cliniques, qui ont produit des résultats mitigés, et ont souligné les limitations des candidats cellulaires étudiés. En lien avec ces pathologies, l'exploration de la biologie des myoblastes et la définition de conditions de production et d'utilisation ont permis la mise en œuvre de ces essais cliniques (Figure 25 ci-dessous).

La recherche, l'identification, l'évaluation de nouvelles catégories de cellules progénitrices sont donc tout à fait justifiées. Des instruments doivent être développés pour permettre l'identification, le tri, l'expansion, le contrôle, l'administration, la migration, la survie, le suivi et l'intégration des cellules d'intérêt, dans des indications qui auront été bien précisées par les médecins. Des concepts doivent encore être proposés concernant l'origine, le rôle, les interactions entre des cellules progénitrices elles-mêmes et avec leur environnement.

Le projet de recherche qui suit reprend donc un certain nombre de thématiques (les approches de thérapie cellulaire, avec des perspectives cliniques), et tente de développer de nouveaux axes (l'identification des propriétés biologiques d'un nouveau type de progéniteur, l'utilisation des cellules ES, l'élargissement des possibilités d'ingénierie tissulaire). Naturellement, d'autres solutions seront possibles, au gré des évolutions conceptuelles, techniques, des rencontres entre chercheurs et des collaborations.

Biologie musculaire et approches thérapeutiques

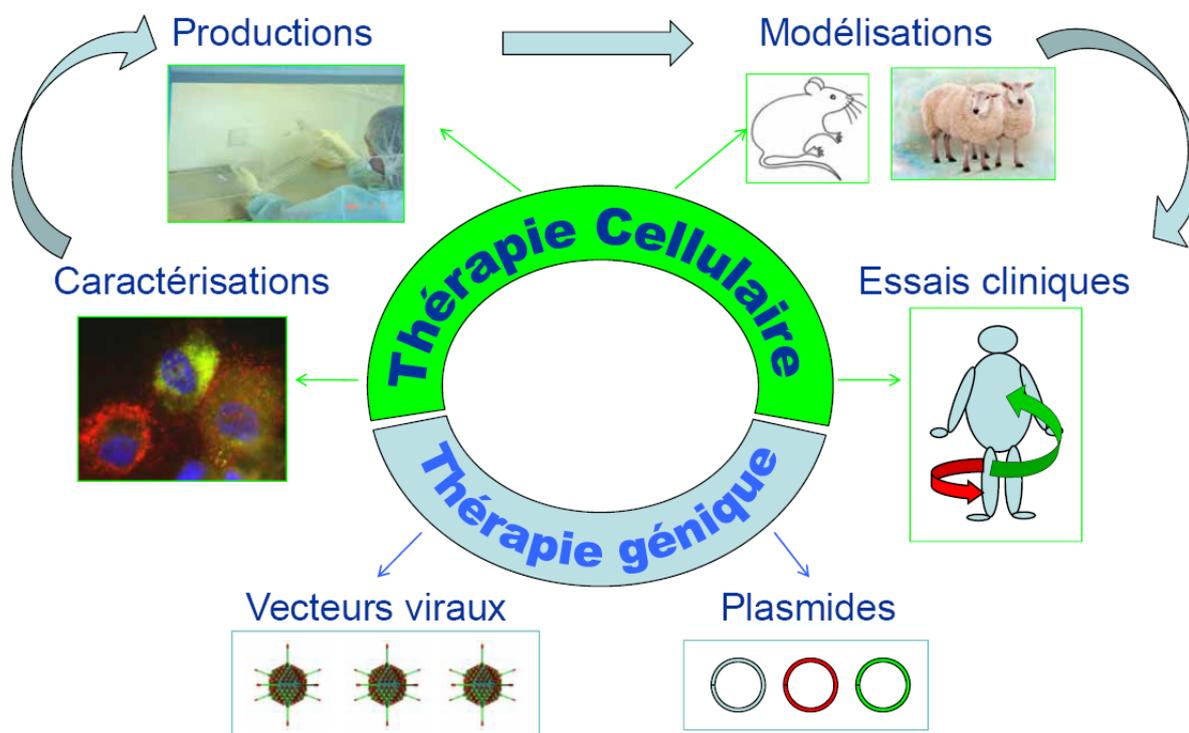


Figure 25. Une description très schématique des thèmes et approches allant de la découverte de progéniteurs d'intérêt vers une utilisation dans des protocoles cliniques potentiels...

2. Caractérisations *in vitro* de cellules d'origine musculaire

Si la biologie et le rôle des cellules satellites sont de mieux en mieux connus, le tissu musculaire contient également, nous l'avons vu, de nombreux types cellulaires encore mal connus, qui jouent cependant probablement un rôle dans l'homéostasie musculaire. Dans les années à venir, sur la base des premières identifications réalisées, nous nous attacherons à caractériser les principaux types cellulaires qui se trouvent, de manière native, dans l'endomysium musculaire. La recherche concernant les cellules ALDH⁺ est la plus avancée (voir ci-dessous), mais nous explorerons aussi les caractéristiques et les capacités fonctionnelles, *in vitro* et *in vivo*, des populations musculaires exprimant en particulier CD15, CD29, CD31, CD34, CD44, CD56, CD90, CD105 ou CD146, ou d'autres antigènes à définir.

Notre recherche de nouveaux progéniteurs musculaires a plus particulièrement introduit un nouveau venu, la cellule SMALD/34⁻, dans le champ de la régénération musculaire. Celle-ci pourrait jouer un rôle dans la régénération spontanée ou induite, et pourrait peut-être servir de marqueur dans le contexte d'études physiopathologiques. Néanmoins, l'économie cellulaire permet de supposer que d'autres rôles, non encore connus, sont dévolus aux cellules de type SMALD/34⁺. Les autres capacités de différenciation de ces cellules SMALD restent à explorer, et les liens entretenus avec les cellules SMALD d'autres origines dans l'organisme, notamment les cellules circulantes, restent à établir.

Nous devons étendre, développer, comparer les caractérisations (phénotypiques, fonctionnelles) des cellules ALDH⁺ extraites des tissus musculaires (squelettique, cardiaque)

et non musculaires (moelle, sang circulant, sang de cordon) à partir de différentes espèces (schématisé en Figure 26).

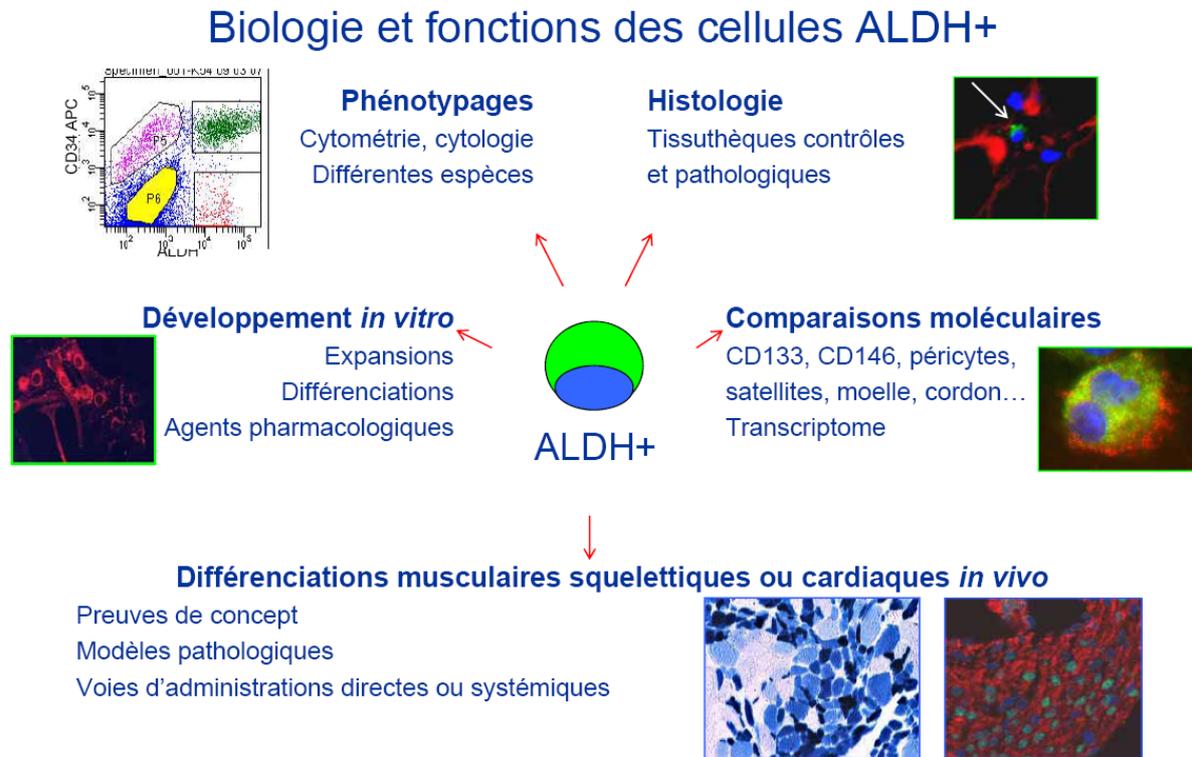


Figure 26 : une représentation schématique des thématiques que nous souhaiterions développer autour des cellules ALDH+ dans les années à venir.

Depuis la publication de notre article princeps, nous avons mis en évidence les cellules ALDH+ au sein du tissu musculaire squelettique de Souris, de Chien, de Singe, ce qui ouvre la porte à l'étude de certains modèles pathologiques, à des essais pré-cliniques (gros modèles animaux), à des études sur une plus large échelle de la biologie de cellules originaires de Primates. De même, des cellules ALDH+ ont été mises en évidence au sein du tissu musculaire cardiaque chez la Souris, le Chien et le Singe, soulignant la diversité biologique et les perspectives thérapeutiques de telles populations (voir ci-dessous). L'utilisation de différentes espèces animales pourrait permettre d'unifier les caractéristiques de ces cellules, et de proposer un rôle dans les différents tissus. L'utilisation de différentes espèces donnera accès ultérieurement à des modèles de pathologies génétiques ou acquises telles que l'insuffisance cardiaque post-ischémique (modèle de ligature coronaire chez le Rat ou la Souris), une cardiomyopathie dilatée (modèle murin KI Lmna), la dystrophie musculaire de Duchenne (chien GRMD, souris mdx).

Le programme est divisé en trois parties chevauchantes correspondant aux objectifs scientifiques. Les expérimentations de caractérisations (*in vitro*) seront menées en parallèle aux premières expérimentations d'implantation *in vivo*.

La première partie correspond à la caractérisation des cellules extraites des tissus musculaires. Nous utiliserons une technique classique mise au point lors de développements cliniques antérieurs. Les cellules seront incubées en présence du substrat de l'ALDH, puis des anticorps marqueurs des antigènes extracellulaires, et analysées par cytométrie de flux. La

caractérisation sera d'abord focalisée sur les cellules humaines, et étendue aux autres espèces animales. Nous rechercherons en particulier: CD9, CD10, CD11, CD13, CD14, CD15, CD29, CD31, CD34, CD38, CD44, CD45, CD47, CD49a,b,c,d,e,f, CD56, CD58, CD61, CD62, CD73, CD81, CD90, CD105, CD106, CD117, CD133, CD138, CD104b, CD144, CD146, CD166, CD184, CD200, CD271, CD273, HLA ClassI, M Cadherin, NG2, VWF.

In situ, nous préciserons la localisation anatomique des cellules originelles par immunohistochimie (endomysium, champs cardiaques...). L'expression de l'ALDH sera mise en évidence par un anticorps monoclonal déjà utilisé précédemment (BD). Les structures musculaires seront identifiées à l'aide d'anticorps polyclonaux dirigés contre les protéines des matrices extracellulaires, et à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques de lignées ou de types cellulaires (cellules satellites, péricytes, cellules endothéliales, myofibroblastes, cellules mésenchymateuses...).

La signature moléculaire sera établie à l'aide de puces dédiées (méthodologie Affymetrix) et confirmée par Q-PCR, à partir de cellules triées par cytométrie de flux. Les ARNs seront extraits et transcrits (environ 30 000 cellules sont requises pour chaque point). Les puces Affymetrix ont été choisies en raison de l'expérience acquise, ainsi que des données antérieures traitées par des membres de notre équipe concernant des analyses de populations de cellules musculaires. En parallèle, nous rechercherons plus spécifiquement et plus classiquement l'expression de gènes exprimés dans des lignages définis : cellules souches, cellules musculaires squelettiques ou cardiaques, cellules angiogéniques, cellules mésenchymateuses, cellules neurales, cellules hématopoïétiques.

La seconde partie correspond à l'évaluation des capacités de différenciation *in vitro*. Après phénotypage des cellules, en fonction des résultats obtenus (sélection d'une ou plusieurs sous-populations, le cas échéant, selon l'espèce animale considérée), les cellules seront triées par cytométrie et placées dans des milieux de différenciation (voir ci-dessous) utilisés au laboratoire (myogénèse, ostéogénèse, chondrogénèse, adipogénèse, cardiogénèse) ou décrits dans la littérature. La différenciation sera évaluée par observation morphologique (formation de myotubes, d'adipocytes, de cellules battantes...) ou par marquages immunocytologiques (directs ou sur lames de Cytospin).

La différenciation myogénique sera induite dans du milieu DMEM supplémenté par du sérum de Cheval. Nous observerons la formation de myotubes, qui expriment l'isoforme rapide de la chaîne lourde de la myosine, la desmine, la dystrophine, l'actine squelettique, l'actinine sarcomérique.

La différenciation adipogénique sera induite dans du milieu alpha-MEM supplémenté par du sérum de veau fœtal, de l'IBMX, de l'indométhacine, de l'insuline, de la dexaméthasone. Les cellules seront observées après 3 à 4 semaines, les éventuelles inclusions lipidiques pouvant être colorées au « Red Oil ».

La différenciation ostéogénique sera induite dans du milieu alpha-MEM supplémenté en sérum de veau fœtal, acide ascorbique, dexaméthasone, phosphate de sodium. L'ostéogénèse peut être mise en évidence par le test au rouge d'alizarine (minéralisation tardive) ou le marquage des phosphatase alcalines (temps précoces).

La différenciation cardiaque sera induite en milieu IMDM supplémenté en sérum de veau fœtal, 2-mercaptoéthanol, insuline, transferrine, IL3, IL6, SCF, ou en milieu BHK21 supplémenté en sérum de veau fœtal, BMP2, LIF, IGF1, bFGF, ou en milieu DMEM/F12 supplémenté en sérum de veau fœtal, insuline, transferrine, sélénite de sodium, cardiotrophine-1, BMP4. Des cellules géométriques, carrées, larges, peuvent être observées, et l'on peut rechercher des activités de battements spontanées. Les cellules différenciées expriment

l'actinine sarcomérique, la connexine 43, l'actine cardiaque alpha, la forme lente de la chaîne lourde de la myosine.

La différenciation hématopoïétique pourra être obtenue en milieu semi-solide contenant de la méthylcellulose, supplémenté en SCF, G-CSF, GM-CSF, IL3, IL6. Les cellules se différencient en formant des colonies de formes caractéristiques et peuvent être analysées par cytométrie de flux après extraction de la méthylcellulose.

Le devenir des cellules sélectionnées, l'évolution de leurs phénotypes, peuvent être étudiés en cultures à long-terme *in vitro*, en utilisant des conditions prolifératives. Les phénotypes seront étudiés à différents moments de la culture (cinétiques).

La prolifération myogénique est obtenue dans du milieu MCDB120 modifié supplémenté en sérum de veau fœtal, bFGF et dexaméthasone.

La prolifération de cellules ressemblant aux cellules mésenchymateuses est observée en milieu MEM alpha supplémenté en sérum de veau fœtal et bFGF.

La prolifération des cellules présentant des capacités angiogéniques peut être obtenue en milieu EGM2 supplémenté par sérum de veau fœtal, hydrocortisone, bFGF, VEGF, IGF1, acide ascorbique, EGF et héparine.

La prolifération des cellules cardiomyogéniques, quand elle a lieu, peut être obtenue en utilisant les milieux décrits pour la différenciation.

La troisième partie correspond à l'évaluation des capacités d'intégration *in vivo* des cellules ALDH⁺ et est plus spécifiquement présentée ci-dessous aux paragraphes dédiés aux expérimentations *in vivo*.

3. Approches *in vivo* de thérapie cellulaire à visée musculaire

Ces études *in vivo* comportent des points communs et des particularités, selon que l'on s'adresse aux muscles squelettique ou cardiaques.

Les populations cellulaires seront extraites par dissociation enzymatique de biopsies obtenues de différentes espèces animales, puis triées par cytométrie de flux sur la base de l'expression de l'ALDH. A partir de souris ROSA, les cellules extraites expriment constitutivement la beta-galactosidase, qui permet ensuite de localiser précisément les cellules à l'endroit de leur injection. Les cellules humaines, de Chien et de Singe elles, expriment certains antigènes qui ne sont pas exprimés par les tissus des souris dans lesquelles nous projetons de les injecter (protéines COX, Lamine, CD56, spectrine, dystrophine...), et peuvent donc être identifiées assez aisément sans que l'on soit obligé de marquer ces cellules par des transgènes.

Les cellules cardiaques et squelettiques de souris ROSA26 exprimant la beta-galactosidase seront implantées dans le cœur et les muscles squelettiques de souris SCID, ou de souris modèles de dystrophies musculaires (mdx) ou de cardiomyopathie (KI LMNA^{-/-}) immunosupprimées (FK506), puis suivies par examen immunohistochimique. Les cellules de primates (humains, non-humains) ou canines seront implantées en souris SCID, et leur implantation sera suivie à l'aide d'anticorps caractéristiques d'espèce. Dans les modèles de cardiopathies, le bénéfice fonctionnel éventuel sera recherché par échocardiographie. Les capacités de migration des cellules ALDH⁺ seront évaluées dans des modèles murins, en comparant les rendements de régénération obtenus par implantation intramusculaire directe et injection systémique.

Les injections intramusculaires seront réalisées après une petite incision cutanée. Les cellules seront injectées dans le muscle tibial antérieur sous un volume de 10 microlitres, puis la peau sera suturée. Les injections systémiques seront réalisées par voie intracardiaque, par abord transcutané. Cette voie évite la circulation veineuse et le premier passage hépatique et pulmonaire. Les injections intramyocardiques seront réalisées sous contrôle de la vue, après une petite thoracotomie gauche, sous ventilation assistée. Les cellules peuvent être distribuées en 4 sites sous un volume de 10 microlitres.

Deux tableaux sont donc proposés ci-dessous qui prennent en compte les objectifs, les étapes et les contraintes complémentaires de ces expérimentations.

(a): preuve de concept: cardiogénèse ou myogénèse *in vivo*:

Source de cellules	Dans: SCID SkM	Dans: SCID Coeur	Dans: SCID Systémique	Dans: Wt SkM	Dans: Wt Coeur	Dans: Wt Systémique
ROSA de SkM	X	X	X	X + FK	X + FK	X + FK
ROSA de Coeur		X			X + FK	
Primate de SkM	X	X				
Primate de Coeur		X				
Chien de SkM	X	X				
Chien de Coeur		X				

SkM: muscle squelettique. ROSA: souris ROSA. Wt: Wild type (sauvage). SCID: souris immunodéficiente. FK: Tacrolimus, FK 506 (2.5mg/kg/jour).

(b): preuve de concept dans les modèles pathologiques :

Source de cellules	Dans: Mdx SkM	Dans: Mdx Coeur	Dans: Mdx Systémique	Dans: LMNA Coeur
ROSA de SkM	X + FK	X + FK	X + FK	X + FK
ROSA de Coeur		X + FK		X + FK
Wt de SkM	X	X	X	
Wt de Coeur		X		

SkM: muscle squelettique. Wt: Wild type (sauvage). SCID: souris immunodéficiente. Mdx: souris dystrophique (absence de dystrophine, modèle de la dystrophie musculaire de Duchenne). FK: Tacrolimus, FK 506 (2.5mg/kg/jour).

Les modèles animaux sont disponibles commercialement (Souris ROSA 26, Souris mdx, Souris SCID), ou élevées à l'animalerie du site Pitié-Salpêtrière (CEF ; Souris sauvages et LMNA).

Les biopsies musculaires de Chien sont obtenues au titre de déchets opératoires, au moment du sacrifice de ces animaux à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort (ces animaux ne sont pas réservés à cet usage, nous nous contentons par cette voie d'utiliser au mieux tout le matériel biologique accessible).

Les biopsies musculaires humaines sont des déchets opératoires collectés par la banque dirigée par l'Institut de Myologie, sur le site de la Pitié-Salpêtrière (MYOBANK), après

obtention du consentement des patients opérés pour des causes orthopédiques ou cardiologiques.

Les analyses de cellules sont réalisées par cytométrie de flux au laboratoire de Thérapie cellulaire de l'Hôpital Saint Louis, dirigé par le Professeur Jérôme Larghéro, qui nous donne libre accès, à l'issue de plus de 10 années de collaborations fructueuses, ou sur les plateformes de cytométrie de l'UPMC (Pitié-Salpêtrière, Groupe Saint Antoine).

L'une des limitations à l'utilisation des progéniteurs classiques, les myoblastes, est leur très faible capacité de migration intra-tissulaire, et leur incapacité à sortir du compartiment sanguin après injection par voie systémique. Nous évaluerons donc l'efficacité des cellules ALDH+ concernant le repeuplement musculaire après injection par voie systémique (injection intraventriculaire) dans des modèles murins. Si cette voie s'avère efficace, les injections seront réalisées dans le modèle murin de dystrophie musculaire (souris mdx). Par la suite, différentes approches peuvent être réalisées, en collaboration avec les laboratoires compétents, notamment sur le site de l'UPMC, afin d'évaluer le bénéfice fonctionnel de ces transplantations à l'échelle de l'animal entier (étude de membre entier, de muscle isolé, performances motrices et physiologiques, dosages enzymatiques...).

Comprendre et améliorer les transplantations

1) Décrire l'implantation

- Suivi à court terme
- Localisation et phénotype à long terme

2) Quantifier les rendements

- Mesure de la mort cellulaire
- Evaluation de la fusion
- Impact du nombre de cellules

3) Comparer les types cellulaires

- Péricytes, CD133+, cordon, satellites, myoblastes
- Nouvelles sous-populations
- Impact des amplifications in vitro

4) Améliorer les rendements

- Adjonction de facteurs de croissance
- Co-injection de différents types cellulaires
- Adjonction de matrices

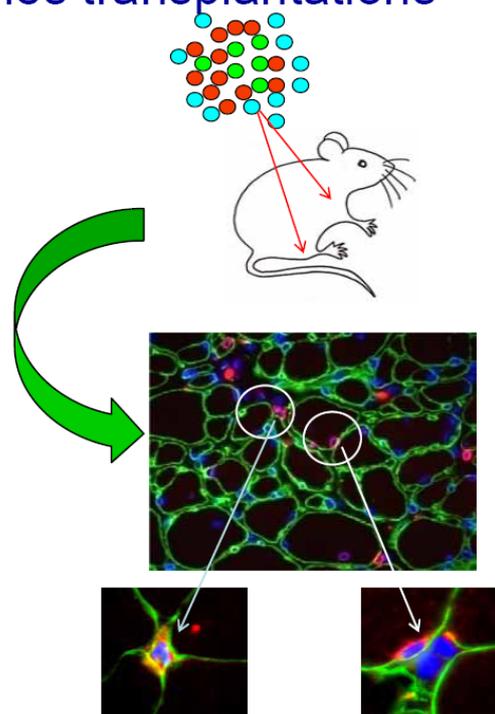


Figure 27. Les rendements et qualités des implantations doivent être comparés à ceux obtenus à l'aide de progéniteurs « classiques » (myoblastes) ou en cours de développement (cellules CD133, péricytes...). Ces études pourront être développées en utilisant les méthodologies utilisées précédemment, puis étendues par l'utilisation de nouveaux facteurs ou de nouveaux agents issus de l'ingénierie tissulaire.

4. Approches *in vivo* de thérapie cellulaire cardiaque.

La thérapie cellulaire à visée cardiaque représente un domaine particulier, ainsi que nous l'avons développé plus haut. Nous continuerons d'utiliser des outils que nous avons mis en

œuvre lors de programmes précédents. Nous étendrons donc nos études sur les cellules souches embryonnaires murines, les cellules dérivées des muscles squelettiques ou cardiaques que nous avons identifiées, ou dont nous connaissons à présent quelques marqueurs (schématisé en Figure 28).

Etendre la thérapie cellulaire cardiaque

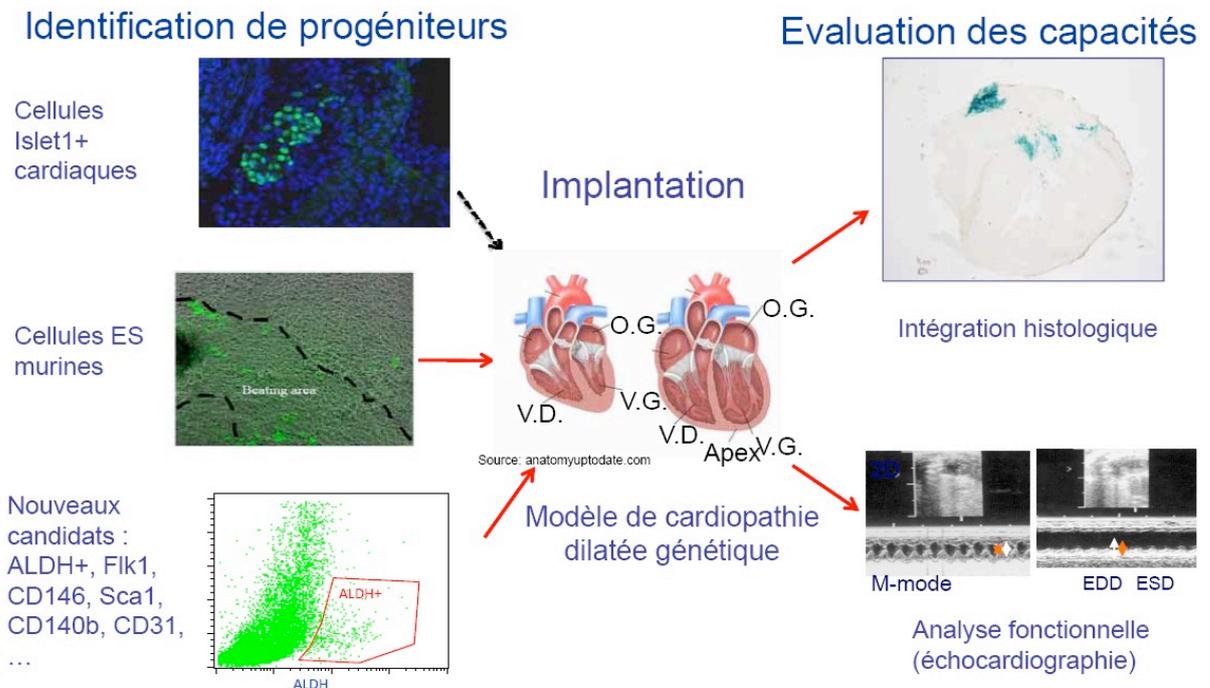


Figure 28. Un schéma des stratégies globales développées pour l'étude de la réparation tissulaire cardiaque au moyen des outils cellulaires en cours d'élaboration.

4.1. Cellules souches embryonnaires murines.

Ainsi que précisé précédemment, de nombreux types cellulaires peuvent être utilisés dans le but d'améliorer la fonction cardiaque dans des modèles défailants. Cependant, les contingences biologiques et le réalisme clinique limitent les possibilités effectives, et seules les cellules souches embryonnaires, après induction de différenciation, sont actuellement capables de fournir des cardiomyocytes fonctionnels et en quantité suffisante, capables d'assurer une véritable intégration tissulaire et une importante amélioration fonctionnelle, au moins dans des modèles d'insuffisance cardiaque post-ischémique. Nous avons donc développé une approche thérapeutique basée sur le modèle de souris LMNA H222P KI mis au point au sein de l'Unité, et qui mime le phénotype humain de dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss associée à une CMD hypokinétique (7).

Une collaboration a été entreprise avec les équipes de Michel Pucéat (I-Stem, Evry) et Philippe Menasché (Inserm, HEGP, Paris) pour acquérir la maîtrise de préparation et pré-différenciation des cellules souches embryonnaires murines. Avant injection, les cellules sont pré-traitées durant 24 h par le BMP2, qui les entraîne dans un lignage cardiogénique. L'utilisation du modèle expérimental de transplantation a nécessité la mise au point des cultures de cellules embryonnaires, de la technique d'injection, et la validation des mesures fonctionnelles. La méthodologie permet actuellement d'administrer jusqu'à 1 million de

cellules en quatre sites d'injection dans l'apex et la paroi libre du ventricule gauche. Une première série d'injections nous a permis de vérifier et contrôler le rejet immunologique, par les souris immunocompétentes, de ces cellules d'origine allogénique, bien qu'initialement embryonnaires. Puis, nous avons transplanté des cellules dans des animaux placés sous immunosuppression au FK506 (Tacrolimus). Les résultats obtenus sont extrêmement encourageants, et valident pour le moment les méthodologies d'injection et d'histologie. Ce projet est mené par un chercheur post-doctoral et par une Assistante Ingénieur, et poursuivi en 2011 et 2012. Nous étudierons notamment la qualité de différenciation des cellules injectées dans le myocarde (marquage des connexines, de l'actine cardiaque, des chaînes de myosine), et l'impact sur la fonction cardiaque des animaux.

4.2. Cellules ALDH+

Nous mettons à profit les méthodologies mises au point ci-dessus pour étudier l'implantation intramyocardique des progéniteurs exprimant l'aldéhyde deshydrogénase, dont il a été fait mention plus haut. L'implantation de cellules ALDH⁺ d'origine musculaire squelettique ou cardiaque est ainsi en cours d'évaluation.

Nous poursuivons la caractérisation des progéniteurs cardiaques murins à l'aide de marqueurs classiques rendant possible leur isolement par cytométrie de flux ou tri magnétique. Les cellules ALDH⁺ expriment à leur surface le marqueur Sca-1, récemment identifié comme un marqueur potentiel de progéniteurs cardiogéniques. Au vu des potentiels régénératifs des SMALD humaines, les cellules ALDH⁺ de tissu cardiaque pourraient présenter des propriétés de différenciation cardiomyocytaire, qui ne sont pas encore connues et évaluées, et cette question est en cours d'évaluation.

Nous réaliserons des injections de cellules xénogéniques (Chien, Singe) ou marquées (souris ROSA) dans des souris immunodéficientes (modèle SCID), puis des cellules allogéniques marquées dans des souris immunodéprimées présentant une cardiomyopathie dilatée (modèle KI LMNA). La présence des cellules, leur différenciation, leur intégration éventuelle seront analysés par histologie. La fonction cardiaque sera évaluée par échographie.

5. Approches expérimentales de thérapie cellulaire ostéogénique *in vitro* et *in vivo*.

5.1. Principe.

L'étude des caractéristiques phénotypiques et des capacités de différenciation *in vitro* des cellules d'origine musculaire a suggéré un caractère mésenchymateux de certaines d'entre elles, en soulignant des traits chondrogéniques et ostéogéniques. Il nous a semblé légitime d'entreprendre un programme visant à explorer plus avant les réelles capacités régénératives *in vitro* et *in vivo* de certaines des populations de cellules d'origine musculaire, en vue de possibles développements thérapeutiques. Nous nous sommes d'abord focalisés sur l'ostéogénèse, cette voie étant a priori moins complexe à contrôler que la chondrogénèse. Le schéma global que nous suivons est présenté en Figure 29. Les caractérisations de cellules d'origine musculaire permettent de sélectionner des sous-populations, dont les capacités sont testées *in vitro* et *in vivo* concernant telle ou telle voie de différenciation.

Découvrir et utiliser des cellules musculaires

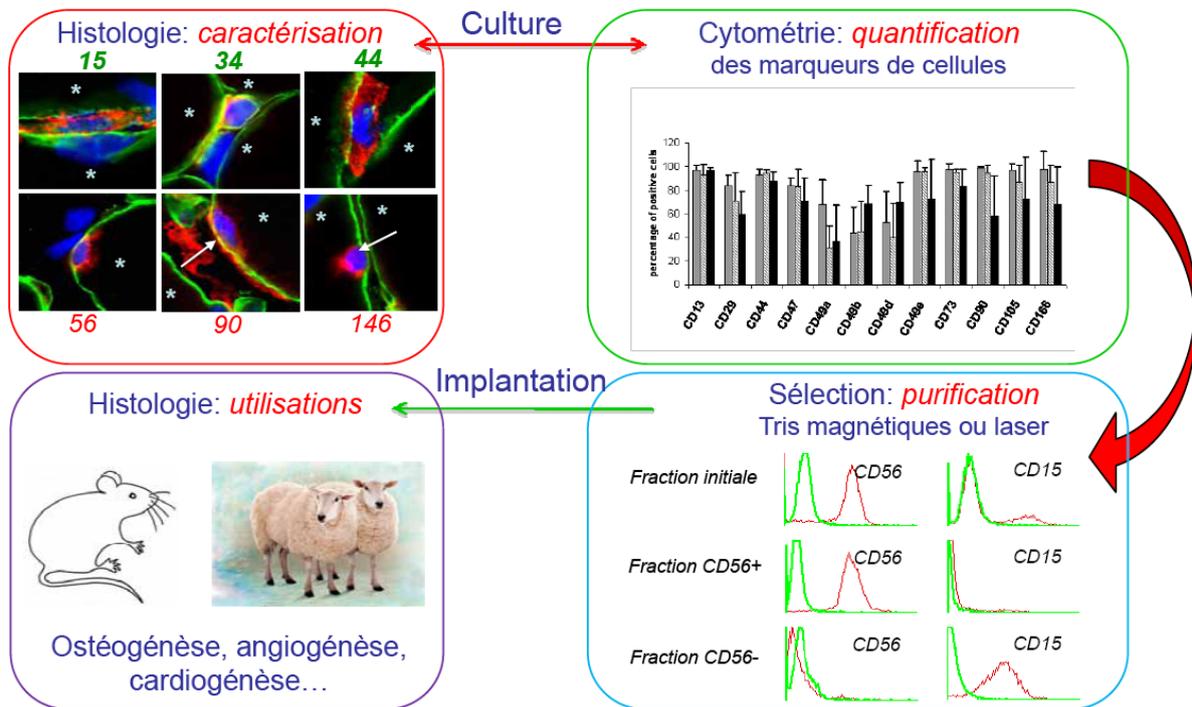


Figure 29. Représentation schématique d'une stratégie visant à étudier les potentiels régénératifs de cellules d'origine musculaire vers une ou plusieurs voies (l'exemple est tiré de nos expériences de tris de cellules CD56+ ou CD15+).

5.2. Contexte de ces recherches.

La progression inexorable des pathologies rhumatologiques, des maladies dégénératives, de la traumatologie, et son cortège de besoins médicaux, sociaux et économiques, justifie le développement alternatif de l'ingénierie tissulaire en médecine orthopédique. En effet, les pathologies articulaires représentent la moitié des situations chroniques chez les personnes de plus de 65 ans. Les interventions sur os ont augmenté de 7 à 10% chaque année durant la dernière décennie. Chaque année, plus de 25 millions de fractures surviennent, et l'on estime que 5 à 10% d'entre elles sont suivies d'une réparation retardée ou incomplète (90). Les fractures liées à l'ostéoporose ont doublé lors de la dernière décennie. Plus de 2 millions de procédures ont concerné les pathologies de la moelle épinière. Les pathologies de l'appareil locomoteur peuvent être divisées (arbitrairement) en deux grandes catégories : les affections localisées et les affections systémiques, et différentes stratégies de recherche doivent être déployées. Dans la catégorie des affections osseuses localisées, on répertorie : la perte osseuse, d'origine traumatique, infectieuse ou cancéreuse ; le retard d'union ou de consolidation suivant fracture, ostéotomie, arthrodèse, allongement ; la nécrose. La catégorie des affections généralisées inclut l'ostéoporose, les maladies auto-immunes, l'ostéogénèse imparfaite et autres maladies génétiques (RP72).

L'objectif de la thérapie cellulaire dans ces domaines est de prolonger les capacités physiologiques de réparation, ou de s'y substituer lorsque celles-ci sont déficientes ou progressent trop lentement. La greffe autologue de biopsies osseuses hétérotopiques reste le standard, mais son usage est limité par la taille et la forme du greffon qu'il est possible de prélever, et par la morbidité occasionnée au site de prélèvement (50). L'approche

thérapeutique peut être envisagée en utilisant des substituts osseux naturels ou synthétiques, des cocktails de facteurs de croissance, des cellules différenciées, dont certaines font déjà l'objet d'essais cliniques (**RP72**). Le concept de l'utilisation des cellules pour parvenir à une réparation tissulaire a émergé progressivement, avec les premières utilisations d'ostéocytes, puis de cellules mésenchymateuses, utilisées seules ou en combinaison avec des matrices naturelles (os décellularisé, corail...) ou artificielles (céramiques, gels...). Les cellules mésenchymateuses (CSM) sont particulièrement attractives car elles peuvent être obtenues par ponction médullaire, et multipliées en culture. Leur utilisation, cependant, nécessite encore une biopsie médullaire (sous anesthésie), et leur petit nombre initial implique des phases de prolifération extensives, les menant aux portes de la sénescence et entraînant souvent l'apparition de clones hétérocaryotypiques aux conséquences biologiques inconnues. La mise en évidence de sources alternatives, telles que le muscle squelettique, augmenterait l'intérêt de ces cellules. De premières études ont été rapportées (**86 ; 94**).

Les cellules peuvent être utilisées seules, ou préférentiellement associées à des matériels, qui doivent idéalement s'avérer biocompatibles, non-inflammatoires, ostéoconductifs, ostéoinductifs, résorbables, faciles à manipuler et à modeler, si possible faciles à suivre par les techniques d'imagerie médicale. Les essais rapportés font état de résultats encourageants en termes de faisabilité, de tolérance, de rapidité de réparation, d'intégration osseuse, mais de petites cohortes de patients ont été étudiées, et il est naturellement difficile de concevoir des études contre placebo dans ces indications.

Nous avons donc décidé de participer à un projet quadri-partite d'identification, de caractérisation et d'utilisation de cellules ostéoprogénitrices à partir de biopsies musculaires humaines et ovines. Il s'agit du projet "Myocellos" soutenu par l'ANR. Le projet prévoit l'identification de différentes populations cellulaires, d'origine musculaire, et présentant un potentiel de différenciation ostéogénique. Le projet prévoit donc l'identification extensive des marqueurs extracellulaires exprimés par les cellules en culture, préalablement au tri de ces populations sur la base de ces expressions. Les expérimentations sont réalisées (1) à partir de tissu humain, dans la perspective d'application clinique ultérieure, après validations *in vivo* dans un modèle murin immunodéficient d'ostéogénèse induite, et (2) à partir de tissu ovin, dans la perspective de validations pré-cliniques dans un grand modèle animal de perte osseuse puis de comblement.

5.3. Premiers résultats et perspectives.

Des cultures primaires de cellules musculaires humaines ont été réalisées à partir de déchets opératoires fournis par la Banque de Tissus pour la recherche (MYOBANK AFM, site Pitié-Salpêtrière). Les expansions de cellules musculaires humaines et ovines ont été réalisées à l'aide de milieux classiques et bien définis, utilisables ultérieurement pour la préparation de cellules de grade clinique. Après expansion, les cellules ont été caractérisées par cytométrie de flux, par l'utilisation d'un panel large de marqueurs de surface. Les proportions des populations ont été estimées. Dans un grand nombre de cas, les marqueurs testés sont exprimés sur la très large majorité des cellules, suggérant une absence de caractère discriminant. Un certain nombre de marqueurs, cependant, sont exprimés sur de plus faibles proportions des cellules, voire en proportions variables. Il s'agit essentiellement des intégrines et molécules associées.

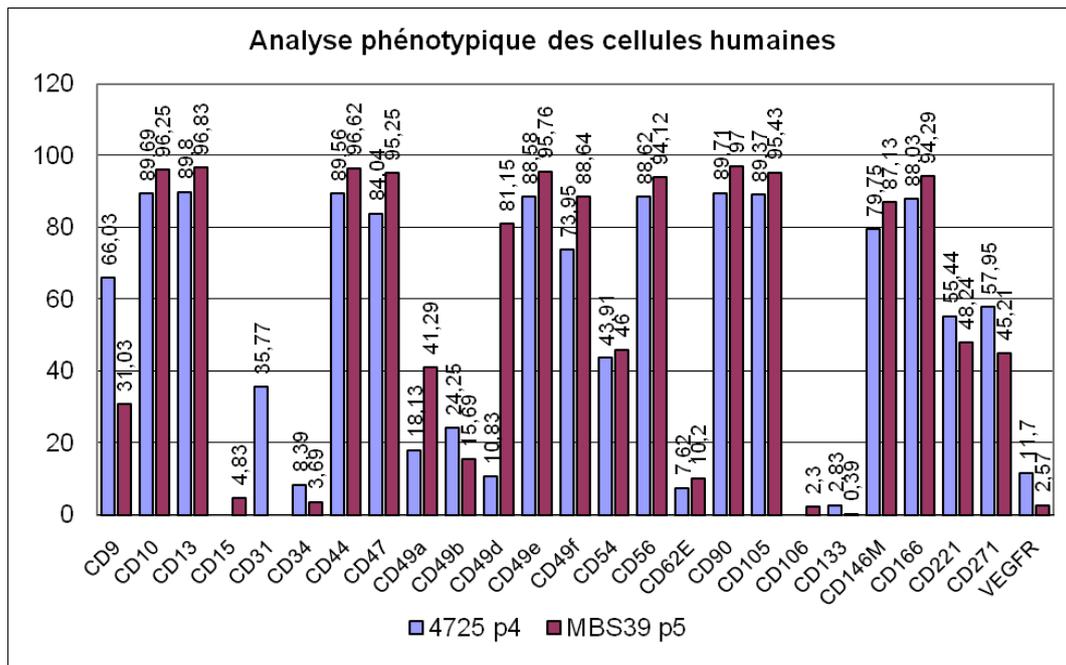


Figure 30. Exemple d'analyse phénotypique de cultures de cellules humaines. Des biopsies musculaires mises en culture ont été phénotypées par cytométrie.

Nous avons pu identifier une sous-population présentant fréquemment une tendance à une activité ostéogénique plus importante *in vitro* que celle des populations initiales non fractionnées (activité enzymatique). Cette première évaluation biochimique a été suivie d'une première étude moléculaire, portant sur l'expression de certains gènes de l'ostéogénèse.

En parallèle, nous avons préparé plusieurs lots de cellules humaines, transmises à nos collaborateurs en charge des expérimentations *in vivo*, qui les ont mises au contact d'un biomatériau ostéoinducteur et ostéoconducteur. L'ensemble a été implanté en territoire sous-cutané chez des souris immunodéficientes SCID, afin d'évaluer *in vivo* le potentiel ostéogène des cellules étudiées. Enfin, des cultures de cellules ovines ont été réalisées dans le but d'une implantation globale chez la Souris, afin de fournir une preuve de concept initiale concernant le potentiel ostéogénique de cette source cellulaire d'origine ovine, avant de procéder, le cas échéant, à une validation dans un grand modèle animal de large perte osseuse (le Mouton). La méthodologie nous a permis de produire des quantités de cellules compatibles avec l'implantation chez les animaux. Ces études sont en cours, la poursuite de cet axe de recherche dépendra des résultats qu'il est possible d'obtenir *in vivo* dans les modèles animaux.

Un schéma analogue peut être suivi pour l'étude, par exemple, de capacités angiogéniques, chondrogéniques, neurogéniques...

6. Perspectives ouvertes par le diplôme.

Le projet global est issu des analyses de nos recherches en thérapie cellulaire des maladies musculaires à visées cliniques, et plus particulièrement de l'identification de nouveaux types de progéniteurs. Il résulte notamment de la restructuration de notre Unité au sein de l'UPMC, qui a permis de mettre en commun connaissances et compétences techniques, et il permettra

de prospecter de nouvelles voies de développement en biologie et thérapie cellulaires. L'homogénéisation des connaissances et des caractérisations, la standardisation des types cellulaires, deviendront un passage obligé tant sur le plan biologique, que sur le plan clinique et industriel. Notre approche rassemble différentes disciplines et nécessite la mise en œuvre de techniques complémentaires: biologie cellulaire (dissociations, cultures, phénotypage par cytométrie), biologie moléculaire (caractérisations), thérapie cellulaire (préparation de lots), myologie (physiologie musculaire), cardiologie (physiologie cardiaque), histologie. Une grande partie de ces compétences se trouve sur le site, et celles qui ne sont pas encore sollicitées le seront davantage dans l'avenir.

A l'issue des projets que nous développons en collaboration avec des structures mises à disposition par l'Université, et avec des collègues d'autres disciplines telles que la cardiologie, l'imagerie, le screening à haut débit, la culture en trois dimensions... nous pourrions proposer de nouvelles catégories de progéniteurs musculaires, squelettiques et/ou cardiaques, ou orientés vers encore d'autres voies de différenciation, et une caractérisation de leurs marqueurs phénotypiques, ainsi que des preuves de concept de leurs capacités d'intégration *in vivo*.

L'unité de recherche à laquelle j'appartiens est rattachée à des tutelles classiques (l'Université, l'INSERM, le CNRS) mais aussi moins classiques telles que l'Institut de Myologie, qui participe à des structures d'enseignement de la Myologie, et, en étroit lien avec l'AP-HP, à des structures d'évaluation des pathologies neuromusculaires ainsi qu'à des structures d'évaluations des essais cliniques. Le projet de recherche proposé peut donc bénéficier d'un « état d'esprit » assez « translationnel », allant de la recherche fondamentale jusqu'à la recherche clinique, avec une unité de lieu.

Enfin sur le plan pédagogique, le diplôme d'Habilitation à Diriger les Recherches me permettra de proposer des projets de recherche, de manière plus régulière, aux étudiants soucieux d'entreprendre ou de compléter leur formation dans ces domaines (Master, Doctorat). Et sur le plan personnel, ce diplôme me permettra de postuler au grade de Directeur de Recherches (DR2) auprès du CNRS.

Références bibliographiques

1. Références Personnelles (RP).

- RP1. Agbulut O, Vandervelde S, Al Attar N, Larghero J, Ghostine S, Leobon B, Robidel E, Borsani P, Le Lorc'h M, Bissery A, Chomienne C, Bruneval P, Marolleau JP, Vilquin JT, Hagege A, Samuel JL, Menasche P. Comparison of human skeletal myoblasts and bone marrow-derived CD133+ progenitors for the repair of infarcted myocardium. *J Am Coll Cardiol*. 2004; 44(2): 458-463.
- RP2. Alattar N, Carrion C, Ghostine S, Garcin I, Vilquin JT, Hagege AA, Menasche P. Long-term (1 year) Results of Autologous Skeletal Myoblast Transplantation in Rat. Functional Assessment by Echocardiography and Pressure-Volume Loops. *Cardiovascular Research* 2003, 58: 42-48.
- RP3. Andriamanalijaona R, Duval E, Raoudi M, Lecourt S, Vilquin JT, Marolleau JP, Pujol JP, Galera P, Boumediene K. Differentiation potential of human muscle-derived cells towards chondrogenic phenotype in alginate beads culture. *Osteoarthritis Cartilage* 2008; 16 (12): 1509-1518.
- RP4. Asselin I, Tremblay M, Vilquin JT, Guérette B, Roy R, Tremblay JP. Quantification of normal dystrophin mRNA following myoblast transplantation in mdx mice. *Muscle Nerve*. 1995; 18(9): 980-986.
- RP5. Asselin I, Tremblay M, Vilquin JT, Guérette B, Tremblay JP. Polymerase chain reaction-based assay to assess the success of myoblast transplantation in mdx mice. *Transplant Proc*. 1994; 26(6): 3389.
- RP6. Baligand C, Vauchez K, Fiszman MY, Vilquin JT, Carlier PG. Discrepancies between the fate of myoblast xenograft in mouse leg muscles and NMR label persistency after loading with Gd-DTPA or SPIOs. *Gene Therapy* 2009; 16 (6), 734-745.
- RP7. Besse S, Allamand V, Vilquin J-T, Li Z, Poirier C, Vignier N, Hori H, Guénet JL, Guicheney P. Spontaneous muscular dystrophy caused by a retrotransposal insertion in the mouse laminin a2 chain gene. *Neuromuscular Disorders* 2003; 13: 216-22.
- RP8. Brasselet C, Morichetti MC, Messas E, Carrion C, Bissery A, Bruneval P, Vilquin JT, Lafont A, Hagege AA, Menasche P, Desnos M. Skeletal myoblast transplantation through a catheter-based coronary sinus approach: an effective means of improving function of infarcted myocardium. *Eur Heart J*. 2005; 26 : 1551-1556.
- RP9. Braun S, Tranchant C, Vilquin JT, Labouret P, Warter JM, Poindron P. Stimulating effects of prednisolone on acetylcholine receptor expression and myogenesis in primary culture of newborn rat muscle cells. *J Neurol Sci*. 1989; 92(2-3): 119-131.
- RP10. Chapdelaine P, Moisset PA, Campeau P, Asselin I, Vilquin JT, Tremblay JP. Functional EGFP-dystrophin fusion proteins for gene therapy vector development. *Protein Eng*. 200; 13(9): 611-615.
- RP11. Desnuelle C, Sacconi S, Marolleau JP, Larghero J, Vilquin JT. The possible place of autologous cell therapy in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Bull Acad Natl Med*. 2005; 189(4): 697-713.
- RP12. Fardeau M, Tome FM, Vilquin JT, Guicheney P. Congenital muscular dystrophies. A short review of the recent progresses. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl*. 1999;50: 335-340.
- RP13. Ghostine S, Carrion C, Guarita Souza LC, Richard P, Bruneval P, Vilquin J-T, Pouzet B, Schwartz K, Ménasche P, Hagege AA. Long term efficacy of myoblast transplantation on regional structure and function after myocardial infarction. *Circulation* 2002; 106, I-131-I-136.

- RP14. Guérette B, Asselin I, Vilquin JT, Roy R, Tremblay JP. Lymphocyte infiltration following allo- and xenomyoblast transplantation in mice. *Transplant Proc.* 1994; 26(6): 3461-3462.
- RP15. Guerette B, Asselin I, Vilquin JT, Roy R, Tremblay JP. Lymphocyte infiltration following allo- and xenomyoblast transplantation in mdx mice. *Muscle Nerve.* 1995; 18(1): 39-51.
- RP16. Guerette B, Tremblay G, Vilquin JT, Asselin I, Gingras M, Roy R, Tremblay JP. Interferon-gamma mRNA expression following alloincompatible myoblast transplantation is inhibited by FK506. *Muscle Nerve.* 1996; 19(7): 829-835.
- RP17. Guerette B, Vilquin JT, Gingras M, Gravel C, Wood KJ, Tremblay JP. Prevention of immune reactions triggered by first-generation adenoviral vectors by monoclonal antibodies and CTLA4Ig. *Hum Gene Ther.* 1996; 7(12): 1455-1463.
- RP18. Guo LT, Zhang XU, Kuang W, Xu H, Liu LA, Vilquin J-T, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Ruegg M, Wewer MU, Engvall E. Laminin α 2 deficiency and muscular dystrophy; genotype-phenotype correlation in mutant mice. *Neuromuscular Disorders* 2003; 13: 207-215.
- RP19. Hagege AA, Carrion C, Menasché P, Vilquin JT, Duboc D, Marolleau JP, Desnos M, Bruneval P. Viability and differentiation of autologous skeletal myoblast grafts in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet.* 2003; 361(9356): 491-492.
- RP20. Hagege AA, Marolleau JP, Vilquin JT, Alheritiere A, Peyrard S, Duboc D, Abergel E, Messas E, Mousseaux E, Schwartz K, Desnos M, Menasche P. Skeletal myoblast transplantation in ischemic heart failure: long-term follow-up of the first phase I cohort of patients. *Circulation.* 2006; 114(1 Suppl): I108-113.
- RP21. Hagege AA, Vilquin JT, Bruneval P, Menasche P. Regeneration of the myocardium: a new role in the treatment of ischemic heart disease? *Hypertension.* 2001; 38(6): 1413-1415.
- RP22. Ito H, Vilquin JT, Skuk D, Roy B, Goulet M, Lille S, Dugre FJ, Asselin I, Roy R, Fardeau M, Tremblay JP. Myoblast transplantation in non-dystrophic dog. *Neuromuscul Disord.* 1998; 8(2): 95-110.
- RP23. Kennel PF, Vilquin JT, Braun S, Fonteneau P, Warter JM, Poindron P. Myasthenia gravis: comparative autoantibody assays using human muscle, TE671, and glucocorticoid-treated TE671 cells as sources of antigen. *Clin Immunol Immunopathol.* 1995; 74(3): 293-296.
- RP24. Khattar P, Friedrich FW, Bonne G, Carrier L, Eschenhagen T, Schwartz K, Fiszman MY, Vilquin JT. Two distinct populations of Islet-1-expressing cells in the hearts of different murine strains. *Stem Cells Development* 2010 (In Press).
- RP25. Kinoshita I, Vilquin JT, Asselin I, Chamberlain J, Tremblay JP. Transplantation of myoblasts from a transgenic mouse overexpressing dystrophin produced only a relatively small increase of dystrophin-positive membrane. *Muscle Nerve.* 1998; 21(1): 91-103.
- RP26. Kinoshita I, Vilquin JT, Gravel C, Roy R, Tremblay JP. Myoblast allotransplantation in primates. *Muscle Nerve.* 1995; 18(10): 1217-1218.
- RP27. Kinoshita I, Vilquin JT, Guérette B, Asselin I, Roy R, Lille S, Tremblay JP. Immunosuppression with FK 506 insures good success of myoblast transplantation in MDX mice. *Transplant Proc.* 1994; 26(6): 3518.
- RP28. Kinoshita I, Vilquin JT, Guerette B, Asselin I, Roy R, Tremblay JP. Very efficient myoblast allotransplantation in mice under FK506 immunosuppression. *Muscle Nerve.* 1994; 17(12): 1407-1415.
- RP29. Kinoshita I, Vilquin JT, Roy T, Tremblay JP. Successive injections in mdx mice of myoblasts grown with bFGF. *Neuromuscul Disord.* 1996; 6(3): 187-193.

- RP30. Kinoshita I, Vilquin JT, Tremblay JP. Mechanism of increasing dystrophin-positive myofibers by myoblast transplantation: study using mdx/beta-galactosidase transgenic mice. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1996; 91(5): 489-493.
- RP31. Kinoshita I, Vilquin JT, Tremblay JP. Pretreatment of myoblast cultures with basic fibroblast growth factor increases the efficacy of their transplantation in mdx mice. *Muscle Nerve*. 1995; 18(8): 834-841.
- RP32. Kuang W, Xu H, Vilquin JT, Engvall E. Activation of the lama2 gene in muscle regeneration: abortive regeneration in laminin alpha2-deficiency. *Lab Invest*. 1999; 79(12): 1601-1613.
- RP33. Le Ricousse-Roussanne S, Larghero J, Zini JM, Barateau V, Foubert P, Uzan G, Liu X, Lacassagne MN, Ternaux B, Robert I, Benbunan M, Vilquin JT, Vauchez K, Tobelem G, Marolleau JP. *Ex vivo* generation of mature and functional human smooth muscle cells differentiated from skeletal myoblasts. *Exp Cell Res* 2007; 313-317: 1337-1346.
- RP34. Lecourt S, Marolleau JP, Fromigué O, Vauchez K, Andriamanalijaona R, Ternaux B, Lacassagne MN, Robert I, Boumédiène K, Chéreau F, Marie P, Larghero J, Fiszman M, Vilquin JT. Characterization of distinct mesenchymal-like cell populations from human skeletal muscle *in situ* and *in vitro*. *Experimental Cell research* 2010; 316: 2513-2526.
- RP35. Léobon B, Garcin I, Menasche P, Vilquin JT, Audinat E, Charpak S. Myoblasts transplanted in infarcted myocardium remain electromechanically isolated. *PNAS* 2003; 100 : 7808-7811.
- RP36. Maurel A, Azarnoush K, Sabbah L, Vignier N, Le Lorc'h M, Mandet C, Garcin I, Carrion C, Bissery A, Fiszman M, Bruneval P, Hagege A, Carpentier A, Vilquin JT, Menasché P. Can Cold or Heat Shock Improve Skeletal Myoblast Engraftment in Infarcted Myocardium? *Transplantation* 2005; 80(5): 660-665.
- RP37. Menasché P, Alfieri O, Janssens S, McKenna W, Reichenspurner H, Trinquart L, Vilquin JT, Marolleau JP, Seymour B, Larghero J, Lake S, Chatellier G, Solomon S, Desnos M, Hagege AA. The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation* 2008; 117(9): 1189-1200.
- RP38. Menasche P, Hagege A, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, Schwartz K, Vilquin JT, Marolleau JP. [Autologous skeletal myoblast transplantation for cardiac insufficiency. First clinical case]. *Arch Mal Coeur Vaiss*. 2001; 94(3): 180-182.
- RP39. Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, Schwartz K, Vilquin JT, Marolleau JP. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet*. 2001; 357(9252): 279-280.
- RP40. Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, Desnos M, Abergel E, Scorsin M, Pouzet B, Sarateanu S, Schwartz K, Marolleau JP, Duboc D. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 1078-1083.
- RP41. Messas E, Bel A, Morichetti MC, Carrion C, Handschumacher MD, Peyrard S, Vilquin JT, Desnos M, Bruneval P, Carpentier A, Menasche P, Levine RA, Hagege AA. Autologous myoblast transplantation for chronic ischemic mitral regurgitation. *J Am Coll Cardiol*. 2006; 47(10): 2086-2093.
- RP42. Paturneau-Jouas M, Parzy E, Vidal G, Carlier PG, Wary C, Vilquin JT, de Kerviler E, Schwartz K, Leroy-Willig A. Electrotransfer at MR imaging: tool for optimization of gene transfer protocols--feasibility study in mice. *Radiology*. 2003; 228(3): 768-775.
- RP43. Pitard B, Pollard H, Agbulut O, Lambert O, Vilquin JT, Cherel Y, Abadie J, Samuel JL, Rigaud JL, Menoret S, Anegon I, Escande D. A non-ionic amphiphile agent

- promotes gene delivery *in vivo* to skeletal and cardiac muscles. Human Gene Therapy 2002; 13 (14): 1767-1775.
- RP44. Pouly J, Hagege AA, Vilquin JT, Bissery A, Rouche A, Bruneval P, Duboc D, Desnos M, Fiszman M, Fromes Y, Menasche P. Does the functional efficacy of skeletal myoblast transplantation extend to nonischemic cardiomyopathy? Circulation. 2004; 110(12): 1626-1631.
- RP45. Pouzet B, Ghostine S, Vilquin JT, Garcin I, Scorsin M, Hagege AA, Duboc D, Schwartz K, Menasche P. Is skeletal myoblast transplantation clinically relevant in the era of angiotensin-converting enzyme inhibitors? Circulation. 2001; 104(12 Suppl 1): I223-I228.
- RP46. Pouzet B, Vilquin JT, Hagege AA, Scorsin M, Messas E, Fiszman M, Schwartz K, Menasche P. Intramyocardial transplantation of autologous myoblasts: can tissue processing be optimized? Circulation. 2000; 102(19 Suppl 3): III210-III215.
- RP47. Pouzet B, Vilquin JT, Hagege AA, Scorsin M, Messas E, Fiszman M, Schwartz K, Menasche P. Factors affecting functional outcome after autologous skeletal myoblast transplantation. Ann Thorac Surg. 2001; 71(3): 844-850.
- RP48. Pouzet B, Vilquin JT, Menasche P. Myocardial implantation of muscle cells. Presse Med. 2002; 31 (33): 1569-1576.
- RP49. Praud C, Vauchez K, Lombes A, Fiszman M, Vilquin J-T. Myoblast xenotransplantation as a tool to evaluate the appropriateness of nanoparticulate versus cellular trackers. Cell Transplantation 2008; 17(9) : 1035-1043.
- RP50. Schwartz K, Vilquin JT. Building the translational highway : toward new partnerships between academia and the private sector. Nature Medicine 2003 ; 9: 493-495 (Commentary).
- RP51. Scorsin M, Hagege A, Vilquin JT, Fiszman M, Marotte F, Samuel JL, Rappaport L, Schwartz K, Menasche P. Comparison of the effects of fetal cardiomyocyte and skeletal myoblast transplantation on postinfarction left ventricular function. J Thorac Cardiovasc Surg. 2000; 119(6): 1169-1175.
- RP52. Skuk D, Furling D, Bouchard JP, Goulet M, Roy B, Lacroix Y, Vilquin JT, Tremblay JP, Puymirat J. Transplantation of human myoblasts in SCID mice as a potential muscular model for myotonic dystrophy. J Neuropathol Exp Neurol. 1999; 58(9): 921-931.
- RP53. Skuk D, Vilquin JT, Tremblay JP. Experimental and therapeutic approaches to muscle dystrophies. Current Opinion in Neurology 2002; 15 (5): 563-569.
- RP54. Tardif-de Gery S, Vilquin JT, Carlier P, Raynaud J, Wary C, Schwartz K, Leroy-Willig A. Muscular transverse relaxation time measurement by magnetic resonance imaging at 4 tesla in normal and dystrophic dy/dy and dy(2j)/dy(2j) mice. Neuromuscul Disord. 2000; 10(7): 507-513.
- RP55. Vauchez K, Marolleau JP, Schmid M, Khattar P, Chapel A, Catelain C, Lecourt S, Larghéro J, Fiszman M, Vilquin JT. Aldehyde dehydrogenase activity identifies a population of human skeletal muscle cells with high myogenic capacities. Molecular Therapy 2009; 17 (11): 1948-1958.
- RP56. Vilquin JT, Asselin I, Guerette B, Kinoshita I, Lille S, Roy R, Tremblay JP. Myoblast allotransplantation in mice: degree of success varies depending on the efficacy of various immunosuppressive treatments. Transplant Proc. 1994; 26(6): 3372-3373.
- RP57. Vilquin JT, Asselin I, Guerette B, Kinoshita I, Roy R, Tremblay JP. Successful myoblast allotransplantation in mdx mice using rapamycin. Transplantation. 1995; 59(3): 422-426.
- RP58. Vilquin JT, Braun S, Labouret P, Tranchant C, Hartmann D, Lombard Y, Goetz J, Urlacher A, Wihlm JM, Warter JM, Poindron P. Establishment and characterization

- of B-like lymphoblastoid cell lines by long-term culture of primary explants from human myasthenic thymus. *Thymus*. 1993; 21(1): 25-42.
- RP59. Vilquin JT, Braun S, Labouret P, Zuber G, Tranchant C, Poindron P, Warter JM. Specific effect of corticoids on acetylcholine receptor expression in rat skeletal muscle cell cultures. *J Neurosci Res*. 1992; 31(2): 285-293.
- RP60. Vilquin JT, Brussee V, Asselin I, Kinoshita I, Gingras M, Tremblay JP. Evidence of mdx mouse skeletal muscle fragility *in vivo* by eccentric running exercise. *Muscle Nerve* 1998; 21: 567-576.
- RP61. Vilquin JT, Guerette B, Kinoshita I, Roy B, Goulet M, Gravel C, Roy R, Tremblay JP. FK506 immunosuppression to control the immune reactions triggered by first-generation adenovirus-mediated gene transfer. *Hum Gene Ther*. 1995; 6(11): 1391-1401.
- RP62. Vilquin JT, Guerette B, Puymirat J, Yaffe D, Tome FM, Fardeau M, Fiszman M, Schwartz K, Tremblay JP. Myoblast transplantations lead to the expression of the laminin alpha 2 chain in normal and dystrophic (dy/dy) mouse muscles. *Gene Ther*. 1999; 6(5): 792-800.
- RP63. Vilquin JT, Kennel PF, Paturneau-Jouas M, Chapdelaine P, Boissel N, Delaere P, Tremblay JP, Scherman D, Fiszman MY, Schwartz K. Electrotransfer of naked DNA in the skeletal muscles of animal models of muscular dystrophies. *Gene Ther*. 2001; 8(14): 1097-107.
- RP64. Vilquin JT, Kinoshita I, Roy B, Goulet M, Engvall E, Tome F, Fardeau M, Tremblay JP. Partial laminin alpha2 chain restoration in alpha2 chain-deficient dy/dy mouse by primary muscle cell culture transplantation. *J Cell Biol*. 1996; 133(1): 185-197.
- RP65. Vilquin JT, Kinoshita I, Roy R, Tremblay JP. Cyclophosphamide immunosuppression does not permit successful myoblast allotransplantation in mouse. *Neuromuscul Disord*. 1995; 5(6): 511-517.
- RP66. Vilquin JT, Marolleau JP, Hagege A, Menasche P, Fiszman M, Schwartz K. Cell transplantation for post-ischemic heart failure. *Arch Malad Cœur Vaiss* 2002; 95: 1219-1225.
- RP67. Vilquin JT, Marolleau JP, Pouzet B, Garcin I, Carrion C, Ternaux B, Robert I, Lacassagne MN, Scorsin M, Hagege A, Desnos M, Duboc D, Fiszman M, Schwartz K, Menasché P. Transplantation of adult skeletal muscle cells in the heart. *Acta Myologica* 2001; XX: 145-150.
- RP68. Vilquin JT, Marolleau JP, Sacconi S, Garcin I, Lacassagne MN, Robert I, Ternaux B, Bouazza B, Larghero J, Desnuelle C. Normal growth and regenerating ability of myoblasts from unaffected muscles of facioscapulohumeral muscular dystrophy patients. *Gene Therapy* 2005; 12(22): 1651-1662.
- RP69. Vilquin JT, Marolleau JP, Schwartz K. Cell transplantation for the treatment of heart failure. *Drug Discovery Today : therapeutic strategies* 2006; 3 (2): 271-278.
- RP70. Vilquin JT, Marolleau JP. Cell transplantation in heart failure management. *Med Sci (Paris)*. 2004; 20(6-7): 651-662.
- RP71. Vilquin JT, Menasché P. Thérapie cellulaire. In: *Biologie et pathologie du cœur et des vaisseaux*, Editeur Groupe de Réflexions en Recherche Cardiovasculaire, Flammarion Médecine-Sciences, Paris, 2008 : 581-596.
- RP72. Vilquin JT, Rosset P. Mesenchymal stem cells in bone and cartilage repair : current status. *Future Medicine – Regenerative Medicine* 2006; 1 (4): 589-604.
- RP73. Vilquin JT, Vignier N, Tremblay JP, Engvall E, Schwartz K, Fiszman M. Identification of homozygous and heterozygous dy2J mice by PCR. *Neuromuscul Disord*. 2000; 10(1): 59-62.

- RP74. Vilquin JT, Wagner E, Kinoshita I, Roy R, Tremblay JP. Successful histocompatible myoblast transplantation in dystrophin-deficient mdx mouse despite the production of antibodies against dystrophin. *J Cell Biol.* 1995; 131(4): 975-988.
- RP75. Vilquin JT. Myoblast transplantation: clinical trials and perspectives. Mini-review. *Acta Myol.* 2005; 24(2): 119-127.
- RP76. Vilquin JT. Place des cellules souches dans le traitement des cardiopathies. *Médecine de la Reproduction, Gynécologie Endocrinologie* 2009; 11(1): 71-83.
- RP77. Roy R, Tremblay JP, Guerette B, Vilquin JT. Methods of restoring a functional protein in a tissue by cell transplantation – Procédé pour reconstituer une protéine fonctionnelle dans un tissu par transplantation de cellules. Dépôt PCT 29/03/1996 (PCT/CA96/00191), phase internationale 09/10/1997 (WO97/36602), phase nationale Canada 18/01/1999 (2.260.808, Int.Cl. 6A61K39/395 - 6A61K35/34).
- RP78. Vilquin JT, Marolleau JP, Tremblay JP, Robert I, Ternaux B. Method for obtaining characterised muscle-derived cell populations and uses. Version PCT N° 2001/094555 (WO/2001/094555), dépôt le 13/12/2001, phase nationale N° PCT/FR2001/001768. Déposants : Assistance Publique, AFM, Inserm. Brevet également validé par l'Office Européen des Brevets en Juin 2009, N° EP 01943584.1
- RP79. Vilquin JT, Marolleau JP, Tremblay JP, Robert I, Ternaux B. Procédé d'obtention de populations cellulaires d'origine musculaire et utilisations. Brevet déposé en France le 7 Juin 2000 (N° 007304). Déposants : Assistance Publique, AFM, Inserm.
- RP80. Vilquin JT, Vauchez K and Marolleau JP. Muscle Cells having myogenic potentials. Dépôt européen le 23/12/2008, N° Dépôt : 08291236.1 Déposants: Inserm, Genzyme SA.

2. Références citées dans le mémoire

1. Abu-Baker A, Rouleau GA. Oculopharyngeal muscular dystrophy: recent advances in the understanding of the molecular pathogenic mechanisms and treatment strategies. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1772(2):173-185.
2. Aihara H, Miyazaki JI. Gene transfer into muscle by electroporation *in vivo*. *Nature Biotech* 1998; **16**: 867-870.
3. Alameddine HS, Quantin B, Cartaud A, Dehaupas M, Mandel JL, Fardeau M. Expression of a recombinant dystrophin in mdx mice using adenovirus vector. *Neuromuscul Disord.* 1994;4(3):193-203.
4. André P, Braun S, Passaquin AC, Coupin G, Bartholeyens J, Warter JM, Poindron P. Rat interferon enhances the expression of acetylcholine receptors in rat myotubes in culture. *J Neurosci Res.* 1988; 19(3):297-302.
5. Arcila MA, Ameredes BT, DeRosimo JF, Washabaugh CH, Yang J, Johnson PC, Ontell M. Mass and functional capacity of regenerating muscle is enhanced by myoblast transfer. *J Neurobiol* 1997; 33: 185-198.
6. Argenziano M, Spotnitz HM, Whang W, Bigger JT Jr, Parides M, Rose EA. Risk stratification for coronary bypass surgery in patients with left ventricular dysfunction: analysis of the coronary artery bypass grafting patch trial database. *Circulation.* 1999; 100(19 Suppl):II119-124.
7. Arimura T, Helbling-Leclerc A, Massart C, Varnous S, Niel F, Lacène E, Fromes Y, Toussaint M, Mura AM, Keller DI, Anthor H, Isnard R, Malissen M, Schwartz K, Bonne G. Mouse model carrying H222P-Lmna mutation develops muscular dystrophy and dilated cardiomyopathy similar to human striated muscle laminopathies. *Hum Mol Genet.* 2005; 14(1):155-169.
8. Asakura A, Komaki M, Rudnicki M. Muscle satellite cells are multipotential stem cells

- that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. *Differentiation*. 2001; 68(4-5): 245-253.
9. Asakura A, Seale P, Girgis-Gabardo A, Rudnicki MA. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J Cell Biol* 2002; 159(1): 123-134.
 10. Azarnoush K, Maurel A, Sebbah L et al. Enhancement of the functional benefits of skeletal myoblast transplantation by means of coadministration of hypoxia-inducible factor 1alpha. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005; 130:173-179.
 11. Barrick CJ, Rojas M, Schoonhoven R, Smyth SS, Threadgill DW. Cardiac response to pressure overload in 129S1/SvImJ and C57BL/6J mice: temporal- and background-dependent development of concentric left ventricular hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007; 292(5): H2119-130.
 12. Barro M, Carnac G, Flavier S, Mercier J, Vassetzky Y, Laoudj-Chenivesse D. Myoblasts from affected and non-affected FSHD muscles exhibit morphological differentiation defects. *J Cell Mol Med*. 2010; 14(1-2): 275-289.
 13. Batulevicius D, Skripka V, Pauziene N, Pauza DH. Topography of the porcine epicardiac nerve plexus as revealed by histochemistry for acetylcholinesterase. *Auton Neurosci*. 2008; 138(1-2):64-75.
 14. Beauchamp JR, Heslop L, Yu DS, Tajbakhsh S, Kelly RG, Wernig A, Buckingham ME, Partridge TA, Zammit PS. Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *J Cell Biol* 2000; 151(6): 1221-1234.
 15. Berry C, Murdoch DR, McMurray JJ. Economics of chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2001; 3: 283-291.
 16. Biancone L, Crich SG, Cantaluppi V, Romanazzi GM, Russo S, Scalabrino E, Esposito G, Figliolini F, Beltramo S, Perin PC, Segoloni GP, Aime S, Camussi G. Magnetic resonance imaging of gadolinium-labeled pancreatic islets for experimental transplantation. *NMR Biomed*. 2007; 20(1): 40-48.
 17. Blau HM, Webster C, Chiu CP, Guttman S, Chandler F. Differentiation properties of pure populations of human dystrophic muscle cells. *Exp Cell Res*. 1983; 144(2): 495-503.
 18. Blin G, Nury D, Stefanovic S, Neri T, Guillevic O, Brinon B, Bellamy V, Rücker-Martin C, Barbry P, Bel A, Bruneval P, Cowan C, Pouly J, Mitalipov S, Gouadon E, Binder P, Hagege A, Desnos M, Renaud JF, Menasché P, Pucéat M. A purified population of multipotent cardiovascular progenitors derived from primate pluripotent stem cells engrafts in postmyocardial infarcted nonhuman primates. *J Clin Invest*. 2010; 120(4):1125-1139.
 19. Bradley WG, Jenkison M. Abnormalities of peripheral nerves in murine muscular dystrophy. *J Neurol Sci* 1973 ; 18, 227-247.
 20. Brais B, Rouleau GA, Bouchard JP, Fardeau M, Tome FM. Oculopharyngeal muscular dystrophy. *Semin Neurol* 1999; 19(1): 59-66.
 21. Bu L, Jiang X, Martin-Puig S, Caron L, Zhu S, Shao Y, Roberts DJ, Huang PL, Domian IJ, Chien KR. Human ISL1 heart progenitors generate diverse multipotent cardiovascular cell lineages. *Nature*. 2009; 460(7251): 113-7.
 22. Budker V, Zhang G, Danko I, Williams P, Wolff J. The efficient expression of intravascularly delivered DNA in rat muscle. *Gene Therapy* 1998; 5: 272-276.
 23. Bulfield G, Siller WG, Wight PAL, Moore KJ. X-chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 1189-1192.
 24. Bulte JW, Duncan ID, Frank JA. *in vivo* magnetic resonance tracking of magnetically labeled cells after transplantation. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; 22: 899-907.
 25. Bulte JW, Kraitchman DL. Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging. *NMR Biomed* 2004; 17: 484-499.

26. Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, Kaul A, Kinnett K, McDonald C, Pandya S, Poysky J, Shapiro F, Tomezsko J, Constantin C; DMD Care Considerations Working Group. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol.* 2010; 9(1): 77-93.
27. Cahill KS, Gaidosh G, Huard J, Silver X, Byrne BJ, Walter GA. Noninvasive monitoring and tracking of muscle stem cell transplants. *Transplantation* 2004; 78: 1626–1633.
28. Cai CL, Liang X, Shi Y, Chu PH, Pfaff SL, Chen J, Evans S. Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev Cell.* 2003; 5(6): 877-89.
29. Cerletti M, Molloy MJ, Tomczak KK, Yoon S, Ramoni MF, Kho AT, Beggs AH, Gussoni E. Melanoma cell adhesion molecule is a novel marker for human fetal myogenic cells and affects myoblast fusion. *J Cell Sci.* 2006; 119(Pt 15): 3117-3127.
30. Christ M, Lusky M, Stoeckel F, Dreyer D, Dieterlé A, Michou AI, Pavirani A, Mehtali M. Gene therapy with recombinant adenovirus vectors: evaluation of the host immune response. *Immunol Lett.* 1997; 57(1-3): 19-25.
31. Christ O, Lucke K, Imren S, Leung K, Hamilton M, Eaves A, Smith C, Eaves C. Improved purification of hematopoietic stem cells based on their elevated aldehyde dehydrogenase activity. *Haematologica.* 2007; 92(9): 1165-1172.
32. Christov C, Chrétien F, Abou-Khalil R, Bassez G, Vallet G, Authier FJ, Bassaglia Y, Shinin V, Tajbakhsh S, Chazaud B, Gherardi RK. Muscle satellite cells and endothelial cells: close neighbors and privileged partners. *Mol Biol Cell.* 2007;18(4):1397-1409.
33. Cohn JN, Bristow MR, Chien KR, Colucci WS, Frazier OH, Leinwand LA, Lorell BH, Moss AJ, Sonnenblick EH, Walsh RA, Mockrin SC, Reinlib L. Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute Special Emphasis Panel on Heart Failure Research. *Circulation.* 1997; 95(4): 766-70.
34. Collins CA, Olsen I, Zammit PS, Heslop L, Petrie A, Partridge TA, Morgan JE. Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell* 2005; 122(2): 289-301
35. Cooper RN, Irintchev A, Di Santo JP, Zweyer M, Morgan JE, Partridge TA, Butler-Browne GS, Mouly V, Wernig A. A new immunodeficient mouse model for human myoblast transplantation. *Hum Gene Ther.* 2001; 12(7): 823-831.
36. Corti S, Locatelli F, Papadimitriou D, Donadoni C, Salani S, Del Bo R, Strazzer S, Bresolin N, Comi GP. Identification of a primitive brain-derived neural stem cell population based on aldehyde dehydrogenase activity. *Stem Cells.* 2006; 24(4): 975-985.
37. Crisan M, Casteilla L, Lehr L, Carmona M, Paoloni-Giacobino A, Yap S, Sun B, Léger B, Logar A, Pénicaud L, Schrauwen P, Cameron-Smith D, Russell AP, Péault B, Giacobino JP. A reservoir of brown adipocyte progenitors in human skeletal muscle. *Stem Cells.* 2008; 26(9): 2425-2433.
38. 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, Péault B. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell.* 2008 11; 3(3): 301-313.
39. Davis HL, Brazolot Millan CL, Watkins SC. Immune-mediated destruction of transfected muscle fibers after direct gene transfer with antigen-expressing plasmid DNA. *Gene Therapy* 1997; 4: 181-188.
40. Decary S, Hamida CB, Mouly V, Barbet JP, Hentati F, Butler-Browne GS. Shorter telomeres in dystrophic muscle consistent with extensive regeneration in young children. *Neuromuscul Disord* 2000; 10: 113-120.

41. Delahaye F, de Gevigney G, Gaillard S, Cheneau E. [Epidemiology and economic impact of heart failure in France]. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 1998; 91(11): 1307-1314.
42. 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, Cossu G. Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat Cell Biol.* 2007; 9(3): 255-267.
43. Doh SG, Vahlsing HL, Hartikka J, Liang X, Manthorpe M. Spatial-temporal patterns of gene expression in mouse skeletal muscle after injection of lacZ plasmid DNA. *Gene Therapy* 4, 648-663, 1997.
44. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006; 8(4): 315-317.
45. Dong J, Asa SL, Drucker DJ. Islet cell and extrapancreatic expression of the LIM domain homeobox gene *isl-1*. *Mol Endocrinol* 1991;5:1633-1641.
46. Dow J, Simkhovich BZ, Kedes L et al. Washout of transplanted cells from the heart: a potential new hurdle for cell transplantation therapy. *Cardiovasc Res*, 2005, 67:301-307.
47. Ehrig K, Leivo I, Argraves WS, Ruoslahti E, Engvall E. Merosin, a tissue-specific basement membrane protein, is a laminin-like protein. *Proc Natl Acad Sci USA*1990; 87: 3264-3268.
48. Erbs S, Linke A, Adams V, Lenk K, Thiele H, Diederich KW, Emmrich F, Kluge R, Kendziorra K, Sabri O, Schuler G, Hambrecht R. Transplantation of blood-derived progenitor cells after recanalization of chronic coronary artery occlusion: first randomized and placebo-controlled study. *Circ Res.* 2005; 97(8):756-762.
49. Ericson J, Thor S, Edlund T, Jessell TM, Yamada T. Early stages of motor neuron differentiation revealed by expression of homeobox gene *Islet-1*. *Science.* 1992; 256(5063): 1555-1560.
50. Eufinger H, Leppanen H. Iliac crest donor site morbidity following open and closed methods of bone harvest for alveolar cleft osteoplasty. *J Craniomaxillofac Surg* 2000; 28 (1): 31-38.
51. Fallon P, Gentry T, Balber AE, Boulware D, Janssen WE, Smilee R, Storms RW, Smith C. Mobilized peripheral blood SSCloALDHbr cells have the phenotypic and functional properties of primitive haematopoietic cells and their number correlates with engraftment following autologous transplantation. *Br J Haematol.* 2003; 122(1): 99-108.
52. Farahmand P, Lai TY, Weisel RD, Fazel S, Yau T, Menasche P, Li RK. Skeletal myoblasts preserve remote matrix architecture and global function when implanted early or late after coronary ligation into infarcted or remote myocardium. *Circulation.* 2008; 118(14 Suppl): S130-137.
53. Fardeau M, Tomé FMS, Helbling-Leclerc A, Evangelista T, Ottolini A, Chevallay M, Barois A, Estournet B, Harpey J-P, Fauré S, Guicheney P, Hillaire D. Dystrophie musculaire congénitale avec déficience en mérosine: analyse clinique, histopathologique, immunocytochimique et génétique. *Rev Neurol* 1996; 152: 11-19.
54. Fedak PW. Paracrine effects of cell transplantation: modifying ventricular remodeling in the failing heart. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 2008; 20(2): 87-93.
55. Friedrich F, Dilanian G, Charron P, Isnard R, Chien KR, Eschenhagen T, Carrier L. Identification of a *Mef2c* gain of function mutation in the *Isl1* transcription factor in patients with familial cardiomyopathies (abstract). *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2009; 236, S1: 50.

56. Furling D, Coiffier L, Mouly V, Barbet JP, St Guily JL, Taneja K, Gourdon G, Junien C, Butler-Browne GS. Defective satellite cells in congenital myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet.* 2001; 10(19): 2079-2087.
57. Gabellini D, Green MR, Tupler R. Inappropriate gene activation in FSHD: a repressor complex binds a chromosomal repeat deleted in dystrophic muscle. *Cell* 2002; 110: 339-348.
58. Galvez BG, Sampaolesi M, Barbuti A, Crespi A, Covarello D, Brunelli S, Dellavalle A, Crippa S, Balconi G, Cuccovillo I, Molla F, Staszewsky L, Latini R, Difrancesco D, Cossu G. Cardiac mesoangioblasts are committed, self-renewable progenitors, associated with small vessels of juvenile mouse ventricle. *Cell Death Differ.* 2008; 15(9): 1417-1428.
59. Garry DJ, Olson EN. A common progenitor at the heart of development. *Cell.* 2006; 127(6): 1101-1104.
60. Genead R, Danielsson C, Andersson AB, Corbascio M, Franco-Cereceda A, Sylvén C, Grinnemo KH. Islet-1 Cells Are Cardiac Progenitors Present During the Entire Lifespan: From the Embryonic Stage to Adulthood. *Stem Cells Dev.* 2010 Aug 28.
61. Gneocchi M, He H, Liang OD, Melo LG, Morello F, Mu H, Noiseux N, Zhang L, Pratt RE, Ingwall JS, Dzau VJ. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med.* 2005; 11(4): 367-368.
62. Greelish JP, Su LT, Lankford EB, Burkman JM, Chen H, Konig SK, Mercier IM, Desjardins PR, Mitchell MA, Zheng XG, Leferovich J, Gao GP, Balice-Gordon RJ, Wilson JM, Stedman HH. Stable restoration of the sarcoglycan complex in dystrophic muscle perfused with histamine and a recombinant adeno-associated viral vector. *Nat Med.* 1999; 5(4): 439-443.
63. Guicheney P, Vignier N, Helbling-Leclerc A, Nissinen M, Zhang X, Cruaud C, Lambert JC, Richelme C, Topaloglu H, Merlini L, Barois A, Schwartz K, Tome FMS, Tryggvason K, Fardeau M. Genetics of Laminin alpha2 chain (or merosin) deficient Congenital Muscular Dystrophies: from identification of mutations to prenatal diagnosis. *Neuromusc Disord* 1997; 7: 187-190.
64. Gussoni E, Blau HM, Kunkel LM. The fate of individual myoblasts after transplantation into muscles of DMD patients. *Nat Med* 1997; 3: 970-977.
65. Habib M, Caspi O, Gepstein L. Human embryonic stem cells for cardiomyogenesis. *J Mol Cell Cardiol.* 2008; 45(4): 462-474.
66. Ham RG, St Clair JA, Webster C, Blau HM. Improved media for normal human muscle satellite cells: serum-free clonal growth and enhanced growth with low serum. *in vitro Cell Dev Biol.* 1988; 24(8): 833-844.
67. Helbling-Leclerc A, Zhang X, Topaloglu H, Cruaud C, Tesson F, Weissenbach J, Tomé FMS, Schwartz K, Fardeau M, Tryggvason K, Guicheney P. Mutations in the laminin a2-chain gene (LAMA2) cause merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *Nature Genetics* 1995; 11: 216-218.
68. Hegge JO, Wooddell CI, Zhang G, Hagstrom JE, Braun S, Huss T, Sebestyén MG, Emborg ME, Wolff JA. Evaluation of hydrodynamic limb vein injections in nonhuman primates. *Hum Gene Ther.* 2010; 21(7): 829-842.
69. Hess DA, Meyerrose TE, Wirthlin L, Craft TP, Herrbrich PE, Creer MH, Nolte JA. Functional characterization of highly purified human hematopoietic repopulating cells isolated according to aldehyde dehydrogenase activity. *Blood.* 2004; 104(6): 1648-1655.
70. Hess DA, Wirthlin L, Craft TP, Herrbrich PE, Hohm SA, Lahey R, Eades WC, Creer MH, Nolte JA. Selection based on CD133 and high aldehyde dehydrogenase activity

- isolates long-term reconstituting human hematopoietic stem cells. *Blood* 2006; 107(5): 2162-2169.
71. Hierlihy AM, Seale P, Lobe CG, Rudnicki MA, Megeney LA. The post-natal heart contains a myocardial stem cell population. *FEBS Lett.* 2002; 530(1-3): 239-243.
 72. Hirata Y, Sata M, Motomura N, Takanashi M, Suematsu Y, Ono M, Takamoto S. Human umbilical cord blood cells improve cardiac function after myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 327(2): 609-614.
 73. Hoffman EP, Brown RH, Kunkel LM. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 1987; 51: 919-928.
 74. Huard J, Bouchard JP, Roy R, Malouin F, Dansereau G, Labrecque C, Albert N, Richards CL, Lemieux B, Tremblay JP. Human myoblast transplantation: preliminary results of 4 cases. *Muscle Nerve* 1992; 15: 550-560.
 75. Huard J, Verreault S, Roy R, Tremblay M, Tremblay JP. High efficiency of muscle regeneration after human myoblast clone transplantation in SCID mice. *J Clin Invest* 1994; 93(2): 586-599.
 76. Irintchev A, Langer M, Zweyer M, Theisen R, Wernig A. Functional improvement of damaged adult mouse muscle by implantation of primary myoblasts. *J Physiol* 1997; 500 (Part 3): 775-785.
 77. Jiang M, He B, Zhang Q, Ge H, Zang MH, Han ZH, Liu JP, Li JH, Zhang Q, Li HB, Jin Y, He Q, Gong XR, Yin XY. Randomized controlled trials on the therapeutic effects of adult progenitor cells for myocardial infarction: meta-analysis. *Expert Opin Biol Ther.* 2010; 10(5): 667-680.
 78. Karlsson O, Thor S, Norberg T, Ohlsson H, Edlund T. Insulin gene enhancer binding protein Isl-1 is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain. *Nature* 1990; 344: 879-882.
 79. Kastan MB, Schlaffer E, Russo JE, Colvin OM, Civin CI, Hilton J. Direct demonstration of elevated aldehyde dehydrogenase in human hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1990; 75(10): 1947-1950.
 80. Kehat I, Khimovich L, Caspi O, Gepstein A, Shofti R, Arbel G, Huber I, Satin J, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L. Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2004; 22(10): 1282-1289.
 81. Kuang S, Gillespie MA, Rudnicki MA. Niche regulation of muscle satellite cell self-renewal and differentiation. *Cell Stem Cell.* 2008; 2(1): 22-31.
 82. Kuang S, Kuroda K, Le Grand F, Rudnicki MA. Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell* 2007; 129(5): 999-1010.
 83. Kuang W, Xu H, Vachon PH, Liu L, Loechel F, Wewer UM, Engvall E. Merosin-deficient congenital muscular dystrophy; partial genetic correction in two mouse models. *J Clin Invest* 1998; 102: 844-852.
 84. Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, Gruber P, Chen Y, Woodard S, Lin LZ, Cai CL, Lu MM, Reth M, Platoshyn O, Yuan JX, Evans S, Chien KR. Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature.* 2005; 433(7026): 647-653.
 85. Leivo I, Engvall E. Merosin, a protein specific for basement membranes of Schwann cells, striated muscle, and trophoblast, is expressed late in nerve and muscle development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988; 85: 1544-1548.
 86. Levy MM, Joyner CJ, Viridi AS, Reed A, Triffitt JT, Simpson AH, Kenwright J, Stein H, Francis MJ. Osteoprogenitor cells of mature human skeletal muscle tissue: an *in vitro* study. *Bone.* 2001; 29(4): 317-322.
 87. Lin SP, Brown JJ. MR contrast agents: physical and pharmacologic basics. *J Magn Reson Imaging* 2007; 25: 884-899.

88. Lioznov MV, Freiburger P, Kröger N, Zander AR, Fehse B. Aldehyde dehydrogenase activity as a marker for the quality of hematopoietic stem cell transplants. *Bone Marrow Transplant* 2005; 35(9): 909-914.
89. Lipinski MJ, Biondi-Zoccai GG, Abbate A, Khianey R, Sheiban I, Bartunek J, Vanderheyden M, Kim HS, Kang HJ, Strauer BE, Vetrovec GW. Impact of intracoronary cell therapy on left ventricular function in the setting of acute myocardial infarction: a collaborative systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *J Am Coll Cardiol.* 2007; 50(18): 1761-1767.
90. Logeart-Avramoglou D, Anagnostou F, Bizios R, Petite H. Engineering bone: challenges and obstacles. *J Cell Mol Med.* 2005 ; 9 (1) : 72-84.
91. Lunt P. Facioscapulohumeral muscular dystrophy: Diagnostic and molecular aspects. In: Deymeer F (ed). *Neuromuscular Diseases: From Basic Mechanisms to Clinical Management. Monographs in Clinical Neuroscience.* Karger, Basel, Freiburg, Paris, London, New York, New Delhi, Bangkok, Singapore, Tokyo, Sydney. 2000; 18: 44 – 60.
92. Lunt PW, Jardine PE, Koch MC, Maynard J, Osborn M, Williams M, Harper PS, Upadhyaya M. Correlation between fragment size at D4F104S1 and age at onset or at wheelchair use, with a possible generational effect, accounts for much phenotypic variation in 4q35-facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD). *Hum Mol Genet.* 1995; 4(5): 951-958.
93. Martin-Rendon E, Brunskill SJ, Hyde CJ, Stanworth SJ, Mathur A, Watt SM. Autologous bone marrow stem cells to treat acute myocardial infarction: a systematic review. *Eur Heart J.* 2008; 29(15): 1807-1818.
94. Mastrogiacomo M, Derubeis AR, Cancedda R. Bone and cartilage formation by skeletal muscle derived cells. *J Cell Physiol* 2005; 204(2): 594-603.
95. Mathiesen I. Electroporation of skeletal muscle enhances gene transfer *in vivo*. *Gene Therapy* 1999; 6: 508-514.
96. Mauritz C, Schwanke K, Reppel M, Neef S, Katsirntaki K, Maier LS, Nguemo F, Menke S, Hausteiner M, Hescheler J, Hasenfuss G, Martin U. Generation of functional murine cardiac myocytes from induced pluripotent stem cells. *Circulation.* 2008; 118(5): 507-517.
97. Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* 1961; 9: 493-495.
98. McMahon JM, Wells KE, Bamfo JE, Cartwright MA, Wells DJ. Inflammatory responses following direct injection of plasmid DNA into skeletal muscle. *Gene Ther.* 1998; 5(9): 1283-1290.
99. Meier H, MacPike AD. Myopathies caused by three mutations of the mouse. *J Heredity* 1977; 68: 383-385.
100. Meier H, Southard JL. Muscular dystrophy in the mouse caused by an allele at the dy locus. *Life Sciences* 1970; 9: 137-144.
101. Menasche P. Cardiac cell therapy: Lessons from clinical trials. *J Mol Cell Cardiol.* 2010 Jun 30. [Epub ahead of print]
102. Michelson AM, Russell ES, Harman PJ. Dystrophin muscularis: a hereditary primary myopathy in the house mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1955; 41: 1079-1084.
103. Mir LM, Bureau MF, Gehl J, Rangara R, Rouy D, Caillaud JM, Delaere P, Branellec D, Schwartz B, Scherman D. High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(8): 4262-4267.
104. Miyagoe Y, Hanaoka K, Nonaka I, Hayasaka M, Nabeshima Y, Arahata K, Nabeshima YI, Takeda S. Laminin alpha2 chain-null mutant mice by targeted disruption of the

- Lama2 gene : a new model of merosin (laminin 2)-deficient congenital muscular dystrophy. *FEBS Lett* 1997; 415, 33-39.
105. Moretti A, Caron L, Nakano A, Lam JT, Bernshausen A, Chen Y, Qyang Y, Bu L, Sasaki M, Martin-Puig S, Sun Y, Evans SM, Laugwitz KL, Chien KR. Multipotent embryonic isl1+ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification. *Cell*. 2006; 127(6): 1151-1165.
 106. Mouly V, Aamiri A, Périé S, Mamchaoui K, Barani A, Bigot A, Bouazza B, François V, Furling D, Jacquemin V, Negroni E, Riederer I, Vignaud A, St Guily JL, Butler-Browne GS. Myoblast transfer therapy: is there any light at the end of the tunnel? *Acta Myol*. 2005; 24(2): 128-133.
 107. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, Pasumarthi KB, Virag JI, Bartelmez SH, Poppa V, Bradford G, Dowell JD, Williams DA, Field LJ. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*. 2004; 428(6983): 664-668.
 108. Murry CE, Wiseman RW, Schwartz SM, Hauschka SD. Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. *J Clin Invest*. 1996; 98(11): 2512-2523.
 109. Nussbaum J, Minami E, Laflamme MA, Virag JA, Ware CB, Masino A, Muskheli V, Pabon L, Reinecke H, Murry CE. Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. *FASEB J*. 2007; 21(7): 1345-1357.
 110. Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussin V, Mishina Y, Pocius J, Michael LH, Behringer RR, Garry DJ, Entman ML, Schneider MD. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(21): 12313-12318.
 111. Partridge TA, Morgan JE, Coulton GR, Hoffman EP, Kunkel LM. Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts. *Nature* 337, 176-179, 1989.
 112. Peat RA, Smith JM, Compton AG, Baker NL, Pace RA, Burkin DJ, Kaufman SJ, Lamandé SR, North KN. Diagnosis and etiology of congenital muscular dystrophy. *Neurology*. 2008; 71(5): 312-321.
 113. Péault B, Rudnicki M, Torrente Y, Cossu G, Tremblay JP, Partridge T, Gussoni E, Kunkel LM, Huard J. Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy. *Mol Ther*. 2007; 15(5): 867-877.
 114. Perez-Illarbe M, Agbulut O, Pelacho B, Ciorba C, San Jose-Eneriz E, Desnos M, Hagege AA, Aranda P, Andreu EJ, Menasché P, Prósper F. Characterization of the paracrine effects of human skeletal myoblasts transplanted in infarcted myocardium. *Eur J Heart Fail*. 2008; 10(11): 1065-1072.
 115. Planat-Bénard V, Menard C, André M, Puceat M, Perez A, Garcia-Verdugo JM, Pénicaud L, Casteilla L. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circ Res*. 2004; 94(2): 223-229.
 116. Potter MA, Chang PL. Review--the use of immunosuppressive agents to prevent neutralizing antibodies against a transgene product. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 875: 159-174.
 117. Pouly J, Bruneval P, Mandet C, Proksch S, Peyrard S, Amrein C, Bousseaux V, Guillemain R, Deloche A, Fabiani JN, Menasché P. Cardiac stem cells in the real world. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2008; 135(3): 673-678.
 118. Povsic TJ, Zavodni KL, Kelly FL, Zhu S, Goldschmidt-Clermont PJ, Dong C, Peterson ED. Circulating progenitor cells can be reliably identified on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *J Am Coll Cardiol*. 2007; 50(23): 2243-2248.

119. Psaltis PJ, Zannettino AC, Worthley SG, Gronthos S. Concise review: mesenchymal stromal cells: potential for cardiovascular repair. *Stem Cells*. 2008 (9) :2201-2210.
120. Radde-Gallwitz K, Pan L, Gan L, Lin X, Segil N, Chen P. Expression of Islet1 marks the sensory and neuronal lineages in the mammalian inner ear. *J Comp Neurol*. 2004; 477(4): 412-421.
121. Ragot T, Vincent N, Chafey P, Vigne E, Gilgenkrantz H, Couton D, Cartaud J, Briand P, Kaplan JC, Perricaudet M, Kahn A. Efficient adenovirus-mediated transfer of a human minidystrophin gene to skeletal muscle of mdx mice. *Nature* 1993; 361: 647-650.
122. Reimann J, Brimah K, Schröder R, Wernig A, Beauchamp JR, Partridge TA. Pax7 distribution in human skeletal muscle biopsies and myogenic tissue cultures. *Cell Tissue Res* 2004; 315(2): 233-242.
123. Rubart M, Pasumarthi KB, Nakajima H, Soonpaa MH, Nakajima HO, Field LJ. Physiological coupling of donor and host cardiomyocytes after cellular transplantation. *Circ Res*. 2003; 92(11): 1217-1224.
124. 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, Cossu G. Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature*. 2006; 444(7119): 574-579.
125. Sharp NJ, Kornegay JN, Van Camp SD, Herbstreith MH, Secore SL, Kettle S, Hung WY, Constantinou CD, Dykstra MJ, Roses AD, et al. An error in dystrophin mRNA processing in golden retriever muscular dystrophy, an animal homologue of Duchenne muscular dystrophy. *Genomics*. 1992; 13(1): 115-121.
126. Shefer G, M. Wleklinski-Lee, Z. Yablonka-Reuveni. Skeletal muscle satellite cells can spontaneously enter an alternative mesenchymal pathway, *J. Cell Sci*. 2004; 117: 5393-5404.
127. Sherwood RI, Christensen JL, Conboy IM, Conboy MJ, Rando TA, Weissman IL, Wagers AJ. Isolation of adult mouse myogenic progenitors: functional heterogeneity of cells within and engrafting skeletal muscle. *Cell* 2004; 119(4): 543-554.
128. Sicinski P, Geng Y, Ryder-Cook AS, Barnard EA, Darlison MG, Barnard PJ. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science*. 1989; 244(4912): 1578-1580.
129. Sinanan AC, Hunt NP, Lewis MP. Human adult craniofacial muscle-derived cells: neural-cell adhesion-molecule (NCAM; CD56)-expressing cells appear to contain multipotential stem cells. *Biotechnol Appl Biochem*. 2004; 40(Pt 1): 25-34.
130. Skuk D, Roy B, Goulet M, Chapdelaine P, Bouchard JP, Roy R, Dugré FJ, Lachance JG, Deschênes L, Hélène S, Sylvain M, Tremblay JP. Dystrophin expression in myofibers of Duchenne muscular dystrophy patients following intramuscular injections of normal myogenic cells. *Mol Ther*. 2004; 9(3): 475-482.
131. Skuk D, Caron NJ, Goulet M, Roy B, Tremblay JP. Resetting the problem of cell death following muscle-derived cell transplantation: detection, dynamics and mechanisms. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003; 62(9): 951-967.
132. Skuk D, Goulet M, Roy B, Chapdelaine P, Bouchard JP, Roy R, Dugré FJ, Sylvain M, Lachance JG, Deschênes L, Senay H, Tremblay JP. Dystrophin expression in muscles of duchenne muscular dystrophy patients after high-density injections of normal myogenic cells. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006; 65(4): 371-386.
133. Skuk D, Goulet M, Roy B, Tremblay JP. Efficacy of myoblast transplantation in nonhuman primates following simple intramuscular cell injections: toward defining strategies applicable to humans. *Exp Neurol* 2002; 175: 112-126.

134. Skuk D, Goulet M, Roy B, Tremblay JP. Myoblast transplantation in whole muscle of non human primates. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000; 59: 197-206.
135. Skuk D, Roy B, Goulet M, Tremblay JP. Successful myoblast transplantation in primates depends on appropriate cell delivery and induction of regeneration in the host muscle. *Exp Neurol* 1999; 155: 22-30
136. Sophos NA, Vasiliou V. Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2002 update. *Chem Biol Interact* 2003; 143-144: 5-22.
137. Soubrier F, Cameron B, Manse B, Somarriba S, Dubertret C, Jaslin G, Jung G, Caer CL, Dang D, Mouvault JM, Scherman D, Mayaux JF, Crouzet J. pCOR: a new design of plasmid vectors for nonviral gene therapy. *Gene Ther.* 1999; 6(8): 1482-1488.
138. Stevens KN, Hakonarson H, Kim CE, Doevendans PA, Koeleman BP, Mital S, Raue J, Glessner JT, Coles JG, Moreno V, Granger A, Gruber SB, Gruber PJ. Common variation in ISL1 confers genetic susceptibility for human congenital heart disease. *PLoS One.* 2010; 5(5): e10855.
139. Stewart S, MacIntyre K, Hole DJ, Capewell S, McMurray JJ. More 'malignant' than cancer? Five-year survival following a first admission for heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2001; 3(3): 315-322.
140. Storms RW, Green PD, Safford KM, Niedzwiecki D, Cogle CR, Colvin OM, Chao NJ, Rice HE, Smith CA. Distinct hematopoietic progenitor compartments are delineated by the expression of aldehyde dehydrogenase and CD34. *Blood.* 2005; 106(1): 95-102.
141. Sun Y, Liang X, Najafi N, Cass M, Lin L, Cai CL, Chen J, Evans SM. Islet 1 is expressed in distinct cardiovascular lineages, including pacemaker and coronary vascular cells. *Dev Biol.* 2007; 304(1): 286-296.
142. Suzuki K, Murtuza B, Beauchamp JR, Smolenski RT, Varela-Carver A, Fukushima S, Copen SR, Partridge TA, Yacoub MH. Dynamics and mediators of acute graft attrition after myoblast transplantation to the heart. *FASEB J.* 2004; 18(10): 1153-1155.
143. Tambara K, Sakakibara Y, Sakaguchi G, Lu F, Premaratne GU, Lin X, Nishimura K, Komeda M. Transplanted skeletal myoblasts can fully replace the infarcted myocardium when they survive in the host in large numbers. *Circulation.* 2003; 108 Suppl 1: II259-263.
144. Tawil R, Forrester J, Griggs RC, Mendell J, Kissel J, McDermott M, King W, Weiffenbach B, Figlewicz D. Evidence for anticipation and association of deletion size with severity in facioscapulohumeral muscular dystrophy. The FSH-DY Group. *Ann Neurol.* 1996; 39(6): 744-748.
145. Tedesco FS, Dellavalle A, Diaz-Manera J, Messina G, Cossu G. Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. *J Clin Invest.* 2010; 120(1): 11-19.
146. Terrovitis J, Stuber M, Youssef A, Preece S, Leppo M, Kizana E, Schär M, Gerstenblith G, Weiss RG, Marbán E, Abraham MR. Magnetic resonance imaging overestimates ferumoxide-labeled stem cell survival after transplantation in the heart. *Circulation.* 2008; 117(12): 1555-1562.
147. Tezak Z, Prandini P, Boscaro M, Marin A, Devaney J, Marino M, Fanin M, Trevisan CP, Park J, Tyson W, Finkel R, Garcia C, Angelini C, Hoffman EP, Pegoraro E. Clinical and molecular study in congenital muscular dystrophy with partial laminin alpha 2 (LAMA2) deficiency. *Hum Mutat.* 2003; 21(2): 103-111.
148. Tomé FMS, Evangelista T, Leclerc A, Sunada Y, Manole E, Estournet B, Barois A, Campbell KP, Fardeau M. Congenital muscular dystrophy with merosin deficiency. *C R Acad Sci Paris* 1994; 317: 351-357.
149. Torrente Y, M. Belicchi, C. Marchesi, G. Dantona, F. Cogiமானian, F. Pisati, M. Gavina, R. Giordano, R. Tonlorenzi, G. Fagiolari, C. Lamperti, L. Porretti, R. Lopa, M.

- Sampaolesi, L. Vicentini, N. Grimoldi, F. Tiberio, V. Songa, P. Baratta, A. Prella, L. Forzenigo, M. Guglieri, O. Pansarasa, C. Rinaldi, V. Mouly, G.S. Butler-Browne, G.P. Comi, P. Biondetti, M. Moggio, S.M. Gaini, N. Stocchetti, A. Priori, M.G. D'Angelo, A. Turconi, R. Bottinelli, G. Cossu, P. Rebullia, N. Bresolin, Autologous transplantation of muscle-derived CD133+ stem cells in Duchenne muscle patients, *Cell Transplant.* 2007; 16: 563-577.
150. Tremblay JP, Malouin F, Roy R, Huard J, Bouchard JP, Satoh A, Richards CL. Results of a triple blind clinical study of myoblast transplantations without immunosuppressive treatment in young boys with Duchenne muscular dystrophy. *Cell Transplantation* 1993; 2: 99-112.
151. Tripathy SK, Black HB, Goldwasser E, Leiden JM. Immune responses to transgene-encoded proteins limit the stability of gene expression after injection of replication-defective adenovirus vectors. *Nature Medicine* 1996; 2: 545-550.
152. Trollet C, Athanasopoulos T, Popplewell L, Malerba A, Dickson G. Gene therapy for muscular dystrophy: current progress and future prospects. *Expert Opin Biol Ther.* 2009; 9(7): 849-866.
153. Turner C, Hilton-Jones D. The myotonic dystrophies: diagnosis and management. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2010; 81(4): 358-367.
154. Vachon PH, Loechel F, Xu H, Wewer UM, Engvall E. Merosin and laminin in myogenesis; specific requirement for merosin in myotube stability and survival. *J Cell Biol* 1996; 134: 1483-1497.
155. van der Maarel SM, Deidda G, Lemmers RJ, van Overveld PG, van der Wielen M, Hewitt JE, Sandkuijl L, Bakker B, van Ommen GJ, Padberg GW, Frants RR. De novo facioscapulohumeral muscular dystrophy: frequent somatic mosaicism, sex-dependent phenotype, and the role of mitotic transchromosomal repeat interaction between chromosomes 4 and 10. *Am J Hum Genet.* 2000; 66(1): 26-35.
156. Vulliet PR, Greeley M, Halloran SM, MacDonald KA, Kittleson MD. Intra-coronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs. *Lancet.* 2004; 363(9411): 783-784.
157. Wagers AJ, Conboy IM. Cellular and molecular signatures of muscle regeneration: current concepts and controversies in adult myogenesis. *Cell* 2005; 122(5): 659-667.
158. Webster C, Blau HM. Accelerated age-related decline in replicative life-span of Duchenne muscular dystrophy myoblasts: implications for cell and gene therapy. *Somat Cell Mol Genet* 1990; 16: 557-565.
159. Webster C, Pavlath GK, Parks DR, Walsh FS, Blau HM. Isolation of human myoblasts with the fluorescence-activated cell sorter. *Exp Cell Res.* 1988; 174(1): 252-265.
160. Williams JT, Southerland SS, Souza J, Calcutt AF, Cartledge RG. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. *Am Surg* 1999; 65(1): 22-26.
161. Winitsky SO, Gopal TV, Hassanzadeh S, Takahashi H, Gryder D, Rogawski MA, Takeda K, Yu ZX, Xu YH, Epstein ND. Adult murine skeletal muscle contains cells that can differentiate into beating cardiomyocytes *in vitro*. *PLoS Biol.* 2005; 3(4): e87.
162. Winokur ST, Barrett K, Martin JH, Forrester JR, Simon M, Tawil R, Chung SA, Masny PS, Figlewicz DA. Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) myoblasts demonstrate increased susceptibility to oxidative stress. *Neuromuscul Disord.* 2003; 13(4): 322-333.
163. Winokur ST, Chen YW, Masny PS, Martin JH, Ehmsen JT, Tapscott SJ, van der Maarel SM, Hayashi Y, Flanigan KM. Expression profiling of FSHD muscle supports a defect in specific stages of myogenic differentiation. *Hum Mol Genet.* 2003; 12(22): 2895-2907.

164. Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science* 1990; 247: 1465-1468.
165. Xu H, Christmas P, Wu XR, Wewer UM, Engvall E. Defective muscle basement membrane and lack of M-laminin in the dystrophic dy/dy mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 5572-5576a.
166. Xu H, Wu XR, Wewer UM, Engvall E. Murine muscular dystrophy caused by a mutation in the laminin alpha2 (Lama2) gene. *Nature Genetics* 1994; 8: 297-302.
167. Yaffe D, Saxel O. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature*. 1977; 270(5639): 725-727.
168. Yaffe D. Retention of differentiation potentialities during prolonged cultivation of myogenic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1968; 61(2): 477-483.
169. Yoon YS, Park JS, Tkebuchava T, Luedeman C, Losordo DW. Unexpected severe calcification after transplantation of bone marrow cells in acute myocardial infarction. *Circulation*. 2004; 109(25): 3154-3157.
170. Yoshida A, Rzhetsky A, Hsu LC, Chang C. Human aldehyde dehydrogenase gene family. *Eur J Biochem* 1998; 251(3): 549-557.
171. Young HE, Steele TA, Bray RA, Hudson J, Floyd JA, Hawkins K, Thomas K, Austin T, Edwards C, Cuzzourt J, Duenzl M, Lucas PA, Black AC Jr. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat Rec*. 2001; 264(1): 51-62.
172. Young HE, Steele TA, Bray RA, Detmer K, Blake LW, Lucas PW, Black AC Jr. Human pluripotent and progenitor cells display cell surface cluster differentiation markers CD10, CD13, CD56, and MHC class-I. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1999; 221(1): 63-71.
173. Yuan S, Schoenwolf GC. Islet-1 marks the early heart rudiments and is asymmetrically expressed during early rotation of the foregut in the chick embryo. *Anat Rec*. 2000; 260(2): 204-207.
174. Zammit PS, Golding JP, Nagata Y, Hudon V, Partridge TA, Beauchamp JR. Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? *J Cell Biol* 2004; 166(3): 347-357.
175. Zaruba MM, Soonpaa M, Reuter S, Field LJ. Cardiomyogenic potential of C-kit(+)-expressing cells derived from neonatal and adult mouse hearts. *Circulation*. 2010; 121(18): 1992-2000.
176. 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, Péault B. Prospective identification of myogenic endothelial cells in human skeletal muscle. *Nat Biotechnol*. 2007; 25(9): 1025-1034.

E. Copies des diplômes.

E.1. Doctorat en Sciences de l'Université Louis Pasteur, Strasbourg



CERTIFICAT

Le Chef de la Division Scolarité de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg, soussigné, certifie que

Monsieur VILQUIN Jean-Thomas

né(e) le **27 octobre 1964**

à **TUNIS**

département ou pays **TUNISIE**

a obtenu le **12 mars 1992** devant l'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR DE STRASBOURG, le grade de **DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG I, en BIOLOGIE ET PHARMACOLOGIE CELLULAIRES** avec la mention **TRES HONORABLE**

En foi de quoi, le présent certificat lui est délivré.

Copie certifiée conforme à l'original qui nous a été présenté

Strasbourg, le

- 9 SEP. 1994



Le Maire,
p.d.

Strasbourg, le 17 mars 1992

Le Chef de la Division Scolarité



A. NONNENMACHER

NOTA. Il n'est pas délivré de duplicata de ce certificat. Il appartient au titulaire d'établir lui-même et de faire certifier conformes par la Mairie de son domicile les copies qui peuvent lui être nécessaires.

E.2. Doctorat d'Etat en Pharmacie, Strasbourg

Université Louis Pasteur
FACULTE DE PHARMACIE

CERTIFICAT PROVISOIRE

de réception au
**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR
EN PHARMACIE**

Nous, Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg, certifions que :

Monsieur VILQUIN Jean Thomas

né(e) le 27 octobre 1964 à TUNIS (Tunisie)

a été admis(e), le 5 Janvier 1993 au

Copie certifiée conforme à l'original qui nous a été présenté

Strasbourg le

- 6 JAN. 1993



Le Doyen,
p.d.

**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN
PHARMACIE**

Le présent certificat, timbré du sceau de la Faculté, a été délivré à l'impétrant, à titre provisoire en attendant la remise du Diplôme.

Fait à Strasbourg, le 14 Janvier 1993

Le Doyen

D. GERARD



Le Responsable des Services
Administratifs

A. RIGAUD

Nota : Le diplôme sera remis contre ce certificat provisoire. En cas de perte, le diplôme ne peut être retiré qu'en vertu d'une autorisation de M. le Ministre qu'il incombe à l'intéressé de solliciter. Le titulaire qui a retiré son certificat provisoire ou son diplôme n'a plus droit à aucun certificat.

E.3. Unité de Valeur en Immunologie, Université Louis Pasteur, Strasbourg



CERTIFICAT

Le Chef de la Division Scolarité de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg, soussigné, certifie que

Monsieur Jean-Thomas V I L L Q U I N

né(e) le 27 Octobre 1964 à T U N I S

département ou pays TUNISIE

est titulaire de l'UNITE DE VALEUR SUIVANTE :

IMMUNOLOGIE (Assez-Bien) obtenue en Juin 1988

Copie certifiée conforme à l'original qui nous a été présenté.
Strasbourg, le - 5 JAN. 1997
Le Maire,
P.M.

En foi de quoi, le présent certificat lui est délivré.



Strasbourg, le 22 Novembre 1990
Le Chef de la Division Scolarité

A. NONNENMACHER

NOTA - Il n'est pas délivré de duplicata de ce certificat. Il appartient au titulaire d'établir lui-même et de faire certifier conformes par la Mairie de son domicile les copies qui peuvent lui être nécessaires.

E.4. Monitorat de l'Enseignement Supérieur, Université Louis Pasteur, Strasbourg

Académie de Strasbourg

STRASBOURG LE 13 juin 1991

Centre d'initiation à l'enseignement supérieur

3 RUE DE ROME 67000 STRASBOURG
TEL. 88.41.74.01

LE DIRECTEUR

CERTIFICAT

En application de l'arrêté du 23 novembre 1990 relatif aux stages organisés à l'intention des moniteurs de l'Enseignement Supérieur, le Directeur du Centre d'Initiation à l'Enseignement Supérieur de l'Académie de Strasbourg, soussigné, atteste, au vu des listes d'émargement que :

Monsieur VILQUIN Jean-Thomas

a participé dans la proportion de 100 % aux stages de formation de l'année 1990-1991.

En outre, Monsieur VILQUIN a participé d'une façon active à la préparation des stages.



E. Trocme
Etienne TROCME

ADRESSE POSTALE : 22 RUE DESCARTES 67084 STRASBOURG CEDEX

F. Propositions des rapporteurs.

A l'étranger :

Laurent Bernheim : Département de Neurosciences Fondamentales, University of Geneva, Centre Médical Universitaire, CH-1211 Geneva 4, Switzerland.

Tel : 41 (22) 379 53 92 ; fax: 41 (22) 379 54 02

laurent.bernheim@unige.ch

Spécialités: Myogénèse, biologie cellulaire et régénération du muscle

Terry Partridge: Research Center for Genetic Medicine, Children's National Medical Center, 111 Michigan Ave NW, Washington, District of Columbia, USA.

Tel: +1 202-476-6029

tpartridge@cnmcresearch.org

Spécialités: Biologie cellulaire du muscle, pionnier en thérapie cellulaire et moléculaire des dystrophies musculaires

En Province :

Nicolas Ferry : INSERM U948, CHU Hotel Dieu, 44093 Nantes Cedex, France.

Tel.: 02 40 08 74 88; fax: 02 40 08 30 48.

nicolas.ferry@inserm.fr

Spécialités: thérapie génique et cellulaire des maladies hépatiques et musculaires

Luc Sensébé : Établissement Français du Sang Pyrénées-Méditerranée, UMR5273 STROMALab-INSERM U1031, 75, rue de Lisieux, 31300 Toulouse, France.

Tel : 05 62 17 08 91 ; fax : 05 62 17 09 05

luc.sensebe@efs.sante.fr

Spécialités: Directeur d'un EFS, validation de produit de thérapie cellulaire et usage pour des essais cliniques.

En Ile-De-France :

Hélène Gilgenkrantz : Endocrinology metabolism and cancer, Cochin Institute, INSERM U 1016, 24, rue du Faubourg Saint-Jacques, Paris 75014, France.

Tel : 01 44 41 24 72 ; fax : 01 44 41 24 21

helene.gilgenkrantz@inserm.fr

Spécialités: physiopathologie musculaire, thérapie génique, cellules souches.

Hervé Petite : INSERM UMR 7052 Biomatériaux et Biomécanique Ostéo-Articulaire, Faculté de médecine de Lariboisière Saint-Louis, 10 avenue de Verdun – 75010 Paris

Tel : 01 44 89 78 18 ; fax : 01 44 89 78 22

herve.petite@univ-paris-diderot.fr

Spécialités: ingénierie tissulaire, cellules souches, thérapie cellulaire ostéo-articulaire

Georges Uzan : INSERM U972, Bâtiment Lavoisier, Hôpital Paul Brousse, 12 avenue Paul Vaillant Couturier, 94807 Villejuif cedex, France

Tel: 01 45 59 52 67; Fax: 01 45 59 53 29

georges.uzan@inserm.fr

Spécialités: angiogénèse, cellules souches, essais cliniques de thérapie cellulaire.

Résumé en Anglais.

The set up of new therapeutic tools, along with the comprehension of the muscle biology, homeostasis and physiopathology, mandated the cellular investigation of muscle tissues. Within skeletal muscle, satellite cells and especially their progeny, the myoblasts, are of easy procurement and expansion from small muscle biopsies, and naturally able to participate to tissue regeneration through cell-cell fusion and formation of new or hybrid muscle fibers. Myoblast transplantation has been developed to repair striated muscles in animal models of various pathological conditions. Procedures were also established for producing human myoblasts for clinical use.

Heterologous approaches of myoblast transplantation have been used in the context of generalized degenerative diseases and allowed transferring a non-pathologic donor genome into the disabled recipient muscle fibers. One major drawback, immune rejection, required the set up of sustained immunosuppressive regimen, which were defined in various animal models of skeletal or cardiac muscle failures.

Autologous approaches were developed as localized repairs were mandated. Cells were transferred from a clinically unaffected area to the disabled territory to increase the muscular regenerative capacity, and pre-clinical validation of the concept led to clinical trials for facioscapulohumeral and oculopharyngeal muscular dystrophies. But myoblast-based cell therapy has been also considered as a potential strategy to improve cardiac structure and function especially in the context of post-ischemic heart failure. The ability of myoblasts to repopulate infarcted myocardium upon intramyocardial injection has been documented in numerous animal models and prompted the set-up of phase I, then phase II clinical trials. Although the cardiologic success has been limited, this approach provided the first generation of cell therapy products for use in cardiac failure.

Whatever the immunological context, myoblast transplantation is still hampered by several issues, mainly the poor survival and the limited migratory ability of the cells. Research ways aim at refining the indications, improving the delivery systems, and considering associations of cell types with supporting biomaterials or growth factors.

Meanwhile, the presence of several cell types within skeletal muscle tissue has been further documented, according to the expression of extracellular markers *in situ*. Classical MSC markers and additional ones are expressed by resident muscle cells, which were classified according to their position relatively to muscle fibers, basement membranes, and intramuscular vessels. The main cell populations, their chronological evolution *in vitro*, their potential relationship or filiation, and the evolution with time of their phenotypical markers and differentiation abilities were described from the onset of cell culture. Then, within endomysial tissue, Aldehyde Dehydrogenase-positive cell populations (ALDH+) were described. ALDH activity is one hallmark of human primitive progenitors presenting broad regeneration capacities *in vivo*. Two main sub-populations of low scatter/ALDH+ cells were discriminated according to CD34 expression, and only the ALDH+/CD34- fraction developed *in vitro* as a highly enriched population of CD56+ myoblasts able to form myotubes and to participate efficiently in muscle regeneration *in vivo* upon intramuscular transplantation. ALDH+ cells were also identified in skeletal and cardiac muscles in several animal species.

Future projects are based on the identification and further characterization of new classes of myogenic and/or cardiogenic progenitors, together with their investigation as new therapeutic tools for neuromuscular or cardiac diseases. The approaches will gather several fields such as cell biology (cell culture, phenotyping), molecular biology (characterizations), cell therapy (standardization of production and batches), myology, cardiology, immunology, histology, imagery. A large number of these competences are housed on the site of the University and its hospital. The harmonization of expertises and of characterizations, the standardization of means and products will become obliged pathways on biological, clinical and industrial levels.

Copies de 5 articles représentatifs.

- 1. Vilquin et al., J Cell Biol 1995.**
- 2. Vilquin et al., Gene Ther 2001.**
- 3. LMenasché et al., Lancet 2001**
- 4. Vilquin et al., Gene Ther 2005.**
- 5. Vauchez et al., Mol Ther 2009.**

Successful Histocompatible Myoblast Transplantation in Dystrophin-deficient mdx Mouse Despite the Production of Antibodies against Dystrophin

Jean-Thomas Vilquin,* Eric Wagner,[‡] Ikuo Kinoshita,* Raynald Roy,[‡] and Jacques P. Tremblay*

*Centre de Recherche en Neurobiologie de l'Université Laval, Hôpital de l'Enfant-Jésus, Québec, P. Q., Canada G1J 1Z4; and [‡]Centre de Recherche en Rhumatologie et Immunologie, Centre Hospitalier de l'Université Laval, Ste-Foy, P. Q., Canada G1V 4G2

Abstract. Myoblast transplantation has been considered a potential treatment for some muscular disorders. It has proven very successful, however, only in immunodeficient or immunosuppressed mice. In this study, myoblasts from C57BL10J +/+ mice were transplanted, with no immunosuppressive treatment, in the tibialis anterior of fully histocompatible but dystrophin-deficient C57BL10J mdx/mdx mice. One to 9 months after transplantation, the success of the graft was evaluated by immunohistochemistry. All the transplanted mice ($n = 24$) developed dystrophin-positive fibers following transplantation. Depending on myoblast cultures, transplantations, and time of analysis, the mice presented 15 to 80% of dystrophin-positive fibers in transplanted muscles. These fibers were correctly oriented and they were either from donor or hybrid origin. The dystrophin-positive fibers remained stable up to 9 months.

Possible humoral and cellular immune responses were investigated after grafting. Antibodies directed against dystrophin and/or muscle membrane were developed by 58% of the mice as demonstrated by immunohistochemistry and Western blotting. Despite the presence of these antibodies, dystrophin-positive fibers were still present in grafted muscles 9 months after transplantation. Moreover, the muscles did not show massive infiltration by CD4 cells, CD8 cells, or macrophages, as already described in myoblast allotransplantations. This lack of rejection was attributed to the sequestered nature of dystrophin after fiber formation. These results indicate that myoblast transplantation leads to fiber formation when immunocompetent but fully histocompatible donors and recipients are used and that dystrophin incompatibility alone is not sufficient to induce an immunological rejection reaction.

SKELETAL muscle fibers are multinucleated giant syncytia formed during embryogenesis and growth by the fusion of hundreds or even thousands of precursor cells named myoblasts (Allbrook, 1981; Campion, 1984). Some of these myoblasts do not immediately participate in the fusion process but remain attached to muscle fibers under the basal lamina sheet as quiescent stem cells; these are termed satellite cells, and their role is to contribute to fiber regeneration after metabolic or mechanical lesions (Campion, 1984). This biological particularity has been used during the last 15 years in attempts to alleviate some muscular genetic diseases, such as Duchenne muscular dystrophy (DMD)¹ (Law et al., 1990; Partridge, 1991;

Karpati et al., 1993; Tremblay et al., 1993). Moreover, the implantation of genetically modified myoblasts has been explored for the treatment of genetic, inherited metabolic deficiencies (Blau et al., 1993).

The mdx mouse, which constitutively lacks full-length dystrophin (Dys) expression because of a single-point mutation (Sicinski et al., 1989), is a good biochemical animal model for DMD and has been widely used to test the efficacy of various transplantation protocols, and successful myoblast transplantation procedures in mdx mice were first reported by the group of Partridge et al. (1989). After injection, the normal myoblasts containing the normal Dys gene fuse together and/or with host myoblasts to form muscle fibers expressing Dys (Karpati et al., 1989; Partridge et al., 1989; Morgan et al., 1990, 1993; Huard et al., 1994a,b; Kinoshita et al., 1994a,b).

Address correspondence to J. P. Tremblay, Centre de Recherche en Neurobiologie de l'Université Laval, Hôpital de l'Enfant-Jésus, 1401, 18e Rue, Québec, P. Q., Canada G1J 1Z4. Ph.: (418) 649-5593. Fax: (418) 649-5910.

1. *Abbreviations used in this paper.* Ab, antibody(ies); DMD, Duchenne muscular dystrophy; Dys, dystrophin; EDL, extensor digitorum longus;

MHC, major histocompatibility complex; NK, natural killer; TA, tibialis anterior.

To date, the results obtained in human clinical trials have been disappointing. Dys-positive fibers have been obtained in some patients (Huard et al., 1991, 1992; Law et al., 1990; Tremblay et al., 1993), and the normal Dys-coding mRNA has been found in two patients after transplantation (Gussoni et al., 1992). Transient strength increases have been reported (Tremblay et al., 1993). Some patients developed antibodies (Ab) directed against donor myoblasts and myotubes, even when donors and recipients were matched for class I and class II (DR) histocompatibility antigens (Huard et al., 1992; Roy et al., 1993; Tremblay et al., 1993). In some cases, Ab were capable of fixing complement proteins, thus lysing the target cells in vitro (Tremblay et al., 1993). Some of the Ab detected in the plasma were directed against donor Dys (Huard et al., 1992; Tremblay et al., 1993). These problems raised the question of the role of the immune system in myoblast transplantations. In the mouse, rejection is very rapid and efficient after major histocompatibility complex (MHC)-incompatible cell transplantation and involves both cellular and humoral immunity (Grounds et al., 1980; Watt et al., 1984; Guérette et al., 1995; Huard et al., 1994a; Kinoshita et al., 1994b; Vilquin et al., 1994, 1995a,c). In some studies, the recipients were immunodeficient mice (nude/mdx mice; Partridge et al., 1989; Morgan et al., 1990, 1993, 1994), or tolerized mice (Grounds et al., 1980; Watt et al., 1982). Only partial success has been achieved using H2-compatible mice (Watt et al., 1984; Law et al., 1988b; Partridge et al., 1989; Labrecque et al., 1992). Various immunosuppressive agents or combinations have also been employed or compared (Watt et al., 1984; Law et al., 1988a; Karpati, 1990; Labrecque et al., 1992; Huard et al., 1994a; Kinoshita et al., 1994a,b; Vilquin et al., 1994, 1995a,c).

The number and viability of injected myoblasts, together with the injection protocol and pretreatment of the muscle, are important problems to consider in animal models. Immunological reactions, however, have to be understood and controlled because they should compromise myoblast transplantation whatever the protocol. In the present study, we addressed the question of the role of normal Dys itself in graft acceptance or rejection in the mouse. We used fully histocompatible animals. The only difference between these donors and recipients was the presence in donor myoblasts of the full-length normal Dys gene. As normal Dys protein expression would result in the presentation of new antigens to the recipient mouse, we wondered whether this new antigenicity could trigger an efficient immune reaction against fibers formed in part by the donor myoblasts, leading to rejection. We showed evidence of long-term implantation success but also the production of Ab directed against Dys. These Ab were unable to participate in short-term or long-term efficient rejection of the muscle fibers expressing normal Dys. This lack of rejection was attributed to the sequestered nature of the antigens after fiber formation. These results are relevant to the general aims of normal or genetically modified cell transplantation in experimental animal models.

Materials and Methods

Cell Cultures

Mouse primary myoblast cultures were obtained from newborn skeletal

muscle biopsies (Cossu et al., 1980; Vilquin et al., 1992). Briefly, the mice were killed, and the arms and legs skinned and cut into 1 mm³ fragments, which were dissociated at 37°C under magnetic stirring, initially with collagenase (600 IU/ml for 1 h; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) and then with trypsin (0.1% wt/vol for 30 min; GIBCO BRL, Gaithersburg, MD), dissolved in Ca²⁺-Mg²⁺-free HBSS. Each animal yielded 12–15 × 10⁶ cells. The cell suspension was grown in 199 medium supplemented with 15% FBS and a mixture of penicillin G (10,000 IU/ml) and streptomycin (10 mg/ml). Cells were harvested at 70% confluence, that is, 2 d after plating, either for immediate grafting or for freezing until grafting. Preliminary experiments indicated that frozen myogenic cells were as good as fresh cultures for transplantation in mice. Freezing was performed in 199 medium containing 15% FBS and 10% DMSO. Different batches of primary cell cultures have been used for this work. Desmin immunoperoxidase labelling indicated that the primary cultures contained, in general, 30–40% myoblasts at the time of injection (personal results). The mice transplanted with different cell batches have been gathered under the letters A, B, C, and D.

Animals

Inbred normal C57BL/10SnJ *+/+* and C57BL/10ScSn *mdx/mdx* mice (*mdx*) were purchased from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME) and reproduced in our animal facilities. Primary myoblast cultures from newborn *+/+* mice were transplanted in 26 male *mdx* mice, 2–3 mo of age. This work was authorized by Laval University Animal Care Committee and conducted according to the Canadian Council on Animal Care.

Cell Transplantations

3 d before transplantation, the left hind legs of the *mdx* mice were Cobalt-irradiated (20 Gy). This level of irradiation has been shown to block host myoblast proliferation (Wakeford et al., 1991), thus making the *mdx* mouse a closer model to DMD patients. 1 d before transplantation, the left tibialis anterior (TA) was exposed and injected with 10 μl of notexin venom (5 μg/ml), which has been shown to trigger muscle fiber degeneration without damaging myoblasts (Harris et al., 1975). On the day of transplantation, the cells were harvested by trypsinization or thawed, washed three times in HBSS, and concentrated as pellets. Cell viability was assessed using trypan blue staining. The left TA muscles were exposed and injected with ~4 × 10⁶ viable cells suspended in 10 μl of HBSS. Mice from group A received fresh cultures, and mice from other groups received frozen cells.

Blood and Muscle Collections

2–37 wk after transplantation, the host mice were killed under deep anesthesia by intracardiac perfusion using sodium chloride (0.9%) containing heparin (2 IU/ml; Leo Laboratories, Ajax, ONT, Canada). Plasma were separated by centrifugation from the first 2 ml of perfusates. Grafted and contralateral untreated TA and extensor digitorum longus (EDL) were collected and immersed in a sucrose solution (30% wt/vol) overnight at 4°C. Muscles were embedded in OCT compound, frozen in liquid nitrogen, and serially sectioned at 8 μm using a Zeiss cryostat. Series of sections were separated by 180 μm. Blood was also obtained from some mice at different times after grafting by retro-orbital puncture.

Dystrophin Immunohistochemistry

The endogenous peroxidase activity was first blocked in muscle sections using 1% hydrogen peroxide for 30 min. Nonspecific Ig binding was then blocked with a 10% serum mixture (i.e., containing 3.3% rabbit serum, 3.3% horse serum and 3.3% FCS) in PBS. The R27 polyclonal sheep Ab against a 60-kD Dys antigen (Hoffman et al., 1987; kind gift of Genica Co, Boston, MA) was used 1/1,000 in 1% serum mixture in PBS for 1 h. The second Ab was a peroxidase-conjugated rabbit anti-sheep Ig (Dako, Copenhagen, Denmark). Binding was revealed with DAB (0.5 mg/ml; Sigma Chemical Co.) and 0.015% hydrogen peroxide. Slides were mounted in PBS-glycerol. Dys expression was also confirmed on some sections using the mouse NCIDys1 mAb (1/40 for 1 h; NovoCastra, Newcastle upon Tyne, UK) directed against the rod domain of Dys or the mouse NCIDys2 mAb (NovoCastra) directed against the COOH-terminal domain. The second Ab was a rabbit anti-mouse Ig conjugated to peroxidase (Dako Corp.). Immunoperoxidase-positive and -negative fibers were counted by microscopic examination for each muscle on the section with apparently the most positive fibers.

Research of Anti-Dys Ab

TA sections from a normal mouse and an mdx mouse were juxtaposed on the same slide. The presence (normal mouse) or absence (mdx mouse) of Dys was demonstrated using R27, NCI1Dys1, or NCI1Dys2 as described above. Instead of these Ab, plasma from grafted mice was used on other slides at a dilution 1/40 and/or 1/400. The second Ab was a rabbit anti-mouse Ab conjugated either to biotin or to peroxidase (1/100 for 1 h; Dako Corp.). The peroxidase activity was revealed with DAB. The presence of biotin was detected using FITC-streptavidin (1/200 for 30 min; Caltag, San Francisco, CA). Negative controls were obtained either by omitting the first antibody or plasma or by using the plasma from 12 naive male mdx mice aged 2–10 mo instead of the grafted mouse plasma.

The reaction of some mouse plasma against their own revertant fibers was also analyzed. Serial sections of TA muscles from the contralateral, nongrafted leg of the mouse were incubated with R27, NCI1Dys1, NCI1Dys2, or the mouse own plasma using the same protocol as described above. Some clusters of revertant fibers were identified and compared.

Western Blotting and Immunoblotting

To determine the molecular weight of the antigens recognized by Ab formed in recipient mice, Western blotting assays were performed. Protein extracts were obtained from one normal and one mdx, both naive, male mice. Skeletal muscles were solubilized in 0.3% SDS. 20 µg protein samples were solubilized in sample buffer by heating at 100°C for 5 min, and separated on a 6% T-SDS-PAGE gel overlaid with a 3.5% T-stacking gel by applying a current of 40 mA for ~3 h at 4°C. Electrophoretic transfer was performed onto a nitrocellulose membrane using a semi-dry technique (Multiphor II Electrophoresis Unit; Pharmacia LKB, Piscataway, NJ) with a current of 0.8 mA/cm² for 90 min. Antibody reactivity was assessed using an immunoblotting technique. Nitrocellulose strips were incubated overnight at 4°C with PBS containing 10% nonfat dried milk, 0.2% Tween 20 and 5% normal horse serum to block nonspecific binding sites. They were then incubated with recipient plasma diluted 1:50 in PBS containing 0.2% Tween 20 and 1% normal horse serum for 90 min under agitation. After several washes in PBS containing 0.05% Tween 20, strips were incubated for 90 min in a 1:500 dilution of horse anti-mouse IgG labeled with biotin (Vector Laboratories, Burlingame, CA). The reaction was followed by another 60-min incubation in the presence of a 1:750 dilution of streptavidin-alkaline phosphatase (Zymed, San Francisco, CA). Alkaline phosphatase was revealed using NBT-BCIP (GIBCO BRL) in Tris buffer (pH 9.5). Reactions were stopped by washing with 20 mM EDTA and the strips were photographed immediately. The presence of Dys in the samples was determined using NCI1Dys1 mAb and R27 polyclonal Ab.

The fine determination of high molecular weight is not easy in one-dimensional electrophoresis. Thus, in a second set of experiments, the positive plasma from mice B1, B3, B5, B6, B7, B8, C2, D1, D4, and D9 were used in the same electrophoresis preparation of normal mouse muscle extract. Strips for NCI1Dys1 and R27 were intercalated between the strips prepared for these plasma. This allowed to compare as exactly as possible the position of the bands stained by NCI1Dys1, R27, and the mice plasma.

Immunocytochemistry

Myogenic cells from C57BL/10SnJ ^{+/+} mice and from C57BL/10ScSn mdx/mdx mice were grown on 2% gelatin-coated plates for 3 d in 199 medium supplemented with 15% FBS. The concentration of FBS was then reduced to 7% to increase myoblast fusion. The 12-well culture plate was divided into two groups: (a) six wells were fixed and permeabilized with methanol at -20°C prior to first Ab or plasma incubation; and (b) six wells were fixed and permeabilized after such an incubation. Incubations were performed in 199 medium containing 1% blocking serum mixture. The mouse plasma were used at 1/40 dilution. Negative controls and further reaction steps have been described above. The second Ab was FITC-conjugated rabbit anti-mouse IgG (Dako Corp.). Incubations were performed at room temperature to avoid endocytosis by living cells. The mdx myotube cultures do not express Dys and were used as a control for non-specific Ig binding. A mouse anti-desmin mAb (Dako Corp.) was also used (1/100) on permeabilized and nonpermeabilized mdx myotube cultures to ascertain the efficacy of the protocol used to differentiate intra- and extracellular protein localization.

CD4 Cell, CD8 Cell, Macrophage, and Natural Killer Cell Immunohistochemistry

Monoclonal antibodies were produced as culture supernatants from the following hybridomas: GK1.5 for CD4 (American Type Culture Collection, Rockville, MD), YTS169 for CD8 (kind gift of Dr. Waldmann, Cambridge University, UK), MAC1 for macrophages and natural killer (NK) cells (American Type Culture Collection). These supernatants were used undiluted. The immunohistochemistry protocol has been previously described (Guérette et al., 1995). For each muscle, positively stained cells were counted in 60 microscopic fields randomly selected in six sections (Guérette et al., 1995). Each field represented ~1.5 × 10⁵ µm².

Results

Short- and Long-term Dys-positive Fiber Formation after Histocompatible Myoblast Transplantation

All 24 grafted mice gave positive results; that is, they produced 15–82% Dys-positive fibers (Table I). These results were obtained in four different groups of animals (designated A to D) using four different primary cultures. Some differences in the final percentages were noted between batches B, C, and D.

2 wk after transplantation, some small- and medium-diameter Dys-positive fibers were formed (Fig. 1 A). These new or hybrid fibers were often associated in clusters that were dispersed in the muscle, probably reflecting the multiplicity of injection sites (Fig. 1 A). At this time, some necrotic zones were still visible, probably resulting from noxigen injection. The percentage of Dys-positive fibers varied between 15 and 30% (Table I).

1 mo after grafting, the number and size of Dys-positive fibers were increased as compared to results observed 2 wk after grafting (Table I, Fig. 1, B–D), and in some cases almost 70% of the fibers were Dys-positive. Most of these fibers had smaller diameters than the original mdx fibers or the remaining dys-negative mdx fibers (Fig. 1, B and D), suggesting that they arose from the fusion of donor myoblasts and from the small-diameter myofibers and myotubes present 2 wk after grafting. Some Dys-positive fibers, however, had very large diameters, close to the maximum diameter of mdx Dys-negative fibers (Fig. 1 C). Most Dys-positive fibers, small or large, were correctly oriented in the muscle section, parallel to Dys-negative fibers.

2, 4, 5, 6, 8, and 9 mo after grafting, the Dys-positive fiber size had increased (Fig. 1, E–N) to a maximum that was sometimes greater than 75 µm (Fig. 1 G), i. e., the larger fibers described in the TA muscles of mdx mice (Coulton et al., 1988; Louboutin et al., 1993; Pastoret and Sebillé, 1993). Normal caliber (i. e., 30–50 µm in TA muscle of this old, Louboutin et al., 1993), however, was the most frequent phenotype. Some necrotic zones were still visible in some muscles 2 mo after grafting but were not observed during the following months (Fig. 1, E and F). Fibrosis extension was rare (not shown). Large areas of Dys-positive fibers were present (Fig. 1 G) and were observed throughout the entire muscle length, but the percentage was higher in the central portion of the muscle (not shown). In these portions, the percentage of Dys-positive fibers reached up to 80% in some mice (Fig. 1 H). Some important variations existed, however, from one mouse to another (Fig. 1, G and H) that may reflect either differences in notexin necrosis or in myoblast implantation be-

Table I. Fiber Formation after Histocompatible Myoblast Transplantation

Mouse number	Days after grafting	Dys +	Dys -	Total	Percent Dys +	Percent Dys -
A1	13	322	1890	2212	14.6	85.4
A2	13	465	970	1435	32.4	67.6
B1	36	1320	1160	2480	53.2	46.8
B2	36	1520	693	2213	68.7	31.3
B3	68	1802	2873	4675	38.6	61.4
B4	68	1909	1771	3680	51.9	48.1
B5	162	2217	565	2782	79.7	20.3
B6	162	830	410	1240	66.9	33.1
B7	239	2354	631	2985	78.8	21.1
B8	239	670	1080	1750	38.3	61.7
Mean B group \pm SD		1,578 \pm 612	1,148 \pm 822	2,725 \pm 1086	59.5 \pm 16.5	40.5 \pm 16.5
C1	55	424	405	829	51.1	48.9
C2	114	883	722	1605	55.1	44.9
C3	114	360	233	593	60.7	39.3
C4	189	315	759	1074	29.3	70.7
C5	189	625	153	778	80.3	19.7
C7	259	1028	473	1501	68.5	31.5
Mean C group \pm SD		606 \pm 294	457 \pm 248	1,063 \pm 410	57.5 \pm 17.3	42.5 \pm 17.3
D1	84	355	870	1225	28.9	71.1
D2	159	388	428	816	47.6	52.4
D3	159	522	1404	1926	27.1	72.9
D5	229	304	551	855	35.6	64.4
D6	229	601	1662	2263	26.6	73.4
D7	229	469	1227	1696	27.7	72.3
D9	229	459	924	1383	33.2	66.8
Mean D group \pm SD		443 \pm 102	1,009 \pm 448	1,452 \pm 541	32.4 \pm 7.5	67.6 \pm 7.5

Mice were sacrificed at the times indicated. Dys histochemistry was done using R27 polyclonal Ab. The numbers of Dys-positive and Dys-negative fibers were counted on the best sections for each mouse. Mice C6 and D8 died accidentally before muscle biopsy. The muscle from D4 mouse was broken during cryostat sectioning, thus not allowing exact fiber enumerations.

tween each mouse in a given set of experiments. Such differences have been pointed out by others (Morgan et al., 1993). Differences in the total number of muscle fibers in the TA were also observed at given post-grafting intervals. Fiber splitting, a frequent event in mdx muscles, was also observed in some grafted muscles (for example, the diameter of the split fiber in Fig. 1 K was \sim 120 μ m). Longitudinal sections showed that Dys-positive fibers were still correctly oriented and that some were more than 750- μ m long (Fig. 1 L). 8 and 9 mo after grafting, Dys-positive fibers were often grouped as bundles (Fig. 1, M and N). The size variabilities among Dys-positive fibers, however, was still striking. The percentage of Dys-positive fibers still showed some variations between mice and batches of myoblasts.

In the contralateral nongrafted leg of the same animals, no more than 1% Dys-positive fibers were present (Fig. 1 O). These were probably revertant fibers.

Some important bundles of Dys-positive fibers were identified in only one EDL of eight investigated. In three other muscles, few scattered fibers were observed, that did not extend throughout the muscle. Although myoblast migration from transplanted muscles to neighboring muscles (i.e., peroneal or EDL) has been described by others (Morgan et al., 1990, 1993; Watt et al., 1993), our results about possible myoblast migration were not consistent. The best results were observed by these authors either when the permanent C2 cell line was used, or when the neighboring muscles were irradiated or submitted to degeneration-regeneration cycles. In our study, Dys-positive fibers may be due to accidental injection of myoblasts in the EDL during our multiple injections in the TA.

Table II shows that the TA weight of the mice was decreased by more than 50% 5–8 mo after irradiation and notexin necrosis even following myoblast transplantation.

Production of Ab against Normal Muscle Fibers by Grafted Mice

The polyclonal R27 Ab and the NCIDys1 mAb specifically reacted with normal mice muscle fibers but not with the large majority (>99%) of muscle fibers in mdx muscles not injected with normal myoblasts. The plasma from 12 naive, nongrafted mdx male mice, however, did not react with the same normal fibers (Fig. 2, A–H). During the course of the experiment, 15 of 26 (58%) grafted mice developed some Ab against the normal muscle fiber membrane, but not against mdx membrane (Table III). The intensity of membrane staining produced by the grafted mice plasma on normal muscle fibers varied from one mouse plasma to another (Fig. 2, I–O). In some cases, the mouse reactive plasma gave a stronger staining on normal muscle than that observed with the Ab specific for Dys (Fig. 2, J–L). In other cases, staining was weaker (Fig. 2 I), but still distinctively stronger than the background staining produced by the same plasma on mdx muscle fibers. The staining produced by even the weakly reactive plasma was also clearly stronger than the background staining obtained on normal muscle fibers when no mouse plasma or the plasma from a naive mouse was used (Fig. 2 C). The pattern of labeling around a muscle fiber varied from one transplanted mouse plasma to another: a smooth, regular pattern was observed in some cases (Fig. 2 I), a rough, irregular pattern in others (Fig. 2, L and O).

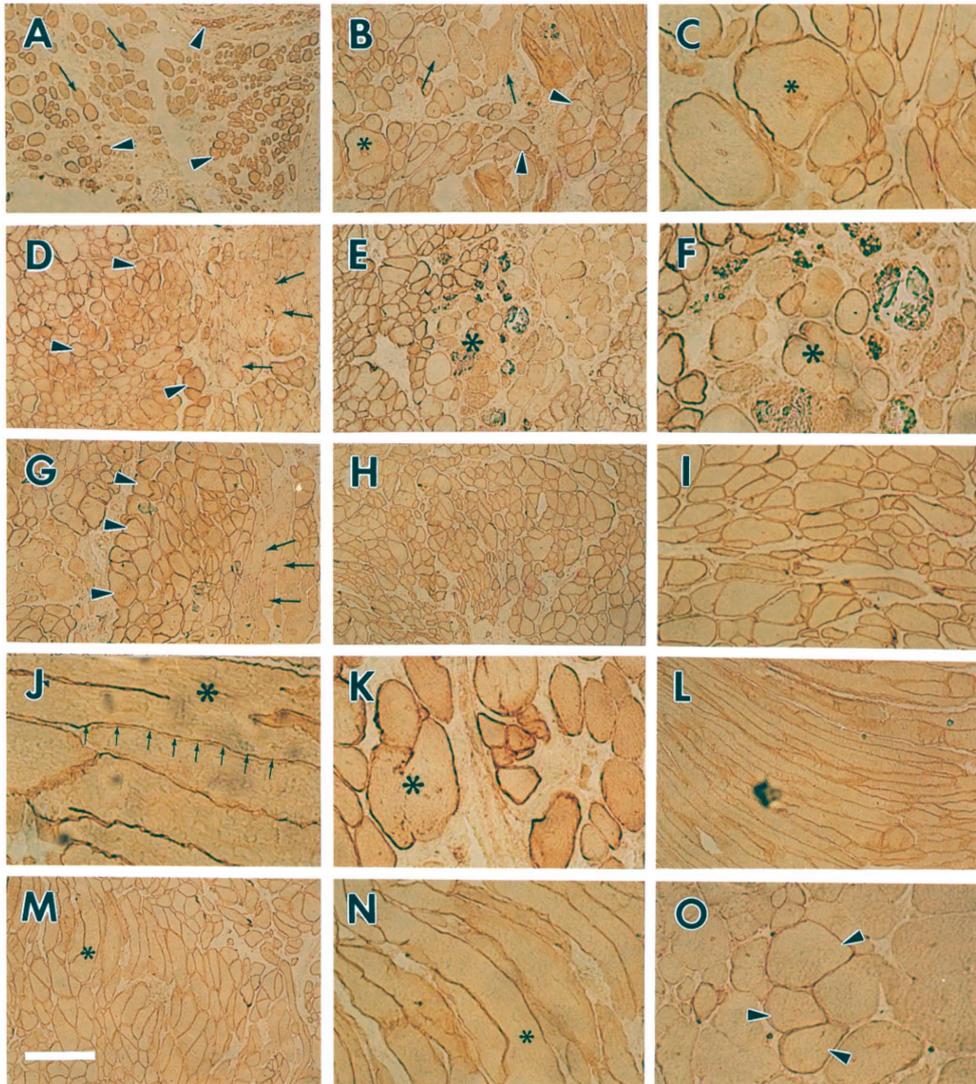


Figure 1. Short- and long-term Dys-positive fiber development after histocompatible myoblast transplantation. Cryostat sections of mouse muscles at various times after grafting and stained using R27 Ab. (A) 2 wk; (B–D) 1 mo; (C) magnification of B; the same fiber is indicated (*asterisk*) and probably results from host-donor hybridization. (E–G) 2 mo after grafting; one necrotic zone is shown in E and magnified in F (same area indicated by an *asterisk*); Dys-positive fibers (*arrowheads*) are often surrounded by Dys-negative fibers (*arrows*). (H–L) 5 mo after grafting; up to 80% of the fibers were Dys-positive, but size differences were observed between fibers (I, magnification of H); on longitudinal sections, Dys is expressed over the full-length of the fibers (J, *arrows*; L); Dys-positive splitted fibers are presented in J and K (*asterisks*). (M–O) 8 mo after grafting (same mdx mouse); (M and N) grafted muscle; N is a magnification of M (same fiber indicated by an *asterisk*); (O) nongrafted muscle; one bundle of revertant Dys-positive fibers is shown. Bars: (A, B, D, E, G, H, L, and M) 190 μm ; (C, F, I, J, K, N, and O) 75 μm .

Downloaded from jeb.rupress.org on January 13, 2009

Table II. Weight of Some Mice TA

Mouse number	Days after grafting	Control	Treated	Graft/control ratio
		mg	mg	
B7	239	90	30	0.33
C4	189	79	23	0.29
C5	189	77	19	0.25
C7	259	51	15	0.29
D2	159	82	29	0.35
D3	159	74	35	0.47
D4	159	66	17	0.26
D5	229	78	28	0.36
D6	229	91	37	0.41
D7	229	61	28	0.46
D9	229	76	24	0.32
Mean \pm SD		75 \pm 12	26 \pm 7	0.34 \pm 0.08

Mice were sacrificed at the times indicated. Treated (irradiation, notexin, transplantation) and control (no irradiation, no notexin, no transplantation) TA muscles, were weighed just after biopsy.

Table III displays Ab production in grafted mice at different times after transplantation, when available. After 13 d, only one mouse (A1) of two gave a slightly positive reaction. After 36 d, two mice (B1, B2) of two gave positive reactions but only at a low dilution of 1/40. After 68 days, two mice (B3, B4) of two gave positive reactions, one of which was positive even at dilution of 1/400. Plasma were unfortunately collected from these six mice only once, when they were killed. The following 20 mice were investigated for Ab production at different times after transplantation. In one case (C2), the plasma was positive on day 27, but no preimmune plasma was available. In four cases, the plasma collected 2 (D1, D4, D9) or 44 d (C7) after grafting were negative, but conversion to positivity developed after 75, 101, or 160 d. In nine cases, negative plasma remained negative, whereas plasma that started to be positive at any time remained positive until sacrifice, 34 wk in some cases, demonstrating sustained Ab production over a long time course.

In six of seven cases investigated, the mouse plasma could also react with some revertant fibers which were present in small numbers in the muscle of the naive, male mdx mouse used as a control for Ab staining (Fig. 2 N). These revertant fibers were also recognized by R27 Ab or NCIDys2 mAb (not shown).

Immune Reactions against Own Revertant Fibers

One to five clusters of revertant fibers were present in the nongrafted muscles. These clusters were identified using R27 polyclonal Ab (Fig. 3, B, E, H, and K) and contained one to eight fibers that expressed some Dys-truncated proteins. Some, but not all, of these clusters were also labeled by NCIDys1 mAb directed against Dys rod domain (Fig. 3, A, D, G, and J) or by NCIDys2 directed against the COOH-terminal domain (not shown). The plasma from mice that developed Ab against normal fibers also reacted against their own revertant clusters and recognized more clusters than R27, NCIDys1, and NCIDys2 (Fig. 3, C, F, I, L); for example, the plasma from mouse B8 reacted against four clusters in its own nongrafted TA muscle, whereas R27 detected only three and NCIDys1 only two (Fig. 3).

It is noteworthy that back-mutated fibers were often

split (Fig. 3, M-O). This was already observed by Hoffman et al. (1990). Fiber splitting is frequent in mdx mouse, but it is an aberration in normal mouse muscles (Coulton et al., 1988; Louboutin et al., 1993), and is interpreted as resulting from excessive fiber enlargement or fusion inability.

Immunoblotting

R27 polyclonal Ab and NCIDys1 specifically reacted with an antigen whose weight was estimated on Western blots to be \sim 420 kD. This antigen was expressed only in normal mouse muscles (Fig. 4) and likely corresponds to Dys whose theoretical molecular weight is 427 kD (Koenig et al., 1988). The plasma from 10 of 14 mice reacting against normal muscle membranes in immunohistochemistry also reacted with antigens whose molecular weight was very close or equal to 420 kD. The band intensity varied greatly from one mouse plasma to another (Table IV). Some plasma reacting positively with normal muscle fibers also reacted with other bands of lower molecular weight (Table IV). The high molecular weight antigens stained by NCIDys1 and R27 were colocalized on the nitrocellulose strips with bands stained by the 10 positive mouse plasma (not shown). The plasma from grafted mice which were not reactive in immunohistochemistry did not react against the high molecular weight antigens stained by NCIDys1 and R27 (Table IV). The control plasma from nongrafted mice served as negative controls (Fig. 4).

Cytochemistry

Normal myotubes express intracellular Dys (Lev et al., 1987). The plasma from naive mice and from mice that did not react with normal muscle fibers did not show any specific binding on myotubes in culture, neither alive nor permeabilized (not shown). Staining was also not observed when living and nonpermeabilized myotubes were exposed to NCIDys2 (Fig. 5 A) or the positive plasma (Fig. 5, D and G). On the contrary, the positive plasma from grafted mice showed a preferential localization on myotubes after permeabilization. A fluorescent staining was observed when myotubes were permeabilized with methanol before incubation with NCIDys2 mAb (Fig. 5 B) or mouse plasma (Fig. 5, E and H). The intensity of the staining varied among the plasma of different grafted mice. Such staining was never observed when the mouse plasma was omitted from the first step of the reaction (not shown), or when these experiments were performed using mdx myotube cultures, that is, myotubes that do not express Dys (Fig. 5, C, F, and I). The permeabilization protocol really allowed to discriminate between intra- and extracellular antigens, since the intracellular cytoskeletal protein desmin was only stained when cultures were permeabilized (Fig. 5, J and K). Taken together, these data suggest that most, if not all, of the antigens recognized by the Ab developed by the grafted mice were located inside the myotubes, and not on the extracellular part of the membrane, except in one case (mouse B3) in which a faint myotube labeling was observed on living cells and a stronger labeling inside the myotubes was seen after permeabilization.

Cellular Infiltration

2 and 4 wk after grafting, CD8⁺ T cells, macrophages, and

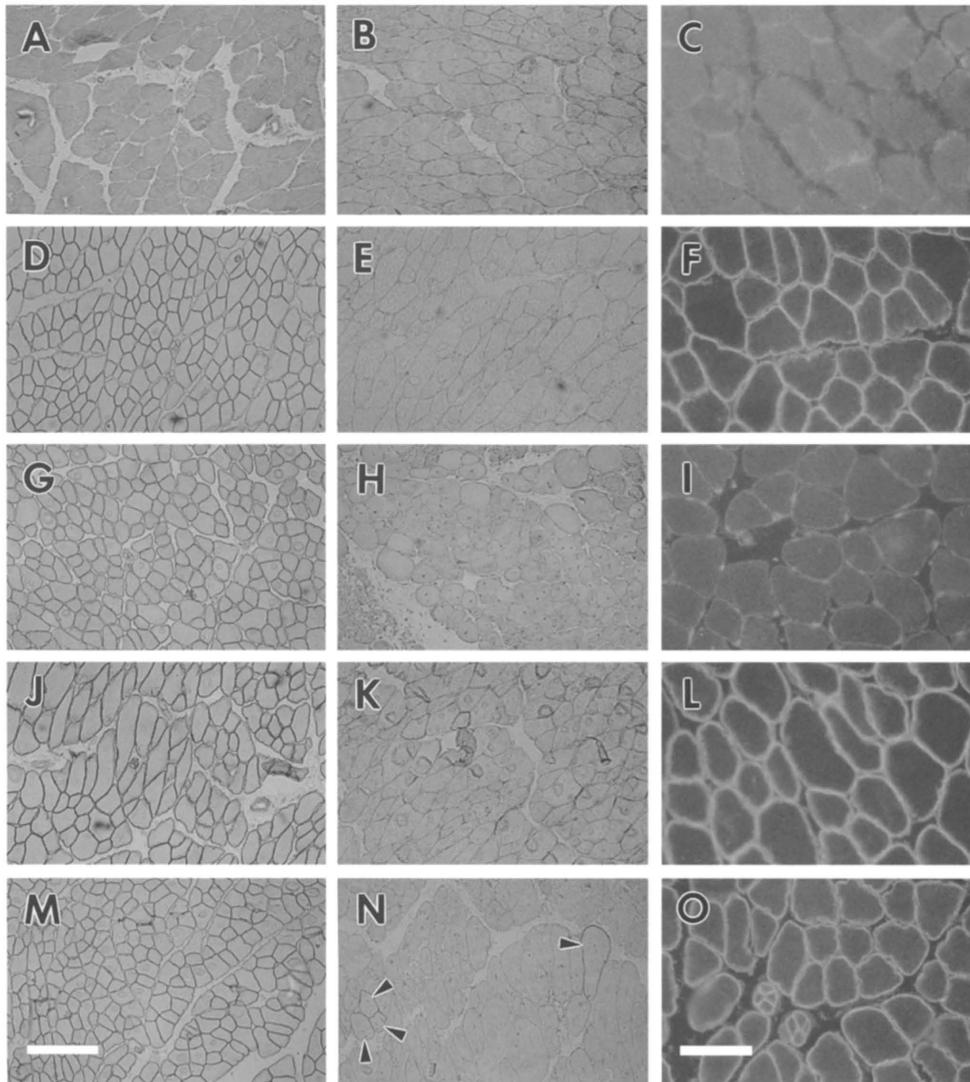


Figure 2. Production of Ab directed against normal muscle membranes. Cryostat sections of normal mouse muscle (*left and right*) or mdx muscle (*middle*) were incubated with mice plasma or specific Ab. (*A–C*) Plasma from a naive, nongrafted mouse. Note that mdx muscle background staining is always more important than normal muscle staining. (*D and E*) NCIDys1 anti-Dys mAb. (*F*) NCIDys2 anti-Dys mAb. (*G and H*) R27 polyclonal anti-Dys Ab. (*I*) plasma from mouse B6 (weakly positive). (*J–L*) Plasma from mouse B8 (strongly positive). (*M–O*) Plasma from mouse C2 (strongly positive). Note that muscle staining pattern presented some differences from one mouse plasma to another (*I, L, and O*). The serum from mouse C2 could also react with revertant fibers in the mdx muscle used for the assay (*N, arrowheads*). Bars: (*left and middle*) 190 μm ; (*right*) 70 μm .

Downloaded from jeb.rupress.org on January 13, 2009

Table III. Reactivity of the Grafted Mice Plasma Against Normal Mouse Muscle Fibers

Mouse number	Days after grafting				
A1	13				
A2	+ †				
	- †				
B1		36			
B2		+/- †‡			
		+/- †			
B3			68		
B4			+++ / ++ †		
			++ / - †		
B5			75	92	160
B6			+++ / ++	ND / ++	+++ †
B7			+ / -	ND	+ †
B8			+++ / ++	+++ / +++	+++ †
			+++ / +++	+++ / +++	+++ †
C1	27	44		101	190
C2	-	- †			
C3	+++	+++ / +		+++ †	
C4	-	-		- †	- †
C5	-	-		ND	- †
C6	-	-		- †	
C7	-	-		+	ND
					ND †
D1	2		75		160
D2	-		+ †		
D3	-		-		- †
D4	-		-		- †
D5	ND		+++		+ †
D6	ND		+		ND †
D7	ND		-		ND †
D8	-		+		+ †
D9	-		ND		- †
			-		+++ †
					+++ †

†, Day of mouse sacrifice;

-, negative;

+, weakly positive;

++ to +++++, positive to strongly positive;

‡, Results are given for serum dilution of 1/40. When two results are given, the first was obtained with a 1/40 dilution of the serum and the second with a 1/400 dilution.

ND, not determined.

NK cells were present in the grafted muscles, mainly at the injection sites (not shown). They were more numerous than in a noninjected mouse muscle, but they were less numerous than when MHC-incompatible cells were grafted (Guérette et al., 1995). CD4⁺ T cells were almost absent from grafted muscles. The values obtained at 2 and 8 mo did not differ from one another (Table V). Some hot spots containing many macrophages or NK cells were located in the immediate vicinity of, or inside, some muscle fibers undergoing degeneration, but this observation is frequent in mdx mouse (not shown) and is the reason for the high standard deviations. Thus, the infiltration of the muscle after histocompatible transplantation was weaker than that observed in previous studies by our group (Guérette et al., 1995; Vilquin et al., 1995a) after MHC-incompatible myoblast transplantation. Indeed, once the necrosis caused by notexin and cell injections has been cleared, the number of infiltrating cells was not significantly higher than in the absence of cell injection.

Discussion

Transplantation Results

Using nude/mdx congenic mice, Partridge group demon-

strated short- and long-term myoblast transplantation success (Partridge et al., 1989; Morgan et al., 1990, 1993, 1994; Watt et al., 1993). The level of success decreased when H2-compatible M9 mice or tolerized mice were used as recipients (Grounds et al., 1980; Partridge et al., 1989). Rando and Blau (1994) reported good success after injecting retrovirally labeled myoblast clones into isogenic hosts, whereas allogeneic grafts were rejected; the use of cyclosporin A or specific anti-adhesion molecules mAb allowed 4-mo-long acceptance of allogeneic grafts (Pavlath et al., 1994). Huard et al. (1994a,b) reported 1-mo success after human cell xenografting in immunodeficient nude and SCID mice. Kinoshita reported 1-5-mo-long success following MHC-incompatible myoblast transplantation into mdx mice immunosuppressed with FK506 (Kinoshita et al., 1994b; and personal results). Karpati et al. (1989) obtained little, unquantified success following human myoblast xenotransplantation in mdx mice without immunosuppression.

In the present study, 100% of the mice presented short or long-term success after compatible myoblast transplantation, as all the transplanted mdx mice expressed Dys-positive fibers after grafting at any time of analysis. Half of the transplanted mice expressed >50% Dys-positive fibers in their grafted muscles. The total number of Dys-positive

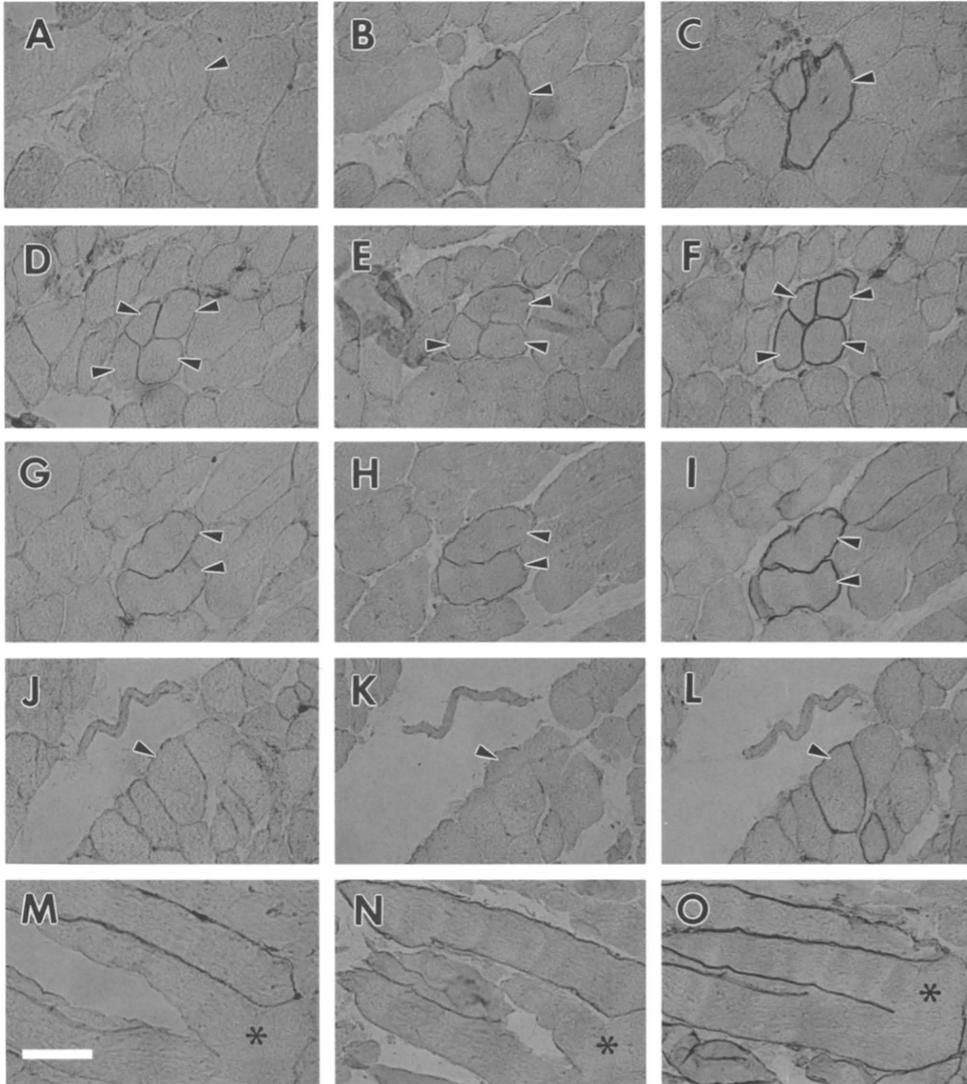


Figure 3. Differential staining of a grafted mouse own revertant fibers by specific anti-Dys Ab or by its own plasma. Serial cryostat sections of the nongrafted TA of mouse B8. *A, D, G, and J* were observed on one muscle section, whereas *M* was observed on another muscle section. NCDys1 anti-Dys mAb (*left*) labeled two clusters of revertant fibers (*D* and *G*), whereas R27 polyclonal anti-Dys Ab labeled 3 clusters (*B, E, and H*). The B8 mouse plasma reacted against four clusters (*C, F, I, and L*). The same fibers on serial sections are indicated by arrowheads. Some revertant fibers were split (*M-O, asterisk*). Bar, 75 μ m.

fibers in the grafted muscle was in some cases >80% of the total fiber number. Myoblast transplantation triggered the formation of hybrid and new Dys-positive muscle fibers. These different fiber categories may be identified by their size 1 mo after grafting. The progressive increase in

total number and size of Dys-positive fibers between the first two weeks and the end of the second month indicates that all injected myoblasts do not fuse immediately after injection, but keep proliferating for some weeks. The increase in Dys-positive fibers number may also be due to

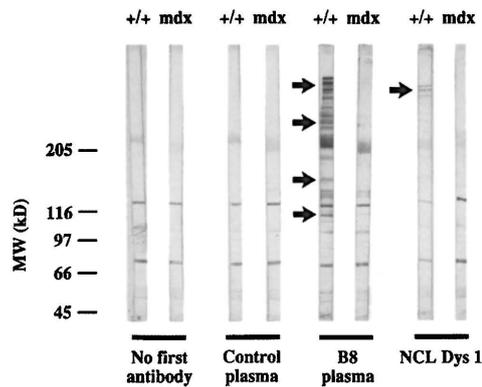


Figure 4. Immunoblot analysis of mouse muscle antigens stained by mouse plasma. NClDys1 mAb specifically reacted with the high molecular weight antigen Dys present in +/+ mouse muscles (arrow) and absent from mdx mouse muscles. The plasma from B8 mouse, which strongly reacted in immunohistochemistry, also strongly reacted against some antigens which were present in +/+ muscles and absent from mdx muscles. The molecular weight of these antigens were around 115, 160, 260, and 400 kD (arrows). The highest molecular weight antigen migrated to the same place as Dys. The control plasma from a naive, non-transplanted mouse, did not react with these antigens.

Dys accumulation and diffusion. Dys expression, however, is thought to be restricted to nuclear domains (Karpati et al., 1989; Pavlath et al., 1989). Therefore, many injected cells could behave as new satellite cells. Variations in and

between groups of transplanted mice are too important to establish whether Dys-positive fibers progressively replaced Dys-negative fibers. Although Dys-positive fibers were obtained with all batches of cell cultures, the D batch produced a consistent lower percentage of Dys-positive cells, indicating some variability in the state of the injected myoblasts.

Rejection reactions may be induced following allotransplantations in both humans and mice by minor histocompatibility antigens (Oppat and Mohanakumar, 1994). In the present study, good transplantation results have likely been obtained because mice compatible for major and minor histocompatibility antigens were used. To short-cut the problem of sex-linked minor histocompatibility antigens (i.e., the HY antigen), male mice were systematically used as recipients, as it is difficult to check exactly the sex of newborn donor mice. Thus, between donor and recipient mice, only full-length Dys was different.

Effect of Irradiation and Notexin on Muscle Regeneration

Except for diaphragm, the skeletal muscles of the young mdx mouse, including the TA muscles under study, do not present the extensive fibrosis and muscle fiber loss observed in Duchenne patients (Louboutin et al., 1993). It has been reported, however, that irradiation and local injection of some snake venoms increased the success of myoblast transplantation in skeletal muscles, probably by suppressing the mitotic activity of host myoblasts and by starting one cycle of degeneration-regeneration in which host myoblast cannot participate (Wakeford et al., 1991; Morgan et al., 1993). Actually, transplantation success was better using irradiation and notexin in mouse than without

Table IV. Molecular Weights of the Normal Muscle Antigens Reacting with Grafted Mice Plasma

Reactivity in histochemistry	Mouse number	Antigens mol wt determination (kD) (1st set of experiments)	Colocalization with Dys (2nd set of experiments)
Positive control	NClDys1	408, 391, 371	yes/R27
	R27	419, 403, 381	yes/NClDys1
Negative	C1	243, 142, 121	ND
	C3	243	ND
	C4	253	ND
	C5	None	ND
	C6	None	ND
	D2	None	ND
	D6	44, 42	ND
	D7	264, 44	ND
Weakly positive	B1	386*, 340, 270, 253	yes
	B2	243	ND
	B4	286, 261, 44, 43	ND
	B6	389, 288, 262, 102, 99, 43, 41	yes
	D1	373, 269, 245, 42	yes
	D5	114	ND
	D7	264, 44	ND
Positive to strongly positive	B3	395, 360*, 260, 243	yes
	B5	389, 379, 321, 238, 103, 43	yes
	B7	405, 389, 330, 300, 273, 251, 238, 42	yes
	B8	437, 414, 386, 377, 361, 283, 268, 162, 114	yes
	C2	424, 403, 377, 271, 53, 45, 43	yes
	D4	379, 277, 251, 238, 42	yes
	D9	400, 389, 273	yes

These plasma were obtained after mouse sacrifice.
*. The bands were very faint on some nitrocellulose strips.
ND, not done.

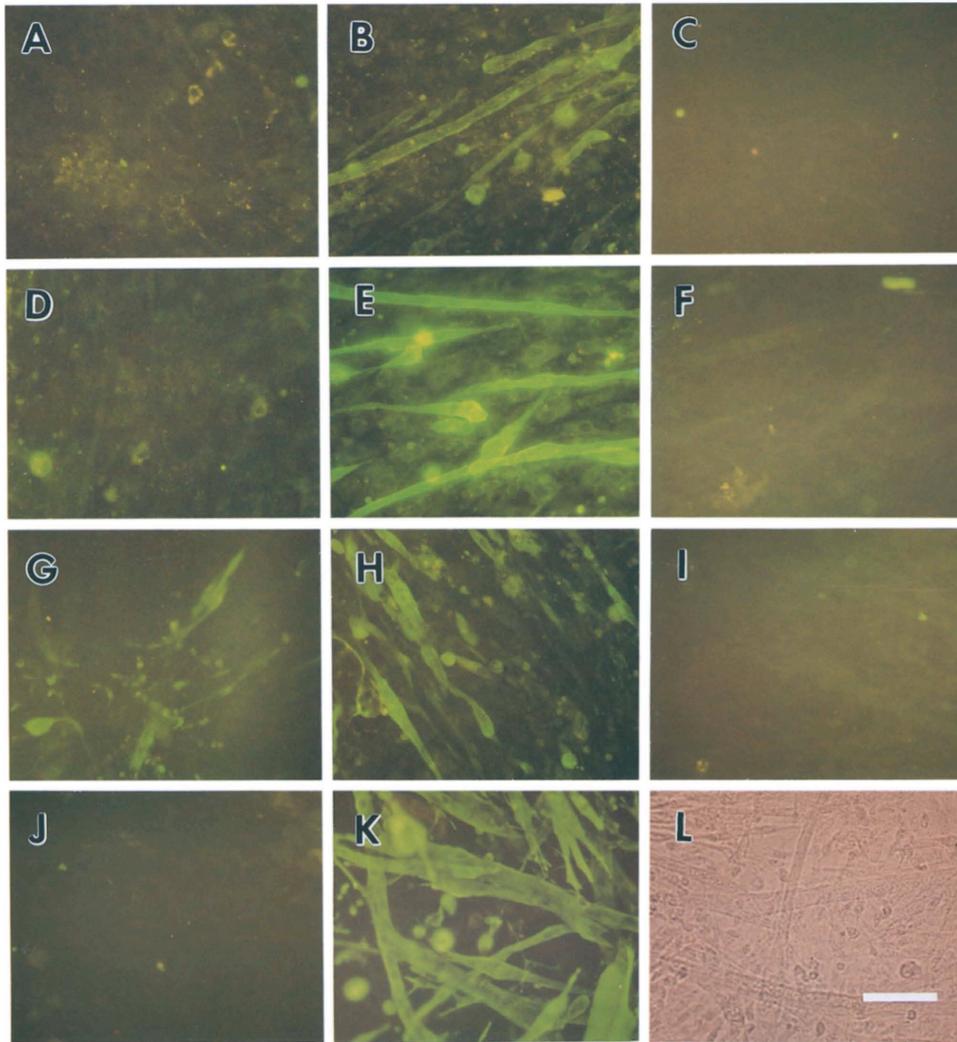


Figure 5. Differential staining of living or permeabilized myotube cultures by specific Ab or mouse plasma. Isogenic myotube cultures were incubated with the specific NCIDys2 mAb (A–C), mouse B8 plasma (D–F), mouse B3 plasma (G–I) or the specific anti-desmin mAb (J and K). (Left) First Ab incubated on living cells; (middle) first Ab incubated on permeabilized cells; (right) first Ab incubated on permeabilized mdx cells. (A, B, D, E, G, and H) Normal mouse cultures; (C, F, I, J, K, and L) mdx mouse cultures. L is a phase contrast image of mdx myotube culture after methanol permeabilization. The specific staining of permeabilized myotubes (B, E, H, and K) was not observed when living myotubes were exposed to the Ab (A, D, G, and J). In one case (mouse B3), the extracellular part of some myoblasts and myotubes was labeled (G), although the intracellular labeling of myotubes was clearly stronger (H). Bar, 70 μ m.

these pretreatments (personal results). The efficacy of these pretreatments, however, seems to depend on the animal model; for example, notexin seems detrimental in dogs or monkeys (Kinoshita, I., and J.-T. Vilquin, personal results). Even at lower concentrations, notexin necrosis is

more extensive in dogs than in mice, where necrosis seems restricted to the injection site (personal results). One may assume that irradiation blocked the regenerative capacities of all the host leg cell types: myoblasts, fibroblasts, chondrocytes, osteoblasts, endothelial, and mesothelial

Table V. Infiltration of Grafted Muscles by Immune Cells

Mouse number	Days after grafting	MAC* (number per field \pm SD)	CD8 ⁺ cells
B3	68	2.0 \pm 2.2	0.15 \pm 0.51
B4	68	2.9 \pm 2.4	0.17 \pm 0.46
B5	162	1.7 \pm 1.6	0.23 \pm 0.50
B6	162	2.5 \pm 4.4	0.18 \pm 0.47
B7	239	2.6 \pm 3.5	0.18 \pm 0.43
C2	101	3.2 \pm 4.8	0.07 \pm 0.25

*. MAC : MAC1 antigen positive cells. One field represents approximately $1.5 \times 10^5 \mu\text{m}^2$.

cells, Schwann cells, and so on. Actually, not only did the TA weight decrease (Table II), but also that of the whole irradiated leg. Thus, in our experimental protocol the result of myoblast transplantation may not be termed muscle regeneration, but rather gene complementation. Some physical or metabolic supports may be lacking for donor cells to sustain full muscle regeneration over a long time course following irradiation.

Anti-Dys Ab Production after Transplantation in Some Mice

In this study, 58% of the mice developed Ab against some antigens present on the membranes of normal muscle fibers but absent from the mdx fibers. These Ab were not produced in some mice and were not detected in the plasma of nongrafted mice, therefore they were allo-Ab, not auto-Ab. The subsequent immunoblot analysis of the antigens recognized by these Ab indicated multiple molecular weights, but in 10 of 14 cases the highest molecular weights corresponded to Dys. It is therefore very likely that these grafted mice developed Ab against Dys. The determination of the nature of the smaller antigens recognized by various plasma would require further investigations.

The Ab appeared slowly after grafting. In some cases, 36 to 75 d were necessary to observe a positive reaction. In the absence of any rejection problem related to major and minor antigens, donor myoblasts slowly colonize part or whole recipient muscle, then they proliferate and/or fuse to form new or hybrid muscle fibers. This process, however, may require at least 1 or 2 wk (Allbrook, 1981; Morgan et al., 1993). As presented in this study, the number of Dys-positive fibers is elevated after only 2 mo. Myoblasts alone do not express Dys to detectable levels (Lev et al., 1987). Dys expression is triggered by muscle differentiation after myoblast fusion (Lev et al., 1987; Scott et al., 1988). Therefore, only myotubes and muscle fibers express the skeletal muscle form of Dys. The immune system of the host may recognize only exogenous Dys after the formation of myotube and/or hybrid fibers, and after they have degenerated once and freed antigens from the inner muscle cells. This degeneration may follow metabolic or mechanic damages. Therefore, it is likely that Dys become fully immunogenic only some weeks after grafting. Then, 3 to 4 wk are necessary before a detectable amount of Ab specific for normal muscle fibers can be seen. Once the reaction is triggered, a low level of continuous stimulation is sufficient to sustain high Ab titers. This stimulation could be due to degeneration-regeneration cycles which cer-

tainly take place in grafted animals, because damage in Dys-positive and Dys-negative fibers is a natural phenomenon. The presence of high Ab levels in some cases 8 mo after grafting shows that Dys is continuously presented to the immune system.

Immune Reactions against Autologous Revertant Fibers

Plasma from mice that developed Ab against Dys also reacted against autologous revertant fibers. Mdx mice, depending on their age and breed, present 0.1–1% revertant fibers in their muscles (Danko et al., 1992; Pastoret and Sebillé, 1993; Zhao et al., 1993). Revertant, or back-mutated, fibers are believed to result from a punctual, individual somatic mutation of the Dys gene in some myoblasts or satellite cells (Hoffman et al., 1990). The Dys-positive fibers in mdx muscles possess Dys, but sometimes with almost completed size and sometimes with various types of deletions (Zhao et al., 1993). Unfortunately, the polyclonal nature of the mice plasma did not allow to discriminate between the various Dys peptides produced by back-mutation. The presence of Ab directed against revertant fibers could be an immunological paradox. One could assume that a mouse producing back-mutated fibers would become tolerant to Dys and would not produce any Ab against this protein after grafting. The Dys peptides produced after back mutation and presented to the immune system, however, likely do not represent full-length Dys. Second, even if myoblasts can be considered antigen-presenting cells (Goebels et al., 1992), they do not yet express Dys (Lev et al., 1987), and mature muscle fibers do not express class I and class II complexes (Roy et al., 1991; Goebels et al., 1992; Hohlfield and Engel, 1994). Thus, the production of Ab directed against revertant fibers could be due either to the presentation of irrelevant antigens, or to an absence of antigen presentation.

Absence of Anti-muscle Membrane Ab Production after Transplantation in Some Cases

The lack of Ab directed against normal muscle membranes in 42% of the mice is striking. Dystrophin, even if considered a foreign antigen, is not always capable of triggering Ab formation. If Dys is released in amounts that are too small or in a too discontinuous way, or if the processing or presentation by the antigen presenting cells is inadequate, anti-Dys Ab should not be produced. The parallel between the total numbers of muscle fibers and the production of anti-Dys Ab suggests that an increased number of Dys-positive fibers in the grafted muscle induces a stronger Ab production (Tables I and III). The mean number of Dys-positive fibers in batch B was two to four times higher than that in batches C and D. The strongest Ab reactions were found in group B, which quantitatively expressed more Dys (Table III). Thus, in many cases, the amount of Dys antigens released by the fibers may have been too low to trigger a strong Ab production.

Anti-Dys Ab and the Absence of Rejection

The production of anti-Dys Ab did not lead to rejection of Dys-positive fibers. All the grafts were successful, Dys ex-

pression was sustained over many months, no increase in lymphocyte number was noted, and Dys-positive fibers did not seem to be rejected either at long or short term. Also none of the plasma directed against Dys could induce a complement-dependent lysis of human myotubes in vitro (E. Wagner, personal results).

Dystrophin is an intracytoplasmic, subsarcolemmal protein without transmembrane or extracellular domain (Watkins et al., 1988; Ervasti and Campbell, 1991). Dystrophin is sequestered in the muscle fibers, whose solid structure is designed to support only a very slow turnover. Thus the absence of Dys-positive fiber destruction could be attributable to a lack of accessibility and thus an absence of recognition of the antigen by the Ab. This hypothesis is confirmed by the differential results obtained in vitro in myotube cultures. When Ab gained access to the cytoskeleton inside the cells following permeabilization, the reaction was clearly positive, whereas the reaction was negative on living non-permeabilized cells, suggesting that the Ab were directed against intracellular antigens. Thus, the recognition of Dys peptides as foreign antigens and the reaction against the intracellular proteins would be two distinct immunological events.

In one clinical trial, human myoblasts compatible for class I and class II (DR) MHC antigens were transplanted in DMD patients (Huard et al., 1992; Tremblay et al., 1993), but histocompatibility was not absolute. Some minor histocompatibility antigens or other immunogenic proteins differences between host and donor could have triggered humoral and/or cellular rejection. In the present experiments, mice were not only histocompatible, but also inbred, and the grafts were not rejected. Thus, we hypothesize that major and minor histocompatibility antigens can trigger rejection following myoblast transplantation, whereas Dys alone cannot.

Concluding Remarks

Histocompatibility, antigen sequestration and slow muscle structure turnover should explain the overall phenomenon reported here. However, access of the immune system to new antigens encoded by normal genomic donor DNA could depend on the availability, location and presentation of these antigens. Immune reactions did not lead to short- or long-term rejection of Dys-containing fibers produced by myoblast-mediated gene complementation in mdx mice, but the situation could be different with other antigens. The data presented in this article should also prove useful in the expanding field of gene therapy where, whatever the vector, the single gene encoding for a non-self-product could lead to immune reactions, with or without associated rejection (Vilquin et al., 1995b).

We thank Brigitte Roy and Marlyne Goulet for myoblast preparation; François Tardif, Isabelle Asselin, Marc Gingras, Van Diep Doan, and the medical staff from the Radiotherapy Unit (Hôtel-Dieu, Québec) for technical assistance; Lyse Larocque for secretarial assistance; Dr. Yoland Smith for his Nikon photomicroscopic system. This work was supported by the Muscular Dystrophy Association of Canada (MDAC) and the Association Française contre les Myopathies (AFM). J.-T. Vilquin is a postdoctoral fellow supported by the AFM.

Received for publication 9 March 1995 and in revised form 25 April 1995.

References

- Allbrook, D. 1981. Skeletal muscle regeneration. *Muscle Nerve*. 4:234-245.
- Blau, H. M., J. Dhawan, and G. K. Pavlath. 1993. Myoblasts in pattern formation and gene therapy. *Trends Genet.* 9:269-274.
- Campion D. R. 1984. The muscle satellite cell: a review. *Int. Rev. Cytol.* 87:225-251.
- Cossu, G., B. Zani, M. Coletta, M. Bouche, M. Pacifici, and M. Molinaro. 1980. In vitro differentiation of satellite cells isolated from normal and dystrophic mammalian muscles. A comparison with embryonic myogenic cells. *Cell Differ.* 9:357-365.
- Coulton, G. R., J. E. Morgan, T. A. Partridge, and J. C. Sloper. 1988. The mdx mouse skeletal muscle myopathy: I, a histological, morphometric and biochemical investigation. *Neuropath. Appl. Neurobiol.* 14:53-70.
- Danko, I., V. Chapman, and J. A. Wolf. 1992. The frequency of revertants in mdx mouse genetic models for Duchenne muscular dystrophy. *Ped. Res.* 32: 128-131.
- Ervasti, J. M., and K. P. Campbell. 1991. Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell*. 66:1121-1131.
- Goebels, N., D. Michaelis, H. Wekerle, and R. Hohlfeld. 1992. Human myoblasts as antigen-presenting cells. *J. Immunol.* 149:661-667.
- Grounds, M., T. A. Partridge, and J. C. Sloper. 1980. The contribution of exogenous cells to regenerating skeletal muscle: an isoenzyme study of muscle allografts in mice. *J. Pathol.* 132:325-341.
- Guérette, B., I. Asselin, J. T. Vilquin, I. Kinoshita, R. Roy, and J. P. Tremblay. 1995. Lymphocyte infiltration following allo and xeno myoblast transplantation in mdx mice. *Muscle Nerve*. 18:39-51.
- Gussoni, E., G. K. Pavlath, A. M. Lanctot, K. Sharma, R. G. Miller, L. Steinman, and H. M. Blau. 1992. Normal dystrophin transcripts detected in DMD patients after myoblast transplantation. *Nature (Lond.)*. 356:435-438.
- Harris, J. B., M. A. Johnson, and E. Karlsson. 1975. Pathological responses of rat skeletal muscle to a single subcutaneous injection of a toxin from the venom of the Australian tiger snake, *Notechis scutatus scutatus*. *Clin. Exp. Pharm. Physiol.* 2:383-404.
- Hoffman, E. P., R. H. Brown, and L. M. Kunkel. 1987. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*. 51:919-928.
- Hoffman, E. P., J. E. Morgan, S. C. Watkins, and T. A. Partridge. 1990. Somatic reversion/suppression of the mouse mdx phenotype in vivo. *J. Neurol. Sci.* 99:9-25.
- Hohlfeld, R., and A. G. Engel. 1994. The immunobiology of muscle. *Immunol. Today*. 15:269-274.
- Huard, J., J. P. Bouchard, R. Roy, C. Labrecque, G. Dansereau, B. Lemieux, and J. P. Tremblay. 1991. Myoblast transplantation produces dystrophin positive muscle fibers in a 16 year old Duchenne patient. *Clin. Sci.* 81:287-288.
- Huard, J., J. P. Bouchard, R. Roy, F. Malouin, G. Dansereau, C. Labrecque, N. Albert, C. L. Richards, B. Lemieux, and J. P. Tremblay. 1992. Human myoblast transplantation: preliminary results of four cases. *Muscle Nerve*. 15: 550-560.
- Huard, J., R. Roy, B. Guérette, S. Verreault, G. Tremblay, and J. P. Tremblay. 1994a. Human myoblast transplantation in immunodeficient and immunosuppressed mice: evidence of rejection. *Muscle Nerve*. 17:224-234.
- Huard, J., S. Verreault, R. Roy, and J. P. Tremblay. 1994b. High efficacy of muscle regeneration following human myoblast transplantation in SCID mice. *J. Clin. Invest.* 93:586-599.
- Karpati, G. 1990. Immunological aspects of histoincompatible myoblast transfer into non-tolerant hosts. In *Myoblast transfer therapy*, R. Griggs and G. Karpati, Eds. Plenum Press, New York. 31-34.
- Karpati, G., Y. Pouliot, E. Zubrzycka-Gaarn, S. Carpenter, P. N. Ray, R. G. Worton, and P. Holl. 1989. Dystrophin is expressed in mdx skeletal muscle fibers after normal myoblast implantation. *Am. J. Pathol.* 135:27-32.
- Karpati, G., D. Ajdukovic, D. Arnold, R. B. Gledhill, R. Guttman, P. Holland, P. A. Koch, E. Shoubridge, D. Spence, M. Vanasse, G. V. Watters, M. Abrahamowicz, C. Duff, and R. G. Worton. 1993. Myoblast transfer in Duchenne muscular dystrophy. *Ann. Neurol.* 34:8-17.
- Kinoshita, I., J. Huard, and J. P. Tremblay. 1994a. Utilization of myoblasts from a transgenic mouse to evaluate the efficacy of myoblast transplantation. *Muscle Nerve*. 17:975-980.
- Kinoshita, I., J. T. Vilquin, B. Guérette, I. Asselin, R. Roy, and J. P. Tremblay. 1994b. Very efficient myoblast allotransplantation in mice under FK506 immunosuppression. *Muscle Nerve*. 17:1407-1415.
- Koenig, M., A. P. Monaco, and L. M. Kunkel. 1988. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell*. 53:219-228.
- Labrecque, C., R. Roy, and J. P. Tremblay. 1992. Immune reactions following myoblast transplantation in mouse muscles. *Transplant. Proc.* 24:2889-2892.
- Law, P. K., T. G. Goodwin, and H. J. Li. 1988a. Histoincompatible myoblast injection improves muscle structure and function of dystrophic mice. *Transplant. Proc.* 20:1114-1119.
- Law, P. K., T. G. Goodwin, and M. G. Wang. 1988b. Normal myoblast injections provide genetic treatment for murine dystrophy. *Muscle Nerve*. 11:525-533.
- Law, P. K., T. E. Bertorini, T. G. Goodwin, M. Chen, Q. Fang, H.-J. Li, D. S. Kirby, J. A. Florendo, H. G. Herrod, and G. S. Golden. 1990. Dystrophin production induced by myoblast transfer therapy in Duchenne muscular dystrophy. *Lancet*. 336:114-115.
- Lev, A. A., C. C. Feener, L. M. Kunkel, and R. H. Brown. 1987. Expression of

- the Duchenne's muscular dystrophy gene in cultured muscle cells. *J. Biol. Chem.* 262:15817-15820.
- Louboutin, J. P., V. Fichter-Gagnepain, E. Thaon, and M. Fardeau. 1993. Morphometric analysis of mdx diaphragm muscle fibres. Comparison with hind-limb muscles. *Neuromusc. Disord.* 3:463-469.
- Morgan, J. E., E. P. Hoffman, and T. A. Partridge. 1990. Normal myogenic cells from newborn mice restore normal histology to degenerating muscles of the mdx mouse. *J. Cell Biol.* 111:2437-2449.
- Morgan, J. E., C. N. Pagel, T. Sherratt, and T. A. Partridge. 1993. Long-term persistence and migration of myogenic cells injected into pre-irradiated muscles of mdx mice. *J. Neurol. Sci.* 115:191-200.
- Morgan, J. E., J. R. Beauchamp, C. N. Pagel, M. Peckham, P. Ataliois, P. S. Jat, M. D. Noble, K. Farmer, and T. A. Partridge. 1994. Myogenic cell lines derived from transgenic mice carrying a thermostable T antigen: a model system for the derivation of tissue-specific and mutation-specific cell lines. *Dev. Biol.* 162:486-498.
- Oppat, W. F., and T. Mohanakumar. 1994. Minor histocompatibility antigens. In *The role of MHC and non-MHC antigens in allograft immunity*. T. Mohanakumar, editor. R.G. Landes Company, Austin, TX. 73-111.
- Partridge T. A. 1991. Myoblast transfer: a possible therapy for inherited myopathies. *Muscle Nerve.* 14:197-212.
- Partridge, T. A., J. E. Morgan, G. R. Coulton, E. P. Hoffman, and L. M. Kunkel. 1989. Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts. *Nature (Lond.)*. 337:176-179.
- Pastoret, C. and A. Schille. 1993. Further aspects of muscular dystrophy in mdx mice. *Neuromusc. Disord.* 3:471-475.
- Pavliath, G. K., K. Riech, S. G. Webster, and H. M. Blau. 1989. Localization of muscle gene products in nuclear domains. *Nature (Lond.)*. 337:570-573.
- Pavliath, G. K., T. A. Rando, and H. M. Blau. 1994. Transient immunosuppressive treatment leads to long-term retention of allogeneic myoblasts in hybrid myofibers. *J. Cell Biol.* 127:1923-1932.
- Rando, T. A., and H. M. Blau. 1994. Primary mouse myoblast purification, characterization, and transplantation for cell-mediated gene therapy. *J. Cell Biol.* 125:1275-1287.
- Roy, R., G. Dansereau, J. P. Tremblay, M. Belles-Isles, J. Huard, C. Labrecque, and J. P. Bouchard. 1991. Expression of major histocompatibility complex antigens on human myoblasts. *Transplant Proc.* 23:799-801.
- Roy, R., J. P. Tremblay, J. Huard, F. Malouin, and J. P. Bouchard. 1993. Antibody formation after myoblast transplantation in Duchenne dystrophic patients, donor HLA compatible. *Transplant Proc.* 25:995-997.
- Scott, M., J. E. Sylvestre, T. Helman-Paterson, Y. J. Shi, W. Ficles, H. Stedman, A. Burghes, P. Ray, R. Worton, and K. H. Fischbeck. 1988. Duchenne muscular dystrophy gene expression in normal and diseased human muscle. *Science (Wash. DC)*. 239:1418-1420.
- Sicinski, P., Y. Geng, A. S. Ryder-Cook, E. A. Barnard, M. G. Darkinson, and P. J. Barnard. 1989. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science (Wash. DC)*. 244:1578-1580.
- Tremblay, J. P., F. Malouin, R. Roy, J. Huard, J. P. Bouchard, A. Satoh, and C. L. Richards. 1993. Results of a triple blind clinical study of myoblast transplantations without immunosuppressive treatment in young boys with Duchenne muscular dystrophy. *Cell Transplantation.* 2:99-112.
- Vilquin, J. T., I. Asselin, B. Guérette, I. Kinoshita, S. Lille, R. Roy, and J. P. Tremblay. 1994. Myoblast allotransplantation in mice: the degree of success varies depending on the efficacy of various immunosuppressive treatments. *Transplant. Proc.* 26:3372-3373.
- Vilquin, J. T., I. Asselin, B. Guérette, I. Kinoshita, R. Roy, and J. P. Tremblay. 1995a. Successful myoblast allotransplantation in mdx mice using rapamycin. *Transplantation.* 59:422-426.
- Vilquin, J. T., S. Braun, P. Labouret, G. Zuber, C. Tranchant, P. Poindron, and J. M. Warter. 1992. Specific effect of corticoids on acetylcholine receptor expression in rat skeletal muscle cell cultures. *J. Neurosci. Res.* 31:285-293.
- Vilquin, J. T., B. Guérette, I. Kinoshita, B. Roy, M. Goulet, C. Gravel, R. Roy, and J. P. Tremblay. 1995b. FK506 immunosuppression to control the immune reactions triggered by first generation adenovirus-mediated gene transfer. *Hum. Gene Ther.* 6:1391-1401.
- Vilquin, J. T., I. Kinoshita, R. Roy, and J. P. Tremblay. 1995c. Cyclophosphamide immunosuppression does not permit successful myoblast allotransplantation in mouse. *Neuromusc. Disord.* In press.
- Wakeford, S., D. J. Watt, and T. A. Partridge. 1991. X-irradiation improves mdx mouse muscle as a model of myofiber loss in DMD. *Muscle Nerve.* 14: 42-50.
- Watkins S. C., E. P. Hoffman, H. S. Slayter, and L. M. Kunkel. 1988. Immunoelectron microscopic localization of dystrophin in myofibres. *Nature (Lond.)*. 333:863-866.
- Watt, D. J., K. Lambert, J. E. Morgan, T. A. Partridge, and J. C. Sloper. 1982. Incorporation of donor muscle precursor cells into an area of muscle regeneration in the host mouse. *J. Neurol. Sci.* 57:319-331.
- Watt, D. J., J. E. Morgan, and T. A. Partridge. 1984. Long term survival of allografted muscle precursor cells following a limited period of treatment with cyclosporin A. *Clin. Exp. Immunol.* 55:419-426.
- Watt, D. J., J. Karasinski, and M. A. England. 1993. Migration of lacZ positive cells from the tibialis anterior to the extensor digitorum longus muscle of the X-linked muscular dystrophic (mdx) mouse. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 14: 121-132.
- Zhao, J. E., K. Yoshioka, T. Miike, and M. Miyatake. 1993. Developmental studies of dystrophin-positive fibers in mdx, and DRP localization. *J. Neurol. Sci.* 114:104-108.



RESEARCH ARTICLE

Electrotransfer of naked DNA in the skeletal muscles of animal models of muscular dystrophies

JT Vilquin¹, PF Kennel², M Paturneau-Jouas¹, P Chapdelaine³, N Boissel¹, P Delaère², JP Tremblay³, D Scherman⁴, MY Fiszman¹ and K Schwartz¹

¹INSERM U 523, Hôpital de la Salpêtrière, Paris; ²Gencell Biodistribution and Early Safety Department, Aventis Pharma SA, Centre de Recherche de Vitry-Alfortville, France; ³Unité de Médecine Génétique et Moléculaire, Centre Hospitalier de l'Université Laval, Québec, Canada; and ⁴UMR 7001 CNRS/ENSCP-Gencell, Aventis Pharma SA, Centre de Recherche de Vitry-Alfortville, France

The electrotransfer of naked DNA has recently been adapted to the transduction of skeletal muscle fibers. We investigated the short- and long-term efficacy of this methodology in wild-type animals and in mouse models of congenital muscular dystrophy (*dy/dy*, *dy²/dy²*), or Duchenne muscular dystrophy (*mdx/mdx*). Using a reporter construct, the short-term efficacy of fiber transduction reached 40% and was similar in wild-type, *dy/dy* and *dy²/dy²* animals, indicating that ongoing muscle fibrosis was not a major obstacle to the electrotransfer-mediated gene transfer. Although the complete rejection of transduced fibers was observed within 3 weeks in the absence of immunosuppression, the persistence was prolonged over 10 weeks when transient or continuous immunosuppressive regimens were used. Using

therapeutic plasmids, we demonstrated that electrotransfer also allowed the transduction of large constructs encoding the laminin $\alpha 2$ chain in *dy/dy* mouse, or a chimeric dystrophin-EGFP protein in *mdx/mdx* mouse. The correct sarcolemmal localization of these structural proteins demonstrated the functional relevance of their expression *in vivo*, with a diffusion domain estimated to be 300 to 500 μm . However, degeneration–regeneration events hampered the long-term stability of transduced fibers. Given its efficacy for naked DNA transfer in these models of muscular dystrophies, and despite some limitations, gene electrotransfer methodology should be further explored as a potential avenue for treatment of muscular dystrophies. Gene Therapy (2001) 8, 1097–1107.

Keywords: *dy/dy* mouse; *mdx/mdx* mouse; dystrophin; laminin $\alpha 2$ chain; naked DNA; electrotransfer

Introduction

Muscular dystrophies are devastating genetic diseases frequently leading to premature death of affected children or young adults. Spontaneous animal models have been described for the most frequent form, Duchenne muscular dystrophy (DMD),^{1–3} and also for the occidantal form of congenital muscular dystrophy (CMD).^{4–11} These models have helped the investigations of potential therapeutic avenues, including the recent approaches based on gene transfer. In skeletal muscle, transduction efficacy is largely dependent on the development of a vector or vehicle that can selectively and efficiently deliver a gene to target cells with minimal toxicity.

Nonviral vectors are particularly suitable due to their simplicity of production and use, absence of size restriction, and lack of immune response. The simplest approach to nonviral delivery systems is direct gene transfer with naked plasmid DNA,¹² which is smaller than other vectors, and may be produced easily on a large scale with standardized quality. However, the use of naked DNA is hampered by the poor efficacy of trans-

duction *in vivo*. Although transduction yields are sufficient to trigger immune reactions in certain situations,^{13–16} they would not reach the threshold required for the development of a functional benefit. The electrotransfer methodology has been recently adapted to skeletal muscle transduction *in vivo* with high efficacy and reproducibility, the expression of reporter or secreted proteins being increased by a factor of one to many hundreds.^{17–23} This physical approach improves naked DNA transfer efficacy by a two-component process consisting of membrane permeabilization and DNA movement enhanced by electrophoresis.^{19,24} The *in vivo* application of electric pulses across muscle tissue instantaneously and temporarily compromises the barrier function of the cell membrane, allowing foreign genetic material to enter.

Naked DNA electrotransfer studies performed up to now were aimed at improving the level and reliability of gene expression after plasmid DNA injection in healthy muscle, but this methodology could be perfectly well-adapted for gene transfer in skeletal muscles of animal models of muscular dystrophies. In the present study, we investigated the efficacy of this methodology in the *mdx/mdx* and *dystrophin muscularis* mice, which are animal models of DMD and CMD, respectively.

DMD is an X-linked disease due to the alteration of the gene coding for a large subsarcolemmal protein termed dystrophin.¹ The most widely studied animal model for

Correspondence: J-T Vilquin, INSERM U 523, Institut de Myologie, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, 47 Boulevard de l'Hôpital, 75651 Paris Cedex 13, France
Received 17 October 2000; accepted 31 March 2001

DMD, the *mdx/mdx* (*mdx*) mouse,^{1,2} lacks subsarcolemmal dystrophin because of a mutation in position 3185 of the *dystrophin* gene.³ The animals are characterized by raising of the level of plasma pyruvate kinase and muscular isoform of creatine phosphokinase, histological abnormalities of muscular tissue,² but adult *mdx* mice show few clinical signs up to 18 months. Depending on the age of the mouse and the muscle considered, 30 to 90% of the fibers are centronucleated, which is a characteristic of adult regenerated fibers. Except the diaphragm, which is one of the most constantly solicited skeletal muscles, they do not show extensive fibrosis.²⁵ Depending on their age and strain, the mice present 0.1 to 1% of revertant fibers, which express a truncated form of dystrophin.²⁶ The lack of dystrophin makes the *mdx* mouse a good model for gene complementation. Indeed, the transfer of a dystrophin minigene into the gastrocnemius muscle of young *mdx* was reported to protect partially the transduced fibers against detrimental consequences of eccentric exercise.²⁷

The occidental form of CMD is an autosomal disease due to the defect of the gene coding for the $\alpha 2$ chain of laminin.¹¹ The association of the large $\alpha 2$ chain with $\beta 1$ and $\gamma 1$ chains constitutes the laminin-2 protein, which is an extracellular protein providing a bridge between the sarcolemmal membrane and the extracellular matrix in muscle fibers.^{28,29} The *dystrophia muscularis dy/dy* and *dy²¹/dy²¹* mice are animal models for the occidental form of CMD.⁴⁻¹⁰ Both murine and human diseases share common clinical, histological and genetic features, among which are the generalized and progressive alteration of the muscular tissue. The number of fibers is decreased and their diameter is greatly variable. Strikingly, a widespread proliferation of the endomysial tissue leads to the progressive fibrosis of the muscle.^{4,5,30} The fibrosis process takes place rapidly in *dy/dy* animals and more slowly in *dy²¹/dy²¹*. In the latter, the process is first segmental but becomes generalized by the age of 3 months.^{5,21,22} In the absence of the laminin $\alpha 2$ chain, muscle regeneration is abortive.^{33,34} The *dy/dy* animals develop a devastating disease reducing the life expectancy to 6 months, whereas *dy²¹/dy²¹* animals develop a milder pathology which allows them to survive up to 24 months. The difference between these models may be related to the expression of a truncated, but partially functional protein in the *dy²¹/dy²¹* mouse.^{9,10} Using these animal models, we addressed some issues specific to dystrophic muscle: is transduction of skeletal muscle fibers efficient in animal models of muscular dystrophies using reporter plasmids, and does muscle dystrophy hamper efficacy? Does the transfer of therapeutic genes induce the expression of functional proteins in these suffering muscles *in vivo*? Does electrotransfer induce immunological responses, and does the expression of the transgene persist in these models? We show that this methodology allows efficient transduction of dystrophic muscle fibers, and that the persistency of the transgene product is dependent upon the immune system and the muscle fibers turn-over.

Results

Short-term transduction efficacy of the β -gal reporter gene in wild-type and dystrophic mice

In wild-type mice, less than 1% ($n = 4$) of the muscle fibers was found to express the reporter protein β -gal 6 days

after gene transfer in the absence of electrotransfer. Conversely, the electrotransfer conditions used in this study allowed transduction of $37 \pm 14\%$ ($n = 19$) of muscle fibers when correlated to the surface containing the reporter protein, and of $47 \pm 13\%$ ($n = 8$) of muscle fibers when correlated to the number of transduced fibers (Figure 1A and B). We observed a good correlation between the results obtained using the two methodologies for measuring expression, ie computer-assisted surface measurement and manual counting of the fibers, the difference between these methodologies for measurement being not significant ($P > 0.05$). Indeed, the amount of fibrotic tissue is negligible in non-dystrophic animals.

In the *dy/dy* and *dy²¹/dy²¹* mice, the transduction efficacy rarely reached 1% (Figure 1E, G) in the absence of electrotransfer. However, the electrotransfer methodology increased the transduction of muscle fibers in these models dramatically (Figure 1F, H). Based on surface measurements, the efficacy of β -gal gene transfer was estimated to be $14.3 \pm 6.3\%$ ($n = 9$) in *dy/dy* animals and $23.3 \pm 8.1\%$ ($n = 9$) in *dy²¹/dy²¹* mice. This discrepancy, which is statistically significant ($P < 0.05$), is due to the presence of fibrotic tissue which, in the surface measurement method, is recognized as non-transduced tissue hence leading to an underestimation of the efficacy of transduction. Alternatively, the direct counting of the transduced fibers gave an efficacy of $32 \pm 9.7\%$ ($n = 5$) in *dy/dy* mice and $35.7 \pm 14\%$ ($n = 4$) in *dy²¹/dy²¹* mice, the difference being not significant, thus indicating that the plasmids were able to diffuse within the tissues and penetrate the muscle fibers with the same efficacy. These results suggest that fibrosis was not an obstacle to electrotransfer in these animal models.

In wild-type as well as in dystrophic animals, the fibers expressing the reporter protein β -gal were not homogeneously distributed over the whole muscle, suggesting that transduction occurred mainly at the multiple injection sites (Figure 1B, F, H). The length of expression of the β -gal, however, extended longitudinally over hundreds of microns (not shown). Variations in staining intensity were observed.

No damage was induced in the muscular tissue by the electrotransfer methodology in wild-type animals. No classical figure of ongoing degeneration-regeneration^{25,26} was observed in the muscular tissue at the time (6 days) of analysis in wild-type mouse muscles (Figure 1C, D). The transduced fibers, which were identified by β -gal expression, were not centronucleated (Figure 1C, D). We did not observe the massive cellular infiltration that is present following delivery of cellular or viral vectors.^{36,37} Given the fibrotic nature of the dystrophic muscles, it is difficult to judge about the potential damage triggered by electrotransfer in the models of muscular dystrophies.

Short-term transduction efficacy of the laminin $\alpha 2$ chain gene in dystrophia muscularis mice

The reporter and therapeutic constructs were mixed and injected together in these short-term cotransduction experiments. This is the first report showing that the transduction of the therapeutic laminin $\alpha 2$ chain cDNA led to the expression of a functional laminin $\alpha 2$ chain in *dy/dy* mice, which is correctly expressed around the muscle fiber membrane (Figure 2A, B). As for β -gal expression, staining intensity varied from fiber to fiber, some cells even showing cytoplasmic expression and fur-

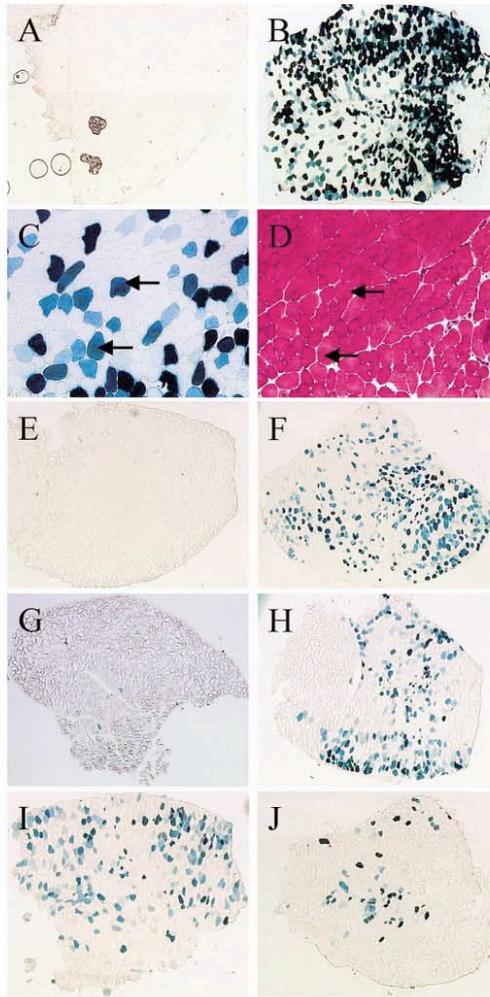


Figure 1 Short-term expression of β -gal reporter transgene in wild-type, dy/dy and dy^2/dy^2 animals. The pCOR β -gal plasmid was injected in the tibialis anterior of wild-type (A–D), dy^2/dy^2 (E, F, I) and dy/dy (G, H, J) animals. The expression of the β -gal reporter protein was analyzed by X-gal histochemistry 6 days (A–H) or 1 month (I, J) after gene transfer in the absence (A, E, G) or presence (B–D, F, H–J) of electrotransfer. C and D are serial sections. In C, X-gal histochemistry localizes the fibers expressing β -gal. In D, hematoxylin-eosin staining indicates the absence of muscle degeneration, necrosis, infiltration or centronucleation in the areas of transduced fibers. Arrows localize identical fibers on serial sections. Animals used in 1-month experiments were immunosuppressed. Original magnification, $\times 30$ (A, B, E–J), $\times 120$ (C, D).

thermore, transduction was not restricted to the large fibers (Figure 2A, B). However, we observed that the number of fibers expressing β -gal was higher than those expressing the laminin $\alpha 2$ chain since 6 to 16% ($n = 3$) of the fibers were positive for $\alpha 2$ chain staining, whereas up

to 33% were positive for β -gal staining. As in the case of wild-type animals, the transduced fibers were not homogeneously distributed. However, the use of serial sections allowed us to estimate the domain of expression of the $\alpha 2$ chain to be close to 500 μm (Figure 2C–F).

Requirement of immunosuppression for long-term transgene expression

In the absence of immunosuppression, the percentage of muscle fibers expressing the foreign protein β -gal dropped dramatically 3 weeks after electrotransfer in both wild-type ($n = 4$, Figure 3B) and dystrophic animals (not shown), as compared with the percentage obtained 6 days after electrotransfer (Figure 3A). Conversely, the number of centronucleated fibers rose, suggesting an event of degeneration–regeneration (not shown). No prominent cellular infiltration was observed at the time of death, ie 3 weeks after gene transfer.

FK506 is a powerful immunosuppressant which has been used successfully in various animal models to prevent the immune rejection triggered by the expression of new antigens. For instance, FK506 blocked the cellular and humoral rejection of transgene products in cell- or virus-mediated gene transfer in mice.^{39–44} Therefore, in the present study, FK506 was used to prevent the rejection of transduced muscle fibers by the mature, adult immune system of the recipient mice. As expected, the daily immunosuppression of animals following transduction led to the persistency of a high percentage of labeled fibers for several weeks in wild-type mice. The continuous immunosuppression over 3 weeks allowed the level of expression to remain high over 3 weeks (surface measurement, $40.2 \pm 8.5\%$, $n = 8$, Figure 3D). The difference between immunosuppressed and non-immunosuppressed groups is significant ($P < 0.05$). Moreover, the discontinuation of FK506 treatment after 3 weeks still allowed a high expression level 4 weeks later, the difference with the group of mice killed after 3 weeks not being significant (surface measurement, $41.5 \pm 13.9\%$, $n = 6$, Figure 3E). The effect was partially sustained over time since, even 10 weeks after cessation of FK506, some fibers were still expressing β -gal (Figure 3F). However, a precocious cessation of FK506 immunosuppression was not efficient at blocking cellular rejection, since a 1 week-long immunosuppression was not sufficient to allow a 3 week-long persistency of transduced fibers ($n = 4$, Figure 3C).

Long-term expression of β -gal and laminin $\alpha 2$ chain genes in dystrophin muscularis mice

For these long-term cotransduction experiments, all animals were immunosuppressed. One month after electrotransfer, the fibers expressing the β -gal reporter protein were still numerous (surface measurements, $8 \pm 2.8\%$ ($n = 2$) in dy/dy animals and $17.7 \pm 5.4\%$ ($n = 6$) in dy^2/dy^2 animals, Figure 1I, J).

Long-term transduction efficacy of β -gal and dystrophin genes in mdx mice

All animals were immunosuppressed for these long-term cotransduction experiments. As in the CMD animal models, electrotransfer greatly increased gene transfer efficacy in this DMD animal model (Figure 4C). It should be noted that 1 month after transduction in these mdx mice, the number of labeled fibers has decreased, as compared with wild-type animals. The difference between the

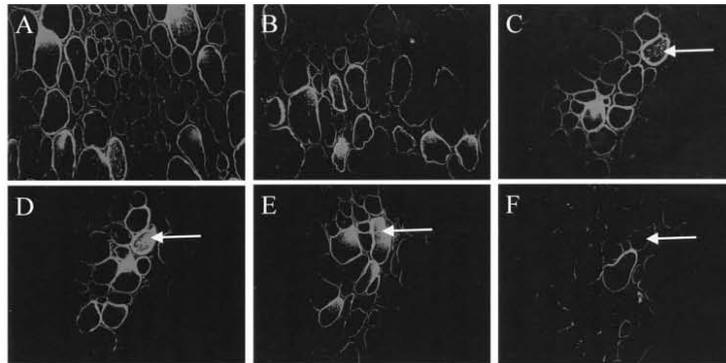


Figure 2 Expression of the $\alpha 2$ chain transgene in *dy/dy* mice. The expression of laminin $\alpha 2$ chain was explored by immunohistofluorescence 6 days after electrotransfer-mediated transfer of the pMER plasmid in *dy/dy* muscles. The protein surrounded muscle fibers of different diameters in continuous or patchy patterns (A, B), and was also present in the cytoplasmic compartment of some fibers. The staining was restricted to portions of the muscle probably representing the injection sites. (B–F). Figures C to F: serial images of consecutive sections interspaced by 160 μm . The arrow identifies the same muscle fibers and indicates that the domain of expression of the $\alpha 2$ chain is restricted to about 500 μm . Original magnification: $\times 250$.

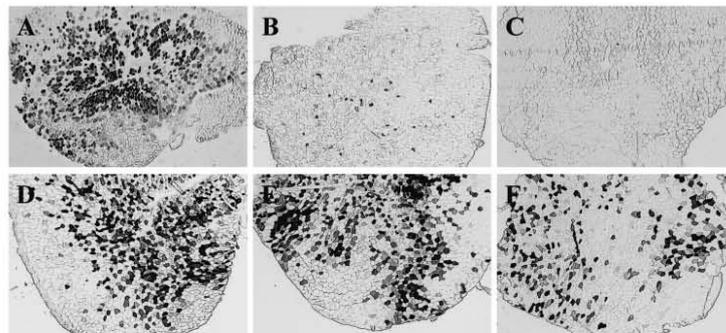


Figure 3 Evidence of immune reactions against the fibers expressing the β -gal reporter transgene. The expression of the β -gal reporter protein was observed at various times after electrotransfer of the pCOR β -gal plasmid in adult, immunocompetent non-dystrophic mice. (A) Death at 6 days after gene transfer; (B) death at 3 weeks after gene transfer in the absence of immunosuppression; (C) death at 3 weeks after gene transfer following a 1-week long transient FK506 immunosuppression; (D) death at 3 weeks after gene transfer following a 3-week FK506 immunosuppression; (E) death at 7 weeks after gene transfer, following a 3-week-long transient FK506 immunosuppression; (F) death at 13 weeks after gene transfer, following a 3-week-long transient FK506 immunosuppression. Original magnification, $\times 25$.

efficacy in wild-type animals ($40.2 \pm 8.5\%$, $n = 8$) and in *mdx* animals ($22.0 \pm 8.9\%$, $n = 7$) is significant ($P < 0.03$). As observed in the other models, the distribution of the fibers expressing β -gal was not homogenous.

The transduction of the EGFP cDNA construct resulted in strong but diffuse expression of the EGFP protein in the cytoplasm of the muscle fibers (not shown). The transduction of either the minidystrophin-EGFP construct (Figure 4A–F) or the full-length dystrophin-EGFP construct (Figure 4G, D) resulted in the strong expression of EGFP protein restricted to the sarcolemmal membrane. As with previous models, staining intensity varied from one fiber to the other.

Given the nature of the constructs used in these experiments, four combinations of fiber labeling were expected following transduction, since the fibers expressing EGFP always express dystrophin: (1) β -Gal+/EGFP+/

dystrophin+ fibers; (2) β -Gal+/EGFP–/dystrophin– fibers; (3) β -Gal–/EGFP+/dystrophin+ fibers; (4) β -Gal–/EGFP–/dystrophin– fibers. As the so-called revertant fibers expressing a truncated form of dystrophin are present in *mdx* muscles,²⁶ two other combinations were also expected: (5) β -Gal+/EGFP–/dystrophin+ fibers; (6) β -Gal–/EGFP–/dystrophin+ fibers. The six combinations were indeed identified among neighboring fibers and five out of six are shown in Figure 4F. It is worth noting that any false positive results between β -gal, EGFP and dystrophin is ruled out by the fact that some fibers expressing the β -gal did not express the EGFP, nor dystrophin, and conversely some fibers expressing EGFP or dystrophin did not express β -gal.

The analysis of serial muscle sections allowed the calculation of the nuclear domains of the reporter proteins, as illustrated in Figure 5. The expression of

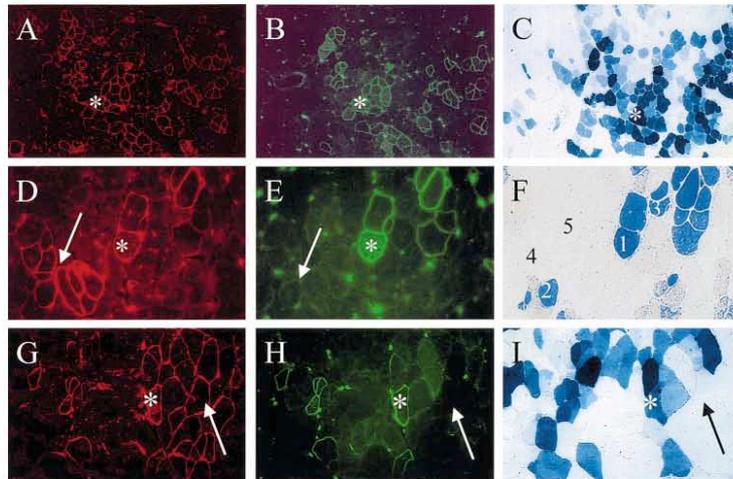


Figure 4 Expression of β -gal, EGFP and dystrophin transgenes in *mdx* mice. Electrotransfer was performed in immunosuppressed *mdx* animals following the injection of pCOR β -gal plasmid associated to the pEGFP-MiniDystrophin (A–F) construct or to the pEGFP-full length dystrophin (G–I) construct and the animals were killed 3 weeks later. The expression of mini-dystrophin (A, D), of full-length dystrophin (G), or of revertant dystrophin (A, D, G) was assessed by immunohistochemistry. The expression of EGFP (B, E, H) was observed by direct histofluorescence. Dystrophin and EGFP were observed on the same section. The expression of β -gal was assessed by X-gal histochemistry (C, F, I) on an adjacent section. (A–C) Asterisks localize the same fibers; the fibers expressing EGFP also expressed minidystrophin, but some fibers expressing a revertant dystrophin, but no EGFP were observed. The fibers expressing the EGFP and β -gal were localized in the same clusters, although the β -gal-positive fibers were more numerous. (D–F) At higher magnification, asterisks localize the same fiber, and arrows identify a cluster of fibers expressing a revertant form of dystrophin. In F, the numbers identify five labeling combinations among neighboring fibers (see text). (G–I) The fibers expressing EGFP also expressed full length dystrophin, but some fibers also expressing a revertant dystrophin but no EGFP were observed (arrows). Asterisks localize the same fiber. Original magnification: $\times 90$ (A–C), $\times 230$ (D–I).

EGFP/dystrophin was generally restricted between 32 and 40 consecutive sections (ie about 300 μ m). As expected, the expression of dystrophin alone in the revertant fibers not expressing EGFP extended over the length of the skeletal muscle (Figure 5 shows a view limited to 40 consecutive sections). Strikingly, the fibers transduced with the β -gal plasmid were expressing the protein over more than 360 consecutive sections, ie 2500 μ m (Figure 6).

Persistence of transgene expression in a model of acute degeneration–regeneration

Notexin is a snake venom which triggers extensive degeneration and regeneration cycles in animal models.^{45,46} In small muscles, as in our experimental conditions, degeneration is rapid and complete and regeneration is achieved by 3 weeks. Centronucleation is a hallmark of regeneration. The presence of fibers of smaller diameter or irregular shape is also frequently observed in regenerated muscles.^{25,35,47,48} In order to mimic an accelerated degeneration of muscle tissue, we injected notexin intramuscularly in one of the two transduced legs of immunosuppressed wild-type animals 4 weeks after the electrotransfer. Immunosuppression was continued for 1 month at which time animals were killed.

As expected (Figure 7C), notexin has induced an acute process of degeneration–regeneration, as illustrated by the very high number of centronucleated fibers in the injected muscle to be compared with the very small number of centronucleated fibers in the contralateral muscle.

Indeed, the ratio of centronucleated fibers *versus* non-centronucleated fibers was over 90% in the notexin-injected muscle and less than 10% in the contra-lateral muscle (Figure 7B, D). Moreover, histological examination of the notexin-injected muscle revealed the presence of numerous small caliber fibers of irregular shape. β -Gal expression almost completely disappeared only from the notexin-injected, degenerated muscle (Figure 7A, C), since very few fibers expressed β -gal (surface measurement $1 \pm 1\%$, $n = 7$, Figure 7A). On the other hand, a high number of muscle fibers were expressing the reporter gene in the muscle which was not damaged by notexin injection (surface measurement $35.5 \pm 3.7\%$, $n = 4$, Figures 7A, C). The difference between these two groups is significant ($P < 0.05$). Therefore we concluded that the muscle degeneration is the cause of loss of β -gal expression after gene transfer, despite a very efficient initial level of transduction.

Discussion

Our results show that naked gene electrotransfer *in vivo* is highly efficient in both dystrophic and non-dystrophic mice. Indeed, a high number of muscle fibers is successfully transduced by using the transfer conditions described in our previous work.^{18,19} The transduction was as efficient in the dystrophic fibrotic tissue as in non-dystrophic muscle. Moreover, dystrophic fibers of variable diameters were transduced. This strongly suggests that the presence of fibrotic tissue does not hamper the trans-

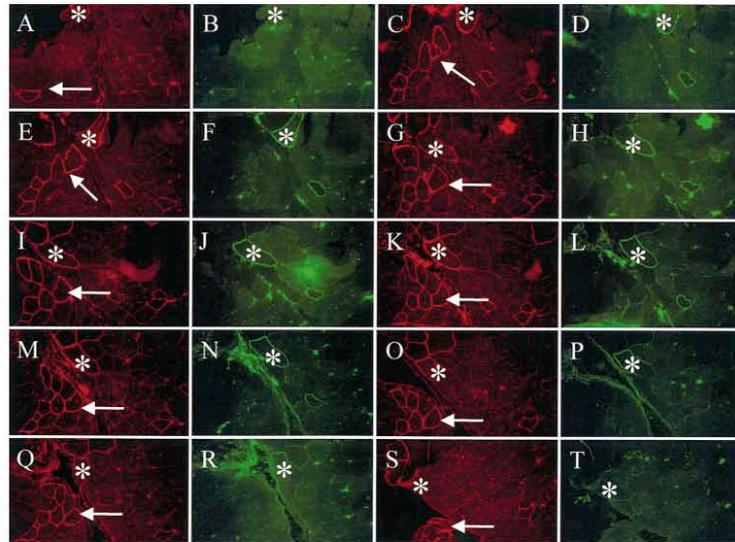


Figure 5 Expression domains of EGFP and dystrophin in *mdx* muscle. Electrotransfer was performed in immunosuppressed *mdx* animals following the injection of the pEGFP-full length dystrophin construct and the mice were killed 3 weeks later. The expression of full-length dystrophin or of revertant dystrophin (first and third columns) was assessed by immunofluorescence. The expression of EGFP (second and fourth columns) was observed by direct histofluorescence. Dystrophin and EGFP were colocalized on the same section. The pairs of sections (dystrophin, EGFP) were interspaced by 32 μm . Asterisks localize fibers expressing both EGFP and dystrophin, and arrows localize a cluster of fibers expressing a revertant form of dystrophin. Note that EGFP and full-length dystrophin are expressed simultaneously over eight sets of sections, whereas the expression domain of the revertant dystrophin extends over the complete set of sections, thus pointing out a difference in the length of the domains of the two dystrophin proteins. Original magnification, $\times 90$.

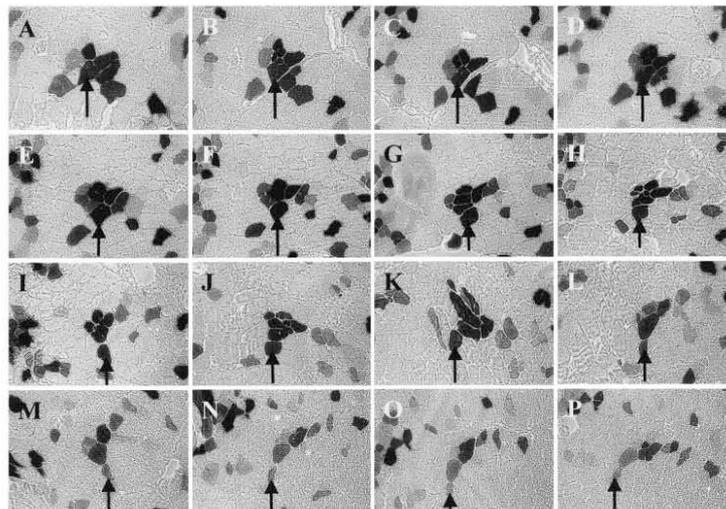


Figure 6 Expression domain of $\beta\text{-gal}$ in *mdx* muscle. Electrotransfer was performed in immunosuppressed *mdx* animals following the injection of pCOR $\beta\text{-gal}$ plasmid and the mice were killed 3 weeks later. The expression of $\beta\text{-gal}$ was assessed by X-gal histochemistry. The sections presented are interspaced by 200 μm , excepted for J, K and L which are separated by 100 μm . The arrows localize the same muscle fiber through the whole length of the muscle fiber. $\beta\text{-gal}$ staining extends over the whole set of pictures. Note that the shape and orientation of the fibers progressively change due to the structure and orientation of the muscle. Splitting is frequently observed in the *mdx* muscle. Original magnification, $\times 110$.

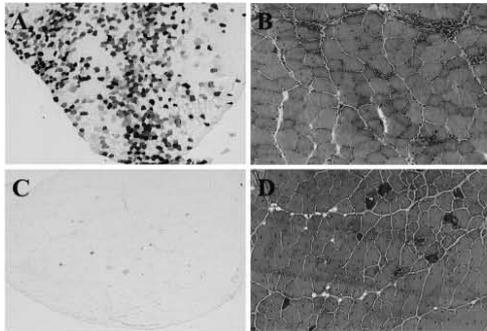


Figure 7 Lack of persistence of transduced fibers in an acute model of degeneration-regeneration. Electrotransfer was performed in both tibialis anterior of wild-type animals following the injection of pCOR β -gal plasmid. Three weeks later, one tibialis was injected with notexin (C, D) whereas the contralateral was not (A, B). The animals were killed 4 weeks after notexin injection, ie 7 weeks after gene transfer. The expression of β -gal was assessed by X-gal histochemistry (A, C). Serial sections were stained with hematoxylin-eosin (B, D). Most fibers were centronucleated in the muscle injected with notexin (D), whereas most fibers were not in the contralateral muscle (B). Original magnification, $\times 35$ (A, C), $\times 140$ (B, D).

duction of fibrotic muscle. However, the distribution of the transduced fibers was not homogenous, suggesting that naked DNA diffusion inside the muscle tissue from the injection site should still be improved. Recent studies documented the administration of various vectors through the vascular route following transient ischemia, chemically induced vasodilatation,⁴⁹ or under high physical pressure.⁵⁰ The focused ultrasound technology should also be considered.⁵¹ Therefore, naked DNA transfer could be improved by the coupling of one of these approaches to the electrotransfer methodology.

We have chosen to quantify reporter gene expression by manual counting of transduced fibers and by computer-assisted measurement of the surface of transduced muscle, because these measurements indicated the topography and extent of transduction, the distribution of the vectors, and the possible relevance to a physiological functional benefit.

The electrotransfer parameters that were used in the present work did not trigger extended muscle damage in non-dystrophic animals as shown by the low number of centronucleated fibers and the absence of cellular infiltration either 6 days or 3 weeks (immunosuppressed animals) after electrotransfer. However, the original nature of dystrophic muscles makes difficult the evaluation of potential additional damage raised by the electrotransfer procedure in dystrophic animals. For example, the *mdx* skeletal muscle is known to be especially sensitive to eccentric contractions,^{27,52,53} and one may not exclude that the electrotransfer protocol may be more detrimental in certain muscular pathologies than in others.

Our results indicate that, in immunocompetent animals, the expression of the β -gal transgene is lost within a couple of weeks. In some models, the expression of a transgene triggers a specific immune rejection directed against the transduced fibers, that results in their elimin-

ation. However, such a phenomenon is dependent on the transgene: it has not been observed for the luciferase reporter gene over a period of 1 year in C57Bl6J immunocompetent mice,^{18,19} but has been observed for secreted proteins such as alkaline phosphatase or human factor IX²³ or cytoplasmic proteins such as hepatitis B envelope protein.¹⁶

To evaluate whether the loss of β -gal expression was due to an immune response of the host, and not to muscle instability or to promoter shut-off in muscular tissue, the animals were immunosuppressed using FK506. This agent is a blocker of interleukin-mediated T cell activation and inhibits cellular- and humoral-specific immune responses directed against neo-antigens.⁵⁴⁻⁵⁸ FK506 has been used previously to prevent the rejection of transgene products brought in recipient animals by cellular or viral vectors.³⁷⁻⁴⁴ Our present results indicate that the specific immune reactions are blocked by the permanent or discontinuous administration of the FK506 immunosuppressant. The protection, however, fades away and the number of β -gal-positive fibers decreases with time after termination of FK506. We observed that a 3-week transient immunosuppression led to a delayed persistency of the β -gal expression over 7 to 13 weeks. FK506 did not induce long-term tolerance of the neo-antigen β -gal, but may slow the rejection reaction, as observed in other experimental situations.^{37,41} Our results thus confirm that β -gal antigens may trigger immune reactions, even in the absence of a cellular or viral vector.³⁷

The present results were obtained in the C57Bl6J mouse strain, using a transgene of prokaryotic origin. It should be underlined that the triggering and extent of immune rejection may vary according to the nature of the transgene product and the animal species or strain. The extent of immune reactions triggered by the introduction of species-specific transgenes and corresponding recombinant protein is not yet elucidated, but the present electrotransfer methodology will provide a valuable tool for the investigation of such reactions.

This study is the first report of the restoration of laminin-2 *in vivo* by direct gene transfer. Indeed, the introduction of laminin $\alpha 2$ chain cDNA led to the expression of a $\alpha 2$ chain located around the sarcolemmal membrane, and the introduction of mini-dystrophin or of full-length dystrophin cDNAs linked to the EGFP cDNA led to the production of fusion proteins which were addressed to the subsarcolemmal membrane. Taken together, these findings indicate that a functional restoration of the missing proteins is possible at the cellular level in dystrophic animals when an electrotransfer-mediated process is combined to the delivery of plasmid DNA.

Among dystrophin-positive fibers, two categories were clearly identified by the presence or absence of co-expression of EGFP. Hence, the utilisation of EGFP-dystrophin constructs expressing fusion proteins allows a clear distinction between revertant fibers expressing a truncated form of dystrophin,²⁶ but no EGFP, and the truly transduced fibers expressing both EGFP and dystrophin. Thus, as they allow easy discrimination between transduced and revertant fibers, the EGFP-dystrophin constructs presented here are useful tools for the design of future gene transfer protocols *in vivo*, as suggested in a previous report.⁵⁹

From the colocalization of EGFP and dystrophin, the

domain of expression of these molecules following gene transfer can be calculated. Our studies confirm some previous findings obtained in other models, ie over 1500 μm for $\beta\text{-gal}$ ^{60,61} and about 300 μm for dystrophin.^{60,62} Along the same line, we show here that the domain of expression of the laminin-2 molecule is approximately 500 μm . These results underline one present limitation of direct gene transfer into skeletal muscles, which is the restricted segmental diffusion of the transgenic proteins inside the transduced fibers. This may be considered an advantage in situations where the local delivery of a protein is required. However, it may also be considered an impediment in situations where the long-range restoration of a structural protein is required, such as in muscular dystrophies.

The numbers of muscle fibers expressing the therapeutic proteins were lower than that observed using a $\beta\text{-gal}$ reporter cDNA (see Figure 5), and the length of stained individual fibers was shorter. These observations raise several hypotheses. First, the therapeutic constructs are bigger than the reporter construct (from 12.5 to 18 kb for dystrophin constructs *versus* 5 kb for $\beta\text{-gal}$ construct). Because the total amounts of DNA material injected into the muscles were similar, the number of copies were different. Moreover, in the present range of 5 to 18 kb, the influence of the physical size of constructs on transduction efficacy is likely to play an important role, since smaller plasmids have been shown to lead to higher transduction either with or without associated electrotransfer^{63,64} (D Scherman, personal communication). Second, the reporter and therapeutic proteins are different in nature. While $\beta\text{-gal}$ is cytoplasmic, dystrophin and laminin $\alpha 2$ chain have defined cellular localizations and are membrane-bound. The $\beta\text{-gal}$ protein is small, whereas $\alpha 2$ chain and dystrophin are large and heavy, and the diffusion coefficients of these proteins may differ. Such differences were already observed in cell transplantation experiments.^{60,61} Third, the plasmid constructions and preparations differ. The $\beta\text{-gal}$ plasmid has a pCOR backbone and, due to its size and construction, may be present in a supercoiled form at a very high percentage (>99%). Such a situation has been shown previously to influence favorably *in vivo* transfer efficacy,^{63,65} but may not be obtained with all plasmid constructs. Finally, the methods used to stain the products were different, ie the $\beta\text{-gal}$ was detected by histochemistry, whereas the $\alpha 2$ chain and dystrophin were revealed by immunohistochemistry.

Although expression of the reporter gene was stable over time in wild-type animals, a slow decrease with time in the percentage of labelled fibers was generally observed in dystrophic animals. A possible explanation could be that murine dystrophic muscles undergo acute or chronic cycles of degeneration-regeneration, as shown by the centronucleation of regenerated fibers.^{1,2,4,5,25,30} To test this hypothesis, we triggered an acute cycle of degeneration-regeneration using notexin administration in wild-type mice in which the reporter gene was previously transduced by electrotransfer. Some snake venoms, such as notexin, trigger muscle degeneration upon intramuscular injection. This myonecrosis is limited to the mature muscle fibers and spares the blood, the nerve supplies, and the myogenic progenitors.^{45,46,48} Following degeneration, small mouse muscle regenerate completely within 3 weeks³⁵ through the activation, proliferation and

fusion of satellite cells and further maturation of the new or hybrid muscle fibers.^{35,47,66}

Upon notexin administration in wild-type mice, we observed that $\beta\text{-gal}$ expression was cleared from the degenerated muscle, while it persisted in the non-degenerated muscle. Therefore we concluded that the muscle degeneration is the cause of loss of $\beta\text{-gal}$ after gene transfer, and that the sustained expression of the reporter gene is not compatible with acute muscle degeneration.

Since muscle regeneration proceeds by activation, proliferation and fusion of satellite cells,^{35,45,47,66} our results imply that these cells have not been substantially transduced by electrotransfer *in vivo*. This is in agreement with the principle of electrotransfer, which claims a relation between cell diameter, voltage intensity, and transduction efficacy.^{19,24}

Our demonstration raises a major problem for long-term expression of a therapeutic gene in the context of degenerating muscle. A number of human neuromuscular disorders are characterized by various degrees of acute or chronic degeneration-regeneration cycles and our results would suggest that in these disorders it will be important to target both muscle fibers and the satellite cells. However, if gene transfer is very efficient and leads to sufficient levels for muscle stabilization, then turnover may be slowed and the need for transduced satellite cells would become less important. Therefore, harmony should be found between the choice of the vector and transduction methodology, and the pathophysiology of the neuromuscular disorder. In this perspective, the overall functional efficacy of the electrotransfer methodology requires further investigation to define the long-term relevance of gene transfer in muscle tissue. Other groups have shown that the conversion of an important proportion of muscle fibers from dystrophin-negative to -positive was a prerequisite for a physiological functional benefit in the *mdx* model (30 to 40%).²⁷ The transduction efficacy presented in this study is close to these values, at least regarding the expression of $\beta\text{-gal}$, and would therefore be compatible with the development of a functional benefit.

Taken together, our results indicate that electrotransfer-mediated muscle transduction is efficient in animal models of muscular dystrophies, and that the expression of therapeutic proteins has functional relevance. Hence, the DNA electrotransfer *in vivo* is one of the strategies to be considered as a potential avenue for treatment of muscular dystrophies.

Materials and methods

Animals

Breeding pairs of *dy/dy* and *dy²¹/dy²¹* mice were purchased at Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA). From these pairs we developed colonies in our facility by heterozygous brother-sister mating. For *dy/dy* animals, the mice were segregated phenotypically as normal or dystrophic. For *dy²¹/dy²¹*, genotyping was performed as previously described.⁶⁷ Control mice were normal, genotyped littermates of *dy²¹/dy²¹* animals. Given the difficulties related to the production of the dystrophic animals, all mice could not be age-matched for the experiments, but they were in the range of 6 to 15 weeks old.

In both mutants, this age coincides with the time at which the muscle can still be influenced by external stimuli such as drug treatments. The *mdx* animals were from Jackson Laboratories and bred in our facility. We used 8-month-old animals. At this stage, revertant fibers are numerous. All animals were allowed free access to food and water. Studies were conducted following the recommendation of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimentation.

Plasmids

The pCOR plasmid pXL3227 (pCMV- β -gal), containing the cytomegalovirus (CMV) promoter inserted upstream of the *Escherichia coli* LacZ gene coding for the cytoplasmic β -gal, was prepared as previously described.⁶⁵ The plasmid preparation contained a high percentage of supercoiled DNA (99.9%), and no RNA was detectable by gel electrophoresis. The plasmid size was 5 kb.

The pMER plasmid p941 (pCMV- α 2chain) was prepared as previously described and kindly provided by Drs Ulla Wewer and Steven Loechel (Institute of Molecular Pathology, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark).³³ The human α 2 chain cDNA was driven by the CMV promoter. The plasmid size was 12.5 kb. The pEGFP, pEGFP-minidystrophin (pEGFPMD) and pEGFP-full length dystrophin (pEGFPFLD) plasmids were prepared as previously described.⁵⁹ The human truncated or full-length dystrophin cDNA were driven by the CMV promoter and validated *in vitro* for the production of minidystrophin or full-length dystrophin. The plasmid sizes were 6 kb, 12 kb and 17 kb respectively. pMER, pEGFP, pEGFPMD, and pEGFPFLD plasmids were prepared using the Qiagen (Courtaboeuf, France) Megaprep endotoxin-free columns.

DNA injection and electric-pulse delivery

Animals were anesthetized during the whole procedure by subcutaneous injection of 30 mg/kg and 15 mg/kg of body weight of ketamine and xylazine, respectively. The skin above the tibial cranial muscle was shaved before injection. A 5-mm incision was made in the skin to visualize the underlying muscle. Twenty μ g of each plasmid DNA in 20 μ l of 0.9% NaCl was injected into the tibialis anterior muscle with a glass capillary in 10 different sites. The capillary thinness allowed injection into all orientations of the muscle in both depth and surface, in sites separated by 1 to 1.5 mm.^{37,61} After injection, the skin was closed with resorbable sutures. Five minutes after naked DNA administration, transcutaneous electric pulses were applied through two stainless steel plate electrodes placed on either side of the hindlimb as previously described.^{18,19} Briefly, square wave electric pulses were generated by an electropulsator ECM-830 (BTX, San Diego, CA, USA) with output voltage of 200 V/cm, pulse length of 20 ms, number of pulses of eight and frequency of pulse delivery of 2 Hz. Electric-field strengths (in V/cm) are reported in terms of the ratio of the applied voltage to the distance between the electrodes.

Immunosuppression

Immunosuppression was started on the day of plasmid injection using 2.5 mg/kg/day of FK506 as previously described (a kind gift from the Fujisawa Co, Osaka, Japan).^{37,38} Depending on the experimental group, FK506 was maintained for 1, 3, 4 or 7 weeks.

Induction of acute degeneration-regeneration

An acute cycle of muscle degeneration-regeneration was triggered by the injection of the snake venom notexin according to the following schedule. At day 0, wild-type animals underwent electrotransfer using the β -gal reporter gene in both right and left tibialis anterior muscles. FK506 immunosuppression was started and given daily for 50 days. At day 28, the left tibialis anterior received 50 μ l of notexin (Sigma, St Louis, MO, USA; 5 μ g/ml). At day 50, the animals were killed and muscles were harvested and analyzed.

Preparation of muscle biopsies

The animals were killed 3 weeks after transplantation. The muscles were frozen by immersion in isopentane cooled in liquid nitrogen. The 8 μ m sections were performed with a cryostat.

β -Galactosidase histochemistry

Following glutaraldehyde fixation (0.25%) and two rinses in PBS, the cryostat sections were incubated overnight in the presence of X-gal reagent (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside, Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) at room temperature as previously described.³⁷

Quantification of pCOR β -gal transduction efficacy

Quantification by surface measurement: The muscle section containing the highest level of β -gal-positive fibers was selected by light microscopy. This section was digitized using a Leica microscope (Rueil-Malmaison, France) connected to a Sony 3CCD (Rueil-Malmaison) color video camera and the Thunder 1.2.0.6 software. The image was computerized at full size to allow global measurement of the surface. Following delineation of the muscle, the total surface of the muscle, the surface containing the blue precipitate, and the ratio between surfaces were calculated automatically by the NIH Image 1.62 software.

Quantification by manual counting: The same section as above was selected, digitized and color-printed on to A4 format paper using a HP Deskjet 1600 CM printer. This magnification allowed the visual counting of the muscle fibers.

Each methodology was performed by an independent observer. The analysis of correlation between the results was done using the Mann-Whitney non-parametric test run under Statview 5.0 software and indicated no significant difference when muscles of non-dystrophic animals were analyzed. However, the surface measurement systematically gave lower results when muscles of *dy/dy* and *dy²⁷/dy²⁷* animals were analyzed.

When indicated, statistical analysis between groups was analyzed by ANOVA paired *t*-tests run under Statview 5.0 software. The differences were considered significant when $P < 0.05$.

Laminin-2 and dystrophin immunohistochemistry

The mouse laminin α 2 chain was detected with the rabbit polyclonal anti-mouse laminin α 2 chain kindly provided by Dr E Engvall (Burnham Institute, La Jolla Cancer Research Center, La Jolla, CA, USA) as previously described⁶¹ using a Cy3-labeled second antibody. Dystro-

phin was detected with a rabbit polyclonal antibody kindly provided by Dr A Cartaud (Institut J Monod, Université Paris VII, Paris, France) as previously described,⁶⁸ using a Cy3-labeled second antibody.

Acknowledgements

We wish to thank Pr Ulla Wewer and Dr Steven Loechel for generously providing the pMER plasmid p941 (pCMV- α 2 chain), and Pr Eva Engvall and Dr Annie Cartaud for generously providing anti-mouse laminin α 2 chain and anti-dystrophin antibodies, respectively. We thank also Claire Carrion, Isabelle Garcin, André Rouche and André Salmon for their technical assistance. This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Association Française contre les Myopathies (AFM), and the European Community (Contract No QLGI-1999-00870).

References

- Hoffman EP, Brown RH, Kunkel LM. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 1987; **51**: 919-928.
- Bulfield G, Siller WG, Wight PAL, Moore KJ. X-chromosome-linked muscular dystrophy (*mdx*) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; **81**: 1189-1192.
- Scinski P et al. The molecular basis of muscular dystrophy in the *mdx* mouse: a point mutation. *Science* 1989; **244**: 1578-1579.
- Michelson AM, Russell ES, Harman PJ. Dystrophin muscularis: a hereditary primary myopathy in the house mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1955; **41**: 1079-1084.
- Meier H, Southard JL. Muscular dystrophy in the mouse caused by an allele at the *dy* locus. *Life Sci* 1970; **9**: 137-144.
- Arahata A et al. Laminin in animal models for muscular dystrophy. Defect of laminin M in skeletal and cardiac muscles and peripheral nerve of the homozygous dystrophic *dy/dy* mice. *Proc Japan Acad* 1993; **69**: 259-264.
- Xu H et al. Defective muscle basement membrane and lack of M-laminin in the dystrophic *dy/dy* mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 5572-5576.
- Sunada Y et al. Deficiency of merosin in dystrophic *dy* mice and genetic linkage of laminin M chain gene to *dy* locus. *J Biol Chem* 1994; **269**: 13729-13732.
- Xu H, Wu XR, Wewer UM, Engvall E. Murine muscular dystrophy caused by a mutation in the laminin α 2 (*Lama2*) gene. *Nat Genet* 1994; **8**: 297-302.
- Sunada Y et al. Identification of a novel mutant transcript of laminin α 2 chain gene responsible for muscular dystrophy and dysmyelination in *dy2/dy2* mice. *Hum Molec Genet* 1995; **4**: 1055-1061.
- Guicheney P et al. Genetics of laminin α 2 chain (or merosin) deficient congenital muscular dystrophies: from identification of mutations to prenatal diagnosis. *Neuromusc Disord* 1997; **7**: 187-190.
- Wolff JA et al. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science* 1990; **247**: 1465-1468.
- Davis HL, Brazolot Millan CL, Watkins SC. Immune-mediated destruction of transfected muscle fibers after direct gene transfer with antigen-expressing plasmid DNA. *Gene Therapy* 1997; **4**: 181-188.
- Doh SG et al. Spatial-temporal patterns of gene expression in mouse skeletal muscle after injection of *lacZ* plasmid DNA. *Gene Therapy* 1997; **4**: 648-663.
- McMahon JM et al. Inflammatory responses following direct injection of plasmid DNA into skeletal muscle. *Gene Therapy* 1998; **5**: 1283-1290.
- Davis HL et al. DNA-mediated immunization in mice induces a potent MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocyte response to the hepatitis B envelope protein. *Hum Gene Ther* 1995; **6**: 1447-1456.
- Aihara H, Miyazaki JI. Gene transfer into muscle by electroporation *in vivo*. *Nat Biotech* 1998; **16**: 867-870.
- Mir L, Bureau M, Rangara R, Schwartz B, Scherman D. Long-term, high level *in vivo* gene expression after electric pulse-mediated gene transfer into skeletal muscle. *CR Acad Sci* 1998; **321**: 893-899.
- Mir LM et al. High efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 4262-4267.
- Mathiesen I. Electroporation of skeletal muscle enhances gene transfer *in vivo*. *Gene Therapy* 1999; **6**: 508-514.
- Rizzuto G et al. Efficient and regulated erythropoietin production by naked DNA injection and muscle electroporation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 6417-6422.
- Vicat JM et al. Muscle transfection by electroporation with high-voltage and short-pulse currents provides high-level and long-lasting gene expression. *Hum Gene Ther* 2000; **11**: 909-916.
- Bettan M et al. High level protein secretion into blood circulation after electric-pulse mediated gene transfer into skeletal muscle. *Mol Ther* 2000; **2**: 204-210.
- Bureau MF et al. Importance of association between permeabilization and electroporetic forces for intramuscular DNA electrotransfer. *Biochem Biophys Acta* 2000; **1474**: 353-359.
- Pastoret C, Sebillle A. *mdx* mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. *J Neurol Sci* 1995; **129**: 97-105.
- Hoffman EP, Morgan JE, Watkins SC, Partridge TA. Somatic reversion/suppression of the mouse *mdx* phenotype *in vivo*. *J Neurol Sci* 1990; **99**: 9-25.
- Deconinck N et al. Functional protection of dystrophic mouse (*mdx*) muscles after adenovirus-mediated transfer of a dystrophin minigene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 3570-3574.
- Leivo I, Engvall E. Merosin, a protein specific for basement membranes of Schwann cells, striated muscle, and trophoblast, is expressed late in nerve and muscle development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 1544-1548.
- Colognato H, Winkelmann DA, Yurchenco PD. Laminin polymerization induces a receptor-cytoskeleton network. *J Cell Biol* 1999; **145**: 619-631.
- Pearce GW, Walton JN. A histological study of muscle from the Bar Harbor strain of dystrophic mice. *J Path Bact* 1963; **86**: 25-33.
- MacPike AD, Meier H. Comparison of *dy* and *dy¹*, two alleles expressing forms of muscular dystrophy in the mouse. *Proc Soc Exp Biol Med* 1976; **151**: 670-672.
- Meier H, MacPike AD. Myopathies caused by three mutations of the mouse. *J Heredity* 1977; **68**: 383-385.
- Vachon PH et al. Merosin and laminin in myogenesis; specific requirement for merosin in myotube stability and survival. *J Cell Biol* 1996; **134**: 1483-1498.
- Kuang W, Xu H, Vilquin JT, Engvall E. Activation of the *lama2* gene in muscle regeneration: abortive regeneration in laminin α 2-deficiency. *Lab Invest* 1999; **79**: 1601-1613.
- Lefaucheur JP, Sebillle A. The cellular events of injured muscle regeneration depend on the nature of the injury. *Neuromusc Disord* 1995; **5**: 501-509.
- Guérette B et al. Lymphocyte infiltration following allo- and xenomyoblast transplantation in *mdx* mice. *Muscle Nerve* 1995; **18**: 39-51.
- Vilquin JT et al. FK506 immunosuppression to control the immune reactions triggered by first generation adenovirus-mediated gene transfer. *Hum Gene Ther* 1995; **6**: 1391-1401.
- Kinoshita I et al. Very efficient myoblast allotransplantation in mice under FK506 immunosuppression. *Muscle Nerve* 1994; **17**: 1407-1415.
- Guérette B et al. Increased interferon-gamma mRNA expression following alloincompatible myoblast transplantation is inhibited by FK506. *Muscle Nerve* 1996; **19**: 829-835.
- Christ M et al. Gene therapy with recombinant adenovirus vectors: evaluation of the host immune response. *Immunol Lett* 1997; **57**: 19-25.

- 41 Lochmuller H *et al*. Transient immunosuppression by FK506 permits a sustained high-level dystrophin expression after adenovirus-mediated dystrophin minigene transfer to skeletal muscles of adult dystrophic (*mdx*) mice. *Gene Therapy* 1996; **3**: 706–716.
- 42 Ilan Y *et al*. Transient immunosuppression with FK506 permits long-term expression of therapeutic genes introduced into the liver using recombinant adenoviruses in the rat. *Hepatology* 1997; **26**: 949–956.
- 43 Yang L *et al*. Adenovirus-mediated dystrophin minigene transfer improves muscle strength in adult dystrophic (MDX) mice. *Gene Therapy* 1998; **5**: 369–379.
- 44 Potter MA, Chang PL. Review – the use of immunosuppressive agents to prevent neutralizing antibodies against a transgene product. *Ann NY Acad Sci* 1999; **875**: 159–174.
- 45 Harris JB, Johnson MA. Further observations on the pathological responses of rat skeletal muscle to toxins isolated from the venom of the Australian tiger snake, *Notechis scutatus scutatus*. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1978; **5**: 587–600.
- 46 Dixon RW, Harris JB. Myotoxic activity of the toxic phospholipase, notexin, from the venom of the Australian tiger snake. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; **55**: 1230–1237.
- 47 Whalen RG *et al*. Expression of myosins isoforms during notexin-induced regeneration of rat soleus muscles. *Dev Biol* 1990; **141**: 24–40.
- 48 Sharp NJ *et al*. Notexin-induced muscle injury in the dog. *J Neurol Sci* 1993; **116**: 73–81.
- 49 Budker V *et al*. The efficient expression of intravascularly delivered DNA in rat muscle. *Gene Therapy* 1998; **5**: 272–276.
- 50 Greelish JP *et al*. Stable restoration of the sarcoglycan complex in dystrophic muscle perfused with histamine and a recombinant adeno-associated viral vector. *Nat Med* 1999; **5**: 439–443.
- 51 Huber PE *et al*. A comparison of shock wave and sinusoidal-focused ultrasound-induced localized transfection of HeLa cells. *Ultrasound Med Biol* 1999; **25**: 1451–1457.
- 52 Vilquin JT *et al*. Evidence of *mdx* mouse skeletal muscle fragility *in vivo* by eccentric running exercise. *Muscle Nerve* 1998; **21**: 567–576.
- 53 Straub V, Rafael JA, Chamberlain JS, Campbell KP. Animal models for muscular dystrophy show different patterns of sarcolemmal disruption. *J Cell Biol* 1997; **139**: 375–385.
- 54 Tocci MJ *et al*. The immunosuppressant FK506 selectively inhibits expression of early T cell activation genes. *J Immunol* 1989; **143**: 718–726.
- 55 Koprak S *et al*. Depletion of the mature CD4⁺8⁺ thymocyte subset by FK506 analogs correlates with their immunosuppressive and calcineurin inhibitory activities. *Transplantation* 1996; **61**: 926–932.
- 56 Adams DH, Liu Q. FK506 inhibits human lymphocyte migration and the production of lymphocyte chemotactic factors in liver allograft recipients. *Hepatology* 1996; **23**: 1476–1483.
- 57 Mori A *et al*. IL-2-induced IL-5 synthesis, but not proliferation, of human CD4⁺ T cells is suppressed by FK506. *J Immunol* 1997; **158**: 3659–3665.
- 58 Sasakawa Y *et al*. FK506 suppresses neutrophil chemoattractant production by peripheral blood mononuclear cells. *Eur J Pharmacol* 2000; **403**: 281–288.
- 59 Chapdelaine P *et al*. Functional EGFP-dystrophin fusion proteins for gene therapy vector development. *Prot Eng* 2000; **13**: 611–615.
- 60 Kinoshita I *et al*. Transplantation of myoblasts from a transgenic mouse overexpressing dystrophin produced only a relatively small increase of dystrophin-positive membrane. *Muscle Nerve* 1998; **21**: 91–103.
- 61 Vilquin JT *et al*. Myoblast transplantations lead to the expression of the laminin $\alpha 2$ chain in normal and dystrophic (*dy/dy*) mouse muscles. *Gene Therapy* 1999; **6**: 792–800.
- 62 Gussoni E, Blau HM, Kunkel LM. The fate of individual myoblasts after transplantation into muscles of DMD patients. *Nat Med* 1997; **3**: 970–977.
- 63 Darquet AM *et al*. Minicircle: an improved DNA molecule for *in vitro* and *in vivo* gene transfer. *Gene Therapy* 1999; **6**: 209–218.
- 64 Kreiss P *et al*. Plasmid DNA size does not affect the physicochemical properties of lipoplexes but modulates gene transfer efficiency. *Nucleic Acids Res* 1999; **27**: 3792–3798.
- 65 Soubrier F *et al*. pCOR: a new design of plasmid vectors for nonviral gene therapy. *Gene Therapy* 1999; **6**: 1482–1488.
- 66 Gross JG, Morgan JE. Muscle precursor cells injected into irradiated *mdx* mouse muscle persist after serial injury. *Muscle Nerve* 1999; **22**: 174–185.
- 67 Vilquin JT *et al*. A restriction-based assay for the detection of the *dy*^{fl} allele in homozygous and heterozygous mice by PCR. *Neuromusc Disord* 2000; **10**: 59–62.
- 68 Alameddine H *et al*. Expression of a recombinant dystrophin in *mdx* mice using adenovirus vector. *Neuromusc Disord* 1994; **4**: 193–203.

Research letters

Myoblast transplantation for heart failure

Philippe Menasché, Albert A Hagège, Marcio Scorsin, Bruno Pouzet, Michel Desnos, Denis Duboc, Ketty Schwartz, Jean-Thomas Vilquin, Jean-Pierre Marolleau

Intramyocardial skeletal muscle transplantation has been shown experimentally to improve heart function after infarction. We report success with this procedure in a patient with severe ischaemic heart failure. We implanted autologous skeletal myoblasts into the postinfarction scar during coronary artery bypass grafting of remote myocardial areas. 5 months later, there was evidence of contraction and viability in the grafted scar on echocardiography and positron emission tomography. Although this result is encouraging, it requires validation by additional studies.

Despite medical and surgical advances, heart failure, mostly of ischaemic origin, is a frequent and life-threatening disorder. The pathophysiology of this disease is multifactorial and loss of cardiomyocytes, which cannot regenerate in adults, is a major factor. Myogenic cell grafting in a damaged myocardium is a promising approach to the treatment of heart failure. We, and others, have previously shown the efficacy of intramyocardial transplantation of fetal cardiomyocytes or autologous skeletal myoblasts in animal models of ischaemic heart failure.¹⁻³ Myoblasts (or satellite cells), which normally lie in a quiescent state under the basal membrane of mature muscular fibres, have several properties that can be exploited for clinical use: autologous origin, ease of expansion in vitro, exclusive differentiation into muscle-fibre cells, and high resistance to ischaemia.

A man aged 72 years presented with refractory heart failure (New York Heart Association class III) due to an extensive inferior myocardial infarction and anterolateral ischaemia suffered previously. Echocardiographic left-ventricular mean ejection fraction was 21% (SD 2, mean of five assessments done in the 10 months before surgery) with extensive akinesia of the posterior wall and severe anterior and lateral hypokinesia. Absence of viability in the left-ventricular

posterior wall was shown by persistence of akinesia with low-dose dobutamine. A biphasic response (reflecting viability and ischaemia) was seen in the anterolateral wall with use of low-dose and high-dose dobutamine.

Lack of viability was confirmed on ¹⁸F-fluoro-deoxyglucose positron emission tomography in the posterior wall, however, viability was shown in the left-ventricular anterior and lateral areas. Angiography showed occlusion of the proximal left anterior descending coronary artery, with distal filling by collaterals, a tight stenosis of a diagonal branch, and a proximal occlusion of the right coronary artery. These findings were a clear indication for anterolateral myocardial revascularisation. Because of the severity of heart failure and the absence of viability in the left-ventricular posterior wall, we decided to try to optimise the effects of bypass surgery by myoblast transplantation in the left-ventricular posterior myocardium to improve heart function. This procedure was approved by our institutional review board. The patient received extensive information on the procedure and subsequently gave his written informed consent.

Once the patient had been given local anaesthetic, we took a biopsy sample of *vastus lateralis* through a 5 cm incision. We minced the sample and put the resultant cell suspension in a myogenic-specific culture medium. We scaled up the total cell number by repeated passaging in a customised multiple-tray cell factory. After 2 weeks, the biopsy sample had yielded a total of 800×10^6 cells, of which 65% were myoblasts (identified by flow cytometry as CD56-positive cells). All microbiological controls were negative. 2 weeks after the biopsy sample was taken the patient had bypass surgery after prophylactic insertion of an intra-aortic balloon pump; before insertion, cardiac output was measured at 1 L/min with a venous oxygen saturation at 55%.

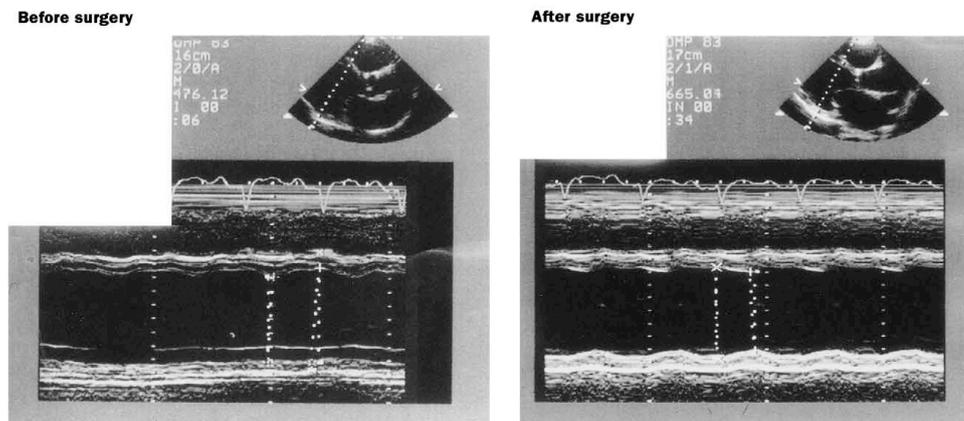


Figure 1: M-mode echocardiograms before and after surgery

An increase in left-ventricular posterior wall contractility occurred after myoblast transplantation. Left-ventricular end-diastolic dimensions did not change after surgery (70.6 mm [SD 1.4]) compared with dimensions before surgery (68.6 [3.6]).

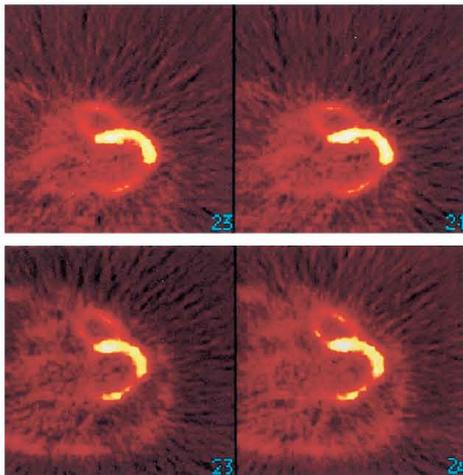


Figure 2: Myocardial imaging on positron emission tomography horizontal biventricular views

Left-ventricular posterior wall (grafted area) is at the bottom of scan. Upper panel: a homogeneous metabolic activity in anterior and septal walls with a decrease in metabolic activity in the posterior wall before surgery. Lower panel: 18 F-fluorodeoxyglucose uptake in posterior wall after surgery.

We grafted the diagonal and left anterior descending arteries with a saphenous vein and left internal mammary artery, respectively, under cardiopulmonary bypass and blood cardioplegic arrest. The area of infarction was then easily visualised on the left-ventricular posterior wall. We injected 33 cell suspensions, suspended in 5 mL albumin, in and around the white spots of necrosis with a customised right-angled 27 G needle designed specifically to allow the creation of subepicardial channels in a blister-like pattern. The aortic cross-clamping time was 56 min, of which 16 min were devoted to cell injections. No bleeding occurred from the puncture sites. The patient's mechanical and drug support was stopped 3 days after surgery. The patient had an uneventful recovery and was discharged 8 days after surgery.

At 5 month follow-up, the patient's clinical status improved, and he had stable New York Heart Association class II disease. The drug regimen remained unchanged. We noted no substantial arrhythmias on 24 h Holter recordings. Four serial echocardiographic studies done monthly since the operation showed a left-ventricular mean ejection fraction of 30% (SD 1). Segmental contractility had improved for the anterior wall and the posterior wall, which could contract (systolic shortening increased from undetectable before surgery values to 40%; figure 1). Other echocardiographic findings included the appearance of a transmural velocity gradient with doppler tissue imaging and an increase in contractility of the left-ventricular posterior wall after dobutamine challenge. Positron emission tomography showed a clear tracer uptake within the posterior wall, with an activity ratio between this wall and the septum (taken as the reference), which had increased from 0.5 before surgery to 0.7, which reflects a new-onset metabolic activity in the previously non-viable scar area (figure 2).

Together, these results suggest that the improved function of the scarred area was probably related to the engrafted myoblasts. Data might have been confounded by

the associated myocardial revascularisation. However, our combined use of echocardiography and positron emission tomography scanning opposes that argument because even an increase in perfusion after surgery by collaterals originating from the bypassed areas would not be expected to cause functional recovery of an area that did not show tracer uptake before surgery. Furthermore, the lack of decrease in left-ventricular end-diastolic cavity size (figure 1) argues against the unmasking of underestimated collateralisation before surgery.

Our findings show the feasibility of autologous myoblast transplantation within an infarcted myocardium in human beings. Many patients with longer follow-ups are required to thoroughly assess safety issues before controlled efficacy trials can be undertaken to define the role of autologous skeletal myoblast transplantation in treatment of severe ischaemic heart failure.

We thank the Fédération Française de Cardiologie, the Fondation de l'Avenir, the Fondation pour la Recherche Médicale, the Association Française Contre les Myopathies, and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale for financial support. We also thank the Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé and the Délégation à la Recherche Clinique de l'Assistance Publique-Hôpitaux de Paris for their logistical support.

- 1 Sakai T, Li RK, Weisel RD, et al. Fetal cell transplantation: a comparison of three cell types. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999; **118**: 715–25.
- 2 Chiu RCJ, Zibaitis A, Kao RL. Cellular cardiomyoplasty: myocardial regeneration with satellite cell implantation. *Ann Thorac Surg* 1995; **60**: 12–18.
- 3 Murry CE, Wiseman RW, Schwartz SM, Hauschka SD. Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. *J Clin Invest* 1996; **98**: 2512–23.
- 4 Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, et al. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med* 1998; **4**: 929–33.
- 5 Scorsin M, Hagège A, Vilquin JT, et al. Comparison of the effects of fetal cardiomyocyte and skeletal myoblast transplantation on postinfarction left ventricular function. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000; **119**: 1169–75.

Department of Cardiovascular Surgery B, Hôpital Bichat Claude Bernard, 75018 Paris, France (P Menasché MD, M Scorsin MD, B Pouzet MD); Department of Cardiology, Hôpital Européen Georges Pompidou and Faculté de Médecine Necker-Enfants Malades, Paris (A A Hagège MD, M Desnos MD); Department of Cardiology, Hôpital Cochin and Service Hospitalier Frédéric Joliot, CEA, Orsay (D Duboc MD); INSERM U-523, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris (K Schwartz PhD, J-T Vilquin PhD); and Laboratoire de Thérapie Cellulaire, Hôpital Saint-Louis, Paris (J-P Marolleau MD)

Correspondence to: Dr Philippe Menasché (e-mail: ccv-bloc.sec3@bch.ap-hop-paris.fr)

Increased mitochondrial toxicity with ribavirin in HIV/HCV coinfection

Alain Lafaillade, Gilles Hittinger, Stephane Chadapaud

In two of 15 patients coinfecting with HIV and hepatitis C virus who received interferon- α plus ribavirin in addition to HAART, we observed multiorgan dysfunction and lactic acidemia. As ribavirin is a nucleoside analogue, an increased risk of mitochondrial toxicity can be induced in HIV-infected patients already treated with nucleoside analogues, leading to clinical deterioration in some cases.

The advent of highly active antiretroviral therapy (HAART) in HIV-1 infection has led to reductions in morbidity and mortality. Chronic hepatitis C virus (HCV)



RESEARCH ARTICLE

Normal growth and regenerating ability of myoblasts from unaffected muscles of facioscapulohumeral muscular dystrophy patients

J-T Vilquin^{1,5}, J-P Marolleau^{2,5}, S Sacconi^{3,5}, I Garcin¹, M-N Lacassagne², I Robert², B Ternaux², B Bouazza⁴, J Larghero² and C Desnuelle³

¹Inserm U582, Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, Institut de Myologie, Paris, France; ²Laboratoire de Thérapie Cellulaire, Hôpital Saint Louis, Paris, France; ³Inserm U638, CHU de Nice, Fédération des Maladies Neuromusculaires, Nice, France; and ⁴CNRS UMR 7000, Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, France

Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) is an autosomal dominant disease characterized by a typical regional distribution, featuring composed patterns of clinically affected and unaffected muscles. No treatment is available for this condition, in which the pathophysiological mechanism is still unknown. Autologous transfer of myoblasts from unaffected to affected territories could be considered as a potential strategy to delay or stop muscle degeneration. To evaluate the feasibility of this concept, we explored and compared the growth and differentiation characteristics of myoblasts prepared from phenotypically unaffected muscles of five FSHD patients and 10 control donors. According to a clinically approved procedure, 10⁹ cells of a high degree of purity were obtained within 16–23 days. More than 80%

of these cells were myoblasts, as demonstrated by labeling of the muscle markers CD56 and desmin. FSHD myoblasts presented a doubling time equivalent to that of control cells; they kept high proliferation ability and did not show early telomere shortening. In vitro, these cells were able to differentiate and to express muscle-specific antigens. In vivo, they participated to muscle structures when injected into immunodeficient mice. These data suggest that myoblasts expanded from unaffected FSHD muscles may be suitable tools in view of autologous cell transplantation clinical trials.

Gene Therapy (2005) 12, 1651–1662. doi:10.1038/sj.gt.3302565; published online 16 June 2005

Keywords: facioscapulohumeral muscular dystrophy; myoblast; cell transplantation; muscle regeneration; muscle differentiation; telomere

Introduction

With an incidence of 1/20 000 in Occidental countries, facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) is considered a rare disease, but is the third most common inherited myopathy.¹ It is characterized by typical regional distribution with progressive weakening of face and shoulder girdle muscles, further extending to abdominal and pelvic girdle, and to humeral and anterior foreleg muscles. The disease is transmitted as an autosomal dominant trait and is associated with a deletion of an integral number of copies of a 3.3 kb tandem repeated unit termed D4Z4 located at the 4q subtelomeric region. This deletion results in an EcoRI fragment shorter than 35 kb, providing the molecular marker for FSHD diagnosis.^{2,3} While, in general population, D4Z4 comprises 11–150 U, FSHD patients carry less than 11 repeats. The disease is usually much worse

(earlier onset and greater clinical severity) when the short 4q D4Z4 array is in the smaller size range (1–4 repeats).^{4,5} In spite of the advances in molecular biology, its pathophysiological mechanism has not been elucidated yet, nor has its anatomical specificity. The difficulty to define this disease exactly is mainly due to its complexity, since a profound misregulation of gene expression rather than a single gene defect seems to be involved.^{6,7} For this reason, no classical gene therapy approach can be considered yet (ie gene transfer, gene repair, exon skipping), prompting for the identification of new therapeutic concepts. No animal model is available, and no treatment can currently be recommended.⁸

Among potential therapeutic strategies for muscular dystrophies, the intramuscular injection of cultured myoblasts (myoblast transplantation, MT) has been considered for generalized myopathies – mainly Duchenne muscular dystrophy (DMD).^{9,10} Unlike FSHD, this disease is characterized by diffuse muscle involvement leading to a progressive degeneration of the whole body musculature. The pathophysiological mechanism of DMD involves deficits of the dystrophin gene, and exhaustion of the myogenic reservoir secondary to multiple cycles of degeneration–regeneration. As a consequence, the remaining cells cannot sustain the

Correspondence: Dr J-T Vilquin, Inserm U582, Institut de Myologie, Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, 47 Boulevard de l'Hôpital, 75651 Paris Cedex 13, France

⁵These authors contributed equally to this work

Received 30 November 2004; accepted 5 May 2005; published online 16 June 2005

large-scale expansions required for perpetual muscle regeneration, or use in clinical practice.^{11–13} For this reason, the DMD myoblasts have been prepared from healthy donors, and MT has been performed in a heterologous context. The MT concept has been validated in normal and dystrophic mouse models, where injection of healthy myoblasts increased muscle mass and function.^{14,15} Despite positive results in these small rodents,^{16–20} clinical trials have presented limited success.^{21–29} Improvements of injection and immunosuppression parameters have recently been achieved in primates^{9,10,30} and translated to the human situation with encouraging, although localized success.³¹ Nevertheless, one of the most important problems of heterologous MT remains the immune response raised by the recipient against donor cells.^{22,29}

This issue is completely avoided in the context of autologous MT, which has been successfully developed as an experimental treatment for postischemic heart failure or dilated cardiomyopathy, showing its feasibility, safety and its great clinical interest.^{32–36} In some myopathic condition such as FSHD, characterized by a relatively localized muscle involvement, and the absence of therapeutic options, autologous MT could be considered as an alternative strategy. In this case, unaffected muscles could be the source of myoblasts to be transferred into affected muscles in order to improve their regeneration ability.

The validation of this concept requires the completion of four stages: (i) production and *in vitro* characterization of FSHD myoblasts from unaffected muscles, and comparison with myoblasts from muscles of healthy donors. This comparison would allow establishing if FSHD myoblasts grown from unaffected muscle, but still carrying the FSHD molecular defect, would manifest or not its deleterious effect when submitted to a large-scale expansion or *in vitro* differentiation. (ii) Evaluation *in vivo* of FSHD myoblast regenerating ability, through implantation into the skeletal muscles of relevant animal

models. Upon validation of these first two steps, clinical trials should be considered as (iii) set up of a phase I assay dedicated to the assessment of safety and feasibility, and (iiii) set up of a phase II clinical trial dedicated to the evaluation of efficacy. This study regards the first two steps. We evaluated *in vitro* proliferation and differentiation and *in vivo* regenerating ability of myoblasts obtained from phenotypically unaffected muscles of five FSHD patients and of 10 control donors prepared in a previous clinical trial using the same procedures.³⁴ We could not observe any difference between FSHD and control myoblasts.

Results

Patient selection

Five FSHD patients (FSHD 1–5) carrying, respectively, 10, 7, 9, 6 and 7 D4Z4 repeats were included after giving their informed consent. These patients presented with a familial form of the disease. According to Brooke–Vignos functional scale,³⁷ all patients were ranked 2 for arms, and 1 for legs. Facial and shoulder girdle muscles were affected while no clinical involvement of the legs was evident. Muscle MRI did not show any fibrotic or adipose infiltration in the muscular territory elected for muscle biopsy. The 10 control donors (C 1–10) had been recruited in the context of a previous clinical study dedicated to the autologous MT in postinfarction left ventricular dysfunction.³⁴ The mean ages of the FSHD patients and control donors were, respectively, 53 ± 5 and 61 ± 11 years. All FSHD patients and controls were males.

Muscle biopsy and transmission to the cell culture laboratory

FSHD patients and control donors underwent a right or left *vastus lateralis* muscle biopsy, which mean weights were, respectively, 1.1 ± 0.1 and 12.9 ± 0.4 g. The larger

Table 1 Schedules of FSHD and control culture productions

Identification	Initial day/# plates	P1 (day, # plates)	P2 (day, # plates)	P3 (day, # plates)	P4 (day, # plates)	Harvest (day)	Harvest (day)
FSHD1	D1/1	8/2	12/4	15/11	19/21	23	
FSHD2*	D1/1	8/1	15/1	19/2	22/8	25/24	28
FSHD3	D1/1	8/1	14/3	16/11	20/26	25	
FSHD4	D1/1	8/1	12/3	15/14	18/26	22	
FSHD5	D1/1	8/1	12/4	15/16	18/23	21	
Identification	Initial day/# plates	P1 (day, # plates)	P2 (day, # plates)	Harvest (day)			
C1	D0/6	8/6	13/14	16	—	—	—
C2	D0/3	9/6	13/22	18	—	—	—
C3	D0/4	9/6	15/24	20	—	—	—
C4	D0/4	7/6	10/26	14	—	—	—
C5	D0/4	8/6	13/24	17	—	—	—
C6	D0/4	7/6	10/26	15	—	—	—
C7	D0/4	8/6	11/26	15	—	—	—
C8	D0/4	8/6	11/26	15	—	—	—
C9	D0/4	8/6	11/26	14	—	—	—
C10	D0/4	8/6	11/24	15	—	—	—

Cell cultures were serially expanded at the indicated times (days). The number of culture plates (#) is given as a function of the expansion step. C: controls. The large size of control muscle biopsies allowed the initial seeding of a larger number of plates than that used for FSHD biopsies. From the onset of myoblast cultures to the day of final harvest, FSHD cells underwent four to five passages (P) within 21 to 28 days, and control cells two passages within 14 to 20 days. The large-scale production required 14 to 26 plates on the last expansion.

*Owing to storage problem, the FSHD2 schedule was moved forward by one passage.

size of control muscle biopsies was a specific requirement of the clinical trial dedicated to intramyocardial MT. Biopsies were well tolerated by both groups. Their histological evaluation did not reveal any sign of muscle pathology. Transmission to the cell culture laboratory was eventless, except for the biopsy of patient FSHD2, which underwent a storage problem. This adverse event delayed the final harvest without affecting the final yield. For this reason, the FSHD2 data were not included in the statistical calculations.

Cell production

The schedules of cell expansions are presented in Table 1. Except for the FSHD2 biopsy, the methodology allowed to extract 1.13×10^6 and 9.7×10^5 cells/g of muscle from FSHD patients and controls, respectively (Figure 1a). The cells were then seeded at low density (2000–4000/cm²). Following a lag time (4–6 days), cells grew as isolated colonies. This first passage (P) allowed a homogeneous spreading of the cells and was performed before colonies were reaching confluence. The highest growth rates were observed between P1 and P2, with doubling times of 31.6 and 29.6 h for FSHD and control cells, respectively. Thereafter, the doubling times increased in both conditions within the same proportions (Figure 2a and b). From Day 0 (D0) to P3, the cells underwent 7.0 and 6.6 divisions, respectively. At P3, 156×10^6 FSHD cells and 957×10^6 control cells were obtained. Since doubling times were equivalent, the difference was attributed to the starting sizes of biopsies, the control being 12 times larger than the FSHD. The threshold number of cells required for potential clinical trials was arbitrarily established at 8×10^8 on the basis of previous experience.³⁴ To reach this number, FSHD cells were grown up to P5, for three supplementary divisions, and overall performed 9.8 divisions. We produced 8.5×10^8 to 1.6×10^9 myoblasts (mean 1.06×10^9) within 22.7 days. This result is to be compared to the production of 6.5×10^8 to 1.2×10^9 myoblasts (mean 9.5×10^8) within 15.8 days in the historical control group. Our results thus suggest that the initial numbers of myogenic progenitors present per gram of disease or control muscles were equivalent. Myoblasts were small, fusiform or polygonal cells, mostly slightly refringent, and not evenly spread onto the substrate. The nuclear/cytoplasm ratio was generally high, and two or three dark nucleoli were clearly distinguishable. No morphological difference was observed between FSHD and control cultures at different passages (Figure 3a–d).

Cell viability

As estimated by propidium iodide exclusion, the viability of the cells at each passage and at the time of final harvest was above 90% in both the FSHD and control groups (Figure 1b).

Phenotypic characterization

Myoblasts express the surface NCAM antigen, previously described as leu-19, 5.1H11, NKH-1 or CD56. Muscle cells (cardiac, smooth and skeletal types) also express desmin, an intracellular cytoskeleton protein, at an early stage of differentiation.^{38–41}

As presented in Figure 1c and d, the cell culture methodologies allowed the rapid and reproducible emergence of myoblasts as a dominant population. The

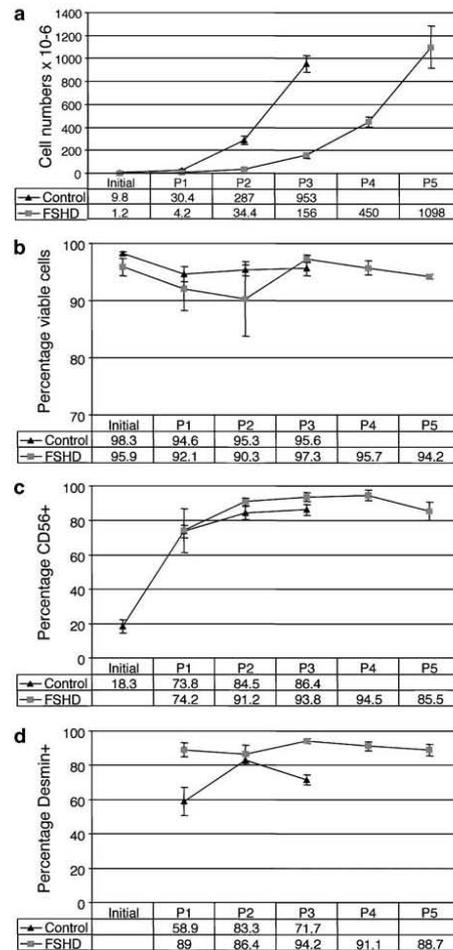


Figure 1 Production and characterization of FSHD and control myoblasts. Presented values are mean ± s.e. Control: n = 10; FSHD: n = 4. The growth characteristics of FSHD2 are not included. (a) Number of myoblasts harvested at each passage. Since the initial sizes of control biopsies were 12 times bigger than those of FSHD biopsies, two supplementary passages were required to reach the final expected number of cells from the FSHD biopsies. (b) Cell viability was assessed by FACS using propidium iodide. It was above 90%. (c) Percentage of CD56-positive cells was evaluated by FACS. Although this population was not dominant on the initial day, the growth conditions allowed the myoblasts to take over any other cell type and to represent more than 80% of the cells from P2 and ongoing passages. (d) The percentage of desmin-positive cells was evaluated by FACS. The low number of cells did not allow this estimation on D0. This percentage reflects that of CD56-positive cells, confirming the high degree of purity in myoblasts of the cultures.

percentage of CD56- and desmin-positive cells increased rapidly, reaching a plateau (above 80%) within two passages and remained elevated throughout the culture. Among the whole-cell population, the specific growth rate of myoblasts can be calculated from CD56

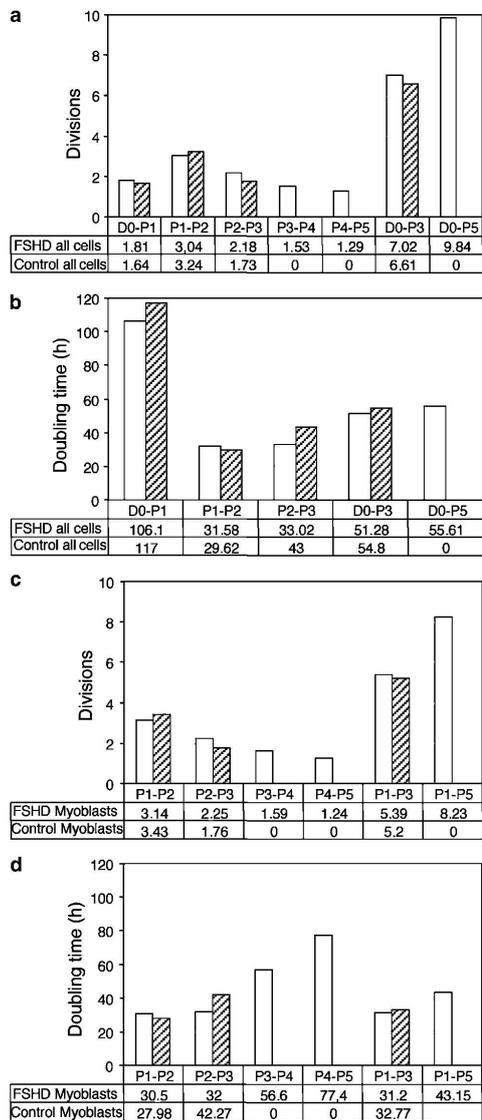


Figure 2 Growth characteristics of FSHD and control myoblasts. The number of divisions (a, c) achieved by the cells and, consequently, the doubling times (b, d) have been estimated from cell counting at each passage. These values were calculated from successive and from first and end passages. Filled bars: Control myoblasts; open bars: FSHD myoblasts. The parameters were established for total cells in the culture, and for the myoblast population only, as the proportion of CD56-positive cells could be established. The doubling times were the longest during the first phase of the culture (a), between initial seeding and P1. The first expansion triggered a round of rapid divisions. The doubling times were the fastest between P1 and P2 (b, d) whatever the nature of the culture or of the cells. Thereafter, it increased gradually with the number of passages. Control and FSHD cells underwent 7 and 9.8 divisions, respectively.

evaluation. The initial content in CD56-positive cells was not assessable in the case of FSHD patients because the initial number of cells was too low for precise cytofluorimetric evaluation. Nevertheless, our data indicate that myoblasts first grew rapidly (Figure 2c and d) and presented the shortest doubling times between P1 and P2. Subsequently, the doubling times were increased. Over the P1–P3 period, growth rates were comparable (doubling times of 31.2 versus 32.8 h respectively). In the control group, myoblasts underwent more divisions than the whole-cell populations during the first phases of the culture (D0–P1, 3.7 versus 1.6; and D0–P3, 8.8 versus 6.6). This may explain their aptitude to become and remain the dominant cell type in the primary cultures.

Proliferative ability

Following the final harvesting (P5 or P6), cells obtained from FSHD patients were further subcultured until the drop of CD56-positive cells under 50%. The final theoretical yield was obtained by multiplication of the expansion ratios observed at each passage. This calculation allowed extrapolating the proliferative potential of these cells (Table 2). These data indicate that the cells produced by serial expansions still kept the ability to grow for at least two (patient FSHD1) to seven (patients FSHD3 and FSHD4) additional passages.

In vitro differentiation

When placed into differentiation conditions, the cells fused to form multinucleated myotubes (Figure 3e–h). Their sizes and shapes could vary, both in patient and control cultures. Myotubes may contain two to dozens of nuclei. Some were branched, and others were straight. In some instances, large and flat syncytia were observed. No morphological difference was noted between FSHD and control myoblasts. The fast and slow isoforms of myosin heavy chain (MyHC) were expressed according to the same chronological pattern in FSHD and control myotubes. No expression was observed at D0. Fast MyHC isoform appeared in myotubes at D1, while slow isoform appeared at D3. Both persisted up to D6 (Figure 4). No significant difference was observed between fusion indexes calculated at different time points (D1, D3, D6) in FSHD and control cultures (data not shown).

Telomere size

The telomere sizes were evaluated for three out of five patients and two controls. They were estimated to be 7.9 ± 0.1 (FSHD1), 6.8 ± 0.3 (FSHD4) and 7.9 ± 0.3 (FSHD5). As a mean (7.53), they did not differ from that of the two controls (6.9 ± 0.2 and 7.4 ± 0.3), and all telomere sizes kept within the range of normal values (6.5–8.5), as published.^{42–44}

Number of D4Z4 repeats

The number of D4Z4 repeats was assessed by the same laboratory (Dr M Jeanpierre) first at the time of patient selection as a molecular confirmation of the clinical diagnosis, and then on cell cultures at the end of the production process (P5 or P6). No difference between these two values was noted (data not shown). These data exclude the possibility that myoblasts not harboring the FSHD mutation would have taken over mutated myoblasts, as could result from the expression of a somatic mosaicism.⁴⁵

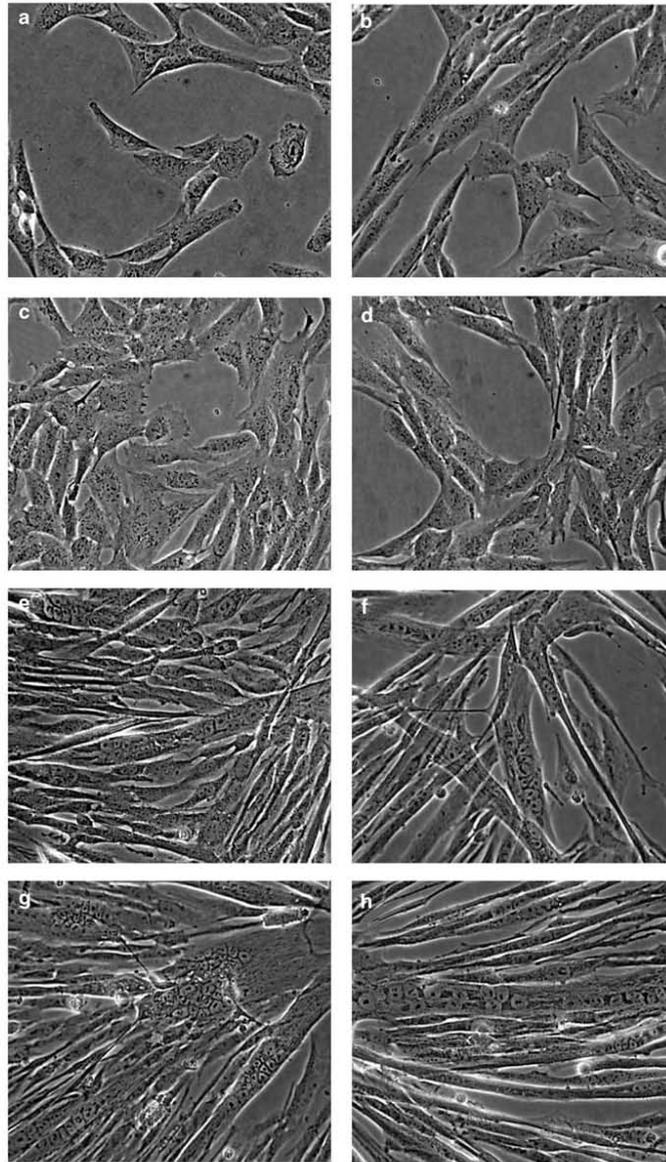


Figure 3 Morphological aspect of FSHD and control myoblasts during proliferation or *in vitro* differentiation. Inverted phase contrast microphotographs were performed before the onset of differentiation (a–d) and 6 days after (e–h). Myoblasts are small, polygonal or slightly fusiform cells with a high nucleocytoplasmic ratio. No morphological difference was observed between control (a) and FSHD myoblasts (b–d illustrate FSHD2, FSHD3 and FSHD5, respectively). Myotubes presented various shapes: some were branched (e, f), flattened (g) or straight (e, h). They contained two to dozens of nuclei presenting one or two contrasted nucleoli. These morphologies could be observed both in control (e) and FSHD cultures (f–h illustrate FSHD2, FSHD3 and FSHD5, respectively). Original magnification: $\times 40$.

In vivo regenerating ability

Since no FSHD animal model is currently available, immunodeficient Rag2/ γ c / (Rag) mice were used to assess the *in vivo* regenerating ability of xenogenic myoblasts. Although they do not present any muscle

Table 2 Maximal theoretical yield of FSHD myoblast cultures

Identification	# Cells at harvest, passage	Theoretical yield	End passage; CD56-positive (%)
FSHD1	980 × 10 ⁶ , P5	5–10 × 10 ⁹	P7; 54%
FSHD2	930 × 10 ⁶ , P6	50 × 10 ⁹	P11; 67%
FSHD3	850 × 10 ⁶ , P5	>1000 × 10 ⁹	P12; 75%
FSHD4	910 × 10 ⁶ , P5	>80 × 10 ⁹	P12; 60%
FSHD5	1648 × 10 ⁶ , P5	>2000 × 10 ⁹	P11; 84%

From the harvest (P5 for FSHD1, 3, 4, 5 and P6 for FSHD2), an aliquot of cells was further expanded and subcultured to evaluate the potential maximal yield that could be achieved before the drop of CD56-positive population below 50%. This yield was estimated by the multiplication of expansion ratios between each passage, by the number of cells obtained at the time of harvest.

pathology, Rag mice were chosen because they do not develop any specific immunity or antigen-dependent cell cytotoxicity.⁴⁶ FSHD myoblasts were injected twice into the *tibialis anterior* muscles of Rag mice preceded, in some instances, by the injection of the myotoxin notexin (Table 3). At 1 month after MT, the expression of human proteins validated the implantation of human cells into mouse muscle fibers.^{16,47–49} Human dystrophin was observed in all cell-injected muscles, and was absent from muscles injected with a saline solution (Table 3, Figure 5). No significant differences were observed between muscles receiving FSHD or control myoblasts ($P > 0.8$). In the absence of notexin, the dystrophin-positive fibers were of small diameter and frequently trapped within muscle fascicles. Notexin administration did not significantly affect the number of dystrophin-positive fibers ($P > 0.1$), but these appeared more scattered within the muscle.

Discussion

The present study has been performed to evaluate the concept of autologous MT as a therapeutic tool for

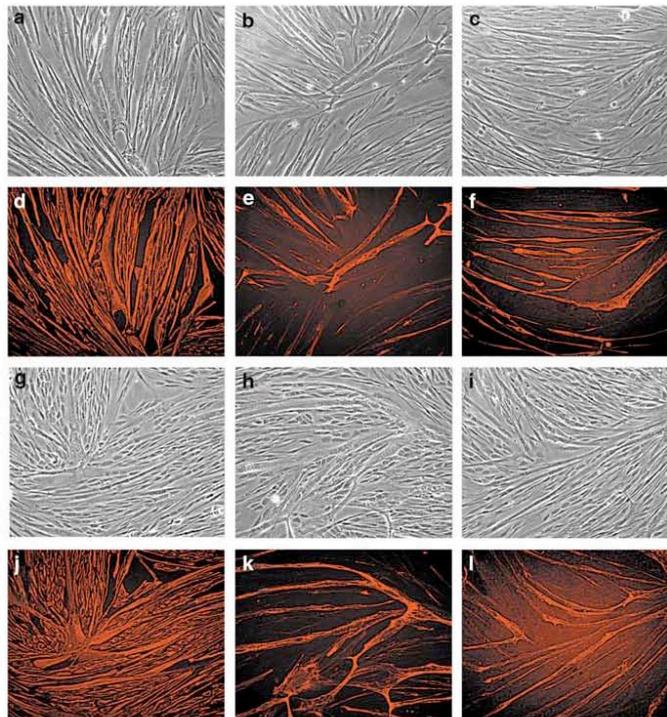


Figure 4 Immunocytofluorescent characterization of control and FSHD myotubes. At 6 days after the onset of differentiation, control (a–f) and FSHD (g–l) cultures were fixed and processed for the analysis of muscle markers expression. Desmin (d, j) stained both myoblasts and myotubes. The parallel observation of phase contrast and immunofluorescent images (a with d, g with j) shows that most cells express this marker, illustrating the high purity of the cultures. The fast (e, k) and slow (f, l) isoforms of MyHC are expressed in most, if not all myotubes, suggesting a co-expression at this stage of the culture. No difference in the expression pattern nor the chronology of differentiation could be observed between control and FSHD cultures (FSHD4 presented here). Original magnification: × 20.

Table 3 Myoblast transplantation into immunodeficient *Rag* mice

Identification	# Injected muscles	# Cells injected	CD56-positive labeling (%)	Injection protocol ^a	Dystrophin-positive fibers
FSHD1	5	5 × 10 ⁶	82	1	23 ± 13
	5	4 × 10 ⁶	68		
FSHD2	5	5 × 10 ⁶	88	1	18 ± 8
	2	3 × 10 ⁶	97		
FSHD3	5	5 × 10 ⁶	86	2	40 ± 10
	5	5.2 × 10 ⁶	88		
FSHD4	5	5 × 10 ⁶	70	1	40 ± 26
	5	5 × 10 ⁶	99		
FSHD5	5	3 × 10 ⁶	80	2	33 ± 18
	5	3.4 × 10 ⁶	81		
C1	5	4.5 × 10 ⁶	94	2	55 ± 23
	5	4.5 × 10 ⁶	70		
C2	5	3.5 × 10 ⁶	82	2	23 ± 19
	5	3.3 × 10 ⁶	90		
Culture medium	5	—	—	2	0
	5	—	—		

Immunodeficient *Rag* mice (12 weeks old) were injected with patient or control myoblasts at 1-week interval ($n=2-5$ muscles for each condition). The cells were used at P6 and P7, and the percentage of CD56-positive myoblasts was estimated by FACS on the day of MT. ^aTwo protocols were followed: (1) one group received 100 ng of notexin at two sites the day before the first cell injection. (2) The other one did not receive notexin. Then, all mice received two series of myoblast injections at 1-week interval. The specific expression of human dystrophin was assessed by immunocytochemistry, and pictures of the muscle sections were taken using a digital camera for the quantification of dystrophin-positive muscle fibers per section ($n=3$). No such fibers could be observed upon injection of culture medium alone. Dystrophin-positive fibers were identified in the animals injected with control or FSHD myoblasts; however, there was no significant difference between the two groups.

patients presenting with a hereditary muscle disorder characterized by a composed pattern of affected and unaffected muscles. This approach would avoid the immunological drawbacks met in heterologous MT clinical trials developed for generalized muscular dystrophies, and it relies on the assumption that, in regional myopathies, clinically unaffected muscles could be a source of myoblasts functionally able to participate in affected muscles regeneration. To our knowledge, this concept has not been proven yet. To establish its pertinence, it was necessary (i) to choose an appropriate pathological model; (ii) to set up and validate a specific cell culture methodology in order to produce, from unaffected muscles, a large amount of myoblasts in a delay compatible with their clinical use; and (iii) to characterize both *in vitro* and *in vivo* these cells.

Among muscular dystrophies presenting with localized muscular involvement, we have selected FSHD, the third most common inherited muscular dystrophy, which is characterized by a typical regional distribution of muscle weakness, an established molecular diagnosis, and an absence of therapeutic solution. We explored proliferation and *in vitro* and *in vivo* differentiation of myoblasts prepared from unaffected *vastus lateralis* muscle of five FSHD patients presenting a mild phenotype and D4ZA repeats number ranging from 6 to 10. Beyond the simple large-scale cell production, our study has been designed to evaluate the characteristics of the cells at any step of the culture, in order to standardize the comparison between these cell cultures and that of control myoblasts prepared from the same muscle of 10 healthy donors. We assumed that these controls could be considered as a baseline reference, since they have undergone a previous successful use in large-scale clinical trials.

Using a validated cell culture methodology, we were able to produce 10⁹ FSHD myoblasts within 23 days.

They presented normal morphology, high and sustained viability, thus the methodologies (including enzymatic treatments and mechanical constraints) elected for cell production were considered harmless for these cells. Both FSHD and control cultures presented a high degree of purity. Myoblasts and, upon differentiation, myotubes, expressed specific muscular markers. No differences between FSHD and control cells were observed in term of *in vitro* differentiation. This study is the first demonstration that large-scale production of myoblasts from unaffected muscles of FSHD patients is feasible within a short delay, standardized, reproducible and fulfilling the clinical requirements. The production was even possible in a critical situation (eg FSHD2 cells).

Interestingly, FSHD myoblasts obtained in our study did not present any morphological aberrations when compared to controls. This finding contrasts with a previous report on FSHD myoblasts carrying three to six D4ZA repeats, showing a 'vacuolar-necrotic phenotype'.⁵⁰ We cannot conclude about this discrepancy because many variables could be involved as, for example, the anatomical location of muscle biopsy, the degree of muscular dystrophy and the cell culture parameters. It may also be due to differences in the genetic status of FSHD patients, since our patients had larger (six to 10) D4ZA repeats.

Our study also underlines some differences between FSHD myoblasts prepared from unaffected muscles and myoblasts prepared from patients presenting with DMD or congenital myotonic dystrophy (CMD). In fact, the proportion of CD56- and desmin-positive FSHD myoblasts remained high throughout the production, while DMD myoblasts have been reported to display an inexorable and rapid decline during consecutive passages^{11-13,51} (personal communication), and to undergo premature senescence, although they generally keep the ability to form myotubes *in vitro*. FSHD myoblasts

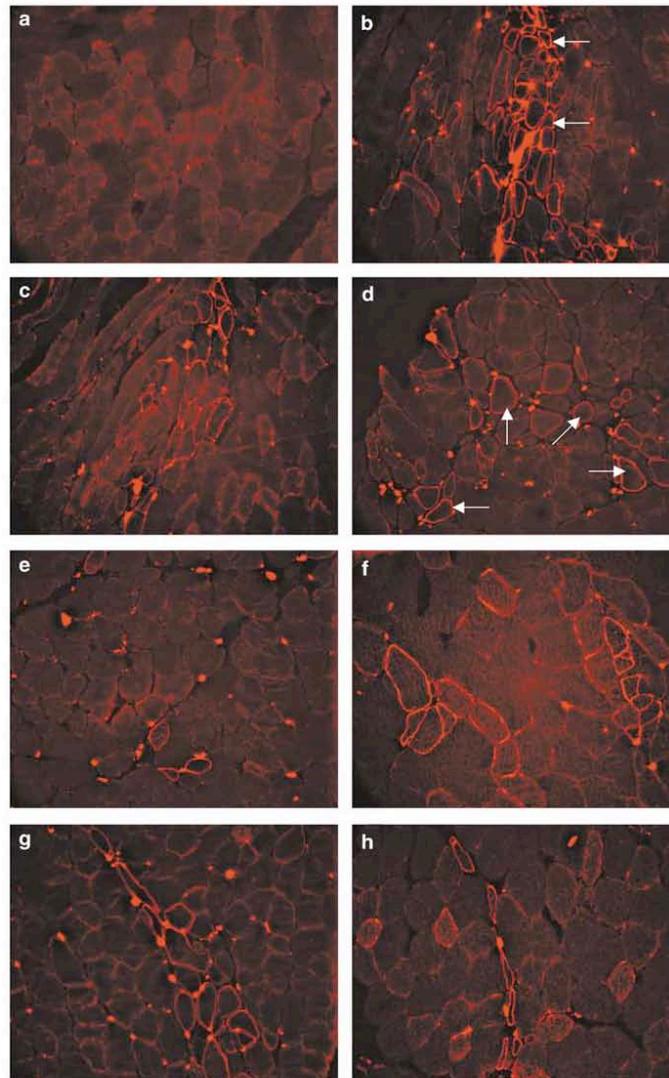


Figure 5 Participation of FSHD and control myoblasts to *in vivo* muscle regeneration. Transverse muscle sections were labeled for human dystrophin expression. At 1 month after MT, donor myoblasts have contributed to the formation of muscle fibers expressing the human antigen (arrows). (a) Culture medium; (b, c) control myoblasts; and (d–h) FSHD1 to FSHD5, respectively. In the absence of notexin pretreatment, the human dystrophin-positive fibers were grouped as clusters (b, f, g). Following notexin pretreatment, they showed a more scattered distribution (d). Original magnification: $\times 25$.

also differ from CMD myoblasts, which show reduction in proliferative ability, and delays in fusion and differentiation.⁵² The proliferative ability of FSHD myoblasts was also explored by the measurement of the telomere size. The length of the telomeric DNA is an indicator of cell proliferation, its measurement reflects the past divisions and is related to the remaining

proliferation ability. Myoblasts from unaffected FSHD muscles displayed a normal telomere size, contrasting with myoblasts from DMD patients or elderly people,^{42–44,53} which usually present shortened telomeres and replicative defects due to a history of cumulative proliferation and muscle regeneration. As expected, these data suggest that the pathophysiological mechanism

leading to muscle degeneration in FSHD would differ from that involved in Duchenne or congenital myotonic dystrophies, or would not progress along the same programs. This assumption is conformed by a previous demonstration that FSHD myoblasts display a normal calcium homeostasis as opposed to DMD myoblasts.⁵⁴

The reason why some muscles are specifically affected in FSHD is not understood yet, and the role played by the myoblasts in its pathophysiology remains unknown. Our data suggest that the large-scale expansion did not trigger an *in vitro* expression of the FSHD disease, since the myoblasts from unaffected muscles maintained a normal morphology and a high proliferative capacity. However, the characteristics of myoblasts prepared from affected muscles have not been investigated, and it would be interesting to explore the *in vitro* and *in vivo* capacities of such myoblasts prepared using our standardized cell culture methodology. The direct comparison of the growth and differentiation characteristics of myoblasts from affected and unaffected muscles could shed light on the mechanisms leading to the specificity of muscular involvement observed in FSHD. These complementary studies would allow identifying a relationship between the dystrophic status of a muscle and the biological features of its myogenic progenitors, and could provide an indication of their role in the progression of the disease. Such a relation has been proposed in other pathological situations, such as DMD, but was not established in FSHD. In this disease, the muscle-specific involvement of local myogenic programs could lead to a restricted deregulation of myogenesis in some muscle groups.

The complete preclinical validation of autologous MT would have implied the transplantation of myoblasts from unaffected muscles into some affected muscles in FSHD animal model, but none is currently available. The use of other dystrophic animal models would not have been relevant since most of these diseases are based on monogenic alterations and their pathophysiological mechanisms are unrelated to FSHD.^{55–58} In the present study, human FSHD myoblasts were injected into immunodeficient *Rag* mice, a validated mouse model for the analysis of muscle regeneration in the context of xenogenic MT. The implantation results we obtained were close to that reported previously^{47–49} and confirmed that myoblasts prepared from unaffected FSHD muscles, even used at the 6th and 7th passages, take part into *in vivo* muscle regeneration. The overall number of dystrophin-positive fibers was inferior to that reported previously in immunocompetent models of muscular dystrophies in the context of syngenic or allogenic MT.^{17,18,20} In these models, however, dystrophic muscles frequently undergo spontaneous cycles of degeneration/regeneration that would increase myoblast incorporation within host tissue. In the present study, the evaluation of transplantation outcome has been performed 1 month after transplantation, a time course that is of general use in human and animal MT assays.^{9,16,17,20,31,47,49} This model was not regarded helpful to evaluate the long-term persistence of muscle fibers harboring the human mutated genes. Indeed, a negative selection of muscle fibers expressing the mutated gene could occur with time in the healthy environment of mouse muscle fibers, and this selection would not be representative of the situation presented in FSHD.

In conclusion, the present study suggests that myoblasts prepared from unaffected muscles of FSHD patients may tolerate the large-scale expansions required for their clinical use, given the large number of cells presently needed to perform intramuscular injections.^{31,34} These myoblasts also preserve, at different passages, their ability to *in vitro* differentiate and to *in vivo* participate to muscle regeneration. The combination of our results and studies on intramuscular injection procedures raise the possibility of future clinical trials of autologous cell therapy for FSHD patients. Moreover, this standardized cell culture methodology could allow in the future the preparation and the assessment of myoblasts from patients presenting with other forms of muscular dystrophies, either in view of similar autologous MT approaches or to establish cellular models of these diseases.

Materials and methods

Patient selection

This preclinical study was approved by the French Regulatory Health Authorities and our Ethics committee (CCPPRB, Nice, France).

Eligibility for inclusion of FSHD patients was based on: (1) age (between 18 and 65 years old); (2) clinical presentation of FSHD, confirmed by molecular diagnosis (number of D4Z4 repeats between 1 and 10); to avoid the possibility of somatic mosaicism, only familial cases (being at least the second generation of affected) were selected; (3) clinical status according to the Brooke and Vignos scale (grade >2 for upper limb muscles and grade 1 for lower limb muscles); and (4) absence of clinical deficit in the *vastus lateralis* muscle assessed by manual muscle testing, and of dystrophic changes at the NMR imaging. A subsequent routine histological examination on muscle biopsy confirmed these findings. The main exclusion criteria consisted of diabetes, pregnancy, vasculopathy, steroid or immunomodulatory treatment, anticoagulant therapy and positive serological test for HIV or hepatitis B, C virus.

Historical control culture data were collected from a previous phase I clinical trial dedicated to the evaluation of MT as a therapeutic approach for postischemic heart failure.³⁴ In this study, 10 patients received intramyocardial transplantation of autologous myoblasts prepared according to the same validated procedure. The exclusion criteria have been described previously,³⁴ one of which being the absence of muscular dystrophy.

Muscle biopsy

A 1 g biopsy of the *vastus lateralis* muscle was performed in FSHD patients under local anesthesia, weighed, placed into a preservation medium containing antibiotics (gentamicin, 50 µg/ml, Panpharma) and sent overnight to the cell therapy laboratory.

The *vastus lateralis* muscle biopsies from control patients were obtained through the same procedure. The initial biopsy retrieved from these patients was larger (up to 14 g) to comply with shorter production delays required by the specific schedule of the clinical trial.

Cell culture

Set-up of culture. Cell culture procedures were agreed by the French Health Authorities (AFSSAPS) and were applied identically to FSHD and control groups. The muscle biopsies were received and processed in a dedicated clean room according to Good Manufacturing Practices. The biopsies were processed 24 h after collection (D1) for FSHD patients, and 4–6 h after collection (D0) for controls, due to a shortened transportation procedure. The muscle fragments were minced and digested using collagenase (1 h at 37°C, Roche-Boehringer), then trypsin-EDTA (0.25%, 20 min at 37°C, Hyclone-Perbio). The cell suspension was filtered through 100 then 40 µm cell strainers (Becton-Dickinson) and pelleted. All subsequent handlings were performed in close systems using custom-made plastic connections and bags. The cells were seeded onto a one-layer substrate (600 cm², Nunc) in the proliferation medium containing: 80% of modified MCDB medium (custom-made by Hyclone-Perbio), 20% Defined fetal bovine serum (DFBS, Hyclone), penicillin (100 U/ml, Sarbach) and streptomycin (10 µg/ml, Specia), 10 ng/ml human recombinant bFGF (R&D) and 1 µM dexamethasone (Merck).

Culture expansion. The cells were settled for 7 days, then harvested by trypsinization and expanded. One fraction was reserved for counting and phenotypic analysis (see below). Expansions were repeated successively, before reaching confluence (Table 1). Up to 26 layers were required to reach the expected number of cells.

The number of divisions (n) between each passage was calculated as:

$$n = [\log(C_x/C_{x-z})] / \log 2$$

The doubling time (D) was calculated as:

$$D = h/n$$

where C_x is the number of cells harvested at a considered passage x and C_{x-z} is the number of cells at a given, previous ($x-z$) passage. h is the number of hours between passages x and $x-z$.

Residual proliferation ability. An aliquot of cells was further subcultured to evaluate the potential maximal yield that could be achieved before the drop of CD56-positive population below the level of 50%. This limit was fixed as an indicator of the exhaustion of the myogenic potential. Briefly, 10⁶ cells were plated into a 25 cm² flask (Falcon), and then harvested before reaching confluence. Cells were counted and a phenotypic analysis was performed. One million cells was further plated into a 25 cm² flask and this operation was repeated as long as cell growth was ongoing. The final theoretical yield was obtained by the multiplication of the expansion ratios observed at each passage.

Cell viability. Cell viability was evaluated by FACS (FACSCalibur, BD-Pharmingen), based on the property of exclusion of propidium iodide (0.1 mg/ml, 2 min at room temperature, Sigma) by living cells.

Microbiological controls. Microbiological controls were performed complying with the standard protocols

defined for bacteriological controls of blood-derived products prepared in clinical practice at Saint Louis Hospital (Paris, France). Samples were tested for the presence of aerobic or anaerobic pathogens at all steps of the production using the Vitale system (Merieux).

Phenotypical characterization

CD56 evaluation. The cells were incubated with the phycoerythrin-coupled anti-CD56 antibody (clone NCAM 16.2, 1/5, 15 min at 4°C, BD-Pharmingen). Nonspecific labeling was evaluated using the control isotype (IgG2b, BD-Pharmingen). FACS data (at least 10⁴ events) were analysed using the Cell Quest software.

Desmin evaluation. The cells were first fixed and permeabilized using saponine (0.1%) in PAF (4%, 20 min at room temperature), then incubated with the anti-desmin antibody (Clone D33, 1/100, 15 min at room temperature, Dako) or the isotypic control (IgG1, 1/25, BD-Pharmingen). The cells were incubated with the secondary antibody (Goat F (ab')₂ anti-mouse H+L) coupled to FITC (1/50, 30 min at room temperature, Caltag) and analysed by FACS.

The characteristics of myoblasts (number of divisions, doubling time) were calculated as above. The true number of myoblasts (M_p) at a given passage (p) was calculated as follows:

$$M_p = C_p * F_p$$

where C_p is the total number of cells at the passage p , and F_p is the fraction of these cells positive for CD56 antigen.

Differentiation. Following cell harvest, 5 × 10⁵ cells were seeded into 25 cm² flasks and allowed to settle and proliferate for 72 h. Differentiation was induced by replacement of the proliferation medium by the differentiation medium containing the modified MCDB medium (98%), DFBS (2%) and antibiotics. Microphotographs (Olympus microscope equipped with a Photometrics Cool snap digital Camera) were performed at the onset of differentiation (D0) and 6 days later. In parallel, 2 × 10⁴ cells were seeded into 12-well plates, allowed to proliferate for 72 h. Following induction of differentiation, cells were permeabilized and fixed by cold methanol at D0, D1, D3 and D6. The expression of CD56, desmin and MyHC isoforms was assessed using anti-CD56, anti-desmin, anti-fast MyHC (clone MY32, 1/400, 1 h, Sigma) or anti-slow MyHC (clone NOQ7.5.4D, 1/1000, 1 h, Sigma) followed by a goat anti-mouse antibody (Alexa Fluor 568, 1/1000, 1 h, Molecular Probes). The presence or absence of labeled structures was evaluated qualitatively using an inverted Olympus microscope equipped for fluorescence analysis. The fusion index was calculated on four to seven microscopic fields (at least 1000 nuclei counted) using the formula:

$$FI = ((\text{number of nuclei within myotube structures}) / (\text{total number of nuclei in the field})) \times 100$$

Evaluation of telomere size. DNA samples were extracted from cell pellets, digested by *HinfI* (Biolabs) for 2 h at 37°C to generate terminal restriction fragments

(TRFs) containing the telomeric region with several kb pairs of the (TTAGGG) repeat sequence and a subtelomeric region of non-TTAGGG DNA.⁴² Digested genomic DNA (3 µg), as well as molecular markers (³²P ladder 1 kb and HMW, Life Technologies) were resolved by electrophoresis for 1400 V h in 0.7% agarose gel. The TRFs were detected by hybridization to a ³²P-(TTAGGG)₄ probe as described.⁴² The signals on hybridized gels were quantified using a phosphorimager (Biorad) and analyzed by a computer-assisted system^{43,53} (*n* = 3 for each determination). The hybridized signals were normalized to have equalized signal intensities. The high purity of myoblasts in the cultures allows attributing the telomere size to this population.

In vivo implantation. To evaluate their ability to take part in muscle formation *in vivo*, the myoblasts were injected into the *tibialis anterior* muscles of immunodeficient Rag mice (kindly provided by Dr James Di Santo).⁴⁶ The cell implantation model had been validated previously.⁴⁷ Aliquots of cells were thawed and grown in one single plate (600 cm², Nunc) in proliferation medium. The myoblasts were then used at P6 and P7. On the day of injection, they were harvested, counted and an aliquot was reserved for the quantification of CD56-positive cells by FACS. Cells were finally suspended in DMEM (Gibco-BRL) containing 0.5% BSA (Sigma) and kept on ice until the injection. Animals were anesthetized using ketamine (30 mg/kg) and xylazine (15 mg/kg). The *tibialis anterior* muscle was exposed by a small skin incision. Two protocols were followed (Table 3). The mice received two series of cell injections at one week interval. 2 to 5 × 10⁶ cells were injected at 8 to 10 sites in a volume of 20 µl using a glass capillary.

The mice were killed 4 weeks after the last series of cell injections, which is a delay compatible with complete mouse muscle regeneration and the expression of donor markers.^{16,47–49} The muscles were snap frozen in nitrogen-cooled isopentane and serially sectioned (8 µm) using a cryostat. The participation of human cells in muscle formation was detected by the specific expression of human dystrophin beneath the basement membrane of muscle fibers. The Mouse on Mouse kit (Vector) was used. Sections were incubated with the anti-dystrophin antibody (NCL-Dys3, 1/20, 30 min at room temperature, Novocastra), and then with a goat anti-mouse IgG (H+L) (Alexa Fluor 568, 1/1000, 30 min at room temperature, Molecular Probes). Slides were mounted under Mowiol (Calbiochem) and observed using a Zeiss fluorescence microscope. Pictures were performed using the Photometric digital camera and used for the quantification of the number of dystrophin-positive fibers. Statistical analysis was performed using the paired *t*-test.

Acknowledgements

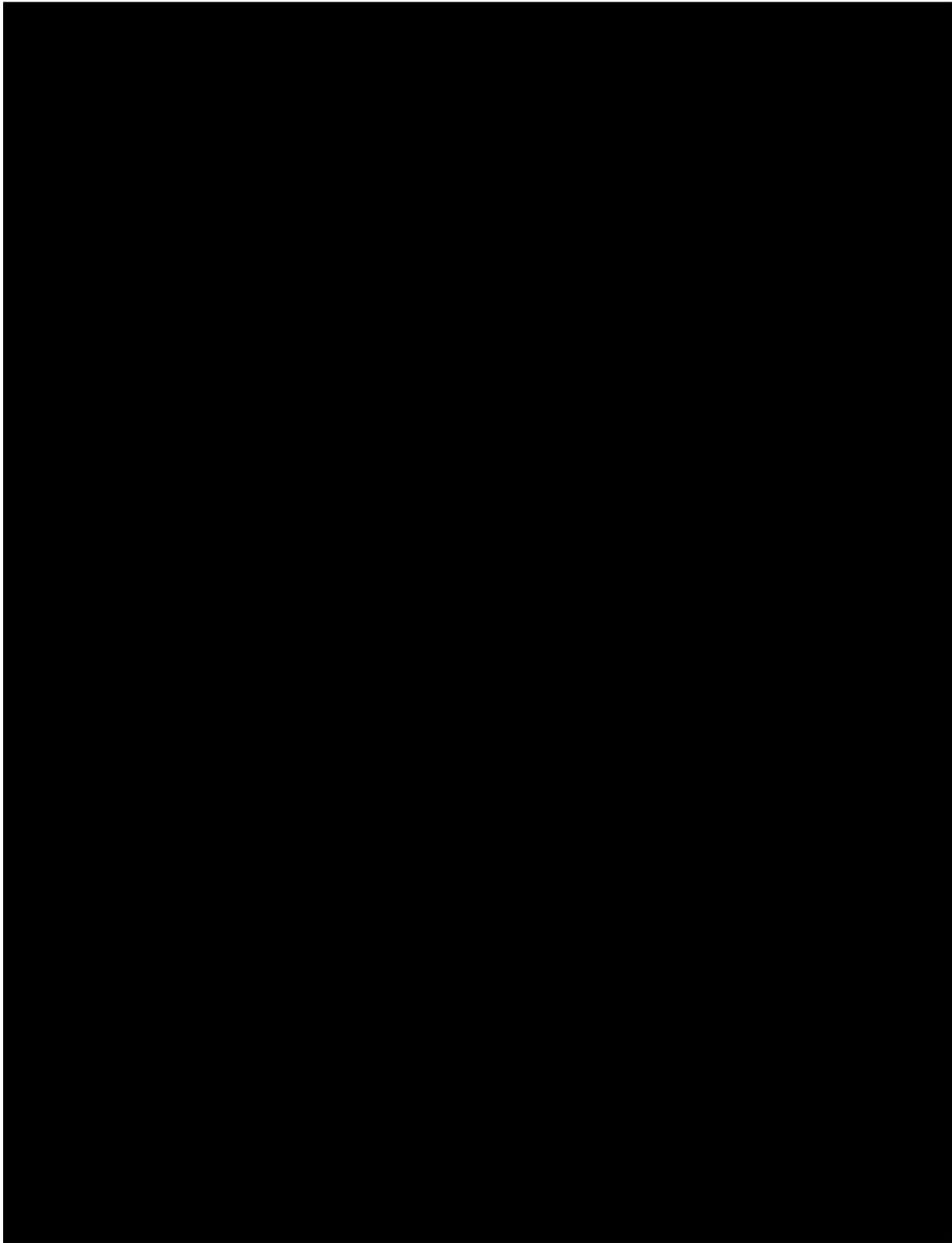
This work was supported by a grant from the 'Association Française contre les Myopathies' (AFM). This study has been promoted by the CHU de Nice. The production of control myoblasts was supported by both AFM and the 'Assistance Publique-Hôpitaux de Paris' (France). We thank Dr James Di Santo (Institut Pasteur, Paris) for the kind gift of the immunodeficient Rag mice, Dr Marc

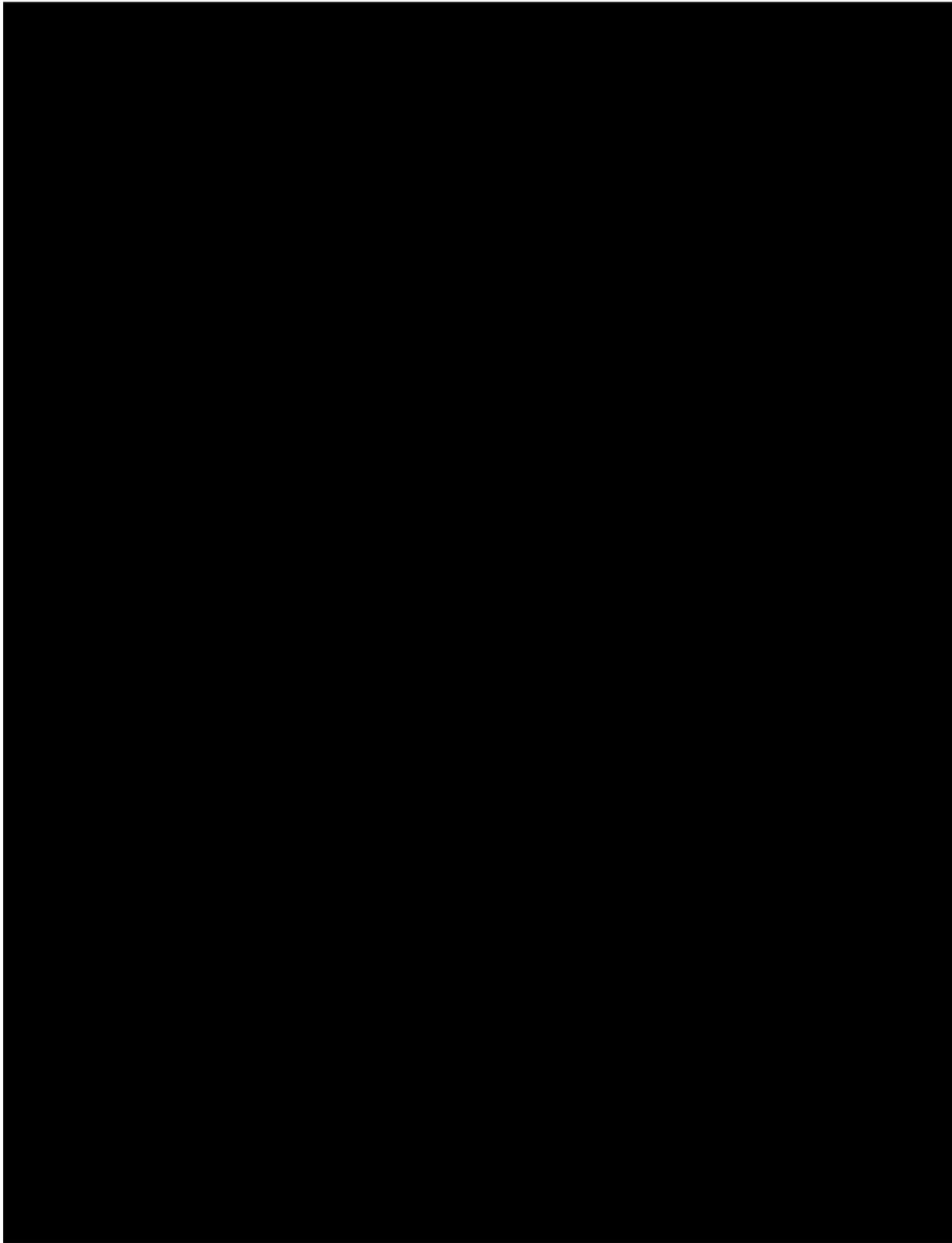
Jeanpierre for FSHD molecular diagnosis, Dr Vincent Mouly for telomere evaluation, Drs Gillian Buttler-Browne and Marc Fiszman for critical review of the manuscript, Drs Philippe Chaumet-Riffaud and Solange Solbes-Latourette for helpful assistance at setting this preclinical protocol and Miss Jessica Shama for helpful revision of the document. We thank the company Myosix SA and Mr Frédéric Chereau for giving access to the myoblast culture methodology. Finally, we would also like to thank all the patients for their participation to this study.

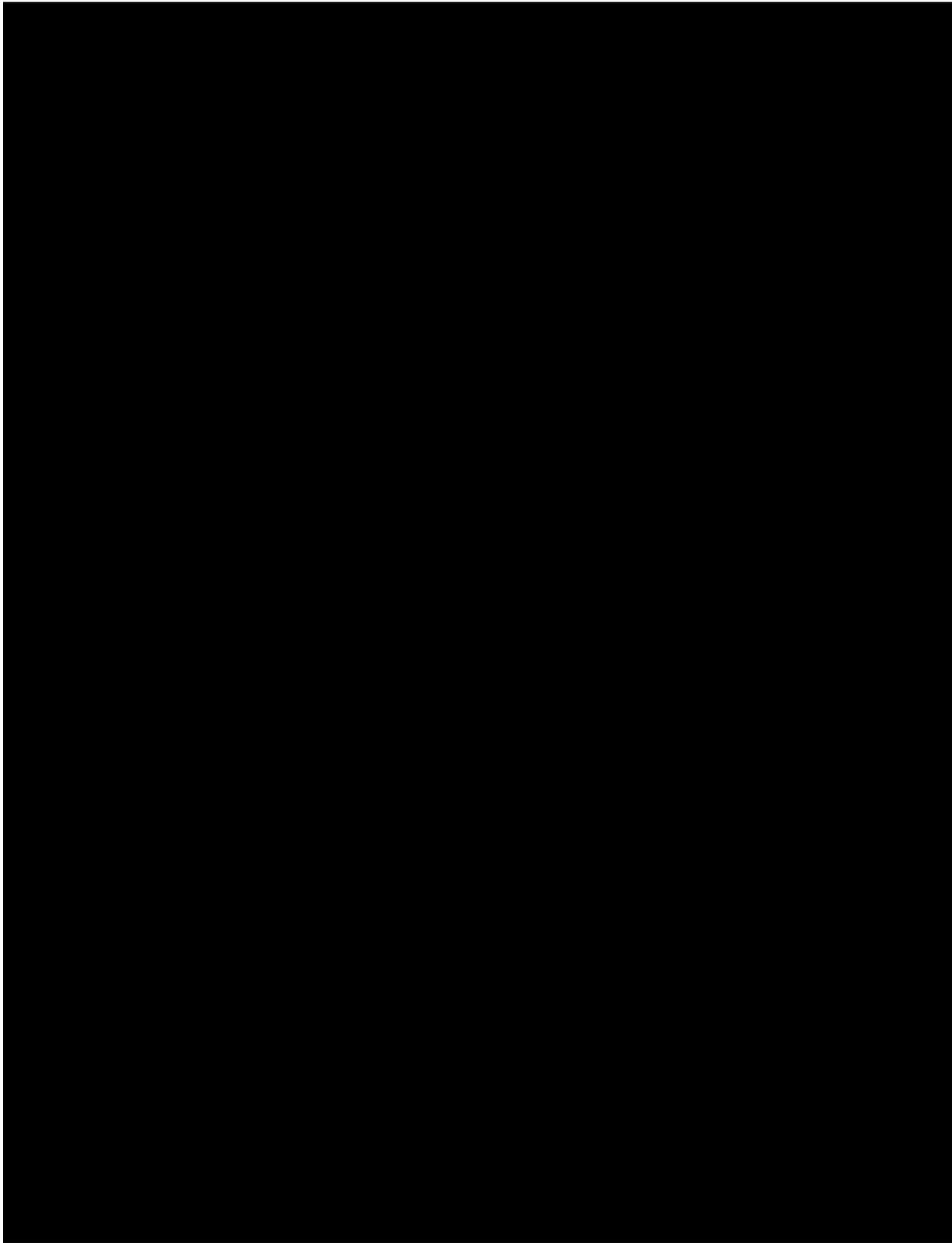
References

- Lunt P. Facioscapulohumeral muscular dystrophy: diagnostic and molecular aspects. In: Deymeer F (ed). *Neuromuscular Diseases: From Basic Mechanisms to Clinical Management. Monographs in Clinical Neuroscience*, Vol. 18. Karger: Basel, Freiburg, Paris, London, New York, New Delhi, Bangkok, Singapore, Tokyo, Sydney, 2000: 44–60.
- Wijmenga C et al. Chromosome 4q DNA rearrangements associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Nat Genet* 1992; 2: 26–33.
- Hewitt JE et al. Analysis of the tandem repeat locus D4Z4 associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 1287–1295.
- Lunt PW et al. Correlation between fragment size at D4F104S1 and age at onset or at wheelchair use, with a possible generational effect, accounts for much phenotypic variation in 4q35-facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD). *Hum Mol Genet* 1995; 4: 951–958.
- Tawil R et al. Evidence for anticipation and association of deletion size with severity in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Ann Neurol* 1996; 39: 744–748.
- Gabellini D, Green MR, Tupler R. Inappropriate gene activation in FSHD: a repressor complex binds a chromosomal repeat deleted in dystrophic muscle. *Cell* 2002; 110: 339–348.
- Winokur ST et al. Expression profiling of FSHD muscle supports a defect in specific stages of myogenic differentiation. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 2895–2907.
- van der Kooij EL et al. Strength training and albuterol in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neurology* 2004; 63: 702–708.
- Skuk D, Roy B, Goulet M, Tremblay JP. Successful myoblast transplantation in primates depends on appropriate cell delivery and induction of regeneration in the host muscle. *Exp Neurol* 1999; 155: 22–30.
- Skuk D, Goulet M, Roy B, Tremblay JP. Efficacy of myoblast transplantation in nonhuman primates following simple intramuscular cell injections: toward defining strategies applicable to humans. *Exp Neurol* 2002; 175: 112–126.
- Blau HM, Webster C, Pavlath GK. Defective myoblasts identified in Duchenne muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 4856–4860.
- Webster C, Blau HM. Accelerated age-related decline in replicative life-span of Duchenne muscular dystrophy myoblasts: implications for cell and gene therapy. *Somat Cell Mol Genet* 1990; 16: 557–565.
- Wright WE. Myoblast senescence in muscular dystrophy. *Exp Cell Res* 1985; 157: 343–354.
- Irintchev A et al. Functional improvement of damaged adult mouse muscle by implantation of primary myoblasts. *J Physiol* 1997; 500: 775–785.
- Arcila ME et al. Mass and functional capacity of regenerating muscle is enhanced by myoblast transfer. *J Neurobiol* 1997; 33: 185–198.

- 16 Huard J *et al.* High efficiency of muscle regeneration after human myoblast clone transplantation in SCID mice. *J Clin Invest* 1994; **93**: 586–599.
- 17 Kinoshita I *et al.* Very efficient myoblast allotransplantation in mice under FK506 immunosuppression. *Muscle Nerve* 1994; **17**: 1407–1415.
- 18 Kinoshita I, Vilquin JT, Roy R, Tremblay JP. Successive injections in mdx mice of myoblasts grown with bFGF. *Neuromuscul Disord* 1996; **6**: 187–193.
- 19 Partridge TA *et al.* Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to dystrophin-positive by injection of normal myoblasts. *Nature* 1989; **337**: 176–179.
- 20 Morgan JE, Pagel CN, Sherratt T, Partridge TA. Long-term persistence and migration of myogenic cells injected into pre-irradiated muscles of mdx mice. *J Neurol Sci* 1993; **115**: 191–200.
- 21 Gussoni E *et al.* Normal dystrophin transcripts detected in Duchenne muscular dystrophy patients after myoblast transplantation. *Nature* 1992; **356**: 435–438.
- 22 Huard J *et al.* Human myoblast transplantation: preliminary results of 4 cases. *Muscle Nerve* 1992; **15**: 550–560.
- 23 Karpati G *et al.* Myoblast transfer in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* 1993; **34**: 8–17.
- 24 Law PK *et al.* Dystrophin production induced by myoblast transfer therapy in Duchenne muscular dystrophy. *Lancet* 1990; **336**: 114–115.
- 25 Mendell JR *et al.* Myoblast transfer in the treatment of Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 1995; **333**: 832–838.
- 26 Miller RG *et al.* Myoblast implantation in Duchenne muscular dystrophy: the San Francisco study. *Muscle Nerve* 1997; **20**: 469–478.
- 27 Morandi L *et al.* Lack of mRNA and dystrophin expression in DMD patients three months after myoblast transfer. *Neuromuscul Disord* 1995; **5**: 291–295.
- 28 Neumeyer AM *et al.* Pilot study of myoblast transfer in the treatment of Becker muscular dystrophy. *Neurology* 1998; **51**: 589–592.
- 29 Tremblay JP *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.
- 30 Skuk D, Goulet M, Roy B, Tremblay JP. Myoblast transplantation in whole muscle of non human primates. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000; **59**: 197–206.
- 31 Skuk D *et al.* Dystrophin expression in myofibers of Duchenne muscular dystrophy patients following intramuscular injections of normal myogenic cells. *Mol Therapy* 2004; **9**: 475–482.
- 32 Hagege AA *et al.* Viability and differentiation of autologous skeletal myoblast grafts in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet* 2003; **361**: 491–492.
- 33 Menasché P *et al.* First successful clinical myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001; **357**: 279–280.
- 34 Menasché P *et al.* Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003; **41**: 1078–1083.
- 35 Pagani FD *et al.* Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia-damaged myocardium in humans. *J Am Coll Cardiol* 2003; **41**: 879–888.
- 36 Pouly J *et al.* Does the functional efficacy of skeletal myoblast transplantation extend to nonischemic cardiomyopathy? *Circulation* 2004; **110**: 1626–1631.
- 37 Vignos PJ, Spencer GE, Archibald KC. Management of progressive muscular dystrophy in childhood. *JAMA* 1963; **184**: 89–96.
- 38 Illa I, Leon-Monzon M, Dalakas MC. Regenerating and denervated human muscle fibers and satellite cells express neural cell adhesion molecule recognized by monoclonal antibodies to natural killer cells. *Ann Neurol* 1992; **31**: 46–52.
- 39 Lanier LL, Testi R, Bindl J, Phillips JH. Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J Exp Med* 1989; **169**: 2233–2238.
- 40 Webster C *et al.* Isolation of human myoblasts with the fluorescence-activated cell sorter. *Exp Cell Res* 1988; **174**: 252–265.
- 41 Li ZL, Lillienbaum A, Butler-Browne G, Paulin D. Human desmin-coding gene: complete nucleotide sequence, characterization and regulation of expression during myogenesis and development. *Gene* 1989; **78**: 243–254.
- 42 Allsopp RC *et al.* Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 10114–10118.
- 43 Decary S *et al.* Replicative potential and telomere length in human skeletal muscle: implications for satellite cell-mediated gene therapy. *Hum Gene Ther* 1997; **8**: 1429–1438.
- 44 Decary S *et al.* Shorter telomeres in dystrophic muscle consistent with extensive regeneration in young children. *Neuromuscul Disord* 2000; **10**: 113–120.
- 45 van der Maarel SM *et al.* De novo facioscapulohumeral muscular dystrophy: frequent somatic mosaicism, sex-dependent phenotype, and the role of mitotic transchromosomal repeat interaction between chromosomes 4 and 10. *Am J Hum Genet* 2000; **66**: 26–35.
- 46 Goldman JP *et al.* Enhanced human cell engraftment in mice deficient in RAG2 and the common cytokine receptor gamma chain. *Br J Haematol* 1998; **103**: 335–342.
- 47 Cooper RN *et al.* A new immunodeficient mouse model for human myoblast transplantation. *Hum Gene Therapy* 2001; **12**: 823–831.
- 48 Skuk D *et al.* Transplantation of human myoblasts in SCID mice as a potential muscular model for myotonic dystrophy. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999; **58**: 921–931.
- 49 Vilquin JT *et al.* Myoblast transplantations lead to the expression of the laminin alpha 2 chain in normal and dystrophic (dy/dy) mouse muscles. *Gene Therapy* 1999; **6**: 792–800.
- 50 Winokur ST *et al.* Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) myoblasts demonstrate increased susceptibility to oxidative stress. *Neuromuscul Disord* 2003; **13**: 322–333.
- 51 Blau HM *et al.* Differentiation properties of pure populations of human dystrophic muscle cells. *Exp Cell Res* 1983; **144**: 495–503.
- 52 Furling D *et al.* Defective satellite cells in congenital myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* 2001; **10**: 2079–2087.
- 53 Renault V *et al.* Regenerative potential of human skeletal muscle during aging. *Aging Cell* 2002; **1**: 132–139.
- 54 Vandebrouck C *et al.* Normal calcium homeostasis in dystrophin-expressing facioscapulohumeral muscular dystrophy myotubes. *Neuromuscul Disord* 2002; **12**: 266–272.
- 55 Hoffman EP, Brown Jr RH, Kunkel LM. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 1987; **51**: 919–928.
- 56 Xu H *et al.* Defective muscle basement membrane and lack of M-laminin in the dystrophic dy/dy mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 5572–5576.
- 57 Xu H, Wu XR, Wewer UM, Engvall E. Murine muscular dystrophy caused by a mutation in the laminin alpha 2 (Lama2) gene. *Nat Genet* 1994; **8**: 297–302.
- 58 Richard I *et al.* Loss of calpain 3 proteolytic activity leads to muscular dystrophy and to apoptosis-associated I κ B α /nuclear factor kappaB pathway perturbation in mice. *J Cell Biol* 2000; **151**: 1583–1590.







CD140b. The SMALD⁺/CD34⁺ population was negative for CD45, CD56, CD105, and only a few cells expressed CD31.

The simple positive SMALD⁻/CD34⁺ population was especially enriched in CD31⁺ cells (up to 27%), thus suggesting a pro-endothelial commitment of a significant fraction of this population, underlined by the expression of CD105. Interestingly, CD56⁺ cells were also present in this SMALD⁻/CD34⁺ population (Table 1), suggesting a combined angiogenic and myogenic commitment of some cells, as described for myoendothelial cells.⁴¹

The double negative SMALD⁻/CD34⁻ population contained cells positive for CD45, CD56 and CD105 in low numbers. Of note, this double negative population included the highest percentage of CD56⁺ cells, reflecting their myogenic commitment, as expected from a mononucleated muscle cell preparation. Interestingly, mature circulating hematopoietic cells expressing CD45 were gathered in this double negative population, whereas they were not observed in the other ones (Table 1).

Table 1 Flow cytometry phenotypic characterization of dissociated muscle cells

Populations ^a	Markers						
	CD31 ⁺ n = 3 ^b	CD44 ⁺ n = 4	CD45 ⁺ n = 3	CD56 ⁺ n = 12	CD90 ⁺ n = 5	CD105 ⁺ n = 4	CD140b ⁺ n = 3
SMALD ⁺ /CD34 ⁻	0%	19.6% (0.0–51.0)	0%	0%	5.9% (1.2–8.5)	1.5% (0.0–2.6)	0%
SMALD ⁺ /CD34 ⁺	<1%	1.0% (0.0–1.5)	0%	0%	6.6% (0.7–39.0)	0%	1.6% (0.2–1.6)
SMALD ⁻ /CD34 ⁺	26.9% (5.1–55.5)	<1%	<1%	1.4% (0.0–21.5)	5.3% (3.5–16.9)	7.4% (2.0–27.7)	0%
SMALD ⁻ /CD34 ⁻	<1%	<1%	2.7% (0.7–4.2)	2.8% (0.4–43.4)	2.6% (1.8–21.8)	1.4% (0.1–3.1)	<1%

Abbreviation: SMALD, skeletal muscle aldehyde dehydrogenase.

^aThe four sub-populations were defined by ALDH activity and CD34 expression and analyzed for coexpression of extracellular markers. ^bNumber of biopsies analyzed. ^cValues correspond to median percentages. Higher and lower values are given within parentheses.

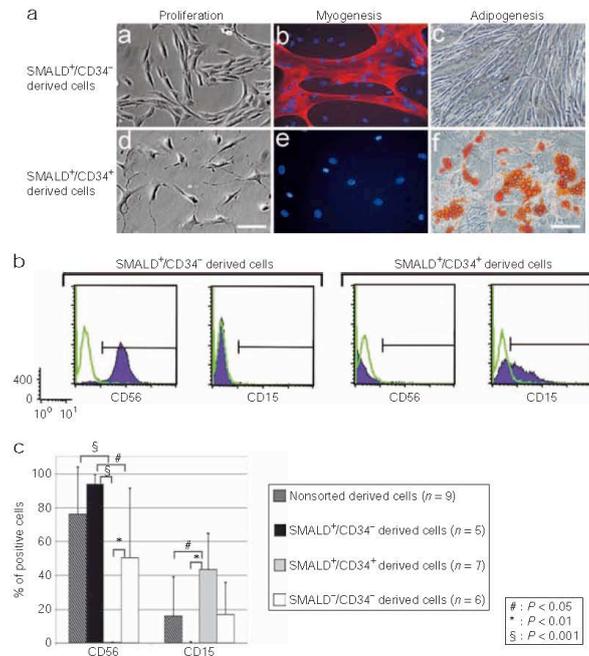


Figure 3 *In vitro* analysis of SMALD⁺/CD34⁻ and SMALD⁺/CD34⁺-derived cells. **(a)** Phase contrast pictures of SMALD⁺/CD34⁻ and SMALD⁺/CD34⁺ cells expanded in proliferation and shifted to differentiation media. SMALD⁺/CD34⁻ derived cells differentiated into myotubes (phase contrast) expressing fast myosin heavy-chain isoform **(b, e)**; red; nuclei stained in blue). SMALD⁺/CD34⁺ derived cells accumulated lipid droplets of various sizes **(c, f)**; droplets stained by Oil Red). Bars = 25 μm **(a–e)**, 8 μm **(f)**. **(b)** Fluorescence-activated cell sorting phenotypic characterizations for CD56 and CD15 membrane markers on expanded SMALD⁺/CD34⁻ and SMALD⁺/CD34⁺ populations. **(c)** Quantitative comparisons between populations regarding CD56 or CD15 expression. Most SMALD⁺/CD34⁻-derived cells expressed CD56 in culture, but not CD15, whereas half SMALD⁺/CD34⁺-derived cells expressed CD15 but never CD56. CD56⁺ cells also originated from nonsorted and SMALD⁻/CD34⁻ fractions. *n*, numbers of biopsies analyzed. SMALD, skeletal muscle aldehyde dehydrogenase.

Phenotype and growth of cell-sorted populations in culture

Dissociated cells were sorted according to their ALDH activity and expression of CD34. The four populations (SMALD⁺/CD34⁺, SMALD⁺/CD34⁻, SMALD⁻/CD34⁺ and SMALD⁻/CD34⁻) were collected separately using a FACSVantage SE DiVa (Becton-Dickinson Biosciences, San Jose, CA) (Figure 2a), with a purity above 95%. The indicated purity of selection was confirmed by re-analysis of each sorted population. The selected populations were plated in myogenic proliferation medium, concurrently to a nonsorted fraction used as a quality control of muscle cell culture. Immunocytofluorescence analysis of SMALD⁺/CD34⁻ and SMALD⁺/CD34⁺ cells *in vitro* confirmed the initial flow cytometry data and allowed us to follow the expression of markers during the first week in culture (Figure 2b). SMALD⁺/CD34⁻ cells were found to be positive only for CD44 and negative for CD34, CD56, and CD15 within hours after seeding, and they expressed CD44, CD56 and/or CD146 in culture. Conversely, SMALD⁺/CD34⁺ cells expressed CD34 immediately after seeding, but this marker was lost in culture, whereas CD15 and/or CD44 appeared within 6 days (Figure 2b), and these cells remained negative for CD56. It should be noted that ALDH activity was sustained throughout the culture. The CD34 marker was not conserved in any sorted population in culture, nor in nonsorted fraction (data not shown).

When further expanded in culture, the SMALD⁻/CD34⁺ cells remained quiescent and rapidly degenerated with time in this proliferation medium. The other cell populations adhered to the substrate, proliferated (Figure 3a, left column) and were harvested on passages 2–3, first for flow cytometry phenotypic analyses, and second for differentiation assays *in vitro*. Following expansion, the percentages of CD56⁺ and CD15⁺ cells (Figures 3b,c) in nonsorted-derived cells increased to 76 and 16, respectively, with high standard deviations reaching 28 and 23%, respectively. These deviations underline the intersample variations, which could be attributed to differences in the anatomical origin of the biopsies or individual status of the donors. SMALD⁺/CD34⁻-derived cell cultures produced on average 94 ± 6% of CD56⁺ cells and never expressed CD15, and were considered as a homogenous population of myoblasts. In contrast, SMALD⁺/CD34⁺-derived cells never presented a CD56⁺ phenotype, but 44 ± 19% of them expressed CD15, and were therefore considered as a heterogeneous population of CD56⁻ cells. SMALD⁻/CD34⁻-derived cells contained 51 ± 41% CD56⁺ cells as expected, and 17 ± 19% CD15⁺ cells. This was not surprising because the SMALD⁻/CD34⁻ fraction is heterogeneous and initially contained CD56⁺ cells.

Differentiation of cell-sorted populations *in vitro*

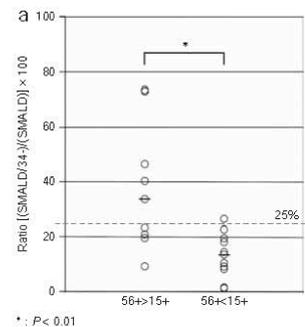
After 4–5 days in myogenic differentiation medium, SMALD⁺/CD34⁻-derived cells fused and formed multinucleated myotubes expressing the fast myosin heavy-chain isoform. Placed in the same conditions, SMALD⁺/CD34⁺-derived cells were unable to fuse into myotubes and consequently stained negative for fast myosin (Figure 3a, middle column).

However, the SMALD⁺/CD34⁺-derived cells differentiated extensively into adipoblast-like cells filled with numerous lipidic vesicles. This population may therefore relate to human CD34⁺ skeletal muscle cells prone to differentiation into brown

adipose tissue.⁴³ In contrast, SMALD⁺/CD34⁻-derived cells fused, differentiated into multinucleated myotubes in adipogenic medium, and never presented the adipogenic phenotype *in vitro* (Figure 3a, right column).

Taken together, our results suggest that SMALD⁺/CD34⁻ and SMALD⁺/CD34⁺ cells progressed in culture along two different pathways associated to myogenic or mesenchymal-like potentials, respectively.

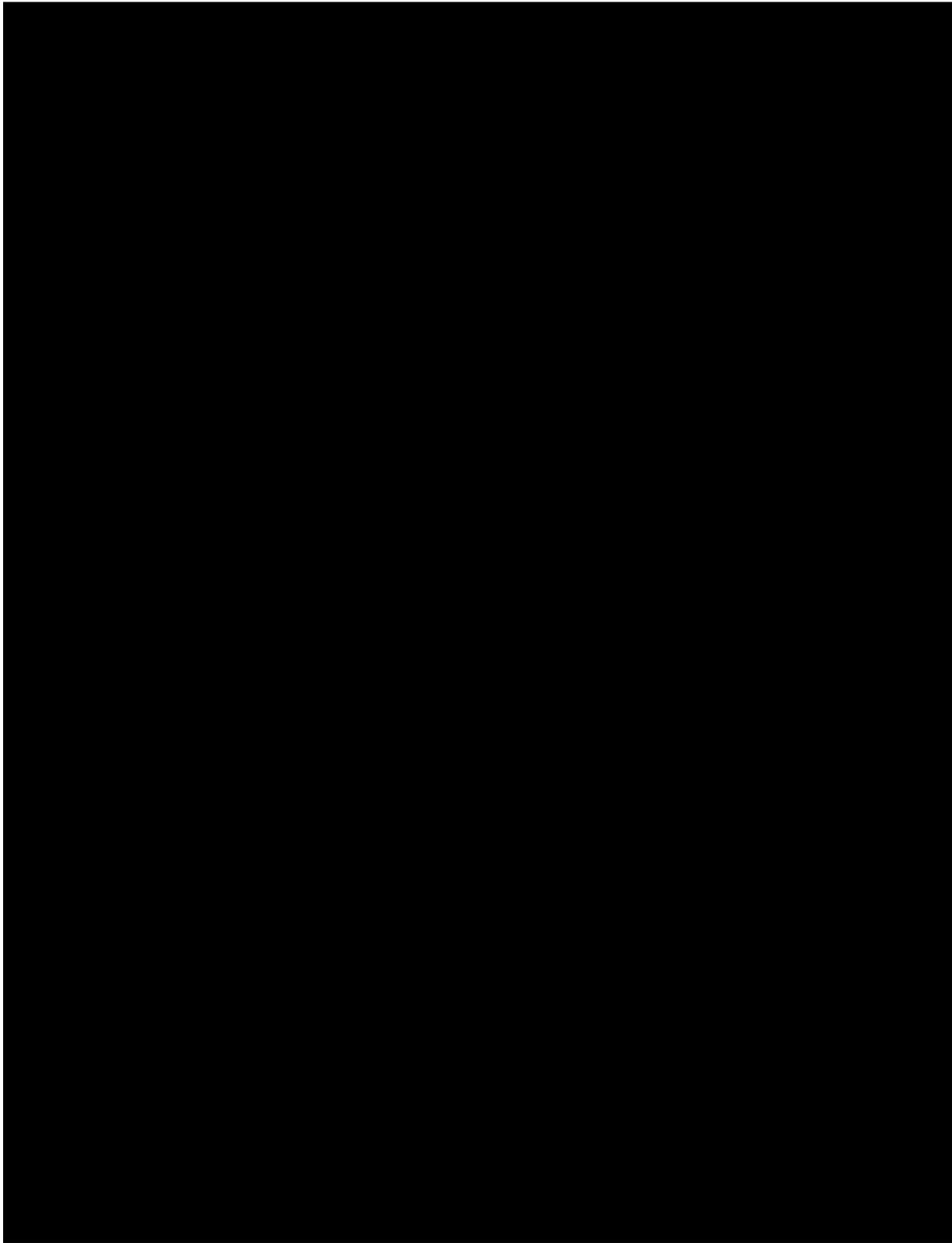
Given the myogenic potential of SMALD⁺/CD34⁻ population *in vitro*, we analyzed the initial ratio (termed predictor percentage, PP) of SMALD⁺/CD34⁻ cells over the whole SMALD⁺ cells contained in muscle biopsies ($n = 20$), and observed a positive correlation with the yield of long-term cultures of bulk dissociated muscle biopsies (*i.e.*, without any selection of populations) in myogenic conditions (Figure 4a). In nine of the biopsies the final number of CD56⁺ cells was greater than that of CD15⁺ cells, whereas in 11 of the biopsies the final yield of CD15⁺ cells was higher than that of CD56⁺ cells (Figure 4a). The PP presented farther median distribution values (33.8 % for the first group and 13.8% for the second group) which were significantly different

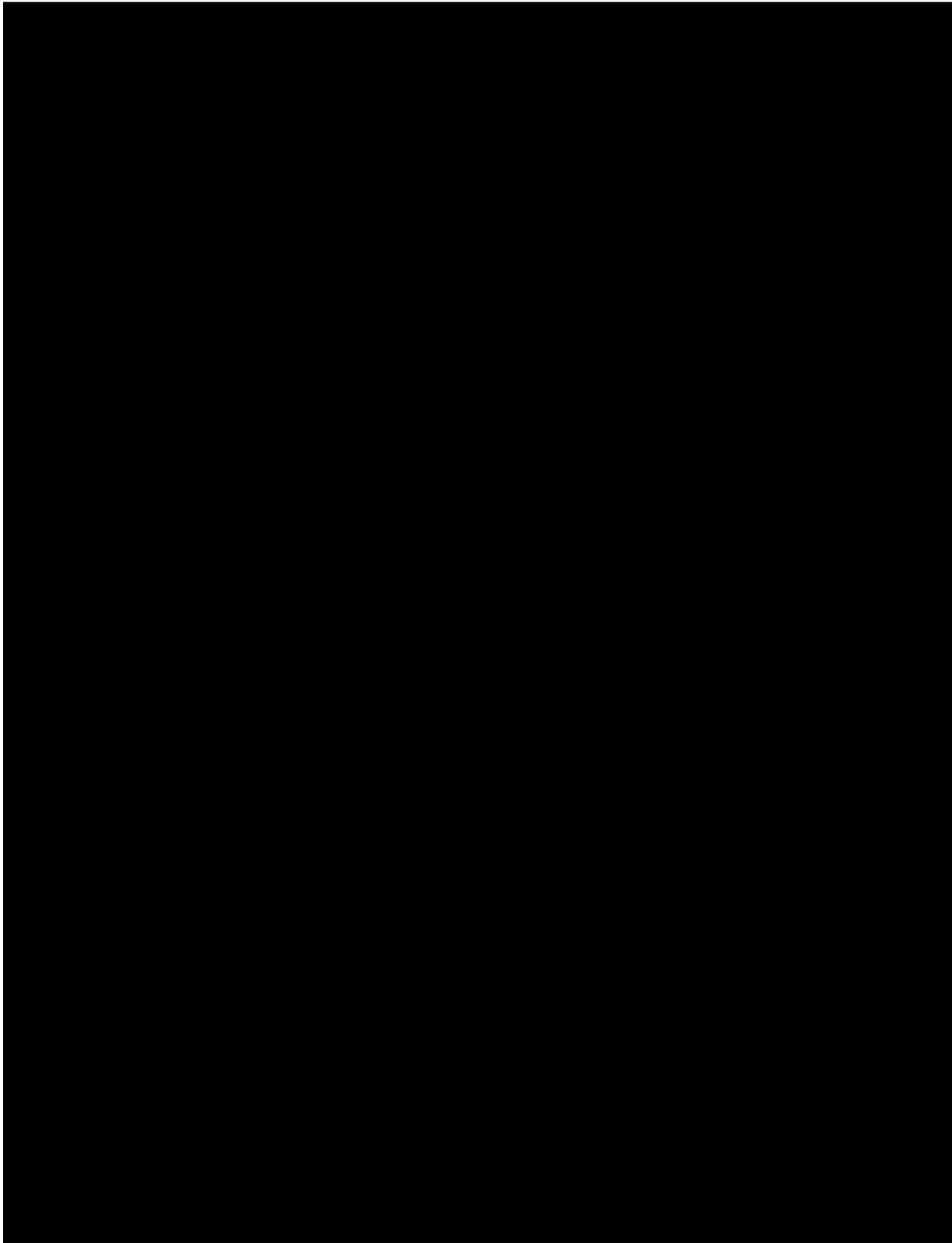


b

PP (%)	Outcome probability (%)	
	CD56 ⁺ > CD15 ⁺	CD56 ⁺ < CD15 ⁺
10	15	85
20	26	74
25.5	50	50
30	72	28
40	99	1
>40	100	0

Figure 4 Establishment and use of the predictor percentage (PP). (a) Initial fluorescence-activated cell sorting analysis of Aldefluor and CD34-allophycocyanin labeling on dissociated muscle cells ($n = 20$ biopsies) enabled calculation of PP value for each biopsy, before expansion in culture. Upon phenotyping (CD56, CD15), cultures were divided in two groups according to respective proportions of markers: [56⁺ > 15⁺] and [56⁺ < 15⁺]. In each group, biopsies (circles) were ranked as functions of their initial PP, with median PP indicated by black dash. The difference between groups was significant ($P < 0.01$). At the threshold PP value of 25.5% (dashed line) the outcome of a culture was equivalent regarding the yield in CD56⁺ and CD15⁺ cells. (b) Illustration of calculated outcome probabilities at established PP values. Below 25.5%, the probability is higher to produce more CD15⁺ cells than CD56⁺ cells. Above 25.5%, the probability is higher to produce more CD56⁺ cells.





such as Aldefluor offers several advantages: the methodology is independent of the strategy used for dissociation of the tissue and would not be sensitive to enzymatic surface digestion. It does not require cell permeabilization. Upon oxidation, the fluorescent probe is trapped inside the cells, thus allowing sorting of viable cells. Analysis and selection of the cells do not require the use of intercalating agents, nor light excitation in the ultraviolet range. The characterization relies robustly on a cellular function rather than on a membrane marker, whose turn-over may introduce biases as previously suggested.⁸ Finally, the reagent may be provided at clinical grade,¹⁰ and the methodology remains reliable using frozen and thawed stocks of dissociated cells, thus widening its usefulness in a clinical perspective.^{10,45}

CD34 labeling of dissociated muscle cells allowed a further refinement of the characterization of the SMALD⁺ populations. We then discriminated SMALD⁺/CD34⁺ and SMALD⁺/CD34⁻ cells. The muscle biopsy also contained SMALD⁻/CD34⁺ and SMALD⁻/CD34⁻ cells. These populations were clearly different, in terms of expression of extracellular markers of commitment, and of their potential to differentiate both *in vitro* and *in vivo*.

SMALD⁺ cells belong to two sub-populations with distinct phenotypal and functional characteristics

Although some markers, such as CD90, were expressed by all populations at different levels, others were restricted to a given population, suggesting a specific stage of commitment (CD31, CD44, CD45, CD56, CD105, CD140b). Based on these distributions and the classical functional attributions of these markers, SMALD⁺ cells would be devoid of already engaged endothelial (CD31), hematopoietic (CD45), and satellite (CD56) cells. Some SMALD⁺/CD34⁻ cells were enriched in CD44⁺ and CD105⁺ cells which are involved in cell adhesion, migration, and myogenesis.⁴⁶ Noteworthy, these populations were still heterogeneous. CD133, which is expressed by important fractions of ALDH^{br} cells from other sources, was not detected on SMALD⁺ cells. This absence may be the hallmark of muscle specificity, or due to the technical issue raised by labeling of enzymatically dissociated cells. Indeed, CD133 labeling is generally observed on nonadherent cells and its sensitivity to collagenase or trypsin treatments is unknown. However, at the present time, no enzyme-free methodology allows a rapid and complete dissociation of skeletal muscle tissue.

SMALD⁺/CD34⁺ cells presented some features of mesenchymal-like cells *in vitro* and *in vivo*. Upon culture these cells did not give rise to CD56⁺ cells, but mainly to a heterogeneous population of CD56⁻ cells, they were unable to form myotubes but differentiated into adipogenic or osteogenic-like cells (K. Vauchez and J.-T. Vilquin, unpublished results) in respective differentiation media. Upon intramuscular injection, sorted cells survived poorly, remained within the endomysial compartment, and did not participate to muscle regeneration.

Conversely, SMALD⁺/CD34⁻ cells proliferated rapidly in the myogenic proliferation medium used in this study and rapidly expressed CD56, the marker of satellite cells and myoblasts. Upon differentiation, these cells formed myotubes in myogenic medium, and osteoblastic-like cells in osteogenic medium (K. Vauchez and J.-T. Vilquin, unpublished results), however they did not produce adipocytes in adipogenic medium. Finally, sorted

SMALD⁺/CD34⁻ cells participated to muscle regeneration *in vivo* with high efficiency, as assessed by the presence of thousands of human nuclei within the SCID mouse muscle tissue, and the labeling of human COX2 protein inside muscle fibers. A small number of cells were observed in a putative satellite position; however, further experiments will be required to confirm their functionality, *e.g.*, submitting the injected muscles to repeated cycles of degeneration and regeneration and evaluating the contribution of injected cells to new rounds of regeneration *in vivo*. The number of human nuclei estimated at the time of sacrifice exceeded by two- to five-fold the number of injected cells, representing an indication that the number of cells had increased during the 1 month interval. This value may be largely underestimated because cell death or disappearance upon injection generally decreases the efficacy of cell transplantation. The mechanism, extent and timing of survival and/or proliferation cannot be assessed in this study, which was focused on initial and final time points dedicated to establish a first proof-of-concept, whereas survival and proliferation are generally considered as early occurrences after cell transplantation.

Comparison between SMALD⁺ cells and ALDH^{br} cells from other sources

The comparison between ALDH^{br} cells originating from hematopoietic compartments and skeletal muscle reveals differences in absolute and relative numbers, the nature and proportions of associated markers, and the lineage differentiation abilities of the different fractions. The frequency of SMALD⁺ cells is ~10–50 times that of ALDH^{br} cells in PB.¹⁶ Similar proportions of ALDH^{br} cells express CD34⁺ in muscle, PB and BM,^{7,15} and the proportion is slightly or significantly higher in UCB.^{6,11–13} SMALD⁺ cells differ from BM and UCB cells by the differential expression of CD45 and CD31. In the present study, CD45 was not expressed by SMALD⁺ cells, but only by a few SMALD⁻/CD34⁻ cells, although it labels 65 and 99% of BM and PB ALDH^{br} cells, respectively.^{7,11} Here also, CD31 was not expressed by SMALD⁺ cells, but only by SMALD⁻/CD34⁺ cells, whereas it labels 99% of UCB cells¹¹ and is depleted in BM ALDH^{br} fraction.⁷ SMALD⁺ resembles BM ALDH^{br} fraction regarding the expression of CD105 and CD90.⁷ SMALD⁺ cells do not express CD133, which is a hallmark of ALDH^{br} primitive hematopoietic progenitors detected in BM, UCB, and PB, although this marker may be cautiously interpreted in our labeling conditions as indicated above. Hematopoietic studies attributed the multilineage capacities to Lin⁻/ALDH^{br}/CD34⁺, Lin⁻/ALDH^{br}/CD133⁺, and/or Lin⁻/ALDH^{br}/CD34⁺/CD133⁺ cells, whereas no significant hematopoietic activity could be demonstrated in ALDH^{br}/CD34⁻ fractions selected from UCB and PB.^{9,13,15} In our hands, the ALDH^{br}/CD34⁻ fraction (*i.e.*, SMALD⁺/CD34⁻) presented the highest tissue-specific differentiation capacity (*i.e.*, myogenic in muscle). Taken together, these observations suggest that, in humans, ALDH^{br} populations from various sources may differ in composition and may have different functions. Interestingly, in rodents, a fraction of BM hematopoietic cells containing c-kit⁺ immature myelomonocytic precursors is able to contribute to muscle fiber formation after intramuscular injection.⁴⁷ However, the human counterpart of this murine population has not been characterized yet.

Comparison between SMALD⁺ cells and classical myogenic progenitors

The analysis of the PP ratio of SMALD⁺/CD34⁻ to SMALD⁺ cell content in muscle biopsies confers a predictive value as to the fate of long-term cultures in myogenic conditions. The use of such a predictive marker has been proposed in a retrospective study of hematopoiesis in humans, where the implantation yield depended on the ratio of ALDH^{br} cells versus the total CD34⁺ cells.⁸ Here, our *in vitro* results suggest a role played by SMALD⁺ cells in the production of myogenic cells, at least *in vitro*. Whether this ratio is of physiological relevance is unknown yet, as is the relationship between satellite cells and SMALD⁺/CD34⁻ cells *in vivo*. Further studies are necessary to correlate this prognostic feature to the anatomical origin of muscle, or to donor parameters.

On the basis of histological, phenotypical, and functional characterizations, our results reveal differences between SMALD⁺ cells and previously described muscle progenitors.²⁵ They first suggest that SMALD⁺ are not classical satellite cells because they are not located beneath the muscle fiber basal lamina and do not express CD56.²⁸ Moreover, satellite cells were identified within the ALDH-negative muscle-derived fractions. The so-called muscle SP cells are heterogeneous.⁴⁸ Overlaps between the SP- and ALDH-defined cell populations have been described in both BM- and UCB-derived cells within the CD34⁺ cell population.⁴⁹ In our hands, however, SMALD⁺/CD34⁺ and SMALD⁻/CD34⁺ fractions, which contain the CD34⁺ populations, do not undergo myogenic differentiation. Furthermore, SP cells classically require coculture with myoblasts to undergo myogenic specification,³¹ whereas SMALD⁺/CD34⁻ cells undergo rapid myogenic differentiation without coculture. Therefore, the SMALD⁺/CD34⁻ cell population would not correspond to the SP cells. A direct back-to-back comparison between SMALD⁺ and muscle SP cells will be mandated in future experiments. Human myoendothelial cells initially harbor CD31, CD34, CD56, CD144, and CD146 antigens.^{40,41} SMALD⁺ cells, either CD34⁺ or CD34⁻, do not express CD56 nor CD31 and are, therefore, unlikely to be myoendothelial cells. In the present study, cells sharing myoendothelial characteristics were observed in the SMALD⁻/CD34⁺ fraction upon sorting, but not in the SMALD⁺ fraction. The direct comparison between SMALD⁺ cells, human mesangioblasts, and pericytes, is made difficult due to methodological differences. Indeed, although SMALD⁺ cells are isolated without prior cultivation, muscle mesangioblasts/pericytes are classically obtained through cell culture.³⁴ Although freshly isolated SMALD⁺ cells did not share the pericytic characteristics, one cannot exclude that some particular sub-population of SMALD⁺ cells express the phenotype of pericytes when grown *in vitro*. Finally, a muscle cell population expressing CD34⁺/CD133⁺ has myogenic capacities and has been used in clinical trial.⁴² SMALD⁺ cells did not express CD133, with all proper reserves regarding this analysis cited above, and moreover SMALD⁺/CD34⁺ cells were unable to undergo myogenic differentiation. This suggests that SMALD⁺ cells would not be equivalent to the CD34⁺/CD133⁺ muscle progenitors.

Conclusion and perspectives

This study, to our knowledge, demonstrates for the first time the presence of two cell populations expressing high levels of ALDH within the human skeletal muscle tissue. The SMALD⁺/

CD34⁻ population presents the abilities to undergo myogenic differentiation *in vitro* and *in vivo*, thus adding a potential new player in the field of muscle homeostasis. However, the alternate differentiation capacities of the SMALD⁺/CD34⁺ and SMALD⁻/CD34⁻ populations along different lineages remain to be explored, and the relationship with ALDH^{br} cells of other tissues deserve further direct studies. Indeed, we recently identified ALDH^{br} populations within murine skeletal and cardiac muscle tissues (K. Vauchez and J.-T. Vilquin, unpublished results). In the medical field, correlations between clinical or physiopathological status of human donors and the presence of SMALD⁺ cells mandate large-scale studies. Finally, the myogenic properties of SMALD⁺/CD34⁻ progenitors suggest their potential for the treatment of muscle diseases.

MATERIALS AND METHODS

Human muscle biopsies. Frozen and fresh human muscle biopsies were obtained for immunohistological analysis and cell extraction, respectively, in agreement with the French Regulatory Health Authorities and our Ethics Committee via the Tissue Bank for Research of the French Association against Myopathies. These were 0.3–4 g *res nullus* specimen from orthopaedic surgery. The patients were free of muscular pathologies.

ALDH characterization by immunohistochemistry. Seven micrometer cryostat sections were fixed (cold acetone, 10 minutes, -20°C), permeabilized [0.03% triton in phosphate-buffered saline, 10 minutes, room temperature (RT)] and nonspecific labeling was blocked [10% defined fetal bovine serum (Hyclone-Perbio, Brebieres, France) in phosphate-buffered saline, 30 minutes, RT]. Human ALDH1 was labeled using anti-ALDH1 mouse monoclonal Ab (mAb) (1/50, overnight, 4°C, Becton-Dickinson, Le Pont de Claix, France) followed by goat anti-mouse immunoglobulin G (IgG) Ab (Alexa fluor 568, 1/1,000, 1 hour, RT, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Then, sections were incubated with a rabbit polyclonal anti-laminin Ab (1/200, 1 hour, RT, Abcam, Cambridge, UK), followed by goat anti-rabbit IgG Ab (Alexa fluor 488, 1/1,000, 1 hour, RT, Invitrogen) to delineate skeletal muscle fibers. Nuclei were labeled with 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) in mounting medium (Vectashield hard set + DAPI, AbCys, Paris, France). Negative controls were obtained by omitting primary Ab. Fluorescence imaging was assessed using Zeiss microscope and pictures captured using a Sony CCD cooled camera (Roper Scientific, Evry, France). The images were combined using Metamorph software and assembled under Adobe Photoshop.

Muscle processing. Fresh muscle fragments were minced and digested using collagenase (Liberase, 1 hour, 37°C, Roche, Meylan, France), then trypsin-EDTA (0.25%, Hyclone-Perbio, 20 minutes, 37°C) as described.⁵⁰ Following filtration through 100 then 40 µm cell strainers (Becton-Dickinson), cells were counted under haemocytometer, and either used directly or frozen for later use.⁵⁰

Flow cytometry phenotyping and sorting. Red cells were depleted from initial fresh bulk using lysis buffer (5 minutes, Beckman Coulter, Roissy, France). Cells were incubated in Aldefluor assay buffer containing the ALDH substrate (1 µmol/l, 20 minutes, 37°C, Stemcell Technologies, Grenoble, France). Controls were obtained by prior incubation of cells with 50 mmol/l of the specific ALDH inhibitor diethylaminobenzaldehyde. Extracellular markers were detected by incubations with allophycocyanin (CD34, Becton-Dickinson), or PE (CD31, CD44, CD45, CD56, CD90, CD105, CD106, CD140b, CD146 from Becton-Dickinson; CD133 from Miltenyi Biotec, Paris, France) -conjugated mAb (1/20, 15 minutes, 4°C). Cells were centrifuged, suspended in Aldefluor kit buffer, and analyzed by flow cytometry (FacsCalibur, Becton-Dickinson) using the

Cell Quest Software (10⁴ events analyzed). Populations were sorted using a Vantage SE DiVA cell sorter on the basis of both ALDH activity and expression of CD34.

Cell culture. Unsorted and sorted cells were seeded and expanded in the proliferation medium containing 80% modified custom-made MCDB medium (Hyclone), 20% defined fetal bovine serum, Gentamicin (50 µg/ml, Panpharma, Fougères, France), 10 ng/ml human recombinant bFGF (R&D systems, Lille, France), 10⁻⁶ mol/l dexamethasone (Merck, Clermont-Ferrand, France). The medium was changed on the following day. The cultures were grown for 7 to 14 days to reach 60% confluence, then cells were harvested by trypsinization and further expanded before reaching 80% confluence for two or three passages. An aliquot was analyzed as above for expression of CD56, CD34 and CD15 (Becton-Dickinson). An aliquot was seeded for differentiation studies (see below). In view of cell transplantation studies, a batch of myoblasts was prepared from unsorted cells as above.

Cytofluorescence studies of SMALD⁺ populations. Upon dissociation and sorting, 500 SMALD⁺/CD34⁺ or SMALD⁺/CD34⁻ cells were seeded in 24-well dishes, and observed 18 hour or 6 day thereafter. Cells were incubated with anti-CD15, CD34, CD44, CD56, CD146 Ab (1/20, 30 minutes, RT, Becton-Dickinson) in culture medium, followed by goat anti-mouse IgM (CD15 analysis) or IgG Abs (all other CDs; Alexa fluor 568, 1/200, 20 minutes, RT). Cells were rinsed in Aldefluor kit buffer and incubated in Aldefluor substrate (20 minutes, 37°C) supplemented with DAPI (30 µg/ml, Sigma, L'Isle d'Abeau, France), then rinsed in buffer and observed immediately using a fluorescence Olympus IX10 inverted microscope. Controls were obtained by omission of the primary antibodies. Captured images (Sony CCD cooled camera) were treated and assembled using Metaview and Photoshop softwares, respectively.

Prognostic value of SMALD⁺/CD34⁻ versus total SMALD⁺ cells in culture. Initial flow cytometry analysis of Aldefluor and CD34-allophycocyanin labeling on dissociated muscle cells (*n* = 20 biopsies) enabled calculation of PP (percentage of SMALD⁺/CD34⁻ cell number in the total SMALD⁺ cell number, PP) for each biopsy, which then underwent expansion in culture. Then, cultures were phenotyped (CD56, CD15) and divided into two groups according to respective proportions of markers: [56⁺ > 15⁺] and [56⁺ < 15⁺]. After ensuring that values of both groups were distributed according normal laws, we performed extrapolation of these distributions and determined the threshold value when both groups [56⁺ > 15⁺] and [56⁺ < 15⁺] presented equal probability according to Bayes law.

In vitro differentiation assays. Both sub-populations were subjected to both myogenic and adipogenic differentiation conditions in culture.

Myogenesis: Fifty thousand expanded cells were seeded into 12-wells plates. Differentiation was induced 24 hour later using Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) supplemented with 10% Horse serum (AbCys). Four to five days later, cells were permeabilized (methanol -20°C, 10 minutes). The expression of fast myosin heavy-chain in differentiated myotubes was assessed using antifast myosin heavy-chain mAb (clone MY32, 1/400, 1 hour, RT, Sigma) followed by goat anti-mouse IgG Ab (Alexa Fluor 568, 1/1,000, 1 hour, RT). The nuclei were labeled with DAPI in mounting medium (Vectashield + DAPI, AbCys).

Adipogenesis: Hundred thousand expanded cells were seeded into 6-well plates. Differentiation was induced 48 hour later using Dulbecco's modified Eagle's medium (1 g/l glucose; Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum, 0.5 mmol/l isobutyl-methylxanthine (Sigma), 60 µmol/l indomethacin (Sigma), 10⁻⁶ mol/l dexamethasone (Merck) and 5 µg/ml insulin (Sigma). The medium was replaced every 3–4 days for 21 days. Cells were fixed in Baker buffer and incubated in Oil Red reagent (15 minutes, 37°C), rinsed, counter-stained with hematein and mounted. The cells containing lipid vacuoles were photographed under phase contrast.

In vivo muscle pretreatment and cell transplantation. All the procedures were conducted according to the Guide for the Care and Use of Laboratory animals (DHAW publication no. 85-23 Office of Science and Health Reports, DRR/NIH, Bethesda MD 20892), and under anesthesia (80 mg/kg Ketamine, 16 mg/kg Xylazine). *Tibialis anterior* muscles of two-month-old female SCID mice (Charles River, L'Arbresle, France) received 18 Gy cobalt irradiation,⁴⁴ followed by the injection of notexin (5 ng, Sigma), respectively 2–4 day and 1 day before cell implantation. Freshly sorted human cells or long-term myoblast culture at third passage were counted, suspended in phosphate-buffered saline containing 0.5% BSA (Sigma) and kept on ice until transplantation. Cells (numbers indicated in Table 2) were injected in 8–10 sites under 10 µl using a custom-made glass needle.

Analysis and quantification of cell implantation in vivo. The animals were killed 4 weeks after transplantation. Cryostat sections (7 µm) were performed throughout whole muscles, from tendon to tendon, in order to ensure a complete overview of human cells distribution. Implantation of human cells in host muscles was evaluated by species-specific labeling of the human proteins lamin A/C and COX2, whereas laminin staining delineated the muscle fibers basal lamina, and dystrophin staining delineated the inner membrane of muscle fibers. Sections were incubated with rabbit polyclonal anti-COX2 Ab (1/1,000, 1 hour, RT, kind gift of Dr. Anne Lombès; Figure 5) or antidystrophin IgG1 mAb (clone NCLDys2, 1/20, 1 hour, RT, NovoCastra Laboratories; Figure 6) followed by goat anti-rabbit IgG Ab (Alexa Fluor 488, 1/1,000, 1 hour, RT) or by goat anti-mouse IgG1 Ab (Alexa Fluor 488, 1/300, 1 hour, RT) respectively. After washings, sections were incubated with antihuman lamin A/C IgG2b mAb (1/100, 1 hour, RT, AbCys), followed by goat anti-mouse IgG2b Ab (Alexa Fluor 568, 1/300, 1 hour, RT). Then, sections were incubated with rabbit polyclonal anti-laminin Ab (1/200, 1 hour, RT) followed by goat anti-rabbit IgG Ab (Alexa Fluor 350, 1/500, 1 hour, RT). Slides were mounted in Moviol. Negative controls were obtained by omitting primary Ab. Image captures were performed as above.

Eight to ten representative sections were selected at regular intervals from proximal to distal tendon to count the numbers of human nuclei located outside or inside muscle fibers (×25 magnification). Then inferred number of human nuclei (IN), percentage of nuclei included in muscular fibers (%NIF), and ratio of IN on initial number of injected cells (RNC) were calculated as described below:

$$IN = \frac{\text{Number of nuclei} \times \text{muscle length}}{\text{Number of sections} \times \text{section width}}$$

$$\%NIF = \frac{\text{Number of human nuclei inside fibers}}{\text{Total number of human nuclei}} \times 100$$

$$RNC = \frac{IN}{\text{Initial number of injected cells}}$$

ACKNOWLEDGMENTS

K.V. was sponsored as a doctoral student by Genzyme SAS and the French Health and Research Institute INSERM. Patricia Khattar and Cyril Catelain were supported by a grant from the Leducq Foundation (CaPTAA Network). This work was supported in part by the Association Française contre les Myopathies (AFM). We thank Maud Chappart and Stéphane Vasseur from the Tissue Bank for Research (BTR) of the AFM for providing muscle specimen, and Anne Lombès (INSERM) for the kind gift of polyclonal anti-COX2 Ab. We thank Gillian Butler-Browne (INSERM) for carefully improving the manuscript. We also thank Bruno Dalle (Myosix SA), Pascale Guicheney (INSERM), Philippe Menasché and Agathe Seguin (both from INSERM—Assistance Publique Hôpitaux de Paris), and Frédéric Chéreau (Genzyme SAS) for technical helps,

discussions and advices. J.-T.V. and J.-P.M. are involved in the French biotechnology company, Myosix SA, in which they have participation as initial founders. However, J.-T.V. and J.-P.M. did not receive any fees in relation to this study and have no consultancy practice. The cell culture methodology developed by Myosix SA was used freely. This work is now patent pending.

REFERENCES

- Sophos, NA and Vasilou, V (2003). Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2002 update. *Chem Biol Interact* **143-144**: 5–22.
- Yoshida, A, Rzhetsky, A, Hsu, LC and Chang, C (1998). Human aldehyde dehydrogenase gene family. *Eur J Biochem* **251**: 549–557.
- Kastan, MB, Schläpfer, E, Russo, JE, Colvin, OM, Chin, CI and Hilton, J (1990). Direct demonstration of elevated aldehyde dehydrogenase in human hematopoietic progenitor cells. *Blood* **75**: 1947–1950.
- Hilton, J (1984). Role of aldehyde dehydrogenase in cyclophosphamide-resistant L1210 leukemia. *Cancer Res* **44**: 5156–5160.
- Jones, RJ, Barber, JP, Vala, MS, Collector, MJ, Kaufmann, SH, Ludeman, SM *et al.* (1995). Assessment of aldehyde dehydrogenase in viable cells. *Blood* **85**: 2742–2746.
- Christ, O, Lucke, K, Imren, S, Leung, K, Hamilton, M, Eaves, A *et al.* (2007). Improved purification of hematopoietic stem cells based on their elevated aldehyde dehydrogenase activity. *Haematologica* **92**: 1165–1172.
- Gentry, T, Foster, S, Winstead, L, Deibert, E, Fioridalisi, M and Balber, A (2007). Simultaneous isolation of human BM hematopoietic, endothelial and mesenchymal progenitor cells by flow sorting based on aldehyde dehydrogenase activity: implications for cell therapy. *Cytotherapy* **9**: 259–274.
- Lioznov, MV, Freiburger, P, Kröger, N, Zander, AR and Fehse, B (2005). Aldehyde dehydrogenase activity as a marker for the quality of hematopoietic stem cell transplants. *Bone Marrow Transplant* **33**: 909–914.
- Storns, RW, Trujillo, AP, Springer, JB, Shah, L, Colvin, OM, Ludeman, SM *et al.* (1999). Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 9118–9123.
- Gentry, T, Deibert, E, Foster, SJ, Haley, R, Kurtzberg, J and Balber, AE (2007). Isolation of early hematopoietic cells, including megakaryocyte progenitors, in the ALDH-bright cell population of cryopreserved, banked UC blood. *Cytotherapy* **9**: 569–576.
- Hess, DA, Meyerrose, TE, Wirthlin, L, Craft, TP, Herrbrich, PE, Creer, MH *et al.* (2004). Functional characterization of highly purified human hematopoietic repopulating cells isolated according to aldehyde dehydrogenase activity. *Blood* **104**: 1648–1655.
- Hess, DA, Wirthlin, L, Craft, TP, Herrbrich, PE, Hohm, SA, Lahey, R *et al.* (2006). Selection based on CD133 and high aldehyde dehydrogenase activity isolates long-term reconstituting human hematopoietic stem cells. *Blood* **107**: 2162–2169.
- Storns, RW, Green, PD, Safford, KM, Niedzwiecki, D, Cogle, CR, Colvin, OM *et al.* (2005). Distinct hematopoietic progenitor compartments are delineated by the expression of aldehyde dehydrogenase and CD34. *Blood* **106**: 95–102.
- Mirabelli, P, Di Noto, R, Lo Pardo, C, Morabito, P, Abate, G, Gorrese, M *et al.* (2008). Extended flow cytometry characterization of normal bone marrow progenitor cells by simultaneous detection of aldehyde dehydrogenase and early hematopoietic antigens: implication for erythroid differentiation studies. *BMC Physiol* **8**: 13.
- Fallon, P, Gentry, T, Balber, AE, Boulyvare, D, Jansen, WF, Smilke, R *et al.* (2003). Mobilized peripheral blood SSCloALDH⁺ cells have the phenotypic and functional properties of primitive hematopoietic cells and their number correlates with engraftment following autologous transplantation. *Br J Haematol* **122**: 99–108.
- Povsic, TJ, Zavadni, KL, Kelly, FL, Zhu, S, Goldschmidt-Clermont, PJ, Dong, C *et al.* (2007). Circulating progenitor cells can be reliably identified on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *J Am Coll Cardiol* **50**: 2243–2248.
- Nagano, M, Yamashita, T, Hamada, H, Ohneda, K, Kimura, K, Nakagawa, T *et al.* (2007). Identification of functional endothelial progenitor cells suitable for the treatment of ischemic tissue using human umbilical cord blood. *Blood* **110**: 151–160.
- Mitchell, JB, McIntosh, K, Zvonick, S, Garrett, S, Floyd, ZE, Kloster, A *et al.* (2006). Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells* **24**: 376–385.
- Gnestier, C, Hur, MH, Charafe-Jauffret, E, Monville, F, Dutcher, J, Brown, M *et al.* (2007). ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* **1**: 555–567.
- Huang, EH, Hynes, MJ, Zhang, MJ, Gnestier, C, Dontu, G, Appelman, H *et al.* (2009). Aldehyde dehydrogenase 1 as a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res* **69**: 3382–3389.
- Corti, S, Locatelli, F, Papadimitriou, D, Donadoni, C, Salani, S, Del Bo, R *et al.* (2006). Identification of a primitive brain-derived neural stem cell population based on aldehyde dehydrogenase activity. *Stem Cells* **24**: 975–985.
- Zhou, P, Hohm, S, Olsunaya, Y, Hess, DA and Nolte, J (2009). Human progenitor cells with high aldehyde dehydrogenase activity efficiently engraft into damaged liver in a novel model. *Hepatology* **49**: 1992–2000.
- Capocotta, BJ, Robson, DL, Levac, KD, Maxwell, DJ, Hohm, SA, Neelamkavil, MJ *et al.* (2009). Revascularization of ischemic limbs after transplantation of human bone marrow cells with high aldehyde dehydrogenase activity. *Blood* **113**: 5340–5351.
- Kuang, S, Kuroda, K, Le Grand, F and Rudnicki, MA (2007). Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell* **129**: 999–1010.
- Péault, B, Rudnicki, M, Torrente, Y, Cossu, G, Tremblay, JP, Partridge, T *et al.* (2007). Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy. *Mol Ther* **15**: 867–877.
- Wagers, AJ and Conboy, IM (2005). Cellular and molecular signatures of muscle regeneration: current concepts and controversies in adult myogenesis. *Cell* **122**: 659–667.
- Mauro, A (1961). Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* **9**: 493–495.
- Reimann, J, Brimah, K, Schröder, R, Wernig, A, Beauchamp, JR and Partridge, TA (2004). Pax7 distribution in human skeletal muscle biopsies and myogenic tissue cultures. *Cell Tissue Res* **315**: 233–242.
- Collins, CA, Olsen, I, Zammit, PS, Heslop, L, Petrie, A, Partridge, TA *et al.* (2005). Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell* **122**: 289–301.
- Sampaolesi, M, Blot, S, D'Antona, G, Granger, N, Tonlorenzi, R, Innocenzi, A *et al.* (2006). Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature* **444**: 574–579.
- Asakura, A, Seale, P, Girgis-Gabardo, A and Rudnicki, MA (2002). Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J Cell Biol* **159**: 123–134.
- Camargo, FD, Green, R, Capetanaki, Y, Jackson, KA, Goodell, MA and Capetanaki, Y (2003). Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates. *Nat Med* **9**: 1520–1527.
- Ferrari, G, Cusella-De Angelis, G, Coletta, M, Paolucci, E, Stornaiuolo, A, Cossu, G *et al.* (1998). Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* **279**: 1528–1530.
- Dellavalle, A, Sampaolesi, M, Tonlorenzi, R, Tagliaro, E, Sacchetti, B, Perani, L *et al.* (2007). Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat Cell Biol* **9**: 255–267.
- Levy, MM, Joyner, CJ, Viridi, AS, Reed, A, Triffitt, JT, Simpson, AH *et al.* (2001). Osteoprogenitor cells of mature human skeletal muscle tissue: an *in vitro* study. *Bone* **29**: 317–322.
- Mastrogiacomo, M, Derubeis, AR and Cancedda, R (2005). Bone and cartilage formation by skeletal muscle derived cells. *J Cell Physiol* **204**: 594–603.
- Crisan, M, Yap, S, Castella, L, Chen, CW, Corselli, M, Park, TS *et al.* (2008). A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* **3**: 301–313.
- Young, HE, Steele, TA, Bray, RA, Hudson, J, Floyd, JA, Hawkins, K *et al.* (2001). Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat Rec* **264**: 51–62.
- Williams, JT, Sutherland, SS, Souza, J, Calcutt, AF and Cartledge, RG (1999). Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. *Am Surg* **65**: 22–26.
- Cerletti, M, Molloy, MJ, Tomczak, KK, Yoon, S, Ramoni, MF, Kho, AT *et al.* (2006). Melanoma cell adhesion molecule is a novel marker for human fetal myogenic cells and affects myoblast fusion. *J Cell Sci* **119**(Pt 15): 3117–3127.
- Zheng, B, Cao, B, Crisan, M, Sun, B, Li, G, Logar, A *et al.* (2007). Prospective identification of myogenic endothelial cells in human skeletal muscle. *Nat Biotechnol* **25**: 1025–1034.
- Torrente, Y, Belicchi, M, Marchesi, C, Dantonà, G, Cogliamian, F, Pibati, F *et al.* (2007). Autologous transplantation of muscle-derived CD133⁺ stem cells in Duchenne muscle patients. *Cell Transplant* **16**: 563–577.
- Crisan, M, Castella, L, Lehr, L, Carmona, M, Paoloni-Giacobino, A, Yap, S *et al.* (2008). A reservoir of brown adipocyte progenitors in human skeletal muscle. *Stem Cells* **26**: 2425–2433.
- Huard, J, Verreault, S, Roy, R, Tremblay, M and Tremblay, JP (1994). High efficiency of muscle regeneration after human myoblast clone transplantation in SCID mice. *J Clin Invest* **93**: 586–599.
- Pearce, DJ, Taussig, D, Simpson, C, Allen, K, Rohatiner, AZ, Lister, TA *et al.* (2005). Characterization of cells with a high aldehyde dehydrogenase activity from cord blood and acute myeloid leukemia samples. *Stem Cells* **23**: 752–760.
- Mylona, E, Jones, KA, Mills, ST and Pavlath, GK (2006). CD44 regulates myoblast migration and differentiation. *J Cell Physiol* **209**: 314–321.
- Doyonnas, R, LaBarge, MA, Sacco, A, Charlton, C and Blau, HM (2004). Hematopoietic contribution to skeletal muscle regeneration by myelomonocytic precursors. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 13507–13512.
- Uezumi, A, Ojima, K, Fukada, S, Ikemoto, M, Masuda, S, Miyagoe-Suzuki, Y *et al.* (2006). Functional heterogeneity of side population cells in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* **341**: 864–873.
- Pearce, DJ and Bonnet, D (2007). The combined use of Hoechst efflux ability and aldehyde dehydrogenase activity to identify murine and human hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* **35**: 1437–1446.
- Vilquin, JT, Marolleau, JP, Sacconi, S, Garcin, I, Lacasagne, MN, Robert, I *et al.* (2005). Normal growth and regenerating ability of myoblasts from unaffected muscles of facioscapulohumeral muscular dystrophy patients. *Gene Ther* **12**: 1651–1662.