

Table des matières

Listes des figures et tableaux.....	12
Abréviations	14
Avant-propos	16
Introduction	19
1. Le système musculaire des mammifères	19
11. Les muscles striés squelettiques.....	19
111. La formation des muscles striés squelettiques.....	19
112. L'anatomie et le fonctionnement des muscles striés squelettiques.....	25
113. La régénération des muscles striés squelettiques.....	31
114. Le vieillissement des muscles striés squelettique	36
115. Les dystrophies musculaires.....	41
116. Les modèles animaux de la DMD	46
117. Les traitements de la DMD.....	48
12. Les muscles cardiaques	53
121. La description macro- et microscopique des muscles striés cardiaques	53
122. Le couplage excitation/contraction des muscles cardiaques.....	55
13. Les muscles lisses	56
2. La thérapie cellulaire	57
21. Les cellules progénitricesmyogéniques.....	57
211. Les cellules souches musculaires (cellules satellites).....	57
212. Les autres progéniteurs musculaires	60
22. Les essais et limites de la thérapie cellulaire de la DMD.....	65
221. L'utilisation de myoblastes pour des essais thérapeutiques.....	67
222. L'utilisation de cellules CD133 pour des essais thérapeutiques.....	70
223. Les pistes pour améliorer la thérapie cellulaire	70
23. Les marqueurs de cellules myogéniques.....	71
231. Les marqueurs nucléaires	73
232. Les marqueurs transmembranaires	73
3. La superfamille des Aldéhydes déshydrogénases (ALDH)	82
31. L' utilisation de l'activité ALDH pour identifier des progéniteurs	83
311. La structure et le mécanisme d'action des ALDH.....	83
312. L'utilisation de l'activité ALDH pour isoler des cellules progéniteurs.....	85
313. La mise au point d'un substrat.....	85
32. La nomenclature.....	86
321. La famille des ALDH1	86
322. La famille des ALDH2	88
323. La famille des ALDH3	90
324. La famille des ALDH4	91
325. La famille des ALDH5	92

326. La famille des ALDH6	92
327. La famille des ALDH7	93
328. La famille des ALDH8	93
329. La famille des ALDH9	93
3221. La famille des ALDH16	94
3222. La famille des ALDH18	94
33. Les fonctions des ALDH.....	96
331. Les fonctions catalytiques particulières.....	96
332. Les principales fonctions non-catalytiques.....	98
34. Les cellules ALDH^{Br} dans les différents tissus	99
341. Les cellules ALDH dans les tissus hématopoïétiques	99
342. Les cellules ALDH dans le cancer	101
343. Les cellules ALDH dans les autres tissus	102
334. Les cellules ALDH dans les muscles squelettiques.....	103
Etude 1.....	106
Expériences complémentaires	162
Discussion	168
Références bibliographiques	181
Annexes.....	220

Listes des figures et tableaux

Figures

Figure 1 : Développement des muscles squelettiques des membres	20
Figure 2 : Schéma d'expression des facteurs de transcription impliqués dans la myogenèse.....	23
Figure 3 : Schéma simplifié d'une coupe transversale d'un muscle strié squelettique	25
Figure 4 : Ultrastructure d'un sarcomère.....	26
Figure 5 : Implication des macrophages dans la régénération et la fibrose musculaire	33
Figure 6 : Relation entre les cellules des vaisseaux sanguins et les cellules satellites au cours de la régénération musculaire	35
Figure 7 : Voies de signalisation majeures impliquées dans la régulation de la taille des fibres musculaires.....	38
Figure 8 : Domaines de la dystrophine et complexe glycoprotéine-dystrophine (CGD)	43
Figure 9 : Histologie d'un muscle dystrophique humain	44
Figure 10 : locus 4q35 du chromosome 4 impliqué dans le DMFSH	46
Figure 11 : Stratégies de thérapie génique	51
Figure 12 : Stratgies d'oligonucléotides anti-sens dans la Souris mdx	52
Figure 13 : Stratégie de translocation des codons stop prématurés	53
Figure 14 : Organisation des couches concentriques du muscle cardiaque.....	54
Figure 15 : Etapes de la progression de la contraction cardiaque et composantes correspondantes sur un électrocardiogramme	55
Figure 16 : Potentiels de différenciation des cellules souches	58
Figure 17 : localisation des cellules satellites dans leur niche au sein du muscle squeletique.....	60
Figure 18 : Différents contextes immunologiques de greffes de cellules.....	66
Figure 19 : Principes de la transplantation intramusculaire de myoblastes.....	68
Figure 20 : marqueurs de cellules souches musculaires	72
Figure 21 : Architecture moléculaire des isoenzymes d'ALDH	84
Figure 22 : Réaction catalysées par les ALDH à cofacteurs NAD(P0)H.....	84
Figure 23 : Métabolisme de l'alcool (éthanol)	89
Figure 24 : Pathologies dans lesquelles l'activation de l'ALDH2 pourrait être bénéfique	90
Figure 25 : Régulation et fonctions des ALDH dans les cellules souches normales ou cancéreuses....	98
Figure 26 : Principales fonctions catalytiques et non-catalytiques des ALDH	99
Figure 27 : Caractérisation des cellules ALDH positives musculaires par cytométrie de flux et capacité de régénération	104

Figure 28 : Caractérisation des cellules ALDH+ dans les muscles de quadriceps et de diaphragme de souris contrôles et mdx.....	163
Figure 29 : Caractérisation des cellules ALDH+ dans les muscles cardiaques de souris contrôles et mdx	164
Figure 30 : Evolution des cellules ALDH au cours de la régénération	166
Figure 31 : Evolution des niveaux d'ARNm au cours de la régénération musculaire	167
Figure 32 : Effets de molécules pharmacologiques sur la prolifération cellulaire des cellules myogéniques.....	167

Tableaux

Tableau 1 : Marqueurs pour isoler les cellules satellites au sein du muscle squelettique	72
Tableau 2 : Comparaison du nombre de gènes ALDH retrouvés dans différentes espèces eucaryotes	82
Tableau 3 : Caractéristiques principales des 19 isoenzymes d'ALDH humaines	95

Abréviations

4-HNE : 4-hydroxynonenal

ACh : acétylcholine / AChR : acetylcholine receptor

ADN : acide désoxyribonucléique

AFM : Association Française contre les Myopathies

ALDF : aldéfluor

ALDH : aldéhyde déhydrogénase

AR : acide rétinoïque

ARN : acide ribonucléique / ARNm : ARN messenger

ATP : adénosine triphosphate

ATRA : all-trans-retinoic acid

bHLH : basic helix-loop-helix

CD : groupe de différenciation (cluster of differentiation)

CCL12 : chemokine (C-C motif) ligand 12 / CCL17 : chemokine (C-C motif) ligand 17

CK : créatine kinase

c-met : récepteur du facteur de croissance des hépatocytes (HGF)

CRBP : protéine de liaison du rétinol (cellular retinol binding protein)

CSC : cellules souches cancéreuses

CSH : cellules souches hématopoïétiques

CSN : cellules souches neurales

CTGF : facteur de croissance du tissu conjonctif (connective tissue growth factor)

CRISPR : clustered regulatory interspaced short palindromic repeats

CXCR4 : C-X-C chemokine receptor type 4 (CD184)

DAPC : complexe de protéines associées à la dystrophine (dystrophin glycoprotein complex)

DHPR : récepteur de la dihydropyridine (dihydropyridin receptor)

DMB : dystrophie musculaire de Becker

DMD : dystrophie musculaire de Duchenne

DMFSH : dystrophie musculaire facio-scapulo-humérale

DMOP : dystrophie musculaire oculopharyngée

Eya1 : eyes-absent 1 / Eya2 : eyes-absent 2

FACS : tri cellulaire basé sur la fluorescence (Fluorescence-activated cell sorting)

FGF : facteur de croissance des fibroblastes fibroblast

GABA : acide γ -aminobutyrique

GRMD : dystrophie musculaire du chien Labrador (Golden retriever muscular dystrophy)

HGF : facteur de croissance des hépatocytes (hepatocyte growth factor)

HSP : protéine de choc thermique (heat shock protein)

IFN : interféron

IGF : facteur de croissance semblable à l'insuline (insulin-like growth factor)

IL : interleukine

IM : intramusculaire

kDa : kilodalton

MAPK : protéine-kinase activée par un mitogène (mitogen-activated protein kinase)

MEC : matrice extracellulaire

Mdx : dystrophie musculaire liée au chromosome X (muscle dystrophy X-linked)

MMP : métalloprotéinase

MRF4 : facteur de régulation de la myogénèse n°4 (myogenic regulatory factor 4)

MSC : cellule souche mésenchymateuse (mesenchymal stem cell)

MSDH : méthylmalonate semialdéhyde déshydrogénase

Myf5 : facteur de régulation de la myogénèse n°4 (myogenic factor 5)
MyoD : facteur de différenciation myogénique (myogenic differentiation)
MRF : facteur de régulation de la myogénèse (myogenic regulator factor)
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
N-CAM : molécule d'adhésion de cellule neurale (neural cell adhesion molecule, CD56)
nNos : syntyhase neuronale d'oxyde nitrique (neuronal nitric oxide synthase)
NO : nitric oxide / oxyde nitrique
Pax3 : paired-homeobox 3
Pax7 : paired-homeobox 7
PECAM 1 : molécule endothéliale d'adhésion des plaquettes (platelet endothelial cell adhesion molecule 1, CD31)
qPCR : réaction quantitative et en chaîne de la polymérase
PDGF : facteur de croissance dérivé des plaquettes (platelet-derived growth factor)
RBP 4 : protéine N°4 de liaison du rétinol (retinol binding protein 4)
ROS : molécule oxygénée réactive (reactive oxygen species)
RT-qPCR : reverse-transcription suivie d'une qPCR
RyR : récepteur de la ryanodine (ryanodin receptor)
Six1: sine oculis homeobox 1 / six 4 : sine oculis homeobox 4
Sdf1 : facteur N°1 dérivé des cellules stromales (stromal cell-derived factor 1)
SOD : superoxyde dismutase
SP : population marginale (side population)
SSADH : succinate semialdéhyde déshydrogénase
STRA 6 : protéine stimulée par l'acide rétinoïque (stimulated by retinoic acid 6)
TFL : tenseur du Fascia Lata
TGFβ : facteur de croissance transformant (transforming growth factor)
TNF : facteur nécrosant des tumeurs (tumor necrosis factor)
VCAM 1 : molécule d'adhésion des cellules vasculaires N°1 (vascular cell adhesion molecule 1, CD106)
VLA-1 : antigène très tardif N°4, very Late Antigen-4) composé de CD49d (α4) et CD29 (β1)
VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (vascular endothelial growth factor)
Wnt : wingless (mutation « sans ailes »)

Avant-propos

Les muscles squelettiques d'un adulte humain représentent environ la moitié de sa masse corporelle. Répartis dans l'organisme, ils participent, entre autres fonctions, à la locomotion, au maintien de la posture, à la respiration, ce qui peut expliquer la capacité de régénération robuste et rapide consécutive à une rupture de leur intégrité. Néanmoins, l'efficacité de ce processus peut être altérée au cours du vieillissement naturel, voire être quasi-inexistante dans les stades avancés d'atteinte par des dystrophies musculaires. Par ailleurs, une perte progressive des capacités motrices, de locomotion et d'autonomie est associée à la rupture permanente de l'homéostasie du tissu musculaire ; or près de 30 % de la population âgée de plus de 65 ans est concernée par une fonte musculaire. Ce remodelage tissulaire représente donc un défi majeur dans les pays développés où l'augmentation de l'espérance de vie fait croître le nombre de personnes concernées.

Plusieurs protocoles de thérapie cellulaire ont été utilisés dans les vingt dernières années dans la perspective de traiter les patients atteints de dystrophies notamment la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) ou du moins d'améliorer leur qualité de vie. Ils ont pointé les principales limites de cette approche qui tiennent à la nature des cellules utilisées, au nombre de cellules injectées, au mode d'administration, à la survie des cellules après transplantation, à leur migration au-delà du site d'injection et finalement à la faible amélioration de la force musculaire générée, lorsqu'elle s'est produite. Approfondir nos connaissances sur les acteurs participant à l'homéostasie, à la régénération et aux pathologies des muscles striés squelettiques permettra aussi bien de comprendre comment ces mêmes processus peuvent être affectés, dans une certaine mesure, à très court terme (dystrophies musculaires, myopathies) ou sur le long terme (vieillesse naturelle, sarcopénie) pour proposer de nouveaux protocoles d'essais cliniques. Ces recherches sont donc menées aussi bien dans des perspectives fondamentales que thérapeutiques.

La nature des cellules transplantées semble être déterminante pour un succès de la thérapie cellulaire, au regard des échecs observés en utilisant les myoblastes obtenus après prolifération des cellules souches musculaires établies, les cellules satellites. Au sein du laboratoire où j'ai réalisé ce projet de recherche, un nouveau type de progéniteurs musculaires cellulaires a été découvert sur la base de son activité enzymatique aldéhyde déshydrogénase (ALDH). A l'heure actuelle, peu d'informations sont connues au sujet de sa présence dans

différentes situations physio-pathologiques ou au sujet de sa biologie. Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit a eu pour objectif de caractériser les progéniteurs musculaires exprimant les ALDH aussi bien dans un contexte homéostatique que dystrophique en passant par le vieillissement naturel. A terme, il s'inscrit dans une démarche de sélection d'une population à potentiel élevé pour des essais thérapeutiques.

Introduction

1. Le système musculaire des mammifères

Les muscles convertissent de l'énergie chimique en énergie mécanique pour mettre en mouvement les fluides biologiques, le sang, les membres ou pour maintenir la posture de l'organisme. Ils participent aussi à des fonctions essentielles (respiration, digestion) et permettent l'adaptation au milieu environnant (locomotion, thermorégulation). Trois types de cellules musculaires (cardiaques, lisses et squelettiques) aux caractéristiques anatomiques, morphologiques et fonctionnelles spécifiques confèrent au système musculaire ses propriétés intrinsèques (conductibilité, contractilité, élasticité, excitabilité et extensibilité). Au cours de ce travail de thèse, j'ai étudié plus particulièrement les muscles squelettiques, impliqués dans la mise en mouvement volontaire de l'organisme. Parmi ceux-ci, mes principaux objets d'analyse ont été les muscles tenseurs du Fascia Lata (TFL) et les muscles paravertébraux. Les muscles squelettiques seront donc détaillés en premier lieu, avant de présenter plus brièvement les principales singularités du muscle cardiaque, moteur de la mise en mouvement du flux sanguin, puis celles des muscles lisses qui assurent les fonctions végétatives.

1.1. Les muscles striés squelettiques

Le corps d'un adulte humain est composé de plus de 600 muscles striés squelettiques répartis entre les membres supérieurs et inférieurs (environ 200), la tête et le cou (environ 170), le tronc (environ 200) et les différents organes (environ 50). Ils peuvent être de tailles, de formes et d'insertions variables. Malgré une localisation distincte au sein de l'organisme, ils partagent une même origine embryonnaire, exception faite de ceux de la tête.

1.1.1. La formation des muscles striés squelettiques

La formation des muscles (myogenèse) débute lors de l'embryogenèse et s'entretient durant toute la vie de l'organisme (Parker et al. 2003 ; Sambasivan et Tajbakhsh, 2007 ; Tajbakhsh 2009). Au cours de la gestation, des oscillations locales d'expression de gènes directement ou indirectement associées aux voies de signalisation de Notch et de la famille « Wingless » (Wnt) couplées aux gradients de morphogènes, essentiellement les Wnt, les facteurs de croissance des fibroblastes (fibroblast growth factors, FGF) et l'acide rétinoïque (AR), induisent la condensation du mésoderme paraxial pour former des somites qui se développeront progressivement de la tête à la queue (**Figure 1**). En effet, la partie caudale du

mésoderme paraxial contient de fortes concentrations de FGF et de Wnt qui maintiennent les cellules à un stade indifférencié mésenchymateux (Audela et Pourquie, 2010). Ces voies de signalisation contrôlent les activités périodiques de la voie Notch qui elle-même contrôle en retour les gènes cycliques impliqués dans la somitogenèse (Hoffman et al. 2004).

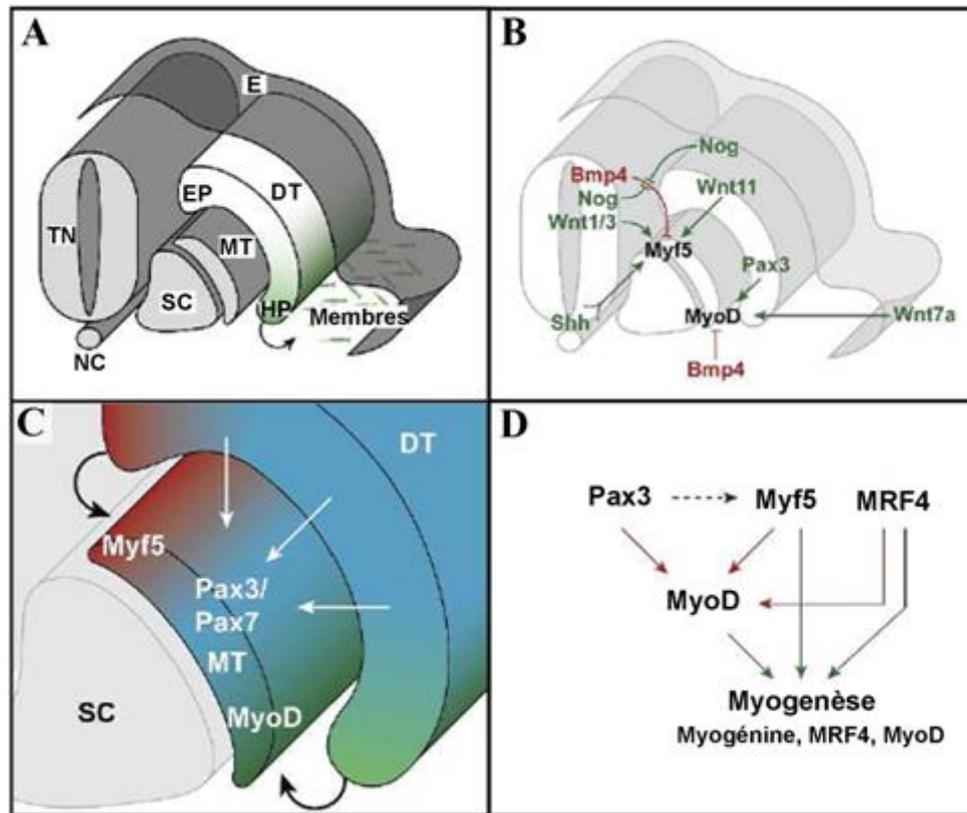


Figure 1 : Développement des muscles squelettiques des membres. (A) Représentation de la somitogenèse à partir du mésoderme paraxial. De part et d'autre du tube neural (TN) et du notochorde (NC), les somites se divisent pour former les muscles de la cage thoraciques et ceux des membres. (B) Des signaux du tube neural, du notochorde et de l'ectoderme (E) activent [Sonic hedgehog (shh), Noggin (Nog)] ou empêchent [Bone morphogenic protein (BMP)] la segmentation des somites pour former le dermomyotome (DT), le myotome (MT) et le sclérotome (SC). (C) Le myotome naît des cellules du dermomyotome : les cellules positives pour Myf5 de la partie épaxiale (EP) donneront naissance aux muscles du tronc et du dos alors que les cellules positives pour MyoD de sa partie hypaxiale (HP) formeront les muscles des membres. Les cellules Pax3 et Pax7 migrent dans la partie centrale du myotome depuis la partie centrale du dermomyotome pour constituer une réserve de cellules satellites disponibles dans les muscles adultes. (D) Des animaux déficients pour les principaux facteurs myogéniques ont permis d'établir une cascade de régulation génique de la myogenèse embryonnaire. Pax3, Myf5 et MRF4 induiraient l'expression de MyoD. Figure adaptée de Shi et Garry 2006

Le départ de la région caudale des cellules entraîne l'arrêt de l'expression des gènes cycliques et l'augmentation des niveaux d'AR. Ces changements établissent la polarité du somite et donnent naissance au mésoderme ventral (le sclérotome) qui contient des précurseurs du cartilage et des os alors que le mésoderme dorsal (le dermomyotome) qui reste

épithélial donne naissance aux muscles squelettiques, à l'exception des muscles de la tête. Les cellules du dermomyotome expriment des facteurs de transcription Paired-homeobox 3 (Pax3) et Pax7 et de faibles niveaux du facteur de transcription en hélice-boucle-hélice myogenic factor 5 (Myf5, voir aussi ci-dessous) (Gouding et al. 1991 ; Kieffer et Hauscha, 2001 ; Jostes et al. 1990). Les somites sont divisés selon l'anatomie et la musculature du corps et en deux parties : épaxiale et hypaxiale. Le dermomyotome épaxial est adjacent au tube neural. Les cellules qui le composent expriment Myf5. Il est à l'origine des muscles dorsaux, alors que les muscles du corps et des membres dérivent du dermomyotome hypaxial.

Des progéniteurs issus des dermomyotomes épaxial et hypaxial migrent sous la régulation de Pax3 et de c-met. Ils se positionnent alors sous le dermomyotome pour former le myotome, premier tissu musculaire différencié de l'embryon. Le myotome intégrera par la suite la musculature du tronc. La différenciation musculaire du myotome est très précoce. Les cellules qui le constituent deviennent très rapidement post-mitotiques, puis expriment Myf5, myogenic regulator factor 4 (MRF4) et myogenic differentiation (MyoD) (décrits ci-dessous).

La spécification et l'organisation des cellules myogéniques dans les somites sont sous régulation épigénétique. Les facteurs de signalisation ont des effets aussi bien permissifs que répressifs sur l'expression des gènes dans les parties épaxiale et hypaxiale du myotome. Les progéniteurs myogéniques prolifèrent intensément avant de diminuer en nombre, alors que le nombre de noyaux musculaires est constant et que la synthèse des protéines des fibres musculaires a atteint un pic de synthèse (Buckingham et al. 2003 ; Davis et Fiorrotto, 2009 ; Schult 1996).

a) Les facteurs de régulation myogéniques (MRF)

Davis et al. (1987) ont identifié le facteur MyoD à partir d'une banque d'acide désoxyribonucléique (ADN) complémentaire issue de myoblastes. La transduction du gène de ce facteur basique hélice-boucle-hélice (basic helix-loop-helix, bHLH) transformait des cellules de type fibroblastique en cellules capables de fusionner avec les myotubes (petites structures musculaires plurinucléées). D'autres équipes ont ensuite découvert les autres membres de la famille des facteurs de régulation myogéniques (myogenic regulation factors, MRF) : Myf5, Myogénine et MRF4 aussi appelé Myf6 (Braun et al. 1989 ; Braun et al. 1990 ; Edmondson et Olson 1989 ; Miner et Wold, 1990 ; Rhodes et Konieczny 1989). Les gènes très conservés au cours de l'évolution sont exprimés dans le lignage de différenciation musculaire squelettique (Rudnicki et Jaenisch 1995 ; Weintraub et al. 1991) (**Figure 2**). Le domaine basique des MRF permet de lier l'ADN tandis que le motif bHLH est nécessaire

pour l'hétérodimérisation avec les protéines E. Ces dernières reconnaissent les motifs des promoteurs de plusieurs gènes spécifiques du muscle, les boîtes génomiques E (Massari et Murre 2000). Myf5 est le premier MRF exprimé au cours du développement embryonnaire (Figures 1 et 2). Le mésoderme paraxial en contient des concentrations très importantes. Ensuite, il est de nouveau exprimé avec les autres MRF au cours de la formation du myotome (Buckingham 1992 ; Ott et al. 1991). Des souris déficientes pour Myf5 et MyoD ont été décrites peu de temps après la découverte des MRF (Braun et al. 1992 ; Rudnicki et al. 1992). Les souris déficientes en Myf5 ont un développement embryonnaire retardé jusqu'au stade d'initiation de l'expression de MyoD (Braun et al. 1992), alors que les souris déficientes en MyoD compensent son absence par une augmentation puis une prolongation de l'expression de Myf5 (Rudnicki et al. 1992). Les souris déficientes pour les deux gènes (souris Myf5:MyoD double-nulles) ne forment pas de muscles squelettiques et n'expriment pas Myogénine (Rudnicki 1993). Des approches d'ablation conditionnelle de cellules positives pour Myf5 ou MyoD par induction de toxine diphtérique ont permis de valider l'existence de deux lignages musculaires indépendants, régulés en amont.

Myogénine et MRF4 interviendraient dans la différenciation des myoblastes et dans l'induction de gènes spécifiques des myotubes puisque la présence d'un allèle fonctionnel de MRF4 dans les souris Myf5:MyoD double-nulles ne permet pas de restaurer la myogenèse. De plus, si les souris déficientes en Myogénine présentent des diminutions de marqueurs de différenciation (chaînes lourdes de Myosine et MRF), MyoD reste exprimée à des niveaux normaux (Hasty et al. 1993). Il en résulte une somitogenèse normale mais une formation diffuse des fibres musculaires puisque de nombreux myoblastes restent indifférenciés dans les stades tardifs de la myogenèse.

b) Les facteurs de transcription Paired-homeobox (Pax)

Tous les vertébrés expriment au moins un des deux facteurs de transcription Paired-homeobox 3 (Pax3) ou Pax7, sûrement dérivés d'un ancêtre commun (Noll et al. 1993). Le dermomyotome central murin contient plus de cellules positives pour Pax7 que de cellules positives pour Pax3. Ce ratio est inversé dans les lèvres dorsales et ventrales (Kassar-Duchossoy et al. 2005). Hutcheson et al. (2009) ont conduit des études d'ablation conditionnelle de cellules contenant des allèles de Pax7 ou Pax3 avec de la toxine diphtérique. Ils ont mis en évidence une mortalité embryonnaire en absence du lignage Pax3 associée à l'inhibition de l'émergence de cellules positives pour Pax7. L'ablation du lignage de Pax7 entraîne des défauts dans les stades tardifs embryonnaires : présence de petits muscles et

quelques fibres musculaires dans les membres à la naissance (Seale et al. 2000 ; Hutcheton et al. 2009). Le lignage Pax3 semble donc créer une matrice pour initier les premières fibres dans les muscles, utilisée par le lignage Pax7 pour générer les fibres secondaires et établir une réserve de cellules souches (Maqbool et Jagla 2007) (Figure 2). Le rôle de Pax3 dans la formation des muscles des membres est donc primordial. Pax3 active la transcription du gène c-met qui, en association avec son ligand, le facteur de croissance des hépatocytes (HGF) permet la délamination des progéniteurs cellulaires à partir du dermomyotome hypaxial, puis leur migration vers les membres en bourgeon. Une fois dans les membres, les progéniteurs prolifèrent sous la régulation du facteur de transcription Msx1, puis activent leur programme de différenciation myogénique.

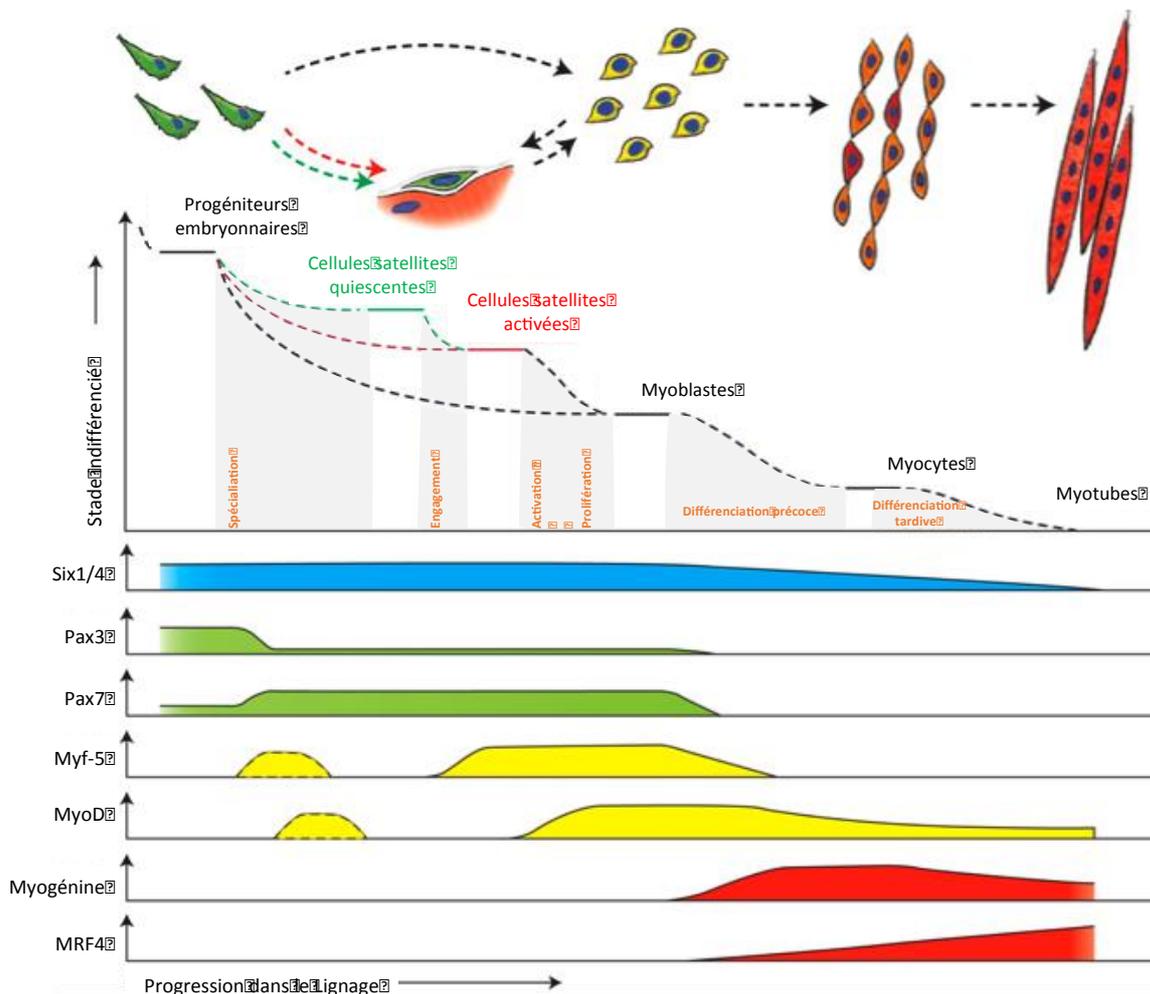


Figure 2 : Schéma d'expression des facteurs de transcription impliqués dans la myogenèse. La myogenèse embryonnaire résulte de l'activation de progéniteurs musculaires qui expriment les régulateurs de la spécification du lignage précoce, Six1/4 et Pax3/7. Certains progéniteurs adoptent une position satellite dans les muscles adultes pour engager une myogenèse en cas de rupture de l'intégrité des muscles, ce sont les cellules satellites. Activés en myoblastes, des progéniteurs peuvent retourner en quiescence ou engager un programme musculaire grâce à l'expression de Myf5 et MyoD. La fusion des myocytes pour former des myotubes nécessite myogénine (myoG) et MRF4. Figure adaptée de Bentzinger al. 2012

c) Les facteurs de transcription associés aux « Sine Oculis » homeobox

Les protéines « Sine oculis-related » homeobox 1 (Six1) et Six4 ont été récemment considérées comme les premiers maillons de la cascade de régulation génétique du lignage des progéniteurs myogéniques du dermomyotome (**Figure 2**). Ces facteurs de transcription contiennent deux domaines conservés : un homéodomaine de type « Six » qui se lie à l'ADN et un domaine « Six amino-terminal » qui interagit avec des coactivateurs ou des corépresseurs de la transcription (Kawaki et al. 2000 ; Tessmar et al. 2002 ; Zhu et al. 2002). Les protéines Six se lient aux 2 homologues Eyes-absent 1 (Eya1) et Eya2, des cofacteurs pour activer l'expression des gènes cibles tels que Pax3, MyoD, Myogénine et MRF4, qu'elles transloquent au noyau (Grifone et al. 2005). Une surexpression de Six1 et Eya2 dans des explants de somites entraîne une augmentation de Pax3 alors que des souris déficientes en Six1 et Six4 (Six1:Six4 double-nulles) ou en Eya1 et Eya2 (Eya1:Eya2 double-nulles) n'expriment plus Pax3 dans le dermomyotome hypaxial ; elles ne forment plus de membres et de muscles hypaxiaux du tronc (Grifone et al. 2007 ; Heanue et al. 2002). Un élément amplificateur actif hypaxial de Myf5 contient des sites de liaison pour les facteurs Six et Pax3. Ces deux facteurs auraient donc des fonctions parallèles (Giordani et al. 2007). Dans les souris Six1:Six4 double-nulles, seuls les muscles dérivés du dermomyotome épaxial sont retrouvés dans les muscles axiaux. L'expression de Myf5 dans cette région est donc indépendante de celle de Pax3. De simples mutants pour les facteurs Six ou Eya présentent des défauts mineurs, aggravés par des mutations multiples dans ces familles. Il y aurait donc une redondance de fonction (Grifone et al. 2005 ; Grifone et al. 2007).

La formation des myofibres se déroule en deux temps (Buckingham et Bajard 2003 ; Buckingham et al. 2006). Une première vague de myoblastes embryonnaires prolifèrent puis fusionnent pour donner les fibres primaires. Toutefois, l'activation de la voie du transforming growth factor β (TGF β) dans une partie des myoblastes, bloque leur programme de différenciation, ce qui permet leur maintien en quiescence. Par la suite, d'autres signaux vont stimuler une seconde vague de prolifération de myoblastes. Une fois différenciés, ils formeront les fibres secondaires. Ces dernières présentent les caractéristiques de fibres rapides alors que les fibres primaires sont considérées comme des fibres lentes (nous reverrons leurs différences dans la **partie 112**).

L'ensemble de ces facteurs de transcription, additionné aux morphogènes et aux facteurs de croissance, permet de créer des organes d'une complexité structurale aussi bien au niveau du tissu musculaire (macroscopique) que cellulaire (microscopique).

112. L'anatomie et le fonctionnement des muscles striés squelettiques

a) La description macro- et microscopique des muscles striés squelettiques

Les muscles striés squelettiques se fixent au squelette pour le mettre en mouvement. Pour ce faire, chaque muscle est composé de centaines voire de milliers de cellules parallèles entre elles et entourées par une gaine de tissu conjonctif de soutien formée de collagènes de type I et III, de glycoprotéines et de protéoglycanes (Bertolotto et al. 1983 ; Bertolotto et al. 1987 ; Light et al. 1984). Trois couches peuvent être distinguées (Figure 3) : l'épimysium recouvre l'ensemble du tissu musculaire, lui-même composé de plusieurs faisceaux, composés de cellules, de nombreuses fibres nerveuses et de vaisseaux sanguins, protégés par le péri-mysium. Enfin, chaque cellule musculaire individuelle est recouverte par l'endomysium.

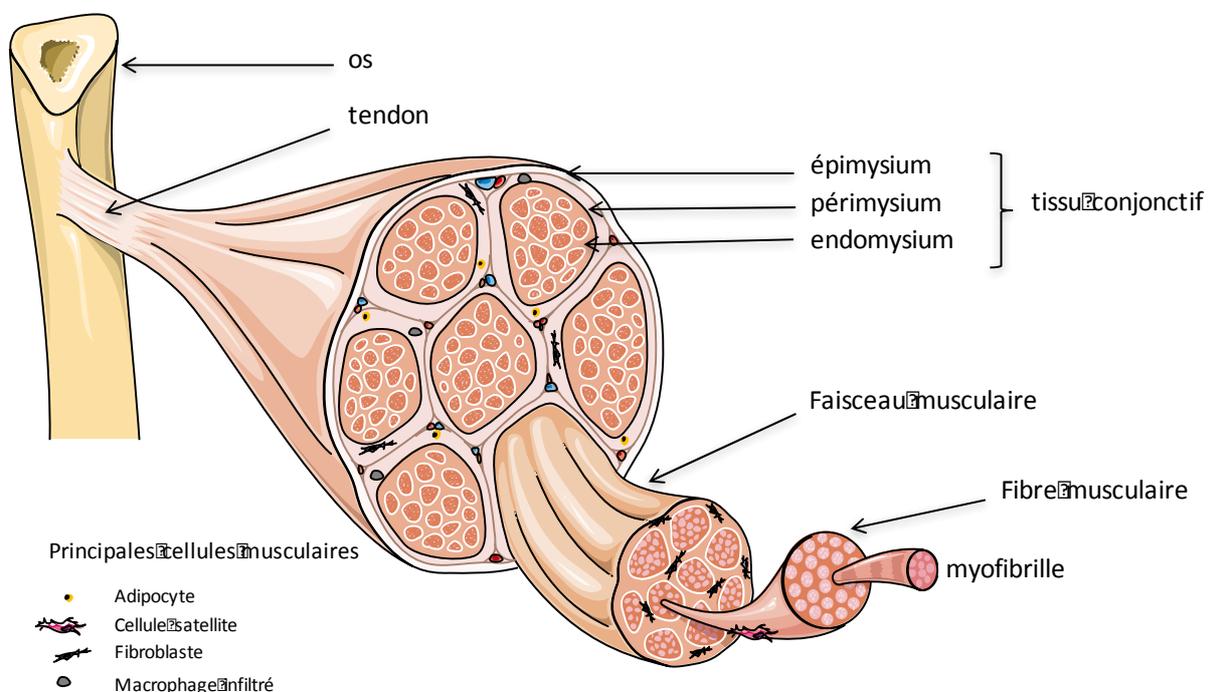


Figure 3 : Schéma simplifié d'une coupe transversale d'un muscle strié squelettique. Les fibres musculaires parallèles et entourées de trois couches de tissus conjonctifs (épi-, péri- et endomysium) se rejoignent pour constituer le tendon, lequel se fixe aux os du squelette pour permettre le mouvement de l'organisme. Des populations cellulaires (adipocytes, cellules satellites, fibroblastes et macrophages infiltrés) sont aussi représentées. Figure adaptée de Servier Medical Art (<http://www.servier.fr/slidekit?item=145>).

Les cellules des muscles squelettiques humains, aussi appelées fibres musculaires, mesurent entre 100 μm et 30 cm, pour un diamètre de 10 à 500 μm . Lors de la fusion des cellules myogéniques, la mise en commun de leur cytoplasme (le sarcoplasme) permet de créer un syncytium où les nombreux noyaux sont accolés à la membrane plasmique (le sarcolemme) (Bruusgaard et al. 2003). L'enchaînement de myofibrilles sur toute leur

longueur et toute leur largeur crée une variété de zones et de bandes à l'origine d'un aspect de striation. En effet, l'unité de base, le sarcomère, contient une trame hexagonale de myofilaments fins (8 nm de diamètre) et de myofilaments épais (16 nm de diamètre) (**Figure 4**) dont la configuration de chevauchement dépend de l'état contracté, relâché ou étiré du muscle. De plus, chaque sarcomère contient des bandes foncées anisotropes (polarisatrice de la lumière visible), appelées bandes A et par opposition, des bandes claires isotropes (non polarisatrices) nommées bandes I. Au milieu de chaque bande A, une rayure plus claire, la zone H, apparaît au repos. Elle est coupée en deux par une ligne sombre, la strie M (**Figure 4**).

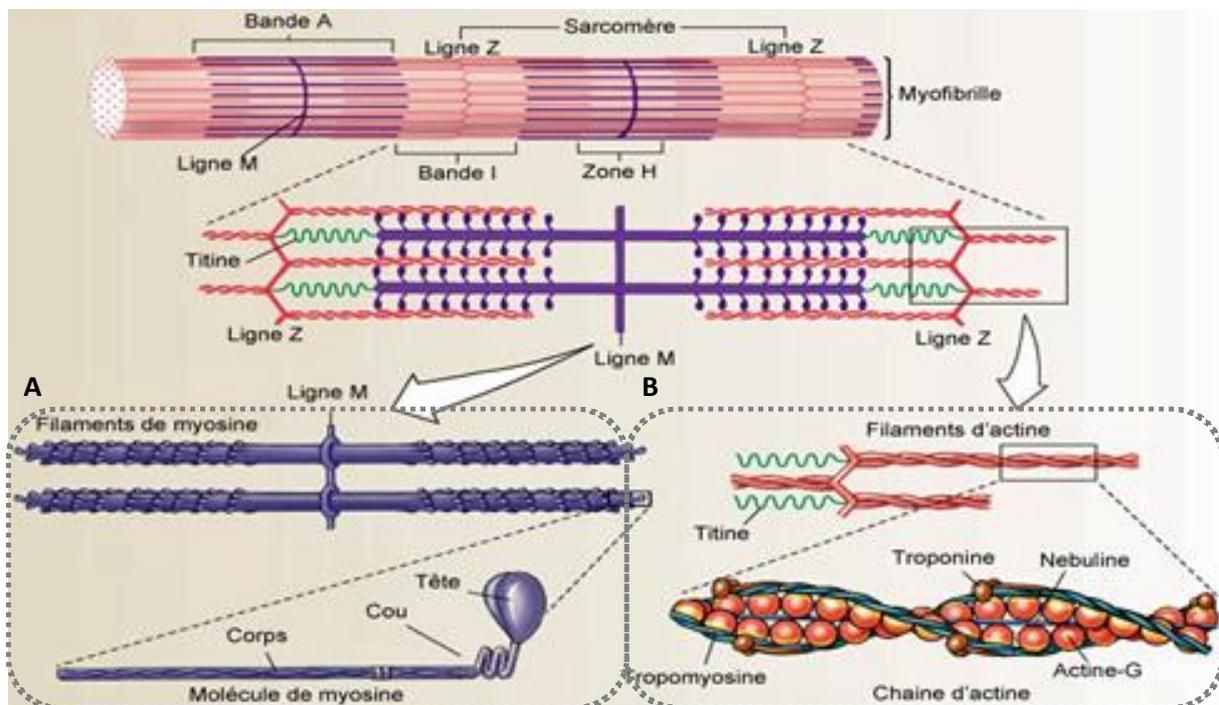


Figure 4 : Ultrastructure d'un sarcomère. Encadré par deux lignes Z, le sarcomère s'étend sur une bande Anisotrope (A) et deux demi-bandes Isotropes (I). Au milieu de la bande A, la ligne M est la zone de maintien des myofilaments épais de myosine au milieu de la zone H, grâce à la protéine structurale de nébuline (**B**). La protéine motrice, la myosine, est composée de deux hélices enroulées et deux têtes APTases (**A**). Les protéines régulatrices de la contraction, la tropomyosine et la troponine, courent le long des myofilaments fins d'actine. La titine, une autre protéine structurale, stabilise les myofilaments épais aux disques Z et aux lignes M (**B**). Figure récupérée sur le site http://www.corpshumain.ca/les_muscles.php

b) La contraction des muscles striés

Lors de la contraction musculaire, les protéines contractiles génèrent la force mécanique nécessaire au mouvement. Les myofilaments épais d'une protéine motrice, la myosine, hydrolysent de l'adénosine triphosphate (ATP) pour obtenir l'énergie nécessaire à leur changement de conformation. Ils transmettent leur mouvement aux myofilaments fins

d'actine, ce qui entraîne un glissement des myofilaments les uns par-rapport aux autres et aboutit à une réduction de la longueur des sarcomères (Rayment et al. 1993).

Des protéines intervenant dans la constitution des myofilaments fins d'actine sont dites régulatrices de la contraction. Elles agissent comme des interrupteurs pour enclencher ou arrêter ce processus. En présence d'ions calciques (Ca^{2+}), la troponine change de conformation et entraîne une rotation de la tropomyosine qui empêchait l'interaction des sites d'accrochage de l'actine avec les têtes de myosine (Lehman et al. 2001). La tropomoduline fixée à l'extrémité des myofilaments d'actine contrôle aussi bien leur taille que leur longueur (Gokhin et al. 2010). Enfin, des protéines structurales liant les sarcolemmes à la matrice extracellulaire contribuent à l'alignement, la stabilité, l'élasticité et à l'extensibilité des myofibrilles. La titine fixe les extrémités des myofilaments épais de myosine aux disques Z et aux lignes M, ce faisant elle contribue à la stabilité de la position de ces myofilaments. Elle joue aussi un rôle dans l'extensibilité et l'élasticité des myofibrilles puisqu'elle aide le sarcomère à retrouver sa longueur au repos (Li et al. 2002). La myoméline est la protéine constituante de la ligne M. Elle lie la titine pour maintenir ensemble deux myofilaments épais de myosine adjacents (Berkemeier et al. 2001 ; Schoenauer et al. 2005). Le disque Z, une entité amorphe, est composé de protéines fibreuses : α -actinine, desmine et vimentine. La dystrophine, dont nous reparlerons dans la **partie 115**, pour son rôle dans la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), est une protéine du cytosquelette qui lie les myofilaments fins d'actine du sarcomère aux protéines intrinsèques de la membrane du sarcolemme. Pour finir, la nébuline court le long des myofilaments fins d'actine et contribuerait au maintien de son alignement, bien que cette fonction soit désormais remise en question (Castillo et al. 2009 ; Pappas et al. 2010).

Les protéines structurales des sarcomères s'attachent aux protéines de la matrice extracellulaire du tissu conjonctif qui entourent les fibres musculaires pour les renforcer et transmettre les forces de contraction aux tendons. À la jonction myotendineuse, le sarcolemme et la lame basale des fibres musculaires présentent d'ailleurs de nombreux replis, ce qui multiplie d'un facteur 10 à 50 la surface de contact entre le tendon et les fibres musculaires (Tibbald et al. 1991 ; Tortora et al. 1994), pour former des tubules transverses (tubules T). Ces derniers interagissent avec le réticulum sarcoplasmique pour permettre la régulation du flux calcique à la base de la contraction musculaire.

c) Le couplage excitation-contraction des muscles striés

Les muscles striés squelettiques interviennent dans le mouvement volontaire sous la commande du système nerveux central. Chaque neurone moteur (motoneurone α) innervent plusieurs fibres musculaires, via une multitude de ramifications, pour créer une unité motrice. Au niveau des jonctions neuromusculaires, les terminaisons axonales des motoneurones α libèrent des vésicules synaptiques contenant un neurotransmetteur nommé acétylcholine (ACh) dans la fente synaptique. Le sarcolemme présente de nombreux récepteurs (AChR) au niveau de cette zone appelée plaque motrice, elle-même à proximité des tubules T (Frank et Fischbach 1979). La liaison des molécules d'ACh aux AChR ouvre des canaux ioniques ligand-dépendants, des canaux sodiques, ce qui modifie temporairement la perméabilité du sarcolemme, lequel est normalement polarisé au repos (intérieur chargé négativement). Une modification du potentiel membranaire nommée dépolarisation est entraînée par une fixation suffisante de molécules d'ACh et se propage sur l'ensemble de la fibre pour transmettre l'excitation de façon quasi-instantanée. L'arrivée du potentiel d'action aux tubules T entraîne l'activation des récepteurs à la dihydropyridine (DHPR) et des récepteurs à la ryanodine (RyR) (Franzini-Amstrong et al. 1999 ; Scriven et al. 2000) présents sur le réticulum sarcoplasmique. Ces trois entités forment une triade autour des myofibrilles (Savio-Galimberti et al. 2008 ; Hayashi et al. 2009). Des ions Ca^{2+} sont libérés dans le sarcoplasme (Fleischer et al. 1985), ce qui augmente la concentration intracellulaire calcique qui passe de $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (relaxation) à $0,1 \text{mmol.L}^{-1}$ (contraction). Les ions Ca^{2+} diffusent au sein des myofibrilles pour activer la troponine. La succession de cycles d'excitation et de liaison des myofilaments d'actine et de myosine entraîne une contraction musculaire (Sciote et Morris 2000).

d) Le métabolisme des muscles striés

Les muscles striés sont hétérogènes en terme de fonctions et ne fournissent donc pas le même travail. Les muscles impliqués dans le maintien de la posture ont une contraction lente sur une longue durée comme les muscles paravertébraux ou du TFL : on parle de contraction tonique. A l'inverse, les muscles impliqués dans le mouvement rapide d'un membre ont une contraction rapide sur une courte durée comme les muscles du biceps : on parle de contraction phasique.

Les muscles squelettiques sont composés de pourcentages complémentaires de deux types de fibres musculaires qui leur permettent de répondre à la commande et présentent des profils

distincts de consommation énergétique en ATP, associés à leur mode de contraction (Johnson et al. 1973). Les fibres lentes dites de « type I » ont un petit diamètre, une vitesse de contraction lente mais une résistance à la fatigue élevée. Leurs isomyosines ont une activité ATPase lente. Très vascularisées, elles peuvent maintenir une activité prolongée. Ces fibres sont donc utilisées pendant des exercices peu puissants et prolongés comme le maintien de la posture. Elles fonctionnent avec un métabolisme oxydatif basé sur une respiration aérobie grâce à la phosphorylation oxydative produit par un nombre élevé de mitochondries. Elles sont riches en myoglobine (fibres rouges). Dans ces fibres, les réserves en glycogènes sont faibles alors qu'elles sont plus importantes en triglycérides.

Par opposition, les fibres rapides dites de « type IIb » ont un gros diamètre, une vitesse de contraction élevée associée à une absence de résistance à la fatigue. Leurs isomyosines ont une activité ATPase rapide. Faiblement vascularisées et pauvres en mitochondries et myoglobine (fibres blanches), elles contiennent un ratio inversé de réserves en triglycérides et glycogène comparativement aux fibres I (Schiaffino et Reggiani 2011) et elles n'utilisent quasiment que la glycolyse anaérobie. Elles sont donc requises lors d'exercices de force de courtes durées.

Il existe aussi des fibres intermédiaires entre les types I et IIb, les fibres IIa, capables d'utiliser les deux types de métabolismes.

La force maximale développée par un muscle est directement corrélée à sa proportion en fibres de type II qui est déterminée génétiquement et influe sur l'aptitude sportive. Un entraînement sportif régulier permet de développer, selon l'exercice (endurance ou résistance), la proportion d'un type particulier. En moyenne, les coureurs de 100 mètres possèdent 75 % de fibres de type II alors que les marathoniens n'en possèdent que 20 %.

Au cours des 10-15 premières secondes d'un exercice intense comme un sprint sur 100 mètres, les créatines phosphokinases (CPK) fournissent l'ATP nécessaire grâce à une réserve immédiatement disponible dans les muscles squelettiques. Néanmoins, une extension de l'effort physique est soutenue par un apport glucidique ou lipidique apporté par notre alimentation (combustible) et d'oxygène prélevé dans l'air ambiant par les poumons (comburant).

Dans les mitochondries des fibres musculaires, le cycle de Krebs est à la base de cette transformation de substrat alimentaire en énergie puis en mouvement puisqu'il catabolise les glucides (glycolyse, voie des pentoses phosphates), les lipides (β -oxydation) et les acides aminés. Il fournit donc les intermédiaires énergétiques pour la production d'ATP dans la chaîne respiratoire mitochondriale. L'activité des fibres musculaires dégage de la chaleur et

des métabolites toxiques (CO₂, ions ammonium, lactate) dont l'accumulation entraîne la fatigue musculaire, voire un arrêt de l'exercice.

L'activité respiratoire mitochondriale fournit l'ATP grâce au transport d'électrons au sein du complexe membranaire pour générer une force motrice. En parallèle, celle-ci libère des espèces oxygénées actives (reactive oxygen species, ROS) au cours des réactions suivantes :



L'augmentation de l'activité respiratoire induit une production élevée de radicaux superoxydes (O₂^{·-}), d'hydroxyles (HO[·]) ou de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) indispensables en faible quantité pour le fonctionnement cellulaire : signalisation cellulaire, différenciation cellulaire, arrêt de la croissance, apoptose, immunité (Tohyama et al. 2004), défense contre les microorganismes, et programmation de leur élimination. Néanmoins, la production en excès est néfaste : production de peroxydes lipidiques, altération de l'ADN, mutations génétiques (Finkel et al. 2001), mort cellulaire par nécrose (Nakagawa et al. 2005) ou attaque des composants cellulaires (Dean et al. 1997 ; Esterbauer et al. 1991).

D'autres enzymes telles que les NAD(P)H oxydases (Chan et al. 2009 ; Lee et Yang 2012 ; Wang et al. 2000), la xanthine oxydase (Zhao et al. 2012) et la phospholipase A2 (Gong et al. 2006) peuvent aussi participer à la production de ROS. Toutefois, les cellules musculaires possèdent des mécanismes physiologiques pour neutraliser les ROS produits notamment lors d'un stress oxydatif : les glutathion peroxydases (Gpx), la superoxydase dismutase (SOD), les catalases, les protéines de la famille des « Heat Shock Protein » (HSP) (McArdle et al. 2001).

Au cours de notre étude (Article), nous avons recherché la présence de cellules progénitrices musculaires dans deux types de muscles striés squelettiques. Nous avons obtenu des échantillons grâce à une collaboration avec la banque de tissus créée par l'Association Française contre les Myopathies (AFM), Myobank, localisée sur le site du groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière. Les biopsies de muscles consistaient en résidus opératoires, prélevés chez des patients indemnes de maladies neuromusculaires et bénéficiant de la pose d'une prothèse articulaire. En grande majorité, ces patients recevaient une prothèse de la hanche et dans certains cas une prothèse du genou. La chirurgie de la hanche est une intervention invasive, ce qui nécessite la découpe d'os et de tissu musculaire. Nous avons obtenu de nombreuses

biopsies du muscle Tenseur du Fascia Lata (TFL) qui nous ont permis de constituer trois cohortes représentatives de patients d'âge différents, pour évaluer l'effet potentiel du vieillissement sur la richesse en progéniteurs. Nous avons aussi obtenu des biopsies de muscles paravertébraux de patients atteints de la DMD ainsi que des biopsies de la même région provenant de patients indemnes de DMD. Ces jeunes patients devaient subir des interventions de chirurgie orthopédique visant à corriger leur posture (déficiência de la musculature paravertébrale chez les patients atteints de DMD et scoliose sévère idiopathique chez les autres patients). Les muscles étudiés permettent le maintien de la posture à long terme et sont plutôt composés de fibres lentes de type I. Tous les échantillons ont été recueillis par les médecins et infirmières, au bloc opératoire, après l'accord des patients certifié par une signature de consentement éclairé.

Les muscles tenseurs du Fascia Lata (TFL)

Les muscles tenseurs du Fascia Lata (TFL) sont de tailles moyennes, allongées et minces. Ils représentent un des types de muscles de la paroi latérale externe de la ceinture pelvienne qui unissent les membres inférieurs au tronc. Ils sont localisés en haut et en arrière de la cuisse. Ces muscles ont la particularité d'être plus tendineux que musculaires, génèrent une puissance faible et permettent l'adduction de la cuisse et dans une moindre mesure la flexion de la hanche.

Les muscles paravertébraux

Les muscles paravertébraux sont nombreux et divers dans leur structure et leur insertion. Ils peuvent être intrinsèques ou extrinsèques mais jouent un rôle crucial dans la stabilité et la mobilité.

113. La régénération des muscles striés squelettiques

La régénération musculaire est une capacité innée robuste des muscles squelettiques à maintenir leur homéostasie suite aux blessures, aux exercices intensifs ou lors d'atteintes par des pathologies. Après rupture de leur intégrité, une accumulation de sang se produit dans le tissu musculaire lésé. En fonction de la nature de l'hématome généré (taille et localisation), des distinctions d'atteintes musculaires peuvent être faites sur le plan clinique. De plus, l'élimination de cet hématome peut entraîner un retard de la régénération musculaire,

augmenter la fibrose et réduire les propriétés biomécaniques du muscle réparé (Beiner et al. 1999).

Dans les premières heures consécutives à une telle lésion entraînant une rupture de l'intégrité des muscles, une réponse tissulaire et non-inflammatoire se met en place. Une nécrose des fibres musculaires fait suite à une rupture de l'homéostasie locale. L'augmentation du calcium intracellulaire (Tidball 2011) inhibe l'activité respiratoire des mitochondries, augmente l'activité de protéases, d'hydrolases et d'enzymes produisant des substances mitogènes pour les cellules musculaires et immunes (Tidball 2005). Les mitochondries se désintègrent comme les autres organites cellulaires. L'activation des enzymes protéolytiques initie la dépolymérisation des microtubules. Enfin, une caryolyse est observée.

a) Dégénérescence musculaire et inflammation

Après la dégénérescence musculaire, de nombreuses molécules pro-inflammatoires comme des cytokines (tumor necrosis factor α (TNF- α), Interleukine ligand 6 (IL-6)), des chémokines (Chemokine ligand 2 et 17 (CCL2, CCL17)), et des facteurs de croissances (fibroblast growth factor (FGF), hepatocyte growth factor (HGF), insulin-like growth factor (IGF-1), vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor β 1 (TGF- β 1)) sont sécrétés par les premières cellules arrivées au site de dommage, les neutrophiles. L'ensemble de ces facteurs crée un environnement chémoattractif pour d'autres cellules inflammatoires : les monocytes et les macrophages (Tidball 1995 ; Toumi et Best 2003). Deux types de macrophages apparaissent séquentiellement au cours de la régénération musculaire (Arnold et al. 2007 ; McLennan et al. 1996) (**Figure 5**). Les macrophages pro-inflammatoires M1, exprimant les marqueurs transmembranaires CD68+/CD163-, contribuent dans les premiers jours de régénération à la lyse cellulaire, à l'élimination des débris cellulaires par phagocytose et à la stimulation de la prolifération des myoblastes. Ils sécrètent le facteur de nécrose tumorale (TNF- α) et l'interleukine 1. Deux à quatre jours après lésion, des macrophages anti-inflammatoires, appelés M2, exprimant les marqueurs extracellulaires CD68-/CD163+, atténuent la réponse inflammatoire et initient la formation des myotubes (Chazaud et al. 2003 ; Chazaud et al. 2014 ; Tidball et Wehling-Henricks 2007). Il existerait 3 sous-groupes de macrophages M2 selon la nature de l'agent produisant leur activation (Martinez et al. 2008). Ces populations seraient issues de la conversion des macrophages M1 lors de la résolution du premier processus inflammatoire, en réponse aux sécrétions locales de

cytokines. Les macrophages M2 sécrètent des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 et restent présents jusqu'à la fin du phénomène d'inflammation dans le muscle lésé. L'infiltration des macrophages dans le muscle lésé est un mécanisme naturel de la régénération musculaire (Zhao et al. 2016) mais peut aussi participer à l'installation d'une fibrose, notamment dans le cas de dystrophies musculaires (Lemos et al. 2015 ; Munoz-Canoves et Serrano 2015) sur le long terme. La succession d'évènements de dégénérescences et régénérations, de manière chronique, finit par perturber les régulations harmonieuses des différents types de macrophages dans ces pathologies.

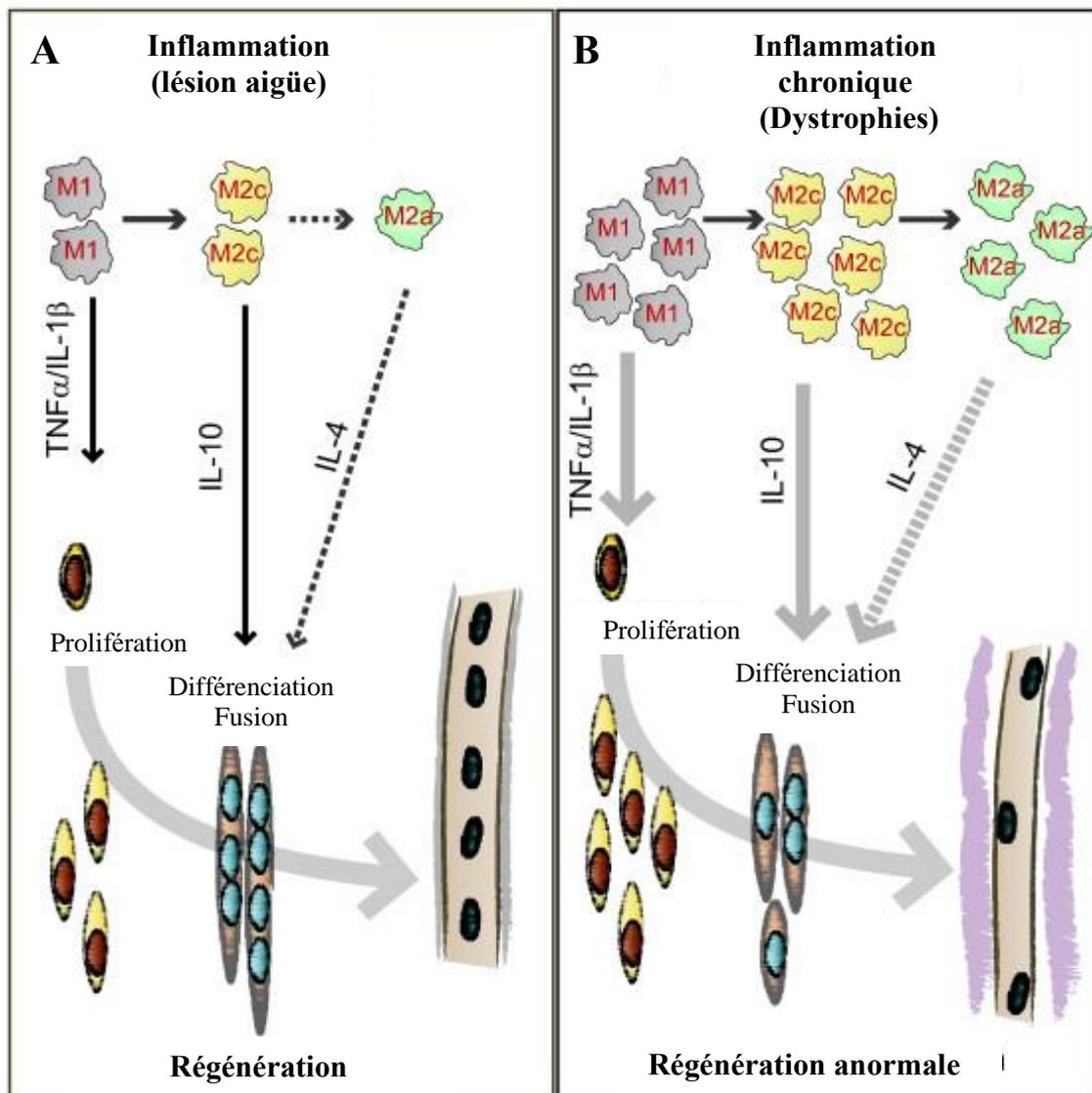


Figure 5 : Implication des macrophages dans la régénération et la fibrose musculaire. Lors de lésions aiguës, les macrophages infiltrés dans le muscle (A) sécrètent des molécules pro-inflammatoires (M1) puis anti-inflammatoires (M2) pour participer aux différentes étapes de la régénération musculaire. Néanmoins, cette réponse inflammatoire est exacerbée dans un muscle dystrophique (B) ce qui conduit au développement progressif d'une fibrose. Figure adaptée de Mann et al. 2011

Les fibres musculaires sont des cellules différenciées ; elles ont donc perdu leur capacité de division pour réparer les fibres musculaires lésées. L'activation des cellules souches musculaires aussi appelés cellules satellites (SC) est donc nécessaire (Relaix et Zammit 2012 ; Sambasivan et al. 2011). Leur activation conduit à une division asymétrique qui fournira des myoblastes dont la fusion produira de nouvelles fibres musculaires et dans une moindre proportion des cellules satellites capables de maintenir un pool de réserve relativement constant. Les cellules satellites sont capables d'autorenouvellement et de différenciation, dans un lignage restreint. Nous en reparlerons plus en détail dans le chapitre dédié à la thérapie cellulaire, et consacré aux cellules progénitrices myogéniques (**partie 221**).

b) Tissu conjonctif et fibrose

Le remodelage du tissu conjonctif est une étape importante du processus de régénération pour combler l'espace formé entre les fibres musculaires endommagées et rempli par l'hématome. La fibrine et la fibronectine présentes au site de blessure participent à la formation d'une matrice extracellulaire (extracellular matrice, ECM), rapidement envahie par des fibroblastes (Darby et al. 2016 ; Desmouliere et Gabbani 1995). Ceux-ci libèrent des cytokines comme le TGF β 1 stimulant encore la prolifération de fibroblastes et leur engagement dans une différenciation en myofibroblastes fibrogéniques, et qui produisent des collagènes de type I et III, des laminines et de la fibronectine (Lehto et al. 1985). La réponse fibrotique est bénéfique dans sa mise en place pour stabiliser le tissu et permettre un support pour la régénération des fibres musculaires (**Figure 5**). Néanmoins, sa persistance après blessure, notamment par la synthèse en excès de collagène, conduit souvent à la formation de cicatrices tissulaires au cours du temps (**Figure 5**). Ceci peut empêcher une fonction musculaire normale (Mann et al. 2011). De nombreux facteurs de croissance sont impliqués dans le développement de la fibrose : facteur de tissu conjonctif (Connective Tissue Growth Factor, CTGF) ; facteur de croissance dérivé des plaquettes (Platelet-Derived Growth Factor, PDGF) ou myostatine. TGF- β 1 stimule les fibroblastes et les myofibroblastes qui produisent des protéines extracellulaires comme la fibronectine et les collagènes de type I et III. TGF- β 1 pourrait entraîner aussi la conversion des myoblastes en myofibroblastes qui produisent alors des niveaux importants de collagènes et contribuent à la fibrose (Li et Huard 2002).

neuromusculaires réapparaissent 2 à 3 semaines après blessures. Celles-ci permettent aussi bien la maturation que l'activité fonctionnelle (Rantanen et al. 1995 ; Vaittinen et al. 2001). La gouttière neurale ou synaptique reste en place si la fibre n'est pas trop endommagée et la jonction neuromusculaire s'établit au même site qu'avant la lésion.

Sur le plan histologique, une coupe transversale de muscles en régénération permet d'apprécier de petites fibres musculaires avec des noyaux centraux qui attestent de la formation de nouvelles fibres musculaires. Elles gagnent en diamètre par fusion et croissance de myoblastes et les noyaux migrent en périphérie de la fibre en fin de régénération. Ainsi, les fibres musculaires après régénération deviennent identiques aux fibres avant régénération.

La régénération musculaire compétente et spontanée après des blessures mineures fait intervenir de nombreux acteurs cellulaires. Un certain nombre d'entre eux sont donc retrouvés dans les biopsies musculaires normales ou pathologiques que nous retrouverons dans l'étude I. Néanmoins, la régénération musculaire décline au cours du vieillissement ou en cas d'atteinte pathologique musculaire et devient incomplète.

114. Le vieillissement des muscles striés squelettique

L'avancée en âge est associée à une perte progressive de la masse musculaire des muscles squelettiques, ce phénomène est appelé la sarcopénie. Dès l'âge de 30 ans, 0,5 à 1% de cette masse est perdue chaque année avec une accélération dramatique après 65 ans (Nair 2005). En effet, nous perdons entre 5-13 % de masse musculaire entre 60 et 70 ans et cette perte augmente entre 11 et 80 % pour les patients de plus de 80 ans. Elle conduit à une fragilité (Cruz-Jentoft et al. 2010), une perte de la force musculaire, à de la faiblesse musculaire et une perte de locomotion. Néanmoins, l'importance du vieillissement musculaire varie selon les individus. Elle est aussi fonction de nombreux facteurs génétiques et environnementaux (Melton et al. 2000). Elle se caractérise par une augmentation du nombre relatif des fibres de type I (enrichies en mitochondries et en réserves en glycogène, responsables des contractions lentes, résistantes à la fatigue). Ce mécanisme de compensation est attribuable en grande partie à une atrophie des fibres de type II (responsables de contractions musculaires puissantes et rapides, fatigables très rapidement), notamment les fibres de type IIb (impliquées dans les réponses musculaires rapides et dans les mouvements fins), à une conversion des fibres de type II en type I au cours du vieillissement et à une réduction de

l'activité physique des personnes âgées. Sur le plan histologique, ces changements conduisent à une forte diminution du nombre (estimée à 50 %) et du diamètre des fibres musculaires chez des sujets de 70 ans et plus. Sur le plan fonctionnel, une perte de la puissance et de la force musculaire, bien avant la réduction de la masse musculaire, est observée. Cependant, les sujets âgés sont endurants lors d'un exercice physique prolongé.

Les mécanismes impliqués dans ce remodelage et cette perte de force au cours du vieillissement sont multifactoriels. Les changements qui surviennent dans les muscles squelettiques sont très semblables entre les espèces humaines et murines (Garcia et al. 2013 ; Miller et al. 2004). Ainsi la régulation des changements intrinsèques et extrinsèques a été observée chez les rongeurs ce qui suggère que les souris et les rats sont de bons modèles pour étudier la sarcopénie humaine (Demontis et al. 2013).

a) Les facteurs extrinsèques

Régulation endocrinienne

Le changement de l'environnement endocrinien au cours du vieillissement contribue à la progression de la sarcopénie tout en limitant la réversibilité rapide et complète observée chez les mammifères juvéniles supplémentés en nourriture (Thomas 2007). En effet, la production de cytokines anaboliques telles que l'IGF-1 diminue au cours du vieillissement (Goldspink et Harridge, 2004). Elle pourrait expliquer la réduction de synthèse de protéines mitochondriales et des fibres musculaires, notamment les chaînes légères de myosine (Nair 2005). Un traitement proposé pourrait consister en une supplémentation en IGF-1. Malgré une atténuation de la perte de masse musculaire consécutive à sa surexpression spécifiquement dans le muscle (Barton-Davis et al. 1998 ; Musarò et al. 2001), l'administration à long-terme pourrait activer la voie de signalisation insuline-IGF-1 impliquée dans le développement de cancer et entraîner une réduction de l'espérance de vie (Kenyon et al. 2010). Ces traitements sont donc risqués.

De plus, au cours du vieillissement les muscles squelettiques perdent en efficacité dans leur réponse aux stimuli anaboliques et cataboliques et développent une résistance anabolique, un phénomène qui contribue à la sarcopénie (Breen et Phillips 2011). L'exercice et l'ingestion d'acides aminés ne stimulent donc plus aussi efficacement la synthèse protéique (**Figure 7**).

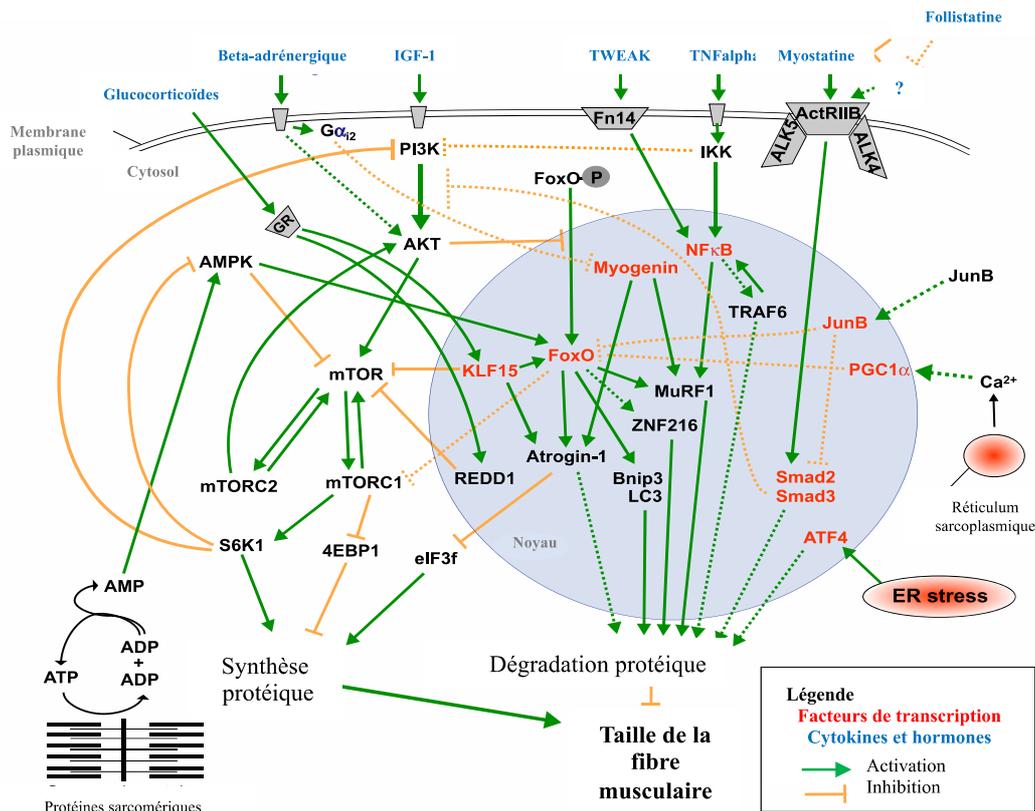


Figure 7 : Voies de signalisation majeures impliquées dans la régulation de la taille des fibres musculaires. La synthèse et la dégradation des protéines des fibres musculaires peuvent être consécutives à l'activation de nombreuses voies de signalisation, suite à des stimuli différents. Plusieurs voies communiquent entre elles ou partagent des molécules intermédiaires. Certaines molécules sont des cibles thérapeutiques potentielles pour tenter de traiter l'atrophie musculaire caractéristique de patients sarcopéniques ou de certaines pathologies musculaires. Figure adaptée de [Bonaldo et Sandri 2013](#).

La contribution des cellules satellites dans la régénération musculaire

Le changement endocrinien associé au vieillissement influe sur le potentiel myogénique des cellules satellites ([Brack et al. 2007](#)). En effet, les progéniteurs impliqués aussi bien dans la maintenance de l'homéostasie de la masse musculaire que dans la régénération après blessure ([Biressi et Rando 2010](#)) diminuent en nombre et en capacité régénérative ([Vinciguerra et al. 2010](#) ; [Shefer et al. 2010](#)). Toutefois, les dysfonctions des cellules satellites sont controversées (voir ci-dessous).

b) Les facteurs intrinsèques

Dysfonctions des cellules satellites

Des études récentes ont mis en évidence des changements dans le transcriptome et le statut épigénétique des cellules satellites (CS) quiescentes ([Liu et al. 2013](#) ; [Sousa-Victor et al. 2014](#)). Ainsi, on observe une augmentation de la méthylation de la chromatine avec de

nombreuses empreintes H3K27me dans le génome (Liu et al. 2013). Ceci entraînerait des réorganisations de la chromatine (en hétérochromatine) et la dérégulation de voies de signalisations nécessaires pour une régénération musculaire efficace.

Dans une étude, la transplantation d'une dizaine de cellules satellites isolées de souris jeunes ou âgées dans des muscles de souris immunosupprimées a montré qu'environ deux tiers des cellules âgées ont intégré le muscle par rapport aux jeunes cellules (Cosgrove et al. 2014). Ceci a été corrélé avec une capacité proliférative limitée associée à des niveaux élevés des niveaux de p38 α/β des Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) et de gènes régulateurs de la sénescence. Cette différence est néanmoins compensée par l'injection en grand nombre de CS (entre 100 et 300) (Collins et al. 2007) ou en utilisant des inhibiteurs pharmacologiques de cette voie de signalisation. La suractivation de la voie p38 α/β des MAPK joue un rôle important dans le déclin drastique de l'autorenouvellement des cellules satellites et empêche leur fonction (Bernet et al. 2014 ; Cosgrove et al. 2014). De plus, cette voie de signalisation est dérégulée dans la division asymétrique des cellules souches produites après activation. Une division symétrique permet une activation de cette voie de signalisation dans toutes les cellules filles.

Une autre étude a mis en évidence des niveaux élevés de l'inhibiteur des kinases cyclines-dépendantes (CDK), la p16^{INK4A}, dans des cellules satellites des souris gériatriques (28-32 mois). Cette élévation entraîne une sénescence irréversible des CS quiescentes (Sousa-Victor et al. 2014). Or la voie p38 α/β des MAPK semble aussi activer cette voie de sénescence. Dans le muscle gastrocnémien, des niveaux d'expression réduits de p16^{INK4A} ont été retrouvés dans les souris exprimant un allèle dominant-négatif de p38 α . Ce lien direct dans le muscle doit néanmoins être confirmé dans les CS (Papaconstantinou et al. 2015).

Des niveaux élevés des gènes cibles de la voie JAK-STAT ont été retrouvés dans des souris âgées de 18 mois par-rapport aux souris âgées de 3 mois. Des perturbations génétiques dans les membres des familles JAK et STAT de CS âgées augmentent leur efficacité de greffe. L'extinction de l'expression de JAK2 et STAT3 dans les CS par introduction de short interfering RNA (siRNA) dans des fibres musculaires isolées âgées induit une augmentation de l'expansion symétrique de la population de cellules satellites Pax7+/Myf5- (Price et al. 2014). STAT3 est nécessaire pour l'engagement *ex vivo* de la myogénicité induite par MyoD. *In vivo*, une inhibition transitoire pharmacologique de STAT3 dans les muscles d'animaux âgés permet d'augmenter la prolifération des CS et augmente la régénération musculaire.

Plusieurs voies impliquées dans le contrôle de la taille des fibres musculaires sont dérégulées au cours du vieillissement. Plusieurs activateurs ou inhibiteurs sont progressivement découverts et testés (**Figure 7**) pour tenter de proposer des protocoles thérapeutiques.

Diminution de la fonction mitochondriale et de l'homéostasie métabolique

Les mitochondries isolées des fibres musculaires humaines et murines présentent de nombreuses différences par-rapport à celles isolées chez des personnes ou modèles plus jeunes : changements des concentrations d'enzymes mitochondriales (Stanton et al. 2011) ; diminution de la synthèse des protéines mitochondriales (Rooyackers et al. 1996) ; dysfonction de la perméabilité du pore de transition (Seo et al. 2008) ; agrandissement des mitochondries surement associé à une augmentation de la fusion (Terman et Brunk 2004) ; augmentation des mutations de l'ADN mitochondrial (Lee et al. 1997 ; McKenzie et al. 2002 ; Melov et al. 1995 ; Wanagat et al. 2001) et plus forte génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Mansourri et al. 2006).

Denham Harman a proposé en 1956 une théorie du vieillissement basée sur les radicaux libres suggérant que les radicaux libres de l'oxygène entraînent les processus de vieillissement (Harman et al. 1956). La diminution de l'activité de détoxification des aldéhydes issues de la peroxydation des lipides par les mitochondries a été observée et proposée comme mécanisme du vieillissement animal (Ohsawa et al. 2008 ; Yu et al. 2009). Chez le rat, la capacité de détoxification du 4 hydroxy-nonéanal (4-HNE) par les ALDH mitochondriales diminue avec l'avancée en âge (Chen et al. 1996). Les fonctions de détoxification des ALDH sont bien connues (**nous y reviendrons dans la partie 33**) et pourraient donc être impliquées dans la résistance au vieillissement. De manière surprenante, les cellules souches médullaires exprimant les ALDH résistent mieux au vieillissement que les cellules ne l'exprimant pas (Dimmeler et al. 2008 ; Povsic et al. 2010).

Changement dans les sarcomères

Les sous-unités contractiles répétitives basiques des fibrilles musculaires composent les sarcomères. Des altérations dans la structure et la fonction des protéines des sarcomères pourraient expliquer le déclin de génération de force associé au vieillissement (Prochniewicz et al. 2007). Des modifications dans le statut oxydatif peuvent aussi entraîner des diminutions fonctionnelles des protéines contractiles (Perkins et al. 1997 ; Lowe et al. 2001).

Changement dans le réticulum endoplasmique et régulation du calcium

Plusieurs changements ultrastructuraux apparaissent dans les muscles âgés murins. Une accumulation d'agrégats tubulaires des membranes du réticulum sarcoplasmique (SR) (Schiaffino 2012) peut conduire à un stockage anormal puis à une libération inadéquate de Ca^{2+} (Jiménez-Moreno et al. 2008 ; Russ et al. 2011). D'autres changements ont été répertoriés, une diminution dans l'homéostasie du Ca^{2+} , une diminution de l'expression de la synaptophysin mitsugumin-29 (Zhao et al. 2008) et de la phosphate-inositide spécifique du muscle (Romero-Suarez et al. 2010). D'autres changements dans les canaux Ca^{2+} dépendants du voltage de type L, les récepteurs dihydropyridine (Payne et al. 2004) ont aussi été décrits. Ces canaux interagissent avec les récepteurs de la ryanodine 1 (RyR1) pour la libération du Ca^{2+} depuis le SR après la dépolarisation membranaire des tubules traverses. Dans le cytosol, les ions Ca^{2+} libérés du SR se lient à la troponine C pour former des points de liaison avec l'actomyosine, entraînant le raccourcissement des sarcomères et le développement de force (Anderson et al. 2011). Les résidus des cystéines des récepteurs RyR1 sont oxydés et nitrosylés au cours du vieillissement. Ceci entraîne le remodelage de la sous-unité Calstabin 1 impliquée dans la stabilité des canaux or ceux-ci limite l'ouverture des canaux.

Les altérations de l'homéostasie musculaire décrites ci-dessus surviennent progressivement au cours du vieillissement naturel. D'autres altérations, souvent plus drastiques, peuvent se mettre en place très précocément chez l'homme ou chez les animaux modèles, notamment en cas d'atteintes par des pathologies musculaires.

115. Les dystrophies musculaires

Les maladies dégénératives provoquées par des mutations de protéines spécifiques du muscle ou ubiquitaires mais qui se manifestent par une pathologie musculaire sont regroupées sous le nom de dystrophies musculaires. Les protéines en cause constituent la structure du sarcolemme (Hoffmann et al. 1987), la structure de l'enveloppe nucléaire (Bione et al. 1994 ; Bonne et al. 1999 ; Mittelbronn et al. 2008), les structures membranaires, le cytosquelette, les lames basales, elles interviennent dans les glycosylations ou autres modifications post-transcriptionnelles (Bonnemann et al. 2009), elles peuvent être impliquées dans des interactions avec des ARNs (Brais et al. 1998 ; Kühn et al. 2009), la chromatine ou avec les systèmes mitochondriaux. Dans certains cas, ces myopathies sont liées à des modifications de

structure ou de fonction au niveau des ARNs. Les mutations sont à l'origine de défauts structuraux, métaboliques, enzymatiques ou de régulation génique.

a) La dystrophie musculaire de Duchenne

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est la maladie musculaire génétique infantile la plus répandue : elle atteint un garçon sur 3500 naissances. Cette pathologie est liée au chromosome X (Xp21). Elle est transmise dans deux tiers des cas par la mère tandis que le tiers restant est dû à une mutation spontanée dans le gène de la dystrophine qui compte 79 exons pour $2,6 \cdot 10^6$ paires de bases. La protéine codée, la dystrophine (Hoffman et al. 1987) (**Figure 8**) est l'une des plus grosses protéines connues. Elle présente un poids moléculaire de 427 kDa et une longueur de 125 nm, elle est liée à la membrane et est essentielle pour le maintien de l'intégrité des sarcolemmes des fibres musculaires (Durbeej et Campbell 2002). Elle est associée à de nombreux partenaires intracellulaires avec qui elle forme un complexe glycoprotéine-dystrophine (CGD) membranaire (**Figure 8**). L'extrémité aminotermine du CGD lie les molécules d'actines polymérisées du cytosquelette tandis que l'extrémité carboxyterminale attache la laminine de la matrice extracellulaire dans les muscles cardiaques et squelettiques (Beaun et al. 2014). L'extrémité carboxyterminale interagit aussi avec d'autres protéines (syntrophines, dystrobrevine) en liaison avec une isoforme de la synthase de l'oxyde nitrique (NO synthase), diverses tyrosine-kinases et des canaux ioniques (Petrof et al. 2002).

La grande taille du gène et de la protéine ont rendu particulièrement complexes les tentatives de restauration par complémentation génique (certaines sont listées dans la **partie 117**). D'autres composants du CGD (les dystroglycans α et β , les sarcoglycans α , β , γ et δ , les sarcospan, les syntrophines $\alpha 1$, $\beta 1$, $\beta 2$ ou $\gamma 1$, $\gamma 2$ dans les neurones, les α -dystrobrevines) se révèlent aussi importants. Des mutations dans ces protéines sont responsables de différentes formes de dystrophies musculaires.

En l'absence de dystrophine, les muscles squelettiques des épaules (ceinture scapulaire), des membres supérieurs, des hanches (ceinture pelvienne), des hauts de la cuisse et des mollets (Emery, 2002) sont fragilisés dès l'âge de 2-3 ans. La perte progressive des tissus musculaires squelettiques, consécutive à une déplétion des réserves de cellules myogéniques dans des cycles de dégénérescence-régénération (Bushby et al. 2010) est remplacée partiellement par des tissus fibreux et adipeux (**Figure 9**). Sur le plan histologique, de nombreuses zones inflammatoires et une diminution drastique du nombre des fibres

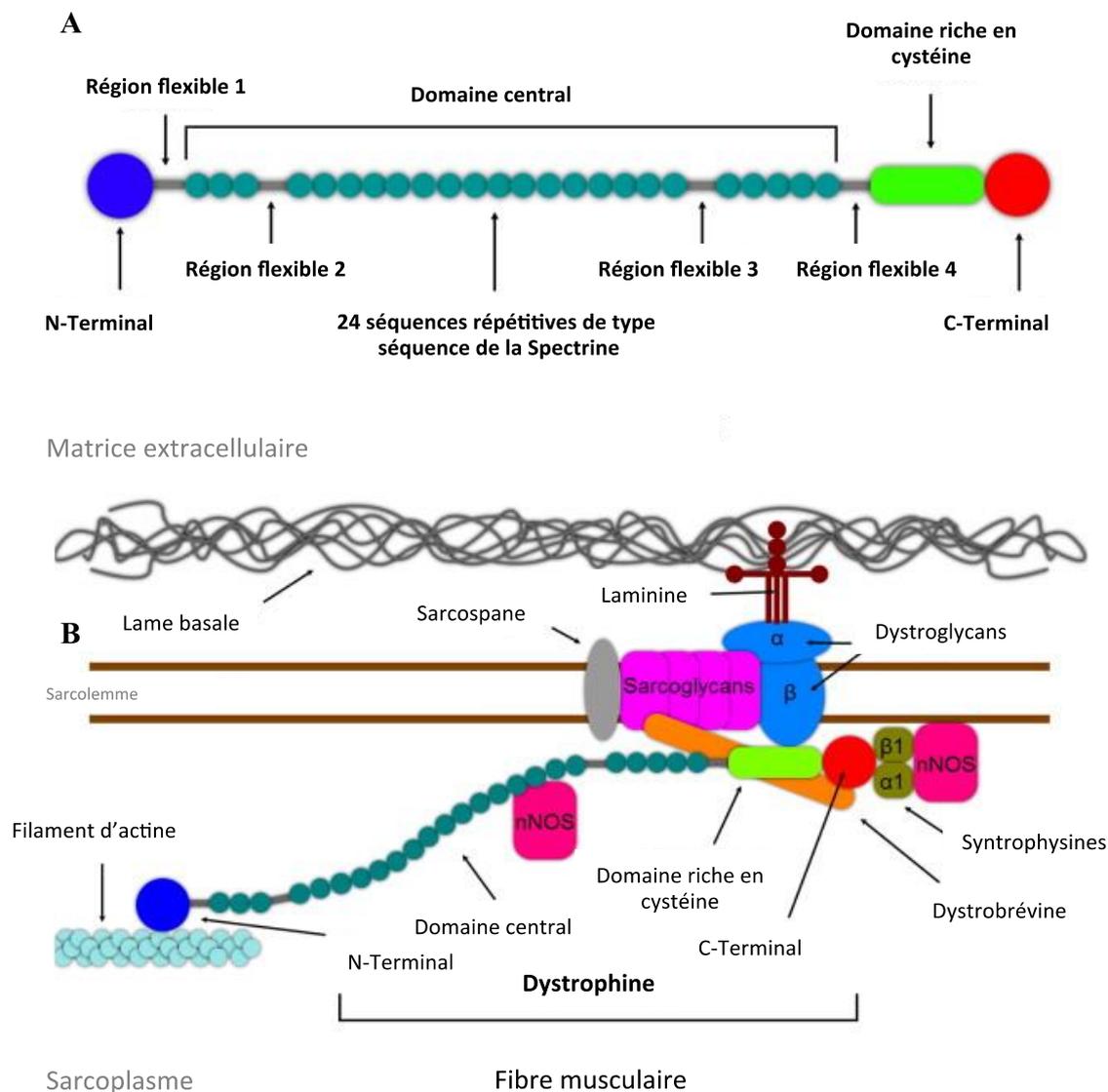


Figure 8 : Domaines de la dystrophine et complexe glycoprotéine-dystrophine (CGD). La dystrophine possède de nombreux domaines de liaison avec ses partenaires (A). (B) Elle lie les myofilaments d'actine via son domaine N-terminal, le dystroglycane β par son domaine riche en cystéines, la protéine nNos par ses régions SR 16 et 17 ainsi que les syntrophines avec son domaine C-terminal. La syntrophine est aussi un partenaire de la nNos. De son interaction avec le dystroglycane β , lui-même impliqué dans un complexe avec le dystroglycane α et la laminine, la dystrophine est reliée à la matrice extracellulaire de collagène IV. Enfin, le complexe est connecté aux sarcoglycans par la dystrobrevine α . Figure adaptée de [Douglas et Wood 2013](#)

musculaires sont observables. La destruction progressive et diffuse des fibres musculaires couplée à la perte de l'intégrité membranaire entraînent le relargage de composés dans le sang périphérique (créatine phosphokinase et la troponine) ([Vilquin et al. 1998](#)), qu'il est possible de doser afin de suivre l'évolution de la maladie, et permet et l'entrée de molécules à l'intérieur des fibres (anticorps, albumine, calcium). Ce remodelage contraint les adolescents à utiliser un fauteuil roulant pour se déplacer dès l'âge de 10-12 ans, puis à subir des

interventions de chirurgie orthopédique ainsi qu'à mettre en place une assistance respiratoire. Dans la trentaine, les patients succombent de problèmes respiratoires (insuffisance et infections répétitives) et de plus en plus fréquemment d'insuffisance cardiaque (Bach et Martinez, 2011 ; Kieny et al. 2013 ; Passamano et al. 2012).

Le muscle cardiaque est atteint dès l'âge de 7 ans. Bien que de nombreuses avancées permettent une amélioration de l'ambulation et/ou de l'autonomie des patients DMD, notamment grâce aux traitements par les corticoïdes, aucun traitement curatif n'est actuellement disponible.

La dystrophie musculaire de Becker (DMB) est un variant allélique de la DMD. Dans cette forme particulière, les mutations affectant le gène de la dystrophine n'entraînent pas de décalage du cadre de lecture et provoquent la synthèse de protéines tronquées mais partiellement fonctionnelles, ce qui se traduit par une atteinte clinique moins sévère des patients atteints.

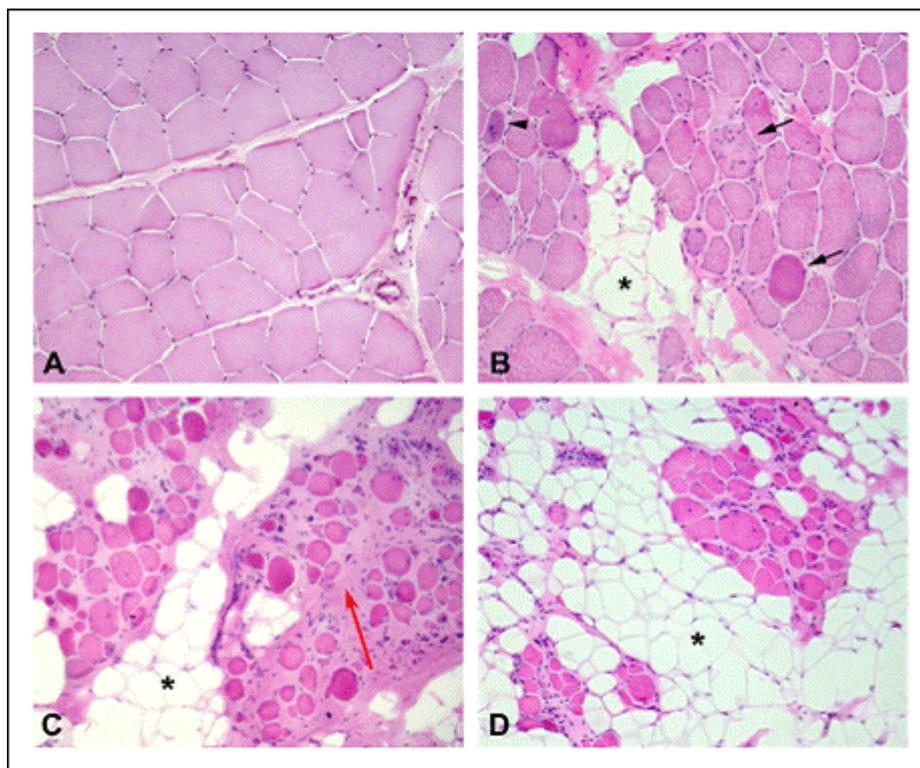


Figure 9 : Histologie d'un muscle dystrophique humain. Alors que le tissu musculaire présente des fibres musculaires polygonales séparées par une couche fine de tissu conjonctif d'endomysium (A), une nécrose des fibres musculaires (flèches noires), des fibres rondes et un épaissement de l'endomysium sont observés dans un stade précoce d'un tissu musculaire dystrophique. De plus, certaines fibres ont régénéré puisqu'elles sont de taille inférieure aux autres fibres (tête de flèche noire). Enfin, une invasion par du tissu adipeux s'installe (astérisque) (B) avant d'occuper majoritairement le tissu musculaire dans des stades avancés (C et D), en association avec une fibrose importante (flèche rouge, C). La figure du bas représente la succession de cycles de dégénérescences et régénérations qui frappe le muscle dystrophique. Jusqu'à un certain stade, les cellules satellites peuvent assurer une régénération correcte, cependant leurs capacités s'apuisent progressivement et les fibres s'atrophient ou disparaissent. Figure tirée de Skuk et al. 2004

Deux autres dystrophies musculaires sont présentées succinctement ci-dessous puisque nous analyserons dans la **partie 2**, consacrée à la thérapie cellulaire, les résultats obtenus récemment lors d'essais cliniques.

b) La dystrophie musculaire facio-scapulo-humérale

La dystrophie musculaire facio-scapulo-humérale (DMFSH) est une maladie autosomale dominante associée à l'expression toxique d'un gène, DUX4, situé sur le chromosome 4q et codé par des séquences répétées appelées D4Z4 (Rickard et al. 2015) (**Figure 10**). Les muscles largement touchés dans cette pathologie sont ceux de la face, des épaules et des muscles de l'avant-bras mais des muscles releveurs des pieds et de la ceinture pelvienne peuvent aussi être affectés (Tawil et Van Der Maarel 2006). De toutes les dystrophies craniofaciales, la DMFSH est celle dont le pronostic vital est le meilleur pour la survie sur le long terme. En effet, c'est une maladie progressive qui affecte rarement le muscle cardiaque ou les muscles respiratoires (Tawil et Van Der Maarel 2006). La majorité des patients atteints (90%) présente une réduction du nombre de séquence D4Z4 (moins de 11 chez un sujet atteint et jusqu'à plus de 100 chez un sujet sain) et sont étiquetés dans la catégorie FSHD1 (**Figure 10**). L'expression d'un haplotype particulier (appelé A) favorise la stabilisation de l'expression de Dux4 par polyadénylation, ce qui entraîne une toxicité musculaire (Lemmers et al. 2010). Le nombre de séquences influencerait la pénétrance de la maladie (Salort-Campana et al. 2015). Les autres patients (10% restants) appartiennent à la catégorie FSHD2 et ne présentent pas de réduction du nombre de répétition D4Z4. Des mutations dans le gène SMCHD1 entraîneraient, cependant, l'hypométhylation de cette région chromosomique (Lemmers et al. 2012 ; Lemmers et al. 2015 ; Sacconi et al. 2013 ; Sacconi et al. 2014) et seraient responsables de l'expression toxique de DUX4. Il n'existe aucun traitement pour cette maladie dont les mécanismes moléculaires et pathologiques sont très complexes et difficiles à contourner.

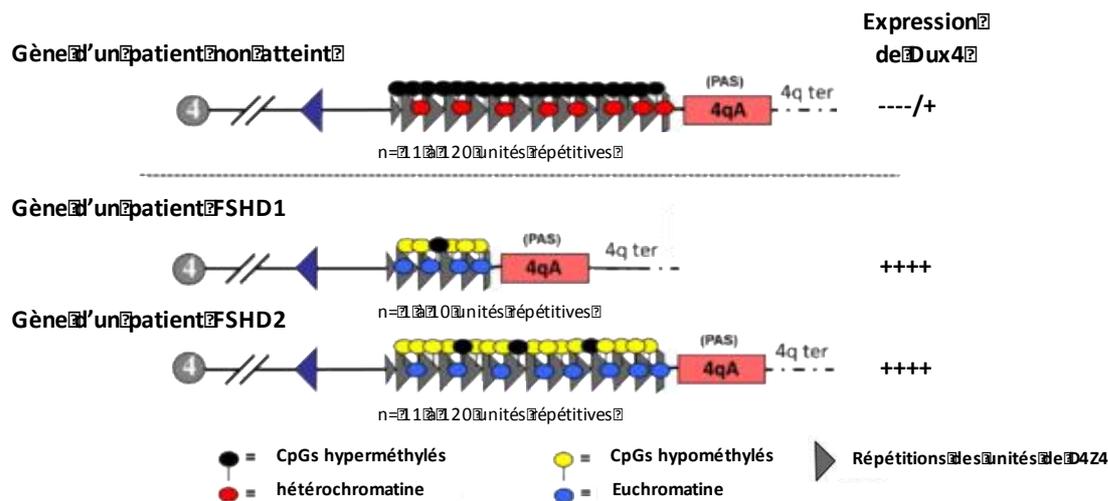


Figure 10 : Locus 4q35 du chromosome 4 impliqué dans la DMFSH. La dystrophie musculaire FascioScapuloHumérale est liée à une réduction du nombre de répétitions D4Z4 (en dessous de 11 alors que jusqu'à 200 répétitions peuvent être retrouvées chez des personnes indemnes de cette pathologie) associée à une hypométhylation de cette région. En effet, 10% des patients atteints de DMFSH ont un nombre élevé de répétitions D4Z4, comme pour les personnes indemnes, mais présentent une hypométhylation drastique, ce qui entraîne un phénotype DMSFH. Ce changement épigénétique entraîne l'augmentation de l'expression et de l'activité de la protéine DUX4 dans le muscle or celle-ci contrôle de nombreux gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant et dans la myogenèse. Figure adaptée de [Peter John 2014](#).

c) La dystrophie musculaire oculo-pharyngée

La dystrophie musculaire oculo-pharyngée (DMOP) est une maladie musculaire autosomale dominante à déclaration tardive puisque les patients atteints ont plus de 50 ans ([Abu-Baker et Rouleau 2007](#) ; [Messaed et Rouleau 2009](#)). Elle est liée à l'expansion d'alanines dans la région N-terminale du gène ubiquitaire de la protéine nucléaire de liaison à la polyadénosine 1 (PABPN1), ce qui provoque l'accumulation de filaments nucléaires dans les noyaux des muscles squelettiques. Le mécanisme physiopathologique exact n'est pas encore connu mais se traduit par une fibrose accentuée de certains territoires très spécifiques. Les patients développent généralement d'abord un ptosis des paupières à cause d'une fibrose du muscle releveur, puis une dysphagie due à l'atteinte des muscles pharyngés, en particulier le muscle cricopharyngé. La dysphagie compromet l'espérance de vie des patients. Toutefois, la pratique d'une myotomie par voie chirurgicale leur apporte un répit transitoire. Les musculatures des membres sont affectées plus tardivement.

116. Les modèles animaux de la DMD

Deux animaux modèles ont été historiquement utilisés dans les études précliniques de la DMD : les souris « muscular dystrophy X-linked » (mdx) ([Bulfield et al. 1984](#) ; [Sicinski et al. 1989](#)) et les chiens « Golden retriever muscular dystrophy » (GRMD) ([Sharp et al. 1992](#)).

Une mutation spontanée ponctuelle dans l'exon 23 introduit un codon stop prématuré dans le gène murin de la dystrophine chez la souris mdx. Jusqu'à 18-24 mois, la souris est relativement indemne de signes cliniques musculaires mais des problèmes surviennent chez la souris plus âgée, en particulier une altération de la fonction cardiaque. Le muscle le plus atteint est d'emblée le diaphragme, qui présente une fibrose extensive, probablement du fait de sa position et de sa structure anatomique, ce qui en a fait l'objet d'études considérables. Respirant à l'horizontale (et non de manière verticale comme les Hommes), la souris ne semble pas présenter de handicap respiratoire majeur du fait de cette fibrose. Sur le plan histologique, la souris mdx présente des fibres musculaires anormales : des noyaux centraux dans les fibres musculaires qui sont des vestiges de vagues successives de régénération, des divisions internes, une augmentation du diamètre et des zones locales d'inflammation sont caractéristiques de phénomènes de dégénérescence-régénération. Au sevrage, entre 3 et 6 semaines après la naissance, un pic des cycles de dégénérescence-régénération est atteint, probablement lié à la forte augmentation de l'activité locomotrice des souriceaux.

Ce modèle est imparfait pour la validation clinique de stratégies thérapeutiques puisque la souris compense l'absence de dystrophine en augmentant l'expression d'une protéine embryonnaire qui peut remplir des fonctions similaires, l'Utrophine. Ceci a conduit au développement de nouvelles lignées murines plus atteintes sur le plan clinique. De plus, ce modèle présente un petit nombre de fibres musculaires, appelées fibres « révertantes », qui expriment des formes tronquées de la dystrophine. Le mécanisme de réversion est mal connu mais résulte probablement d'un réarrangement spontané d'épissage qui permet de sauter les exons mutés tout en conservant le cadre de lecture. Ces fibres ont été mises en évidence uniquement par des techniques fines de biologie moléculaire ou l'utilisation d'une panoplie d'anticorps monoclonaux. La souris mdx a donc été largement utilisée pour évaluer l'efficacité des mécanismes de restauration biochimiques de la dystrophine (Partridge et al. 1989).

L'étude clinique des traitements est actuellement plutôt confirmée à l'aide du modèle de chien GRMD, dont les signes cliniques sont plus proches de ceux des patients atteints de DMD. Cet animal présente des signes importants et progressifs (posture anormale, défaut de locomotion, dégénérescence musculaire, fibrose, adipogénèse, insuffisance respiratoire et cardiomyopathie dilatée (Kornegay et al. 2012)) mais il existe de nombreuses variations cliniques inter-individuelles, du fait sans doute des variations génétiques entre individus (il ne s'agit pas de souches pures ainsi que c'est le cas chez la Souris). Ce modèle présente une mutation spontanée dans le 6^{ème} intron du gène canin de la dystrophine qui entraîne un

épissage alternatif provoquant l'apparition d'un codon stop prématuré et la terminaison de la traduction (le modèle ne produit pas de dystrophine fonctionnelle). Ce modèle animal est proche, en taille et en poids des jeunes patients DMD, ce qui pourrait permettre une transposition des traitements des animaux vers l'homme, mais plusieurs limitations existent telle que la structure du système musculaire, le mode de locomotion, le système immunitaire, le mode d'alimentation et de digestion.

De nombreux autres modèles intermédiaires entre la souris et le chien ont été utilisés. Ils sont apparus spontanément dans les colonies, ont été obtenus par croisement ou grâce aux avancées dans l'ingénierie génétique. Des modèles de rat, de chat, de mini-cochon (Klymiuk et al. 2013 ; Larcher et al. 2014) ont rejoint plus récemment les modèles immunodéficients permettant de réaliser des greffes cellulaires sans rejet immunologique dans des contextes xénogéniques tels que des greffes de cellules humaines injectées dans des modèles murins.

Ces modèles permettent de tester de nouvelles hypothèses thérapeutiques, notamment cellulaires lors d'études pré-cliniques avant d'envisager des études cliniques sur de petites cohortes de patients atteints de DMD. Ces modèles fournissent aussi des informations intéressantes quand à la biologie musculaire, lorsque leurs tissus sont accessibles. Au cours de nos études, nous avons ainsi pu étudier les contenus cellulaires des muscles pathologiques de ces modèles, grâce à des collaborations.

117. Les traitements de la DMD

Différentes approches pour tenter de traiter les symptômes de la DMD ont émergé au cours des années. Elles reposent presque toutes sur la restauration de l'expression de la dystrophine, généralement sous une forme tronquée mais partiellement fonctionnelle, pour augmenter la résistance et la force musculaire générée par le muscle squelettique. Néanmoins, alors que certaines proposent de corriger l'absence d'expression du gène de la dystrophine par une supplémentation transgénique, par une modulation des mécanisme d'épissage (saut d'exon), par une modulation de traduction (translecture des codons stop) ou par une modification des séquences mutées (chirurgie génique par des nucléases), des stratégies que l'on pourrait qualifier de « thérapie génique », d'autres approches proposent de transplanter directement de nouveaux progéniteurs musculaires au sein des tissus malades, dans le but d'apporter un potentiel frais de régénération tissulaire, en même temps que des cellules contenant un gène non muté susceptibles de former des fibres musculaires saines. A l'heure

actuelle, il n'y a cependant pas de traitement curatif disponible pour la DMD mais uniquement un traitement palliatif aux corticoïdes.

a) Le traitement aux corticostéroïdes

Le traitement hebdomadaire aux corticostéroïdes est devenu un standard pour les patients encore ambulants. Bien que le mécanisme d'action reste encore peu connu dans cette indication thérapeutique, il passe probablement par une réduction globale des mécanismes inflammatoires, la modulation des événements cellulaires tels que l'apoptose, l'inflammation, la régulation de la concentration calcique et la myogenèse. Ce traitement permet une amélioration de la force musculaire des patients (Bushby et al. 2004). Son utilisation est fortement recommandée pour les patients vers l'âge de 4-6 ans puisqu'ils peuvent encore se déplacer de façon autonome mais elle est non-indiquée pour ceux de moins de 2 ans (Bushby et al. 2010). Un début de traitement avant la perte de l'ambulation permet une préservation de la force des membres supérieurs, une réduction de la progression de la scoliose et un retard dans la diminution des fonctions pulmonaires et cardiaques (Moxley et al. 2010). Sur le long terme, les corticoïdes permettent de retarder de plusieurs années la perte de l'ambulation et le recours à la ventilation non-invasive, de réduire le recours aux opérations orthopédiques, d'augmenter la fonction cardiopulmonaire et d'améliorer globalement l'espérance de vie et sa qualité (Shapiro et al. 2014). Le médecin joue un rôle primordial en équilibrant le traitement, en mettant en balance les effets bénéfiques contre les effets secondaires, qui peuvent être nombreux et invalidants (ostéoporose, obésité, alopecie, immunosuppression, altération de l'humeur...).

b) La thérapie génique

Le développement de stratégies de thérapie génique se heurte à de nombreuses difficultés. Tout d'abord, les mutations dans ce gène géant sont nombreuses. Si l'on veut s'attaquer à la correction de mutations localisées (saut d'exon, chirurgie du gène par des nucléases), il faudra mettre au point des outils personnalisés, en fonction de chaque type de mutation. Si l'on veut supplémer les cellules en transgène fonctionnel, il faut mettre au point des vecteurs, et des transgènes de petite taille qui peuvent s'accomoder des faibles capacités d'empaquetage des vecteurs viraux actuels. Les molécules modificatrices (oligonucléotides, vecteurs viraux, transgènes...) doivent être produites en grandes quantités selon des normes très strictes. Des voies d'administration efficaces doivent être trouvées,

ciblant sinon la totalité de la musculature (qui représente la moitié de la masse corporelle), au moins des territoires vastes et utiles au maintien de la qualité de vie. Enfin, la DMD étant une maladie progressive, il serait pertinent de pouvoir appliquer le traitement avant la disparition des masses musculaires, c'est-à-dire dans la prime enfance.

De nombreuses preuves de concept ont été obtenues dans les modèles animaux (en particulier les souris mdx et les chiens GRMD) ce qui a même permis dans certains cas la réalisation d'essais cliniques. La complémentation génique (qui symbolisait longtemps le terme de « thérapie génique ») s'est appuyée sur la mise au point de mini-molécules d'ADN complémentaires insérables dans les nouvelles générations de vecteurs, représentées principalement par les vecteurs associés aux adénovirus (AAV) dont les capacités d'empaquetage sont inférieures à 5kb (**Figure 11**). Ces mini-dystrophines comportent un domaine central très réduit, mais des extrémités N- et C- terminales complètes, ce qui leur permet de présenter une fonctionnalité suffisante. Leur schéma est basé sur les molécules de dystrophine tronquées naturellement produites par les patients atteints de la myopathie de Becker (évoquée plus haut). Il a été montré assez rapidement que, dans de jeunes souris, après injection des vecteurs, 65% des fibres musculaires exprimaient le transgène, et les muscles étaient plus résistants aux contractions et capable de générer de la force musculaire ([Kobinger et al. 2003](#)). Après de nombreuses validations, un essai thérapeutique incluant 6 patients souffrant de DMD a été rapporté. Celui-ci comprenait plusieurs doses d'AAV de sérotype 2 (AAV2) contenant une minidystrophine, injectées dans les muscles biceps ([Mendel et al. 2010](#)). L'ADN viral a été retrouvé dans toutes les biopsies prélevées à différents moments, mais la présence d'une importante infiltration de lymphocytes a suggéré une réponse immune des cellules T imprévue lors de l'établissement des protocoles. Ainsi, l'immunogénéité des vecteurs entraîne actuellement une réponse systémique immune, ce qui pose question concernant cette stratégie ([Konieczny et al. 2013](#)). Dès lors, le contrôle de la réponse immunitaire semble indispensable pour envisager des traitements répétés d'un même patient. De plus, un grand nombre de patients, comme la population générale, ont développée une immunorésistance à ces types de virus au cours de leur vie. D'autres approches sont à l'étude et présentent des résultats encourageants.

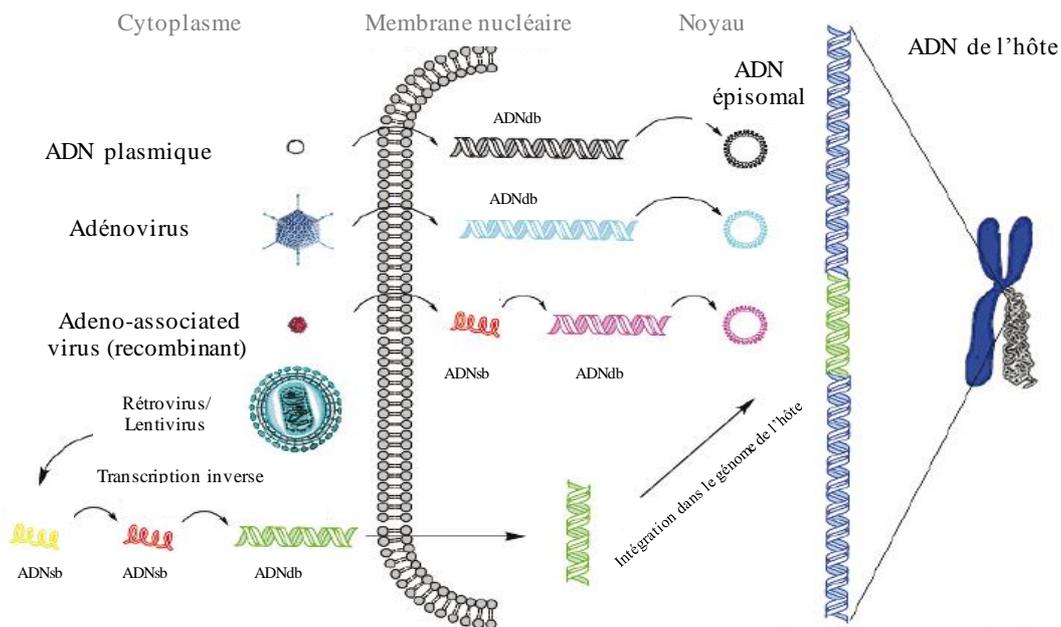


Figure 11 : Stratégies de thérapie génique. De nombreuses stratégies ont été envisagées ou développées pour tenter d'introduire des transgènes au sein des cellules ou des fibres musculaires. Alors que les plasmides nus ou associés à des vecteurs non viraux (lipides...) ne sont pas suffisamment efficaces, les vecteurs adénoviraux ne sont pas tout à fait sûrs et sont très immunogènes. Les rétrovirus peuvent s'intégrer au génome de cellules répliquatives, ce qui peut constituer un avantage dans certains cas (transfection de cellules souches) mais une limitation dans d'autres (les fibres musculaires sont post-mitotiques ; les intégrations peuvent être aléatoires). Les AAV sont très efficaces, non intégratifs, mais de faible capacité d'emballage et immunogènes. (ADN simple brin, ADNsb ; ADN double brin, ADNdb). Figure adaptée de Lyon et al. 2008.

c) Le traitement par saut d'exon

De par sa longueur et sa structure en 3 dimensions, la dystrophine possède de nombreux domaines répétitifs. Ceci suggère la possibilité d'exclusion d'exons dans l'ARNm au cours de l'épissage alternatif, ce qui permet d'obtenir une protéine fonctionnelle partiellement conservée (**Figure 12**). De plus, il n'est pas nécessaire, pour retrouver ou préserver une fonction musculaire, d'exprimer la dystrophine à 100% de son niveau naturel, plusieurs études indiquant qu'un niveau de 30-60% d'expression de la protéine devrait suffire (**Muntoni et Wells 2007**). Le saut d'exon est un épissage de l'ARN pour « sauter » les exons contenant les défauts, ou pour sauter des régions entières qui ne sont plus en phase du fait d'une mutation en amont (**Figure 12**). Le saut d'exon produit finalement une protéine tronquée mais partiellement fonctionnelle. Plusieurs modulations de l'épissage sont possibles grâce aux oligonucléotides anti-sens (AONs), molécules nucléotidiques synthétiques capables de lier les régions introniques ou exoniques des sites de l'ARNm ou de modifier les événements d'épissage. Ainsi, dans le cas de la DMD où la protéine dystrophine est prématurément tronquée et conduit à une protéine non-fonctionnelle, le saut d'exon permet de restaurer la

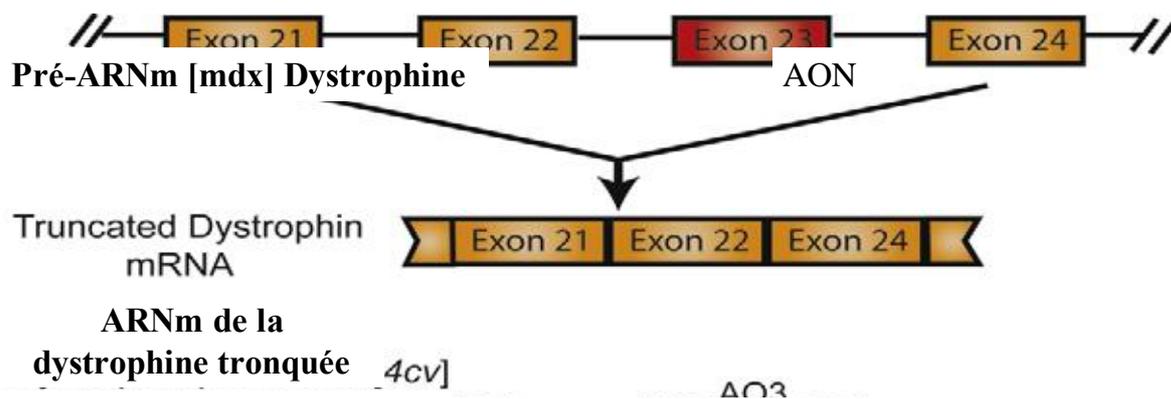


Figure 12 : Stratégie d'oligonucléotides anti-sens dans la Souris mdx. L'utilisation d'oligonucléotides anti-sens dirigés contre le site donneur de l'exon23 (contenant un codon- stop prématuré) permet d'exclure cet exon lors de l'épissage, ce qui forme une protéine dystrophine tronquée d'un exon mais fonctionnelle. Figure modifiée de Arnett et al. 2009.

phase de lecture dans le gène (Touznik et al. 2014). Au moins 20% des patients de DMD ont une mutation de l'exon 51, mais 63% des patients DMD ont un génotype permettant des approches multiples de saut d'exon (Aoki et al. 2012) (Helderman-van den Enden et al. 2010).

Des essais cliniques récents ont été conduits pour permettre un saut de l'exon 51 dans les patients DMD afin d'améliorer leur phénotype clinique. Ainsi, l'administration systémique d'oligonucléotides anti-sens PRO051 a montré une efficacité dépendant de la dose administrée et une augmentation modeste des scores du test de marche de 6 minutes après 12 semaines de traitement (Goemans et al. 2011). Certains essais cliniques ont été décevants, mais des progrès sont attendus dans la synthèse des familles d'oligonucléotides et les voies d'administration. Il faudrait donc confirmer ces améliorations de l'ambulations dans des études à plus grandes échelles. De grands groupes pharmaceutiques se sont déjà investis dans le champ du traitement des maladies rares par ces approches de saut d'exon.

d) Le traitement par translecture des codons stop prématurés

Certaines molécules (notamment de la famille des aminosides) présentent la capacité de gêner, par une liaison spécifique et un encombrement stérique, la lecture des codons stop par les ARNs de transfert. Lors de la lecture, le codon stop n'est donc pas interprété comme tel, mais remplacé par un acide aminé (Figure 13). La production de la protéine n'est pas arrêtée, mais une protéine légèrement différente est produite et cela n'altère pas systématiquement sa fonctionnalité. Environ 15% des patients atteints de DMD présentent une mutation de type codon stop. La souris mdx présente aussi une mutation introduisant un codon stop, et elle a

été utilisée pour rechercher des composés actifs dans cette translecture. Ainsi, l'Ataluren (PTC124), active par voie orale, a été développée pour traiter des patients atteints de maladies génétiques de type mutation non-sens. Elle est en développement pour traiter les patients DMD présentant une mutation non-sens (**Figure 13**). Après le succès d'une étude de phase IIa (innocuité et tolérance) conduite sur 38 patients ambulants et non-ambulants une étude en double-aveugle, randomisée avec des placebos a été menée pour évaluer l'innocuité et l'efficacité d'un traitement de 48 semaines sur 174 patients DMB et DMD [ClinicalTrials.gov identifier : NCT00592553]. Les résultats ont été décevants, cependant, ce traitement pourrait se montrer efficace pour certaines catégories de patients, toutes les mutations stop n'étant pas équivalentes, dans leur nature et leur environnement nucléotidique.

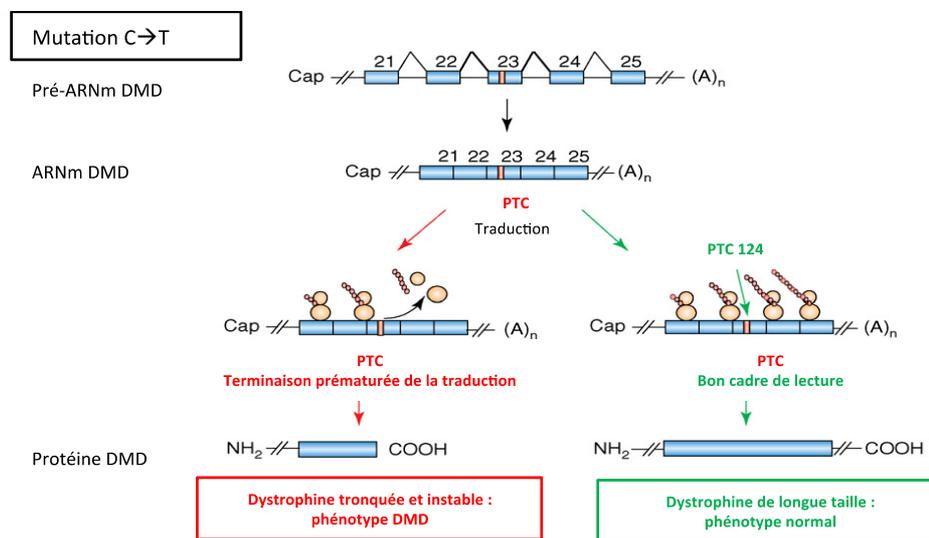


Figure 13 : Stratégie de translocation des codons stop prématurée. La traduction de l'ARNm s'arrête normalement lors de la rencontre d'un codon stop. Certaines molécules peuvent permettre de confondre ce codon stop, et de continuer l'incorporation des acides aminés, ce qui permet la synthèse finale d'une protéine légèrement modifiée, mais souvent fonctionnelle. Figure adaptée de Leroy et al. 2009.

12. Les muscles cardiaques

121. La description macro- et microscopique des muscles striés cardiaques

Le muscle cardiaque, formé de 4 cavités (2 oreillettes et 2 ventricules), met en circulation le sang dans le réseau vasculaire pour approvisionner les cellules en nutriments et en oxygène tout en excréant les déchets produits par ces derniers. Il est composé de couches laminaires séparées par des feuillets de tissu conjonctif (Zhang et al. 2012). Le myocarde est composé de cellules musculaires allongées plus courtes que celles des fibres squelettiques, les cardiomyocytes, d'un tissu conjonctif fibreux (collagène de type I, protéoglycanes,

glycoprotéines) (Reinks et al. 2014), et d'un réseau vasculaire complexe, efficace, à haut débit. Les cardiomyocytes établissent des contacts directs entre eux ; par leurs extrémités adjacentes, grâce aux disques intercalaires (jonctions adhérentes, desmosomes, jonctions « gap ») (Estigoy et al. 2009) pour créer un pseudo-syncytium fonctionnel. Leurs cytoplasmes présentent une organisation identique à celles des fibres musculaires, avec des striations, mais aussi une surface mitochondriale importante (Neary et al. 2014). De part et d'autre du myocarde deux tissus épithéliaux simples sont retrouvés : l'épicaire qui sépare le myocarde du feuillet pariétal du péricarde séreux tandis que l'endocarde est au contact du sang circulant (Figure 14). Le muscle cardiaque connecté au système nerveux autonome est continuellement actif, contrairement aux muscles squelettiques. Il est donc très dépendant du métabolisme oxydatif, notamment dépendant des lipides (Goldbert et al. 2012).

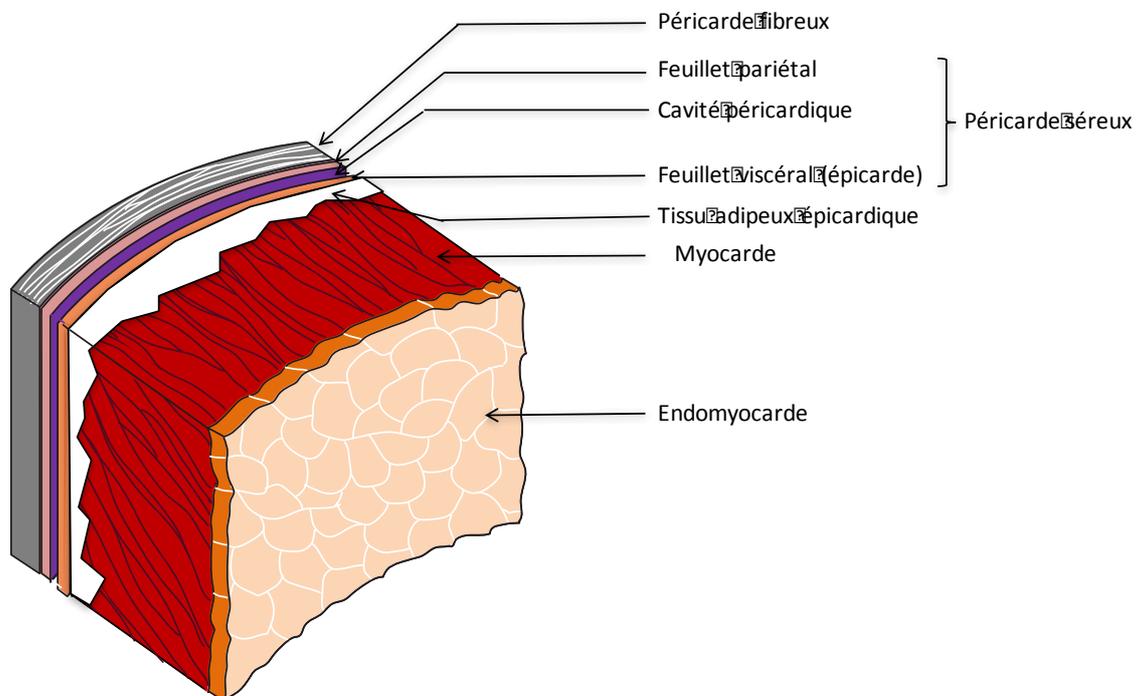


Figure 14 : Organisation des couches concentriques du muscle cardiaque. Le péricarde est constitué de deux groupes de feuillets séparés par un fluide lubrifiant : le péricarde fibreux formé de tissu conjonctif dense entoure et protège le tissu musculaire cardiaque ainsi que le péricarde séreux constitué d'un feuillet pariétal et un feuillet viscéral (épicaire). Le myocarde est infiltré par un tissu adipeux épicaire. Un épithélium squameux unistratifié, l'endocarde sépare le myocarde du sang circulant. Figure adaptée d'une planche illustrative Servier Medical Art (<http://servier.fr/slidekit/?item=106>).

Plusieurs populations cellulaires sont aussi retrouvées dans le muscle cardiaque, comme nous l'avons vu dans la partie 11. pour le muscle squelettique. L'existence de cellules souches cardiaques multipotentes (Beltrami et al. 2003) est controversée, et serai net trop peu nombreuses pour régénérer le tissu, notamment après un infarctus. Les fibroblastes cardiaques

sont capables de moduler et interagir avec la MEC interstielle, via des sécrétions de cytokines. Des cellules immunitaires résidentes, comme des macrophages ou des mastocytes, peuvent aussi libérer des molécules fibrotiques et inflammatoires, ce qui peut contribuer au remodelage du tissu cardiaque (Aldi et al. 2015 ; Frangogiannis et al. 1998).

Deux types d'activité lui permettent d'assurer sa fonction :

- Une activité intrinsèque ou électrique des cardiomyocytes (**Figure 15**) : le tissu nodal génère un influx ionique au niveau du nœud auriculo-ventriculaire pour contracter en rythme les fibres musculaires cardiaques des ventricules, après modulation dans le nœud auriculo-ventriculaire et transmission via le faisceau de His et le réseau de Purkinje.
- Une activité extrinsèque ou mécanique : contraction et relaxation du muscle cardiaque de manière continue.

Maintaining the Heart's Rhythmic Beat

- The impulses that travel during the cardiac cycle can be recorded as an electrocardiogram (ECG or EKG).

1 Pacemaker 2 Signals are delayed 3 Signals pass 4 Signals spread

Figure 15 : Etapes de la progression de la contraction cardiaque et composantes correspondantes sur un électrocardiogramme. Le nœud sinusal, situé à même la paroi du haut de l'oreillette droite, donne naissance à une onde excitatrice (1) qui permet le battement cardiaque. Cette onde parcourt le tissu musculaire des deux oreillettes, gagne le nœud auriculo-ventriculaire (2) pour être transmise aux parois des deux ventricules (4) après distribution dans les faisceaux de His (3) et les fibres de Purkinje (4).

122. Le couplage excitation/contraction des muscles cardiaques

Le muscle cardiaque se contracte de façon autonome grâce aux cardiomyocytes situés au niveau du nœud auriculo-ventriculaire de l'oreillette droite. Les cellules nodales génèrent un potentiel d'action automatique (Boyett et Dobrzynski 2007) qui se propage dans les oreillettes, le faisceau de His, les fibres de Purkinje pour rejoindre les ventricules où un processus de contraction du myocarde similaire à celui des muscles squelettiques se réalise

(**Figure 15**), à l'exception du fonctionnement d'une synapse. Le potentiel d'action se propage de cellule en cellule par les jonctions « gap » ([Beauchamp et al. 2004](#)) qui connectent les cytoplasmes de cardiomyocytes adjacents grâce aux connexines (Cx43) des disques intercalaires ([Gourdie et al. 1991](#)). Les jonctions « gap » interagissent aussi avec des protéines des jonctions adhérentes ([Zemljic-Harpf et al. 2014](#)), des desmosomes ([Sato et al. 2011](#)) et des canaux sodiques voltage-dépendants ([Westenbroek et al. 2013](#)).

13. Les muscles lisses

Le but de ce paragraphe n'est que de préciser certains éléments anatomiques et physiologiques des muscles lisses. En effet, ils sont peu touchés ou secondairement dans les dystrophies (notamment, DMD, DMFSH et DMOP) que nous avons vu dans la **partie 115**, cependant ils sont encore peu étudiés sur les plans cliniques et fondamentaux. Les muscles lisses composent la paroi des organes creux tels que l'estomac, l'œsophage, les bronches, la vésicule biliaire, la vessie ainsi que les parois des vaisseaux sanguins, des voies aériennes, de l'intestin.

Deux grandes familles peuvent être distinguées :

- Le muscle lisse unitaire ou viscéral : la stimulation d'une fibre entraîne un potentiel d'action qui se propage aux fibres adjacentes et entraîne leur contraction.
- Le muscle lisse multi-unitaire : la stimulation d'une fibre n'entraîne que sa propre contraction puisqu'elle est individualisée.

Les cellules musculaires lisses sont fusiformes, mononuclées, de taille variable (20 à 200 µm) avec un noyau en position centrale et possèdent un réticulum peu développé. Les myofilaments fins d'actine et épais de myosine ne se chevauchent pas pour créer les effets de striation visibles au microscope, sur des coupes de muscles lisses, comme observés pour des coupes de muscles squelettiques ou cardiaques. En absence de tubules transverses, la contraction involontaire d'une fibre lisse commence lentement et dure plus longtemps que celle d'une fibre squelettique. Ce processus permet de maintenir le tonus musculaire jusqu'à la fin du travail des structures associées. Enfin, les cellules musculaires lisses ont une plasticité phénotypique ([Alexander et al. 2012](#)) : elles peuvent être contractiles, prolifératives ou productives et sécrétoires au cours du développement ou en réponse à des stimuli de l'environnement. En cela, elles diffèrent des cellules musculaires squelettiques et cardiaques qui sont totalement différenciés.

2. La thérapie cellulaire

Les cellules souches jouent un rôle majeur aussi bien dans le développement que dans la maintenance de nombreux tissus et organes (Price et al. 2007). En fonction de leurs capacités de différenciation dans des lignages, elles ont été classées en trois catégories (Parkinson 1992) (**Figure 16**). Elles sont dites pluripotentes (totipotentes) quand elles peuvent être dérivées dans les trois lignages de l'embryon (endoderme, ectoderme et mésoderme) et sont appelées cellules souches embryonnaires (ES). Elles sont dites multipotentes lorsqu'elles se différencient en plusieurs types cellulaires d'un seul et même lignage : les cellules souches hématopoïétiques (CSH) ou les cellules souches nerveuses (CSN) en sont des exemples. Enfin, les cellules unipotentes ou progéniteurs ne donnent qu'un seul type cellulaire, par exemple, les kératinocytes.

La thérapie basée sur l'utilisation des cellules souches repose sur leur capacité à s'autorenouveler et à se différencier dans de nombreux lignages cellulaires. Elle est considérée comme l'une des méthodes prometteuses pour traiter de nombreuses pathologies : la maladie de Parkinson (Ourednik et al. 2002), la lésion de la moelle épinière (Teng et al. 2002), les scléroses multiples (Pluchino et al. 2003), la sclérose latérale amyotrophique (Clement et al. 2003), l'accident vasculaire cérébral (Liu et al. 2009), la dégénérescence rétinienne (Li et al. 2006), la maladie d'Alzheimer (Barnham et al. 2004), l'infarctus du myocarde (Jackson et al. 2001)...

21. Les cellules progéniteurs myogéniques

Depuis la découverte et la caractérisation de cellules souches musculaires par Mauro (1961), de nombreux autres types cellulaires présents dans le tissu musculaire, ou circulants, ont démontré des potentiels d'engagement dans un lignage musculaire aussi bien lors d'études menées *in vitro* qu'*in vivo*.

211. Les cellules souches musculaires (cellules satellites)

Au sein des muscles squelettiques, les cellules souches musculaires sont généralement assimilées aux cellules satellites, considérées comme les principaux progéniteurs myogéniques. Elles assurent la croissance, l'homéostasie et la régénération des muscles squelettiques (Péault 2007 ; Tedesco et al. 2010). Les cellules satellites restent quiescentes sous la lame basale des fibres musculaires (Schultz et al. 1978), avec lesquelles elles sont en contact étroit (**Figure 17**).

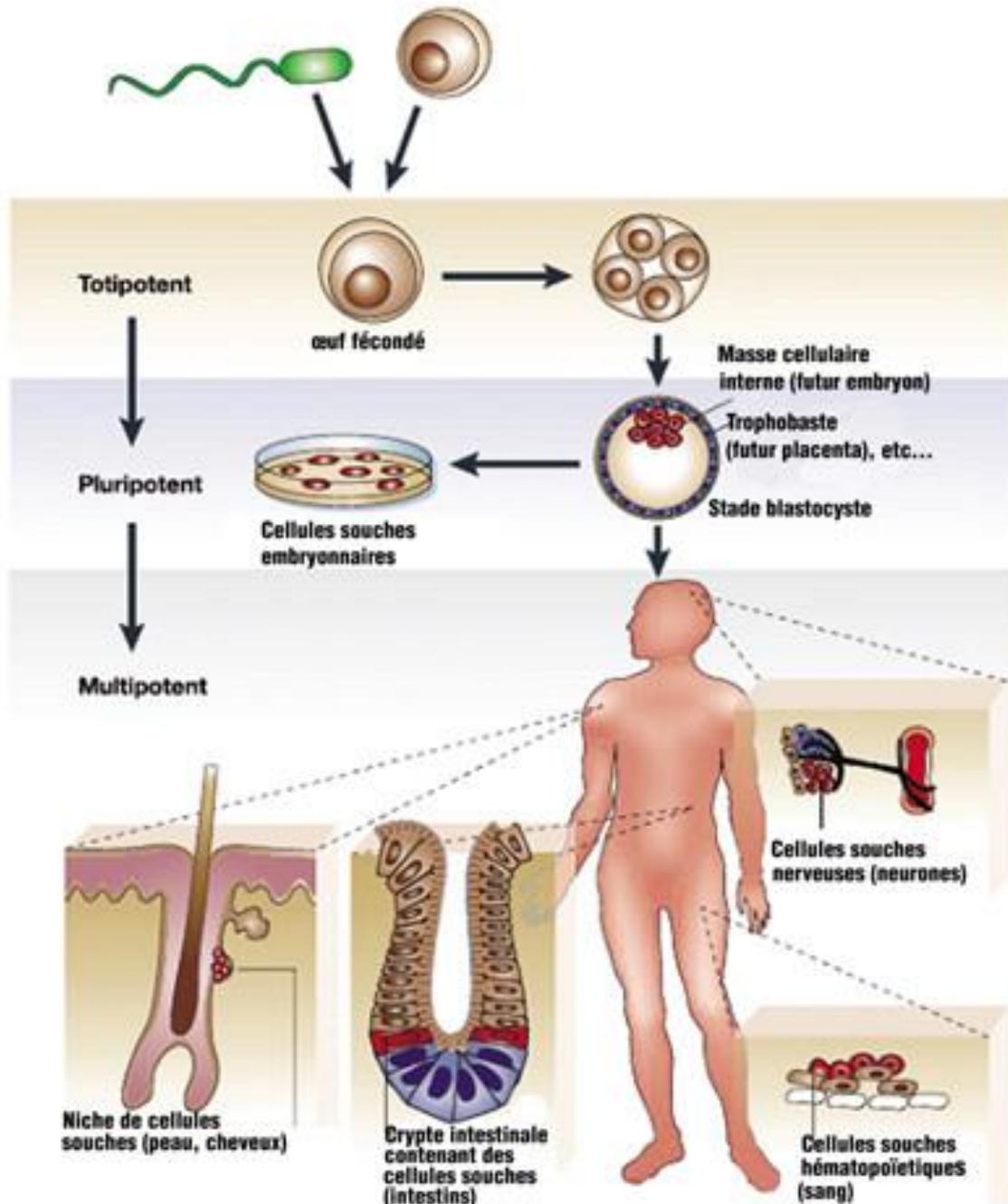


Figure 16 : Potentiels de différenciation des cellules souches. Issues d'un ovule fécondé, les cellules totipotentes sont les seules cellules capables de donner naissance à un individu complet. Les cellules pluripotentes génèrent tous les tissus de ce dernier et donnent par divisions successives des cellules multipotentes, à l'origine de plusieurs types cellulaires d'un même lignage.

<http://imagesbiogeolfxm.free.fr/clonage/original/cellules%20souches.html>

En réponse aux signaux biochimiques, électriques ou mécaniques de leur environnement, elles s'activent pour donner naissance aux myoblastes qui fusionneront en vue de donner des fibres musculaires ou assurer une réparation localisée (Hawke et Garry, 2001 ; Wagers et

Conboy 2005). Les cellules satellites sont capables aussi de s'autorenouveler par division asymétrique (Kuang et al. 2007).

Les cellules satellites sécrètent de nombreuses cytokines et sont hétérogènes : elles présentent des différences (i) phénotypiques, (ii) de potentiel de différenciation, (iii) d'expression de marqueurs transmembranaires selon les espèces ou les muscles considérés, (iv) d'induction de facteurs de transcription myogéniques, (v) et de caractéristiques prolifératives *in vivo et in vitro* (Beauchamp et al. 2000 ; Boldrin et al. 2009 ; Collins 2005 ; Day et al., 2007 ; Lecourt 2010 ; Montohashi et Asakura 2014 ; Perez-LLzarbe 2008 ; Rouger et al. 2004 ; Sherwood et al. 2004 ; Ten Broek et al. 2010). Rocheteau et al. (2012) ont mis en évidence au moins deux populations de cellules satellites sur la base de l'expression de Pax7. Une forte expression conférerait un phénotype « souche » aux cellules satellites : prolifération moins rapide, métabolisme plus faible et capacités de différenciation limitées. De plus, différentes sous-populations ont été distinguées sur la base d'expression de protéines telles que les intégrines α -7 (CD49g) ou β 1 (CD29), c-met, CD34, le récepteur à la calcitonine, le récepteur chémokine de type 4 C-X-C (CXCR4, aussi connu sous le nom de CD184), la M-Cadherine, Myf5, la molécule d'adhésion cellulaire neuronale 1 (N-CAM1, aussi connu sous le nom de CD56), les syndecans 3 et 4 et la molécule d'adhésion cellulaire vasculaire 1 (V-CAM1, aussi connu sous le nom de CD106) (Beauchamp et al 2000 ; Blanco-Rose et al. 2001 ; Cornelison et al. 2001 ; Cornelisson et Wold 1997 ; Fukada et al. 2007 ; Rosen et al. 1992 ; Ikemoto et al. 2007 ; Kuang et al. 2007 ; Kafadar et al. 2009 ; Tamaki et al. 2002 ; Sherwood et al. 2004). Nous reverrons plus en détail les marqueurs transmembranaires associées aux populations musculaires dans la **partie 232**. A notre connaissance et à ce jour, aucune étude intégrant l'ensemble des marqueurs ci-dessous n'a été conduite pour confirmer la présence des sous-populations distinctes. De plus, certains des marqueurs sont spécifiques humains ou murins.

Pour le moment, les cellules satellites sont les acteurs intervenant dans la myogenèse les plus documentées. Néanmoins d'autres types cellulaires sont capable d'engager un programme musculaire via le lignage des cellules satellites utilisant l'expression de Pax7 (Pannerec et al. 2012) ou dans un lignage distinct. J'ai choisi de présenter plus en détail quelques uns des candidats envisagés ou utilisés pour des approches thérapeutiques : il s'agit des cellules de la « side-population » musculaire, des péricytes, des mésoangioblastes, des cellules circulantes CD133, des cellules MDSC et des cellules embryonnaires (Dellavalle 2007 ; Gussoni, 1999 ; Liadaki et al. 2012 ; Mitchell 2010 ; Sampaolesi 2003 ; Torrente 2004).

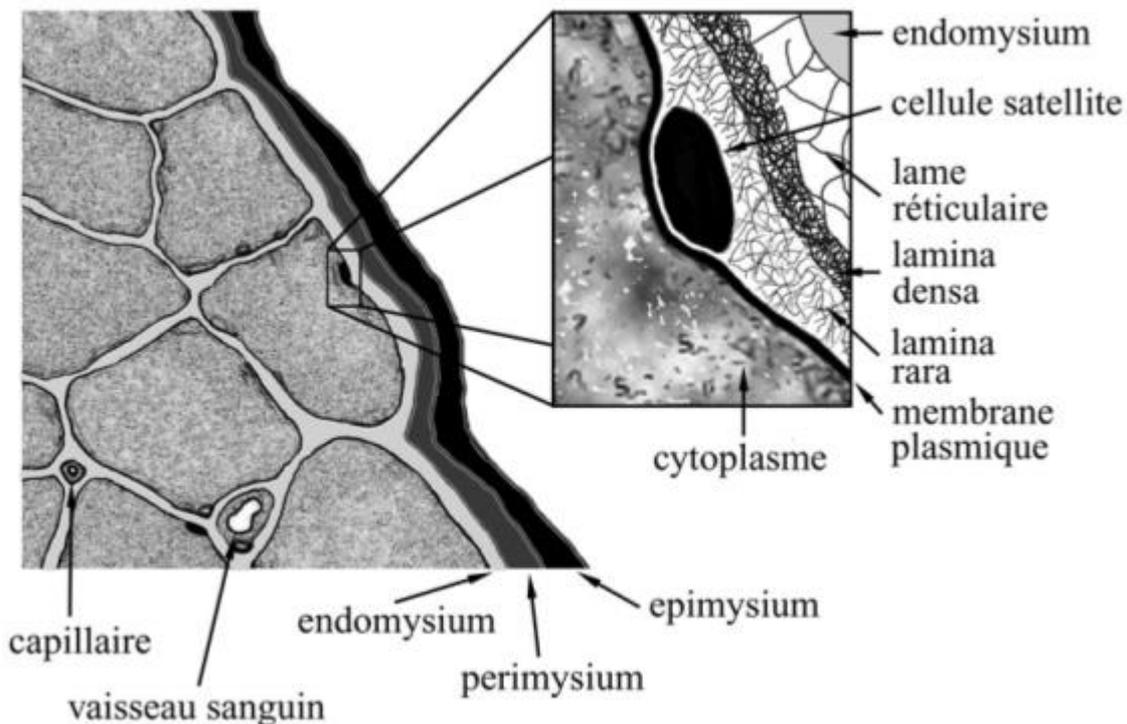


Figure 17 : Localisation des cellules satellites dans leur niche au sein du muscle squelettique. Les cellules satellites sont quiescentes sous la lame basale. Les principaux éléments qui structurent le muscle sont aussi représentés comme les trois couches de tissus conjonctifs, les capillaires et les vaisseaux sanguins. D'après la thèse de Nicolas Caron, Université Laval, Québec, Canada.

212. Les autres progéniteurs musculaires

a) La « side population » musculaire

Les travaux de purification de la « side population » (SP), ou population marginale, des cellules de la moelle osseuse ont été optimisés pour isoler des cellules SP issues de muscles squelettiques murins. Cet isolement est basé sur la capacité d'exclusion des colorants nucléaires tels que le Hoechst 33342 qui possède un faible pourcentage de cellules, et qui fait appel à un mécanisme de transport actif via l'action de transporteurs spécifiques (ATP-binding cassette sub-family G member 2, ABCG2). La population ayant exclu ce colorant fluorescent est légèrement décalée (« marginale », ou « side ») et peut être séparée et isolée par cytofluorimétrie de flux (Fluorescence-activated cell sorting, FACS). Cette population exprime le marqueur Sca1, mais pas le marqueur CD45, exprimé lui uniquement par des cellules SP issues de la moelle osseuse. De plus, les cellules SP issues des muscles squelettiques représentent une population différente des cellules satellites. Elles ont une localisation anatomique différente et elles sont retrouvées dans des souris mutées *Pax7^{-/-}* (nulle) déficientes en cellules satellites. *In vitro*, elles adoptent une destinée myogénique et expriment des marqueurs de cellules satellites activées. Enfin, des expériences ont démontré

la possibilité d'injection intraveineuse de ces cellules au sein de souris mdx. Cependant, il n'est pas aisé d'expandre ces cellules *in vitro*, et leur isolement pose des problèmes méthodologiques et de sécurité, dans une perspective clinique. En effet, les colorants vitaux sont génotoxiques, potentiellement mutagènes et la cytométrie de flux n'est généralement pas recommandée pour la préparation de cellules à usage clinique au vu des risques de contamination mais aussi d'éventuels dommages causés aux cellules.

b) Les Péricytes et les cellules souches mésenchymateuses

Les péricytes, les cellules souches mésenchymateuses (CSM) et les cellules adventitielles sont proches aussi bien sur le plan anatomique que fonctionnel (Armulik et al. 2011 ; Corselli et al. 2010 ; Péault et al. 2007 ; Sanricca et al. 2010). Les péricytes forment un groupe hétérogène de cellules périvasculaires, présentes dans de nombreux tissus, capables de se contracter pour modifier la perméabilité locale des microvaisseaux (Armulik et al. 2011). Ils proviennent du sclérotome embryonnaire et sont décrits comme des régulateurs du flux sanguin des capillaires (Kutcher et al. 2009 ; Pouget et al. 2008 ; Peppiatt et al. 2006). Elles expriment essentiellement la phosphatase alcaline, l'actine musculaire lisse α , homing cell adhesion molecule (H-CAM) aussi connue sous le nom de CD44, la molécule d'adhésion cellulaire des mélanomes (M-CAM) aussi connue sous le nom de glycoprotéines de surface MUC18 ou de CD146, l'antigène neural/glial 2 (NG2), le récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFR β , aussi connu sous le nom de CD140b), et peuvent se différencier en cellules ressemblant aux CSM (Covas et al. 2008 ; Crisan et al. 2008 ; Delavalle et al. 2007 ; Sampaolesi et al. 2006).

Le tissu musculaire squelettique contient en effet aussi des cellules s'apparentant, par leur phénotype et leurs capacités de différenciations *in vitro*, à des cellules souches mésenchymateuses (CSM). Certaines d'entre elles en effet expriment le CD146, qui serait donc un marqueur exprimé à la fois par des péricytes et des CSM. Cependant deux autres populations majoritaires apparaîtraient ensuite en culture (Lecourt et al 2010) : une population exprimant primitivement CD34 puis rapidement CD15, et une population n'exprimant pas primitivement CD34, ni CD15, mais CD56. Les deux populations expriment CD13, CD29, CD44, CD47, CD49, CD73, CD90, CD105, CD166, marqueurs fréquemment exprimés par les cellules mésenchymateuses (Lecourt et al 2010). La population initialement CD34+ se différencie *in vitro* en cellules adipogéniques, ostéogéniques et chondrogéniques et cette population serait impliquée dans les phénomènes fibro-adipogéniques lors de la régénération

musculaire (Arrighi et al. 2015). La population initialement CD34⁻ se différencie in vitro en cellules myogéniques et ostéogéniques. Seules les cellules initialement CD34⁻ et exprimant en culture CD56 sont capables de différenciation myogénique in vivo par voie intramusculaire directe.

Les mésoangioblastes ont été caractérisés à des stades embryonnaires et fœtaux du développement. Ils composeraient un groupe particulier de péricytes chez l'adulte (Delavalle et al. 2007 ; Sampaolesi et al. 2006). Plusieurs populations cellulaires semblables aux cellules périvasculaires et associées soit aux vaisseaux soit aux fibres musculaires, ont été décrites comme des cellules myo-endothéliales. L'une de ces populations expriment le CD31 et le CD146 (Cerletti et al. 2006) et la seconde CD34, CD56 et CD144 (Zheng et al. 2007).

La capacité de migration au travers des microvaisseaux fait des péricytes et des mésoangioblastes, des candidats plus intéressants que les myoblastes pour la thérapie cellulaire puisque ces cellules pourraient ainsi être distribuées largement dans les tissus musculaires. Elles sont d'ailleurs étudiées pour leurs capacités réparatrices dans différents modèles de la DMD, des dysferlinopathies et de la DMFSH (Diaz-Manera et al. 2010 ; Morosetti et al. 2011 ; Sampaolesi et al. 2006). Cependant, la méthodologie de préparation des mésoangioblastes est souvent basée sur des caractérisations rétroactives ce qui introduit des variations dans les cultures (rendement, qualité) et peut expliquer les différences de résultats observées entre laboratoires (Meng et al. 2011). En effet, malgré de bons résultats obtenus lors des études de greffes de mésoangioblastes et de cellules apparentées aux péricytes par voie systémique chez l'animal, de nombreuses variations ont été rapportées (Diaz-Manera 2010 ; Meng et al. 2011 ; Sampaolesi et al. 2006). Récemment testée en clinique, la transplantation de mésoangioblastes allogéniques n'a pas permis de restaurer l'expression de dystrophine en quantité suffisante ou encore l'intégration d'un grand nombre de cellules dans les muscles des enfants atteints de DMD (Cossu et al. 2015), soulignant encore une fois les différences qui peuvent apparaître entre les études faites chez les animaux et leur transposition chez l'Homme malade.

c) Les cellules CD133

Une sous-population de progéniteurs cellulaires a été identifiée dans le sang périphérique humain. Elle exprime plusieurs molécules d'adhésions dont CD133 (d'où elle tire son nom), CD34, l'intégrine $\alpha 4$ (very late antigen-4 ; composée de l'intégrine $\beta 1$ ou CD29 et de l'intégrine $\alpha 4$ ou CD49d) et la L-Sélectine (CD62). Ces cellules expriment aussi les MFR

(Pax7, Myf5, MyoD et Myogénine) (Negroni et al. 2009 ; Péault et al. 2007 ; Torrente et al. 2004) Une coculture de ces cellules avec les myoblastes murins C2C12 avant une injection intramusculaire ou intraartérielle permet une régénération des fibres musculaires et une reconstitution de la réserve des cellules souches satellites dans la souris mdx (Torrente et al. 2007). Dans ces études, les cellules CD133 restent dans le tissu musculaire probablement grâce à la présence des marqueurs transmembranaires, VLA-4 et L-Selectin, des récepteurs chémoattracteurs exprimés en réponse à l'inflammation musculaire induite par de l'exercice et les ruptures de l'intégrité des fibres musculaires (Negroni et al. 2009). Ces cellules, présentes en très petites quantités dans les muscles squelettiques, sont très difficiles à amplifier *in vitro*, sans perte de leurs capacités. Elles ont fait l'objet d'une étude clinique (voir ci-dessous), mais en dépit d'espoirs suscités après leur découverte, elles n'ont donc pas été développées beaucoup plus avant.

d) Les « Muscle-derived stem cells » ou MDSC

Les MDSC représentent une population résidente spécifique du muscle squelettique. Au vu de leurs capacités de différenciations revendiquées, bien plus multipotente (non-restreintes aux types myogéniques ou mésenchymateux), elles se positionneraient en amont des cellules satellites (Cao et al. 2003 ; Huard et al. 2003). Ces cellules, obtenues à partir d'une technique d'adhésion différentielle, expriment fortement les marqueurs de surface Sca1 et CD34, mais aussi MyoD. Elles partagent certaines caractéristiques avec une population hématopoïétique qui expriment aussi fortement ces marqueurs de surface (Jackson et al. 1999).

Injectées dans les muscles de la patte ou dans la circulation de souris mdx, les MDSC participent à la régénération musculaire. L'expression de la dystrophine est 10 fois plus importante que celle obtenue après transplantation de myoblastes primaires ; elles s'incorporent aussi aux vaisseaux et aux tissus nerveux environnants (Payne et al. 2005 ; Qu-Petersen et al. 2002 ; Torrente et al. 2001). Cependant, leur localisation intramusculaire est encore inconnue ainsi que leur origine anatomique ou embryonnaire. Certaines études suggèrent qu'elles seraient issues de la moelle osseuse et résideraient dans la musculature (Issarachai et al. 2002) alors que d'autres décrivent une origine purement musculaire (Deasy et al. 2005 ; Mueller et al. 2002). Cette catégorie cellulaire a été initialement décrite aux Etats-Unis. En France, un équivalent probablement assez proche a été développé et nommé MuStem (Rouger et al. 2011). Ces cellules ont été utilisées dans des essais précliniques chez le chien GRMD. Si ce sont de bons candidats pour des traitements thérapeutiques (prolifération facile *in vitro*, possibilité de migration à travers les vaisseaux), un manque

d'augmentation physiologique de l'expression de dystrophine, ainsi qu'un manque de renouvellement à long terme posent des questions quant à leur intégration et à leur mécanisme d'action réel. Aux Etats-Unis, ces cellules ne sont utilisées que dans des essais cliniques de tissus musculaires isolés et de petite taille (thérapie cellulaire de l'incontinence urinaire) (Carr et al. 2008).

e) Les cellules souches embryonnaires

Les cellules souches embryonnaires (ES) peuvent, en principe, être produites en quantités illimitées aussi bien pour des usages de thérapie que de recherche. Jusqu'à très récemment, la différenciation musculaire squelettique était difficile à obtenir à partir des cellules ES. Peu de cellules satellites pouvaient être produites et récupérées par un FACS sur la base de l'expression de marqueurs du mésoderme paraxial (Sakurai et al. 2008). En parallèle, des équipes ont produit des cellules myogéniques par transduction de cellules ES avec des facteurs myogéniques Pax3 et Pax7 ; celles-ci participaient activement à la régénération au sein des modèles de DMD (Darabi et al. 2009 ; Darabi et al. 2011 ; Mizuno et al. 2010). Néanmoins, la transduction cellulaire n'est pas recommandée dans le cadre d'utilisations cliniques puisque ces cellules deviennent des organismes génétiquement modifiés dont l'expression est difficile à contrôler.

Aujourd'hui, des protocoles permettent d'obtenir en quelques semaines des cellules myogéniques à des stades précoces, par ajout de molécules intervenant à différentes étapes dans la myogenèse. Leur efficacité de régénération est actuellement étudiée (Borchin et al. 2013 ; Chal 2015 ; Chal 2016 ; Shelton 2014). Néanmoins, les cellules ES sont immunogènes, par définition, et requièrent donc un traitement immunosuppresseur adapté (Nussbaum et al. 2007).

Les cellules souches induites à la pluripotence (iPS) dérivent de cellules somatiques. Elles sont obtenues par l'expression transitoire de facteurs de différenciation précoces [octamer binding transcription factor 3/4 (OCT 3/4), SRY-box containing gene 2 (SOX2), Kruppel-like factor 4 (KLF4) et c-Myc] (Yamanaka et Takahashi 2006). Il est donc possible de préparer des cellules issues de patients (Wang et al. 2011) pour une utilisation en greffe autologue après correction des défauts génétiques *in vitro*, rendue possible par de nouveaux outils de recombinaison, avant d'induire leur différenciation dans une lignée thérapeutique (Kazuki et al. 2010 ; Tedesco et al. 2012). Toutefois, les cellules iPS peuvent acquérir des caractéristiques immunogéniques en culture (Zhao et al. 2011). Il est encore souvent

nécessaire d'utiliser des outils de transgénèse pour les produire, ce qui n'est pas souhaité pour un usage courant lors de protocoles thérapeutiques.

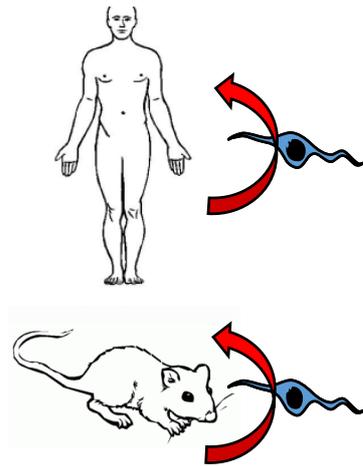
Les cellules ES et iPS représentent de très sérieux candidats thérapeutiques. En effet, il serait possible d'orienter leur différenciation de plus en plus finement afin d'obtenir un candidat injectable par voie systémique. Cependant, il faudra résoudre les difficultés liées à leurs biologies particulières (caractère tumorigène des cellules pluripotentes ; efficacité des protocoles de différenciation et de sélection). Pour le moment, aucune étude ne fait description d'un tel type cellulaire.

La majorité des essais de thérapie cellulaire effectuée pour tenter de traiter la DMD, par les différentes équipes, ont été faite par transplantation intramusculaire de myoblastes. D'autres études ont été menées avec les mésoangioblastes et les cellules positives pour le CD133. Nous commencerons donc par faire l'historique de l'utilisation des myoblastes, en présentant les principales avancées et limites puis nous verrons brièvement les principaux résultats avec les autres candidats de thérapie cellulaire.

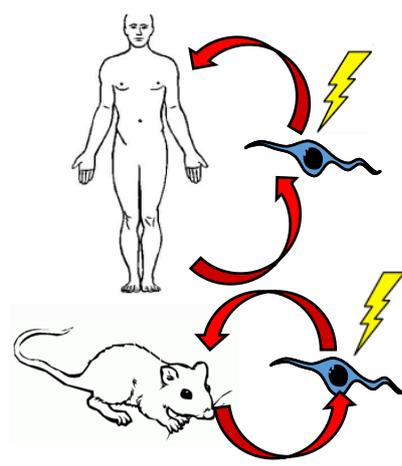
22. Les essais et limites de thérapie cellulaire de la DMD

Il existe schématiquement quatre modalités de thérapie cellulaire en fonction du contexte immunologique et de la nature des cellules utilisées (**Figure 18**). Si toutes quatre, elles peuvent être utilisées sur le plan expérimental dans des animaux modèles, seulement deux ont été utilisées dans des essais cliniques dédiés aux myopathies (Vilquin et al 2011).

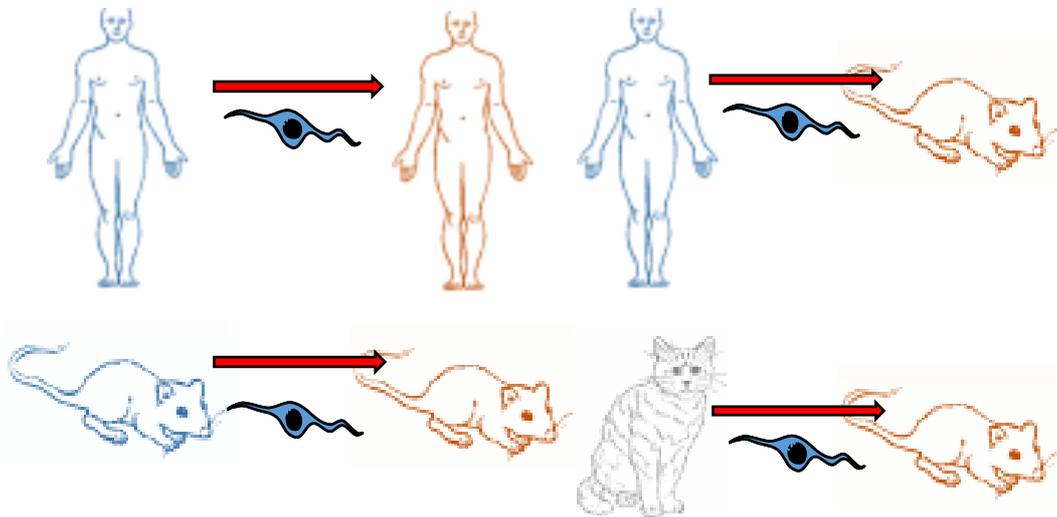
Alors que le transfert autologue propose un traitement local en réimplantant des cellules du patient après expansion (Mendell et Clarke 2006), le transfert allogénique propose d'implanter des cellules issues de patient sain dans un patient atteint de pathologie musculaire (Partridge et al. 2004), néanmoins cette dernière méthode présente des risques de rejet immunologique. Le transfert autologue après modification génétique in vitro est réservé aux maladies rapidement mortelles, ce qui n'est pas le cas des myopathies. Quelle que soit la stratégie considérée, deux voies d'administration peuvent être utilisées : la voie systémique (artérielle ou veineuse) ou intramusculaire (IM). Dans la plupart des premiers essais cliniques conduits sur les patients atteints de la DMD, les cellules satellites ont été cultivées massivement pour produire des centaines de millions ou des milliards de myoblastes qui ont été injectés en IM. La caractérisation des progéniteurs myogéniques a été réalisée au cours de la production grâce au marqueur CD56 (N-CAM).



Greffe autologue ou syngénique
Pas de rejet et réparation localisée
Gènes déficients conservés



Greffe autologue avec modification
Locale ou systémique
Maladies mortelles



Greffe hétérologue ou allogénique
Fortes capacités régénératives
Locale ou systémique
Rejet, Sécurité biologique

Greffe xénogénique
Locale ou systémique
Rejet aigü, Pour modélisation

Figure 18 : les différents contextes immunologiques de greffes de cellules. La modalité autologue est envisagée lorsque les cellules du donneur sont disponibles et fonctionnelles, pour réaliser une réparation localisée (exemple : greffe de peau). Cette approche ne pose pas de problème immunologique. Elle a été utilisée pour les indications de DMOP et DMFSH, où les atteintes musculaires sont localisées. Si la maladie considérée est génétique, le génôme altéré est conservé, et l'amélioration peut n'être que transitoire. La modalité autologue avec modification est envisagée si la mutation est identifiable, corrigeable, et si les cellules peuvent être amplifiées *in vitro* ou *in vivo*. En pratique, elle est réservée à des traitements sans autre option thérapeutique (traitement des enfants-bulles immunodéficients) car les cellules sont génétiquement modifiées. La modalité hétérologue est envisagée si le malade ne peut fournir de cellules, dans ce cas on lui transfère celles d'un donneur (exemple : greffes de moelles allogéniques), ce qui oblige à mettre en œuvre une immunosuppression pour éviter le rejet immunitaire. Sur le plan logistique, la préparation doit aussi éviter le risque de contamination virologique. Cette modalité a été utilisée dans l'indication de la DMD. Enfin, les greffes xénogéniques ne sont pas réalisées en clinique, car elles entraînent des rejets aigus et sont limitées par les incompatibilités moléculaires, mais cette modalité permet de vérifier les qualités des cellules greffées ou d'étudier des types cellulaires en recherche.

221. L'utilisation de myoblastes pour des essais thérapeutiques

a) Utilisation dans la DMD

Historiquement, Patridge et al. (1989) ont démontré que l'injection de cellules musculaires issues de souris contrôles dans les muscles de souris mdx entraîne la fusion des myoblastes, la formation de nouvelles fibres ou de fibres hybrides et l'expression de dystrophine dans celles-ci. Ceci a permis de proposer l'injection intramusculaire (IM) de myoblastes comme un traitement expérimental possible (**Figure 19**). Néanmoins, les essais cliniques de 7 équipes incluant 76 patients atteints de DMD et 6 patients de DMB ont présenté des résultats mitigés (Vilquin et al 2011). Les résultats de ces premiers essais ont été difficiles à interpréter du fait de grandes variations entre les protocoles : (i) emploi de traitements d'immunosuppressions différents (cyclophosphamide, glucocorticoïdes, ciclosporine), (ii) de quantités variables de cellules produites et (ii) injectées de façon simples ou multiples, uniques ou répétées et dans différents muscles (biceps, extenseurs carpiens, tibiaux antérieurs, vastes internes et externes, muscles inter-costaux). En effet, le nombre de cellules injectées, le volume d'injection et la modalité de distribution influent sur le succès des greffes. De plus, l'introduction d'une aiguille dans un muscle induit des dommages locaux favorables aussi bien à la régénération musculaire qu'à la fusion des myoblastes. Il a été observé que la formation de grandes poches cellulaires au site d'injection augmente la mortalité aigüe et entraîne l'inflammation et la nécrose (Pellegrini et al. 2011 ; Skuk et al. 2007).

Les principaux obstacles aux succès de ces greffes ont été identifiés successivement : (i) une mort immédiate abondante, (ii) une migration limitée à partir du site d'injection, (iii) un rejet immunologique du receveur ; néanmoins, l'injection intramusculaire a bénéficié de nombreuses améliorations dont les patients des essais cliniques suivants ont bénéficié (Skuk et al. 2006 ; Skuk et al. 2007 ; Richard et al. 2010). De nouvelles techniques d'injection ont permis d'améliorer la distribution cellulaire au sein des muscles et de limiter la mortalité immédiate. L'immunosuppression a été obtenue au moyen de Tacrolimus (Skuk et al 2011). Néanmoins, cette approche n'atteint que des territoires limités et n'est considérée que pour améliorer potentiellement des fonctions locales (ciblage des petits muscles permettant de bouger la main ou les doigts) et ainsi maintenir à terme une certaine qualité de vie.

Les myoblastes ne sont pas capables de franchir les barrières endothéliales et leur administration par voie systémique provoque des embolies multiples (Skuk et Tremblay

2014). Ils ne peuvent donc pas être considérés comme des candidats pour des traitements sur de larges zones musculaires.

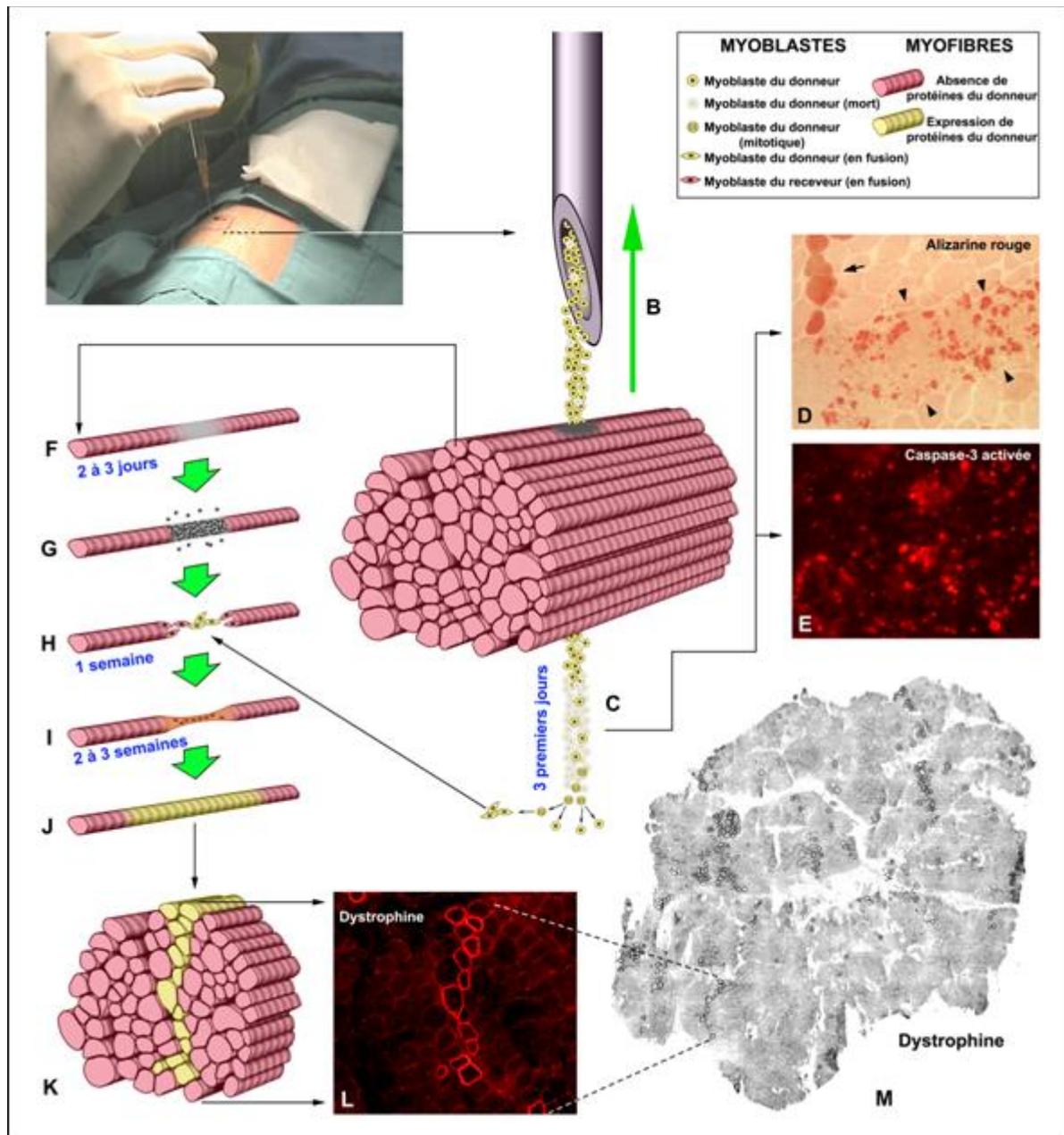


Figure 19 : Principes de la transplantation intramusculaire de myoblastes. Plusieurs injections sont faites perpendiculairement à l'axe du muscle d'un patient (A), grâce à une seringue Hamilton. Près de 90 % des myoblastes d'un donneur sain meurent dans les trois jours (D et E) après leur transplantation dans un faisceau de fibres musculaires (B). Ainsi, une coloration à l'alizarine rouge 6 heures après injection des myoblastes met en évidence une nécrose cellulaire (tête de flèche) dans les poches d'injection, associée à une apoptose, mise en évidence par une immunodétection de fluorescence rouge de la caspase-3 activée après 24 heures. L'introduction d'une aiguille elle-même endommage des fibres musculaires (flèches, D) ce qui entraîne une régénérescence des fibres (F - J) par les myoblastes ayant survécu et proliféré (H) puis attirés sur le site de nécrose par les macrophages venus nettoyer la zone (G). Les myoblastes fusionnent avec les fibres endommagées (I) pour former des fibres hybrides qui expriment dès lors la dystrophine du donneur, détectée par une immunodétection en fluorescence rouge (L, M). Néanmoins, cette régénération musculaire reste limitée au site d'injection (K, M). Figure tirée de Skuk 2004.

Néanmoins, la transplantation de myoblastes entraîne régulièrement la formation de tissu musculaire squelettique au site d'injection. Pour cette raison, elle peut être utilisée comme un traitement palliatif de certaines pathologies musculaires localisées comme la DMFSH et la DMOP.

b) Utilisation dans la DMFSH et la DMOP

En situation autologue, des progéniteurs cellulaires sont extraits de muscles non affectés cliniquement par la maladie, multipliés *in vitro* et injectés dans les territoires affectés cliniquement. Cette approche vise donc à améliorer la structure, les capacités de régénération et les paramètres de contractilités des muscles atteints chez le patient. Des exemples de greffes de myoblastes ont ainsi été répertoriés dans le traitement de l'insuffisance cardiaque post-ischémique (Ménasché et al. 2008) et dans le traitement de la dysfonction sphinctérienne (Stangel-Wojcikiewicz et al. 2010), bien que l'objectif final soit de générer du muscle squelettique ectopique.

Dans le cas des dystrophies musculaires, la greffe est réalisée avec l'espoir de transférer des capacités intrinsèques de régénération et de participation à la formation de muscle squelettique permettant une contraction suffisante par la suite. Toutefois, il est à noter que ces cellules ne subissent aucune correction génétique *in vitro*. Elles comportent donc un code génétique associé aux pathologies musculaires, ce qui peut influencer sur l'étendue de la réparation et sa durée.

Dans le cas de la DMFSH, une validation pré-clinique pour le concept d'une greffe de myoblastes autologue a été obtenue (Vilquin 2005) et a conduit à la mise en place d'un essai clinique de phase I/II. Des patients ont reçu des injections de 800 millions de cellules dans un volume correspondant à la moitié du muscle tibial antérieur (10 ml) selon trois modes d'administration de densités différentes. Les résultats obtenus à 6 mois (évolution de la force, de la résistance et de la composition des muscles) ont mis en évidence une légère amélioration de la contraction et une légère baisse de la fatigue musculaire sans pour autant améliorer l'état clinique des patients (article en cours de préparation). La faisabilité et la tolérance de la procédure obtenus avec des myoblastes permettent d'envisager une utilisation des mésoangioblastes dont les capacités de migration endothéliales sont plus importantes (Morosetti et al. 2011).

Par similitude dans l'indication de la DMOP, des résultats préliminaires d'essais cliniques sont d'ores et déjà encourageants pour l'utilisation de transplantations de myoblastes pour améliorer les symptômes liés à la dysphagie. En effet, un essai clinique en phase I/IIa a été conduit chez 12 patients sur la base d'injections massives de myoblastes (180 millions en moyenne), obtenus de muscles squelettiques non-atteints, puis transplantés dans les muscles cricopharyngés lors d'une opération chirurgicale. Les patients améliorent leur déglutition deux ans après l'opération (Perié et al. 2014). Cependant, il s'agit d'un premier essai sans groupe contrôle. De plus, les patients ont subi en parallèle une myotomie. L'efficacité ne pourra donc être prouvée qu'après des essais menés à plus grande échelle en double-aveugle contre placebo.

222. L'utilisation de cellules CD133 pour des essais thérapeutiques

Le problème du rejet immunologique a aussi pu être surmonté dans le cadre d'un essai clinique de phase I (faisabilité, tolérance, sécurité) conduit chez des patients atteints de DMD. Huit patients ont reçu une injection de leurs propres cellules CD133 issues de leurs muscles squelettiques. Si aucun effet indésirable n'a été noté, l'absence de marquage ou de correction de l'absence de dystrophine au sein de ces cellules, n'a pas permis de suivre leur destinée (Torrente et al. 2007). Du fait de l'expansion difficile *in vitro* des cellules CD133 sans perte de leur capacité de différenciation, cette étude n'a pas été suivie d'études de plus grande ampleur, à notre connaissance.

223. Les pistes pour améliorer la thérapie cellulaire

En parallèle des avancées réalisées dans l'injection intramusculaire de myoblastes, des équipes ont développé et optimisé l'utilisation de matériaux obtenus à partir d'hydrogels, de gels de fibrines, d'alginate, de collagène (Christman et al. 2008 ; Giraud et al. 2008) pour obtenir des cultures spécialisées sans perte des capacités ultérieures d'autorenouvellement, pour induire une différenciation précise, pour améliorer la survie, pour promouvoir la diffusion ou la régénération locale (Boldrin et al. 2007). Ces approches bénéficient à d'autres tissus, notamment pour promouvoir la réparation des myocardi (Christman et al. 2004 ; Giraud et al. 2008 ; Hamdi et al. 2009 ; Klumpp et al. 2010 ; Ménasché et al. 2011) mais une transposition aux thérapies du muscle squelettique pourrait permettre d'augmenter le nombre de cellules disponibles pour réparer les fibres musculaires (90% de perte dans les premières

heures après injection) et reconstituer la réserve de progéniteurs mobilisables sur le long terme.

Dans les dystrophies musculaires, les cellules souches musculaires atteintes et les cellules du système immunitaire produisent des molécules inflammatoires (TGF- β , TNF- α). Elles contribuent à la dégénérescence massive des fibres musculaires mais rendent aussi l'environnement musculaire hostile à la survie ou à la prolifération de nouvelles cellules musculaires. Afin de ralentir l'atrophie musculaire caractéristique des patients atteints de la DMD, la réduction de la réponse inflammatoire est l'une des voies étudiées. A l'heure actuelle des stéroïdes sont utilisés chez l'Homme mais d'autres approches anti-inflammatoires sont évaluées chez l'animal. La transplantation de cellules souches mésenchymateuses dans des muscles de souris dystrophiques réduit l'inflammation de façon significative grâce à la sécrétion de molécules anti-inflammatoires. De plus, un traitement combiné d'oxyde nitrique et d'ibuprofène est efficace pour stimuler la régénération par activation des cellules souches musculaires, réduire la nécrose et l'inflammation (Sciorati et al. 2010). Il semble donc important de prendre en compte l'impact de la réponse inflammatoire lors des prochains essais cliniques.

L'une des premières limites mis en évidence dans les essais thérapeutiques tient en la nature des candidats cellulaires injectés. Plusieurs types cellulaires sont désormais disponibles ou le seront dans les années à venir mais peu réunissent tous les critères pour traiter de larges régions musculaires : expansion sans perdre les capacités futures de différenciation et d'autorenouvellement, survie à la transplantation, administration par voie systémique, migration dans le muscle endommagé, synthèse de la dystrophine, augmentation de la force musculaire produite. Il est donc indispensable d'identifier plus finement les nouveaux candidats potentiels, notamment grâce à des marqueurs spécifiques.

23. Les marqueurs de cellules myogéniques

La préparation de progéniteurs musculaires en quantités suffisantes, en vue d'essais thérapeutiques a fait intervenir de nombreuses méthodes d'extraction à partir de biopsies initiales puis au cours des cultures lorsque nécessaire : sorties d'explant, adhésions différentielles, dissociation enzymatique, sélection immunomagnétique, tri par cytométrie de flux et utilisation de milieux sélectifs.

Nous recherchons de nouvelles cellules progénitrices aux capacités améliorées par rapport aux candidats déjà testés. Pour cela, nous devons les identifier en utilisant des marqueurs les plus discriminants possible. Toutefois, ces marqueurs peuvent être spécifiques de la population d'intérêt à isoler (et permettre une sélection positive) ou spécifiques des autres populations (et se prêter à une sélection négative) (**Figure 20 et Tableau 1**). Nous avons donc recherché la présence de populations musculaires qui exprimaient les principaux marqueurs associés à différents lignages connus : lignage adipogénique, endothélial, hématopoïétique, mésenchymateux et musculaires. Nous avons complété notre palette de marqueurs avec des molécules ayant été rapportées comme intervenant dans la quiescence, la prolifération ou la différenciation cellulaire.

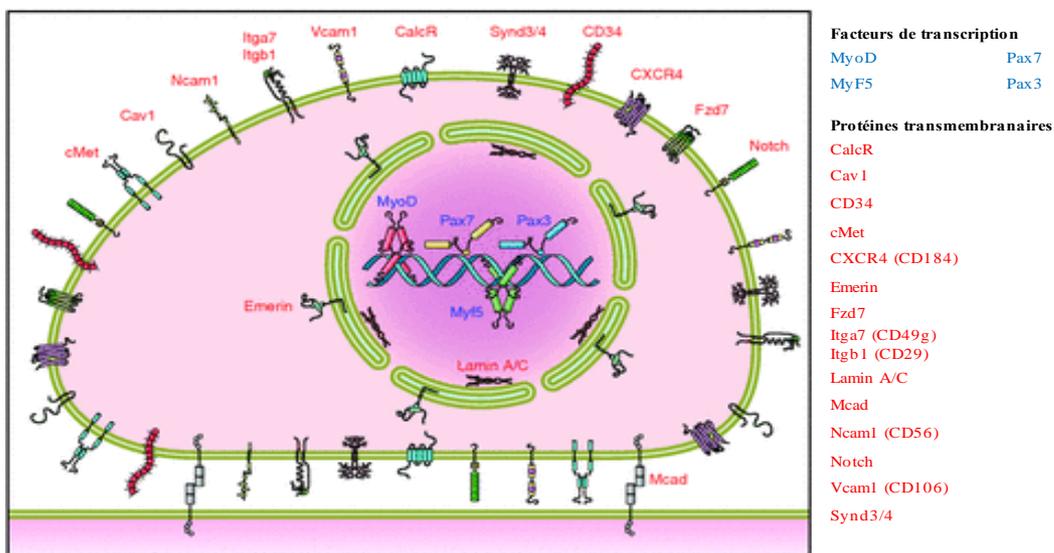


Figure 20 : Marqueurs des cellules souches musculaires. Plusieurs protéines transmembranaires ou nucléaires permettent de distinguer les cellules souches musculaires établies, les cellules satellites, des autres cellules résidentes dans le muscle squelettique. La diversité des marqueurs associée à différentes méthodes d'isolement ou à des espèces distinctes soutient l'hypothèse d'une hétérogénéité au sein de ces progéniteurs. Figure modifiée de Yin et al. 2013.

Marqueurs positifs	Marqueurs négatifs	Références
SM/C-2.6	CD31, CD45, Sca-1	Fukada et al. 2004; 2007
Intégrine alpha-7 (CD49g), Intégrine beta-1 (CD29, CXCR4 (CD184))	CD45, Sca-1, Mac-1	Scherwood et al. 2004
CD34	CD45, Sca-1	Montarras et al. 2005

Tableau 1 : Marqueurs pour isoler les cellules satellites au sein du muscle squelettique. Tableau adapté de Fukada et al. 2013.

231. Les marqueurs nucléaires

Ainsi que nous l'avons vu dans la **partie 111**, le lignage des progéniteurs musculaires a été largement étudié au cours de l'embryogenèse et a mis en évidence l'intervention des MRF (MyoD, Myf-5, MFR4, Myogénine), des Pax (Pax3, Pax7) et des Six (Six1, Six4) pour un développement normal des muscles squelettiques. L'expression nucléaire de ces facteurs ne permet pas de sélectionner des cellules vivantes puisqu'il est nécessaire de les fixer puis de les perméabiliser pour assurer la pénétration des anticorps. Bien sûr, il existe des modèles animaux chez lesquels l'activation de certains gènes myogéniques déclenche l'expression d'un marqueur (pour les tracer, souvent associé à la Green fluorescent protein, GFP) mais nos études ont été tournées vers l'utilisation de cellules humaines, dans des perspectives de transposition clinique ultérieure.

Nous avons donc concentré nos recherches sur des molécules transmembranaires dont le marquage avec des anticorps spécifiques permet de les étudier après isolement par FACS. De plus, dans le cadre d'essais thérapeutiques, l'utilisation de la sélection immunomagnétique serait aussi réalisable. Ci-dessous, j'ai donc décrit les marqueurs les plus indicatifs dans la sélection positive ou négative de populations musculaires d'intérêts. Ils se sont révélés les plus intéressants lors de nos caractérisations de cellules de Primates.

232. Les marqueurs transmembranaires

a) CD9

Le TSPAN29 (CD9), une protéine transmembranaire de 24kDa appartient à une superfamille de 33 protéines transmembranaires : les tétraspanines, dont les membres TSPAN30 (CD63) et TSPAN27 (CD82) se comportent expérimentalement comme le CD9. CD9 est associé à des dimères de récepteurs intégrines $\alpha3$ (CD49c), $\beta1$ (CD29) (Berditchevski et al. 1995). Nous reverrons plus bas les intégrines. Il permet la migration de nombreuses lignées de cellules cancéreuses. Les interactions de CD9 avec plusieurs intégrines telles que $\alpha3\beta1$, $\alpha4\beta1$, $\alpha5\beta1$, $\alpha6\beta1$, $\alpha6\beta4$ et $\alphaIIb\beta3$ (Powner et al. 2011) conduisent à un changement de conformation et d'activation qui modulent les voies de signalisation dépendant des intégrines (Kotha et al. 2008). Le réseau de tétraspanine module la localisation des métalloprotéases de type 1 de la surface cellulaire (MMP1) et peut induire l'expression et l'activation de la métalloprotéinases de type 2 (MMP2) (Hong et al. 2005 ; Schröder et al. 2013). Ainsi, CD9 pourrait réguler la migration cellulaire mais aussi le remodelage tissulaire au cours du développement embryonnaire, l'angiogenèse, l'invasion tumorale et métastatique.

Au niveau plus spécifiquement musculaire, Tachibana et Hemler ont mis en évidence l'inhibition de la fusion des myoblastes murins C2C12 par l'ajout des anticorps anti-CD9, sans que l'expression des protéines spécifiques du muscle (chaînes légères de myosine, desmine et actine) soit affectée (Tachibana et Hemler, 1999). Le complexe CD9/ α 3 β 1 intervient dans la fusion des myoblastes et dans la régénération musculaire (Przewoźniak et al. 2013). Les myoblastes issus de souris déficientes en intégrine β 1 (CD29) ne fusionnent pas et n'expriment pas CD9 (Schwander et al. 2003). Charrin et al. ont mis en évidence la nécessité de la présence de CD9 et CD81 pour la fusion des myoblastes lors de la régénération musculaire puisque les souris déficientes en CD9 ou CD81 ou pour les deux marqueurs n'étaient pas capables de régénération fonctionnelle musculaire ; ainsi les myoblastes de ces souris formaient des fibres musculaires dystrophiques géantes (Charrin et al. 2013). Enfin, si l'absence des deux CD9 et CD81 induit une hyperfusion incontrôlée des myoblastes *in vitro*, l'absence d'un seul des deux marqueurs n'influe pas sur la fusion des myoblastes, ce qui suggère des phénomènes de compensation. L'ajout de son ligand le Stromal-Derived Factor 1 (Sdf-1, aussi connu sous le nom de CXCL12), induit une augmentation de l'expression de CD9 qui conduit à une régénération musculaire via l'induction de la migration des cellules souches et une fusion des myoblastes. Cette surexpression est indépendante de la voie CXCR4 (que nous reverrons plus bas) et touche plusieurs types cellulaires, aussi bien les myoblastes que les cellules satellites et les cellules qui infiltrent le site de lésion musculaire. L'ensemble de ces études démontre bien l'importance de l'expression de CD9 par les progéniteurs myogéniques, notamment dans la formation des fibres musculaires (Tachibana et Hemler 1999).

b) CD10

Le CD10, aussi appelé l'endopeptidase neutre ou néprilysine, est une enzyme transmembranaire qui peut aussi exister sous forme soluble. C'est une métalloprotéase dont l'activité est dépendante du zinc. Elle est codée par le gène Membrane Metallo-Endopeptidase (MME) du chromosome 3 humain. Elle est exprimée par tous les organes et libérée notamment par l'endothélium vasculaire, dont elle est un marqueur, et dans des exosomes dont la formation est régulée par ADAM17. L'inhibition de la néprilysine potentialise l'action de la bradykinine chez les patients traités par un inhibiteur de l'enzyme de conversion. Ceci entraîne donc une vasodilatation accrue des artères. CD10 intervient dans la régulation des cellules souches.

c) CD31

Le CD31, aussi connu sous le nom de la platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM1), est une protéine dont le gène est situé sur le chromosome humain 17 et la masse de 130kDa. Cette glycoprotéine transmembranaire est un membre de la superfamille des immunoglobulines. Elle est exprimée très fortement par le compartiment vasculaire, notamment dans les cellules endothéliales immatures et matures, les plaquettes, la plupart des leucocytes mais aussi à la jonction des cellules endothéliales (Albelda et al. 1990 ; Goyert et al. 1986, Muller et al. 1989 ; Ohto et al. 1985 ; van Mourik et al. 1985). Le CD31 est aussi exprimé dans une population majeure des cellules précurseurs dentritiques/macrophages dans la moelle osseuse. Ainsi, CD31 joue plusieurs rôles dans la biologie vasculaire dont l'angiogenèse, la fonction des plaquettes et la thrombose. C'est un mécanosenseur des cellules endothéliales en réponse au stress induit par la pression des fluides (flux sanguins) et qui agit comme un capteur de cisaillement au niveau de la paroi des artéioles. Lorsqu'elle se déforme, la protéine phosphorylée active le système Akt et la NO synthase pour produire le monoxyde d'azote (NO) ce qui entraîne une vasodilatation. CD31 intervient aussi dans la régulation de la migration des leucocytes à travers les parois des veinules. CD31 est liée une protéine des filaments intermédiaires, la vimentine, et exprimée dans les jonctions intercellulaires.

d) CD34

Le CD34 est une phosphoglycoprotéine transmembranaire, de 115kDa, identifiée en 1984 sur les progéniteurs et cellules souches hématopoïétiques (Civin et al. 1984). Elle possède des domaines extracellulaires fortement glycosylés lié à O et des sites de glycosylations lié à N. CD34 comporte aussi une hélice simple transmembranaire et une queue cytoplasmique qui contient des domaines de liaison PSD-95-Dlg-ZO-1 (PDZ) (Krause et al. 1994 ; Nielsen et McNagny 2008). Le ligand le plus répertorié de CD34 est la L-Selectin (CD62L). Néanmoins, la protéine adaptatrice CrkL qui intervient dans la régulation de l'adhésion est aussi un partenaire (Baumheler et al. 1993 ; Felschow et al. 2001).

Bien que la structure de CD34 soit bien connue, il y a encore peu d'informations sur les fonctions associées à ce récepteur. Des études conduites sur des cellules hématopoïétiques suggèrent des rôles dans la cytoadhésion et la régulation de la prolifération et la différenciation cellulaires (Healy et al. 1995 ; Nielsen et McNagny 2009). Les lymphocytes ont une adhésion médiée par la L-Selectin et le CD34 à la surface de l'endothélium vasculaire et il a aussi été proposé un rôle de CD34 dans la circulation des CSH dans la niche de la

moelle osseuse (Baumhater et al. 1993 ; Butcher et Picker 1996 ; Nielsen et McNagny 2009). Toutefois, le CD34 a été associé à un blocage de l'adhésion cellulaire dans le cas des mastocytes (Drew et al. 2005).

Classiquement, chez l'Homme, le CD34 est un marqueur des cellules souches hématopoïétiques médullaires, circulantes et de sang de cordon, un marqueur des progéniteurs circulants des cellules endothéliales, et un marqueur de la couche endothéliale au niveau des vaisseaux (Lecourt et al. 2010). CD34 a été utilisé, à ces titres, comme marqueur pour la préparation de produits de thérapie cellulaire dans des indications de greffes de moelle osseuse, ou de greffes de cellules endothéliales.

Des cellules satellites humaines et murines peuvent être identifiées par le CD34 (Lee et al. 2000 ; Sinanan et al. 2004) à différents degrés. Cependant, l'activation des cellules ainsi marquées entraîne une extinction complète et rapide de son expression (Beauchamp et al. 2000). Ainsi, il a été suggéré un rôle fondamental dans la maintenance du pool de cellules satellites et dans la régulation de leur différenciation cellulaire (Beauchamp et al. 2000). CD34 n'est cependant pas exprimé sur l'ensemble des cellules satellites, en particulier chez l'Homme. Au cours du développement, les cellules précurseur myogéniques n'expriment pas le CD34 qui n'apparaît que dans l'activation des cellules satellites au cours du développement musculaire (Cossu et al. 1983). CD34 peut aussi, au sein du tissu musculaire squelettique, être associé à la fois à des marqueurs mésenchymateux et myogéniques (CD144, CD56) pour marquer une population très minoritaire de cellules interstitielles, qualifiée de myo-endothéliale (Zheng et al. 2007). En culture, l'expression de CD34 est rapidement perdue. Ces cellules myo-endothéliales sont capables de suivre des différenciations myogéniques, endothéliales, ostéogéniques et chondrogéniques. Leur parenté avec les péricytes n'est pas connue.

Précédemment, le laboratoire d'accueil a observé que des populations cellulaires exprimant initialement CD34, étaient capables, dans des milieux spécifiques, de différenciation de type mésenchymateux (génération de cellules adipeuses, chondrogéniques, ostéogéniques) mais formaient peu de cellules myogéniques même dans des milieux très adaptés (Lecourt et al. 2010). L'expression de CD34 précédait alors celle de CD15 qui devenait un marqueur de fibroblastes. Cette observation a été confirmée récemment et a permis de définir une population de cellules dites fibro-adipogéniques (Arrighi et al. 2015).

Le marqueur CD34 semble donc relativement pléiotrope, mais ne semble pas associé à la myogénèse lorsque celle-ci est activée. CD34 peut être associé à différents marqueurs, qui seraient plus spécifiques dans leur caractérisation : CD133 pour les cellules hématopoïétiques,

CD31 pour les cellules endothéliales, CD146 ou CD15 pour les cellules mésenchymateuses, et peut-être CD56 pour une sous-population de cellules satellites (Blanpain et al. 2004 ; Fina et al. 1990 ; Lin et al. 2012 ; Nakayama et al 2000 ; Nielsen et McNagny 2008 ; Sinanan et al. 2004). CD34 pourrait alors jouer un rôle, ponctuellement, dans les fonctions de ces sous-populations (Dupas et al. 2011).

e) CD45

Le CD45 est connu comme étant l'antigène commun des leucocytes (LCA). C'est une glycoprotéine, une tyrosine phosphatase transmembranaire de type 1 exprimée par les cellules hématopoïétiques nucléées. Elle régule de nombreuses voies de signalisation des cellules du système immunitaire. Son expression est recherchée systématiquement, pour infirmer ou confirmer l'existence, au sein du tissu analysé, de cellules hématopoïétiques.

f) CD49

Les intégrines forment une large famille de glycoprotéines de la surface de la membrane cellulaire dont les sous-unités sont comprises entre 80 et 180kDa. Elles sont principalement impliquées dans les interactions cellule-cellule, mais permettent aussi une connexion de la matrice extracellulaire (ECM) avec le réseau de filaments d'actine intracellulaire. Les intégrines sont composées d'un large domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'une petite queue cytoplasmique. Près de 18 sous-unités α et 8 sous-unités β ont été identifiées dans les cellules des mammifères pour former 24 récepteurs hétérodimères. La sous-unité de l'intégrine $\alpha 1$ est aussi appelée CD49a, celle de l'intégrine $\alpha 2$ est appelée CD49b, etc... De nombreuses intégrines sont exprimées par les cellules mésenchymateuses. Il faut noter que, dans le domaine musculaire, les mutations du gène de l'intégrine $\alpha 7$ (CD49g) sont responsables d'une forme particulière de myopathie congénitale. Cette sous-unité est exprimée sur les tissus musculaires et certaines cellules satellites, ce qui peut permettre de les trier, en particulier chez la Souris.

g) CD56

Le CD56 aussi appelé N-CAM ou Antigène Leu-19 est exprimé constitutivement par les myoblastes en prolifération, les cellules satellites, les fibres en régénération, les myotubes (Belle-isles et al. 1993 ; Illa et al. 1992 ; Lindström et Thornell 2009). Son expression disparaît sur les muscles matures (Schubert et al. 1989). D'autres types cellulaires expriment

le CD56 (lymphocytes Natural killer, neurones) mais pas les fibroblastes. L'expression du CD56 a été utilisée pour trier les myoblastes en cultures, par cytométrie de flux ou en utilisant des billes immunomagnétiques, ainsi que pour suivre les productions de myoblastes au cours d'essais cliniques (Menasché et al 2008 ; Vilquin et al. 2005). Il n'existerait pas de marqueur CD56 chez la Souris, ce qui a longtemps rendu problématique leur caractérisation, et la transposition des données biologiques de myogénèse de l'Homme à la souris (et vice-versa).

h) CD105

Le CD105, aussi appelé endogline, est un membre des complexes de récepteurs des facteurs de croissance de transformation (TGF- β 1 et β 3). Il module la voie de signalisation TGF- β en influant sur la localisation et la migration des récepteurs cellulaires (Cheifetz et al. 1992). Il promeut l'angiogenèse, la régulation de l'organisation du cytosquelette et affecte aussi bien la migration que la morphologie des cellules (Blobe et al. 2000 ; Fonsatti et al. 2003 ; Saroufim et al. 2014). Les cellules CD105 induisent la prolifération des métastases tumorales par la mise en circulation de cellules tumorales (Duff et al. 2003 ; Khan et al. 2014). Le CD105 est un marqueur classique des cellules mésenchymateuses et de certaines cellules endothéliales.

i) CD106

Le CD106, aussi appelé VCAM1, est une protéine inductible par des cytokines. Elle permet l'adhésion cellulaire pour recruter au site d'inflammation des leucocytes qui expriment l'intégrine α 4 (CD49d). Le CD106 joue un rôle très important dans le développement embryonnaire, notamment dans la formation du cordon ombilical et du placenta (Gurtner et al. 1995).

Le CD106 est l'un des composants de la niche des cellules souches neuronales (Kokovay et al. 2012). De plus, une sous-population des MSC exprimant le CD106 joue un rôle essentiel dans l'immunosuppression médiée par les MSC (Ren et al. 2010). Cette population est activée par des cytokines pro-inflammatoires (Interféron- γ , IL-1 β et TNF- α) (English et al. 2007 ; Polchert et al. 2008 ; Prasanna et al. 2010 ; Wang et al. 2010). Par ailleurs, le CD106 permet la liaison des cellules progéniteurs hématopoïétiques (Simmons et al. 1992). Enfin, le CD106 est aussi un marqueur de populations de cellules satellites chez la Souris.

j) CD133

Le CD133, aussi connu sous le nom de prominine-1, est un antigène de surface cellulaire à 5 domaines transmembranaires. (Mizrak et al. 2008). C'est essentiellement un marqueur précoce des cellules hématopoïétiques. Des progéniteurs hématopoïétiques CD133+ sont capables de former de nouveaux vaisseaux sanguins et de mettre en place une vascularisation dans les tumeurs murines (Bruno et al. 2006). Sa présence a été suggérée au sein du tissu musculaire squelettique humain (Torrente et al. 2007).

k) CD140b

Le CD140b est aussi connu sous le nom de récepteur b du PDGF (PDGFR- β). Lors de blessure, les plaquettes libèrent une molécule appelée le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) qui stimule la cicatrisation des plaies (Robson et al. 1992) via le recrutement et l'activation de cellules qui expriment des récepteurs aux PDGF : fibroblastes, cellules musculaires lisses, neutrophiles et macrophages. PDGFR- β est aussi exprimé par les péricytes. Il permet de recruter ces cellules lors de la formation de nouveaux vaisseaux en réponse à la sécrétion de PDGF par les cellules endothéliales (Bjarnegard et al. 2004 ; Dellavalle et al. 2007 ; Hellström et al. 1999 ; Lindahl et al. 1997a) notamment dans l'extrémité de la cellule qui forme un bourgeon proto-angiogénique (Gerhardt et al. 2003). Les embryons murins déficients en CD140b présentent des défauts de développement des cellules mésangiales ce qui conduit à un développement de glomérules rénaux anormaux (Levéen et al. 1994 ; Lindahl et al. 1998 ; Soriano 1994), des microanévrismes des capillaires (Lindahl et al. 1997a), des défauts cardiaques (Van den Akker et al. 2008), des défauts du placenta (Ohlsson et al. 1999) et une mort par hémorragie entre les jours embryonnaires 16 et 19.

CD140b pourrait aussi jouer un rôle dans le développement précoce des précurseurs hématopoïétiques et endothéliaux puisque l'activation des récepteurs CD140b dans ces cellules conduit à une différenciation en cellules endothéliales (Rolny et al. 2006).

Chez l'adulte, les fibroblastes et les myofibroblastes qui expriment le CD140b lient la matrice extracellulaire pour se contracter et ce faisant contrôlent la pression des fluides intestinaux et empêchent la formation d'œdèmes (Rodt et al. 1996).

l) CD146

Le CD146, aussi connu sous le nom de molécule d'adhésion cellulaire des mélanomes (M-CAM), appartient à la superfamille des immunoglobulines. Il est codé par le gène *MCAM*

du chromosome 11 humain. C'est une molécule endothéliale et sous-endothéliale de 113kDa exprimée par presque toutes les cellules endothéliales, les cellules T activées et les cellules dendritiques (Despoix et al. 2008 ; Elshl et al. 2007 ; Pickl et al. 1997). Bien que sa fonction reste inconnue, elle pourrait être impliquée dans la régulation de la mobilité cellulaire et des adhésions, et des interactions avec des protéines ERM (Ezrine, radixine et merosine) (Bardin et al. 2001 ; Luo et al. 2012). Le CD146 est un marqueur mésenchymateux précoce des CSM obtenues à partir de la moelle osseuse humaine, de la pulpe dendaire, des tissus adipeux et du cordon ombilical, des endothéliums vasculaires et des cellules musculaires lisses (Bardin et al. 1996 ; Dmitrieva et al. 2012 ; Filshie et al. 1998 ; Martin-Rendon et al. 2008 ; Sacchetti et al. 2007 ; Shi et Gronthos 2003 ;). De manière importante, CD146 est exprimé par les péricytes musculaires, qui partagent des propriétés angiogéniques avec les mésoangioblastes (Delavalle et al. 2007), et il joue un rôle dans la myogénèse fœtale (Cerletti et al. 2006 ; Cerletti et al. 2008 ; Gussoni et al. 2006). CD146 serait donc un marqueur pléiotrope, retrouvé à la fois sur des cellules mésenchymateuses, angiogéniques, et myogéniques.

Une extinction de l'expression de CD146 dans les MSC humaines perturbent la prolifération et la différenciation en cellules ostéogéniques (Stopp et al. 2013).

m) CD184

CD184 est aussi connu sous le nom de CXCR4. Les chémokines sont des peptides de 8 à 12kDa qui fonctionnent comme des cytokines chémoattracteurs pour activer des cellules, moduler leurs migrations ou leurs circulations, et induire leurs différenciations. La chémokine CXCL12 (ou SDF-1) se lie à son récepteur C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4). Comme de nombreux récepteurs aux chémokines, CXCR4 appartient à la superfamille des récepteurs hétérotrimériques à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (GPCR). La voie de signalisation CXCL12-CXCR4 joue un rôle dans la rétention et l'hébergement ou « homing » des cellules souches hématopoïétiques dans l'environnement de la moelle osseuse et la circulation des lymphocytes. CD184 a également été décrit comme un marqueur des cellules satellites chez la Souris (Meisner et al. 2016 ; Sherwood et al. 2004).

La recherche et l'identification de marqueurs fiables pour isoler des progéniteurs cellulaires revêtent un intérêt stratégique pour les prochains essais de thérapie cellulaire. Comme nous avons vu dans ce chapitre, des candidats ont déjà été testés mais présentent des limites. Il est donc crucial d'identifier d'autres populations myogéniques dont les capacités d'extraction à partir d'une biopsie initiale, de prolifération tout en gardant un potentiel de

différenciation à moyen et long terme une fois transplantées soient élevées. D'autres limites telles que les options d'administration et la résistance aux premières heures consécutives après injection sont aussi importantes à prendre en considération.

Au sein du laboratoire, nous avons identifié une population de progéniteurs myogéniques sur la base leur activité Aldéhyde Déshydrogénase. En cytométrie de flux, l'utilisation d'un substrat fluorescent non-toxique, l'Adéluor, permet de distinguer ces progéniteurs dont l'activité enzymatique laisse envisager des capacités de résistance au stress oxydatif et de détoxifications nécessaire notamment lors de la transplantation cellulaire.

3. La superfamille des Aldéhydes déhydrogénases (ALDH)

Les gènes des ALDH sont retrouvés dans tous les organismes vivants, des Archae aux Eucaryotes en passant par les Eubacteria (Black et al. 2009 ; Jackson et al. 2011 ; Sophos et Vasiliou 2003). Ils sont donc très conservés au cours de l'évolution bien que le nombre de gènes répertoriés diffère selon l'espèce Eucaryote considérée (**Tableau 2**). Compte-tenu de leur rôle primordial dans les oxydations, les « ancêtres » des gènes actuels remonteraient à plus de 3 milliards d'années. Toutes espèces confondues, les ALDH sont codées par environ 500 gènes différents... Les isoenzymes d'ALDH sont retrouvées dans différents tissus mais possèdent une spécificité de substrat (Vasiliou et al. 2004). Présentes dans différents compartiments subcellulaires (cytosol, mitochondrie, réticulum endoplasmique, noyau), elles jouent leur rôle majeur d'oxydation irréversible des aldéhydes aliphatiques et aromatiques, endogènes ou exogènes, de façon dépendante de leur cofacteur NAD(P)⁺, en acides carboxyliques correspondants. Ces fonctions sont généralement assimilées à des détoxifications indispensables à la survie des cellules. Un corollaire ou un effet collatéral de cette activité de détoxification est la propriété de certaines isoenzymes de métaboliser et inactiver des molécules exogènes telles que certains anticancéreux, ce qui confère aux cellules qui les expriment une résistance aux traitements anti-tumoraux.

Nom latin	Nom commun	Nombre de gènes ALDH
<i>Homo sapiens</i>	Humain	19
<i>Pan troglodytes</i>	Chimpanzé commun	19
<i>Callithrix jacchus</i>	Ouistiti commun	16
<i>Pongo abelii</i>	Orang-outan de Sumatra	18
<i>Macaca mulatta</i>	Macaque Rhesus	20
<i>Bos taurus</i>	Vache domestique d'Europe et Zébu	20
<i>Rattus norvegicus</i>	Rat brun ou surmulot	21
<i>Mus musculus</i>	Souris grise	21
<i>Taeniopygia guttata</i>	Diamant mandarin	15
<i>Gallus gallus</i>	Poule ou Coq	14
<i>Danio rerio</i>	Poisson-zèbre	25

Tableau 2 : Comparaison du nombre de gènes ALDH retrouvés dans différentes espèces eucaryotes identifiées par leur noms latins et comuns. Tableau adapté de Jackson et al. 2011.

L'activité enzymatique des ALDH est aussi essentielle pour la synthèse d'aldéhydes intermédiaires impliqués dans de nombreux processus cellulaires comme la modulation de la prolifération, de la différenciation et de la survie cellulaire. En effet, les ALDH interviennent dans les voies de biosynthèse de l'AR (essentiel pour le développement), de la bétaine (un osmolite) et de l'acide γ -aminobutyrique (le neurotransmetteur GABA). D'autre part, certaines isoenzymes possèdent des fonctions non-catalytiques impliquées dans la résistance aux traitements chimiques, notamment dans le cancer, ou la protection de la cornée des mammifères, par la liaison à la lumière ultraviolette.

Enfin des dysfonctions dans l'activité des ALDH (suite au polymorphisme génétique ou à des mutations) entraînent l'accumulation des aldéhydes, ce qui peut déboucher sur de nombreuses maladies rares.

31. L'utilisation de l'activité ALDH pour identifier des progéniteurs

311. La structure et le mécanisme d'action des ALDH

Les isoenzymes d'ALDH partagent de nombreuses fonctions physiologiques et certains substrats communs. Néanmoins, la co-cristallisation de chaque membre avec son substrat préféré a permis de montrer une spécificité (Wang et al. 2009) en fonction du site actif de chaque isoenzyme (Cobessi et al. 2000 ; D'Ambrosio et al. 2006 ; Larson et al. 2005 ; Liu et al. 1997 ; Lowe et al. 2008). Les ALDH de mammifères fonctionnent normalement en homodimères ou homotétramères, dont chaque monomère de 500 à 600 acides aminés (pour la majorité) ou de 800 à 900 acides aminés (pour les ALDH1L1, 1L2, 16A1 et 18A1) (Min et al. 1988 ; Strickland et al. 2011), possède un site actif dont le mécanisme catalytique est commun aussi bien pour leur activité déhydrogénase qu'estérase (Kazmi et al. 1992 ; Xiao et al. 2009). Ceci est probablement dû aux résidus catalytiques très conservés Cys302, Lys192 et Glu268. Chaque monomère présente les 3 mêmes régions fonctionnelles, indépendamment de sa famille : un domaine de liaison avec le coenzyme ou NAD⁺, un domaine catalytique et un domaine d'oligomérisation (Cobessi et al. 2000 ; Colby et al. 1998 ; D'Ambrosio et al. 2006 ; Liu et al. 1997 ; Steinmetz et al. 1997) (**Figure 21**). A cet égard, l'ALDH6A1 est particulière puisqu'elle utilise le cofacteur CoA plutôt que le NAD(P)⁺ (Kazmi et al. 1992 ; Xiao et al. 2009) (**Figure 22**).

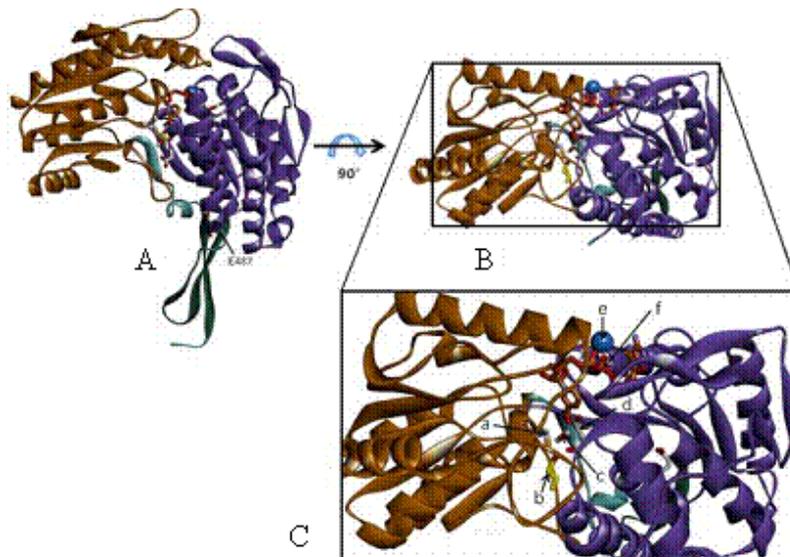


Figure 21 : Architecture moléculaire des isoenzymes d'ALDH. (A) Représentation d'un monomère d'ALDH depuis la Protein Data code 1O01 : complexe de l'aldéhyde déshydrogénase mitochondriale humaine avec la crytoaldéhyde, le NADH et le Mg^{2+} . Les régions fonctionnelles sont représentées : avec le domaine catalytique en marron, le domaine de liaison du NAD en violet et le domaine d'oligomérisation en vert. Vue du dessus de la région du site actif (B) avec une magnification pour mettre en évidence les différents acteurs de la réaction enzymatique : la Cys302 (a), le substrat aldéhyde (b), la molécule d'eau entre le Glu268 et la Cys302 (c), le Glu268 (d), l'ion Mg^{2+} (non représenté) et le cofacteur NADPH (f) (C). Figure tirée de Koppaka et al. 2012.

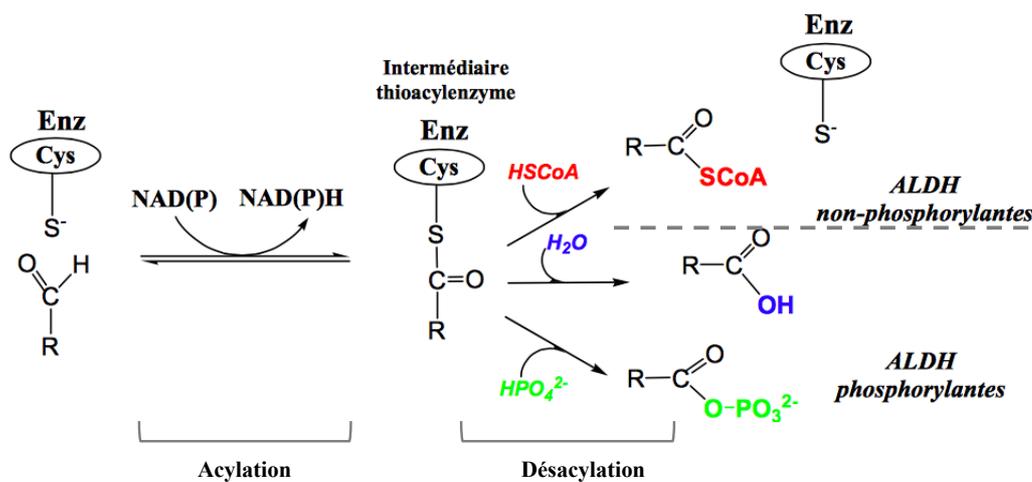


Figure 22 : Réaction catalysées par les ALDH à cofacteurs NAD(P)H. A l'exception de l'ALDH6A1 qui utilise le cofacteur CoA, toutes les ALDH humaines sont des ALDH phosphorylantes qui utilisent le NAD(P)H. Elles oxydent les aldéhydes par un mécanisme à deux étapes d'acylation puis de désacylation. Figure modifiée de la thèse d'Arnaud Pailot (http://docnum.univ-lorraine.fr/public/SCD_T_2006_0217_PAILOT.pdf).

L'activité enzymatique d'oxydation des ALDH pour oxyder des aldéhydes peut se résumer ainsi (**Figure 22**) : (i) une étape d'acylation où la Cys du site catalytique, sous forme thiolate, attaque le groupement carbonyle du substrat aldéhydique. Ensuite, par un processus d'oxydoréduction, un ion hydrure est transféré sur le cofacteur NAD(P)⁺ pour former l'intermédiaire thioacylenzyme et du NAD(P)H. Enfin, (ii) dans une seconde étape de

désacylation, un groupement nucléophile vient rompre la liaison thioester pour former le produit et libérer l'enzyme.

312. L'utilisation de l'activité ALDH pour isoler des cellules progéniteurs

Il y a une vingtaine d'années, Kastan et al. ont découvert une population de cellules hématopoïétiques primitives résistantes à un agent anti-cancéreux, le cyclophosphamide (Kastan et al. 1990). La présence d'une activité ALDH dans cette population a suggéré une association entre la présence d'ALDH et ce phénomène de résistance, liée à des cellules souches, ce qui a motivé la mise au point de réactifs pour une détection standardisée rapide.

313. La mise au point d'un substrat

Depuis deux décennies, les ALDH ont été utilisées comme marqueurs pour étudier les cellules souches normales ou cancéreuses de différents tissus. Certaines cellules souches à activité ALDH sont déjà utilisées comme des ressources pour la médecine régénérative dans des modèles précliniques et des essais cliniques en cours, notamment pour les cardiomyopathies ischémiques (clinical.gov. NCT00314266). Pour les détecter, un kit commercial contenant du BODIPY aminoacétaldéhyde (BAA) est utilisé et porte le nom d'Aldéfluor® (Stemcell Technologies). Hydrophobe et non-toxique, ce substrat fluorescent diffuse librement dans les cellules. Il est métabolisé en ion carboxylate hydrophile, BODIPY aminoacétate, dans les cellules qui expriment certaines ALDH, il se retrouve donc piégé et s'accumule lorsque les systèmes de transport actif de la cellule sont neutralisés (principalement par maintien à 4°C). Dans la cellule, la fluorescence mesurée est donc proportionnelle à l'activité enzymatique ALDH exprimée, soit à la quantité d'isoenzymes présente, dans des conditions standardisées. Un contrôle négatif est obtenu par l'utilisation de diéthylaminobenzaldehyde (DEAB) qui inhibe l'activité d'un grand nombre d'isoenzymes d'ALDH. La détection du BODIPY dans la lumière visible (longueur d'onde de 488 nm et détectable dans le filtre Fluorescéine isothiocyanate - FITC) rend possible l'utilisation d'autres marqueurs extracellulaires pour un phénotypage des cellules d'intérêt. En cytométrie de flux, il est donc possible d'apprécier un décalage de fluorescence pour les cellules qui expriment les ALDH (ALDH Bright ; ALDH^{br}) en comparaison avec celles qui ne l'expriment pas ou faiblement (ALDH low ; ALDH^{lo}) (**Figure 27**). Par commodité, nous noterons « ALDH+ » les cellules ou populations cellulaires positives pour l'expression d'ALDH.

L'Aldéfluor® est très sensible et spécifique pour identifier les cellules ALDH+. Néanmoins, la spécificité de reconnaissance de l'Aldéfluor® n'est pas encore connue de façon fiable et les inhibiteurs ne sont pas totalement polyvalents (Balber et al. 2011 ; Koppaka 2012 ; Marchitti et al. 2008) ce qui peut constituer un obstacle à son utilisation rationnelle. Enfin des compensations dans les fonctions des isoenzymes ALDH pourraient intervenir ce qui peut compliquer les identifications des populations ou la compréhension des mécanismes impliqués (Kumar et al. 2012 ; Levi et al. 2009).

32. La nomenclature des familles des ALDH

Au cours du 9^{ème} symposium international sur l'enzymologie et la biologie moléculaire du métabolisme Carbonyle, en 1999, une nomenclature commune a été établie pour la superfamille des ALDH. Elle suggère une origine commune aux 19 gènes humains et 21 gènes murins (Jackson et al. 2011 ; Marchitti et al. 2008) répertoriés pour l'heure à partir de la divergence d'un ancêtre commun, il y a environ 3 milliards d'années. Elle regroupe au sein de la même famille des gènes dont la séquence en acides aminés est similaire à plus de 40% alors que les membres d'une même sous-famille, eux, partagent plus de 60% de similitude. Un site internet (www.aldh.org) est dédié à suivre l'évolution et les mises à jour de la superfamille des ALDH, au sein du laboratoire du Dr. Vasilis Vasiliou à l'Université de Colorado à Denver. Les ALDH humaines sont regroupées dans 11 familles allant de 1 à 9, puis de 16 et 18. Les paragraphes suivants décrivent ces familles, et les isoenzymes, dans leurs lignes principales (**Tableau 3**). Certaines d'entre elles sont encore (très) peu connues.

321. La famille des ALDH1

La sous-famille ALDH1A comprend les isoenzymes de ALDH1A1, ALDH1A2 et ALDH1A3, impliquées dans la biosynthèse de l'AR à partir de l'oxydation du rétinaldéhyde, et jouent donc un rôle crucial dans cette voie de signalisation puisqu'elles ont une forte affinité pour oxyder le *tout-trans* (all-trans) et le 9-cis-retinal. Elles régulent ainsi la transcription de nombreux gènes impliqués dans le développement, au cours de l'embryogenèse (Niederreither et Dollé, 2008).

L'ALDH1A2 et l'ALDH1A3 sont plus efficaces et sélectives que l'ALDH1A1 pour oxyder le rétinaldéhyde (Niederreither et al. 1997), avec la plus forte spécificité revenant à l'ALDH1A2 (Duester et al. 2001 ; Maly et al. 2003). L'utilisation de modèles animaux, des souris déficientes pour ces gènes, a démontré que leur présence est d'ailleurs vitale pour le

développement et la survie. En effet, les souris meurent au stade embryonnaire par défaut de production d'AR au stade E7,5-8,5 (souris *Aldh1a2*-nulle) (Neiderreither et al. 1999) ou dans les 10h après la naissance à cause de défaut dans le développement nasal (souris *Aldh1a3*-nulle) (Dupé et al. 2003). L'administration d'AR à la mère gestante ou au nouveau-né peut restaurer partiellement ou totalement le phénotype (Neiderreither et al. 1999 ; Dupé et al. 2003).

Les différences d'activités associées à chaque membre de la famille, combinées à une spécificité de tissu et d'âge, sont responsables de gradients de concentrations au sein des tissus embryonnaires (Haeslbeck et al. 1999). Ainsi, l'ALDH1A2 serait le contributeur majeur à la synthèse d'AR dans les stades embryonnaires précoces alors que les ALDH1A1 et ALDH1A3 sont plus importantes pour les stades tardifs (Dupé et al. 2003).

Les ALDH1 sont exprimées à de forts niveaux dans le système oculaire de plusieurs mammifères (Horwitz et al. 2006 ; Piatigorsky et al. 1989). L'ALDH1A1 intervient dans l'homéostasie oculaire, en partenariat avec l'ALDH3A1, en détoxifiant des aldéhydes peroxydiques produits par l'absorption de lumière ultraviolette par l'oeil (Kinf et Holme 1997).

Le gène *ALDH1A1* code pour une protéine homodimère cytosolique dont les sous-unités font 54,7kDa. Elle est exprimée dans de nombreux tissus : cerveau, cornée, rétine, foie et tube gastrointestinal. L'ALDH1A1 a une forte affinité pour le *trans*-et le 9-*cis*-rétinaldéhyde ($K_m < 0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$) et pour l'acétaldéhyde (K_m entre 50 et 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$).

Le gène *ALDH1A2* code pour une protéine homotétramère cytosolique dont les sous-unités font 56,7kDa. Les souris déficientes pour l'*ALDH1A2* ne sont pas viables du fait d'un défaut de développement des muscles cardiaques et du cerveau antérieur.

Le gène *ALDH1A3* code pour une protéine homotétramère dont les sous-unités font 56kDa. Elle est exprimée à faible niveau dans la plupart des organes et à des niveaux élevés dans les glandes salivaires, l'estomac et le rein.

L'*Aldh1a7* est exprimée uniquement chez la Souris et le Rat. Un traitement au phénobarbital (PB) induit l'expression de l'*Aldh1a7* chez le rat et conduit à l'augmentation de son activité dans le surnageant du foie d'un facteur 10 par-rapport à une situation contrôle (Deitrich et al. 1971). Elle est identique en terme de séquence en acide aminé à l'*Aldh1a1* avec laquelle elle est interchangeable (Kathmann et Lipsky, 1997 ; Kathmann et al. 2000 ; Marselos et al. 1987) bien que leurs schémas d'expressions, et leurs préférences pour les substrats soient différents. De plus, l'*Aldh1a7* ne participe pas à l'oxydation du rétinol en AR (Hsu et al. 1999 ; Marselos et al. 1987).

Bien que l'ALDH2 soit un membre de la famille ALDH1B (elle est semblable à 68% à l'ALDH1A1), elle bénéficie de l'ancienne nomenclature en tant qu'ALDH2 compte-tenu des nombreux travaux qui ont été conduits sur le métabolisme de l'éthanol.

L'ALDH1B1 est une enzyme mitochondriale homotétramérique dont les sous-unités font 57,3kDa. La particularité de l'ALDH1B1 relève de sa transcription à partir d'un gène sans introns. Elle est très similaire à l'ALDH2 (75% d'identité) mais insensible à l'inhibition de son activité enzymatique par le disulfiram (cet inhibiteur sera revu plus loin). Elle est exprimée dans le foie et les testicules, le rein, les muscles squelettiques et les tissus fœtaux. L'identification d'une séquence partielle de l'enzyme dans la cornée pourrait y identifier sa présence. Elle contribue à l'oxydation de l'acétaldéhyde bien que son affinité soit moindre, et à la production d'AR. Elle serait plus particulièrement impliquée dans le développement du pancréas (Ioannou et al. 2013).

Les gènes *ALDH1L1* et *ALDH1L2* codent pour des homotétramères dont les sous-unités font 98,9 et 98,6kDa, respectivement. Elles codent respectivement pour la forme cytosolique ou mitochondriale de la déshydrogénase 10-FTHF (FDH) qui convertit le 10-formyltétrahydrofolate (10-FTHF) en tétrahydrofolate et CO₂ en utilisant le cofacteur NAD(P)H. Elles sont aussi capables d'hydrolyser le 10-FTHF en tétrahydrofolate et formate de façon indépendante du NAD(P). Bien que leur activité enzymatique soit proche, L'ALDH1L2 ne métabolise pas les substrats aldéhydes à chaînes courtes. L'ALDH1L1 est fortement exprimée dans le cytosol de foie humain où elle peut représenter jusqu'à 1% du contenu total en protéines cellulaires solubles.

322. La famille des ALDH2

L'ALDH2 est une enzyme mitochondriale homotétramérique dont les sous-unités font 54,4kDa. Elle est très abondante dans le cœur et le cerveau. Elle est largement impliquée dans le métabolisme de l'alcool, notamment la seconde étape puisqu'elle oxyde l'acétaldéhyde. Environ 40% de la population d'Asie de l'Est présente un polymorphisme dans ce gène (*ALDH2*2*). Le remplacement de la Glu487 par une lysine diminue son affinité pour le NAD⁺ (Farrés et al. 1994). Ceci conduit donc à une réduction importante de l'activité enzymatique. Lorsque le métabolisme de l'éthanol ne peut être mené à son terme, par absence de cette isoenzyme fonctionnelle, une accumulation d'acétaldéhyde induit des effets secondaires gênants (rougissements, nausées, céphalées, vomissements) (Wall et al. 1999) après l'absorption d'alcool (**Figure 23**). Ce phénomène explique l'intolérance à l'alcool par

certaines populations et une moindre prévalence de l'alcoolisme dans cette région du monde (Higuchi et al. 1995 ; Luczak et al. 2002). Ce phénomène a été mis à profit pour aider au sevrage alcoolique. La prise d'un inhibiteur de certaines isoenzymes et en particulier de l'ALDH2, le disulfiram, entraîne des effets secondaires similaires et participe au dégoût de l'alcool. Il faut noter que le dysfonctionnement de l'ALDH2, naturel ou induit, entraîne l'accumulation d'aldéhydes toxiques qui peuvent être à l'origine de pathologies (**Figure 24**).

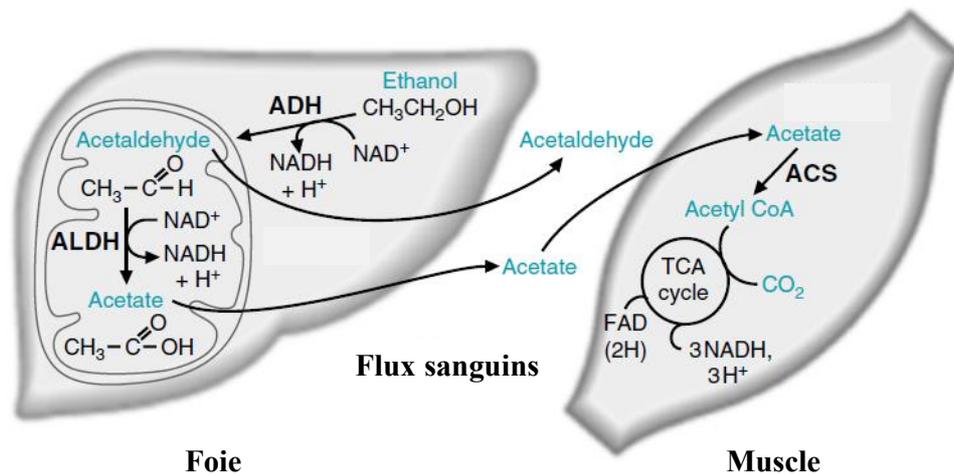


Figure 23 : Métabolisme de l'alcool (éthanol). Dans les cellules hépatiques, l'alcool déshydrogénase (ADH) métabolise, lors d'une réaction réversible, l'éthanol ingérée en acétaldéhyde toxique, lui-même métabolisé rapidement en acétate (non-toxique) par l'aldéhyde déshydrogénase 2 (ALDH2) mitochondriale. L'acétaldéhyde produit diffuse très facilement à travers les membranes biologiques et peut donc circuler dans le sang pour être métabolisé dans d'autres tissus. Transporté dans le sang, l'acétate est métabolisé par l'Acetyl-CoA Synthetase (ACS) dans le muscle squelettique et génère le cofacteur Acetyl-CoA nécessaire au cycle de Krebs ou tricarboxylic acid cycle (TCA). Flavine adénine dinucléotide (FAD). Figure adaptée de Marks' Basic Medical Biochemistry p.458.

L'ALDH2 est aussi impliquée dans le métabolisme de l'oxyde nitrique par la bioconversion de la nitroglycérine. Néanmoins, un traitement continu entraîne une désensibilisation, notamment chez les patients atteints d'angine de poitrine (Ferreira et al. 2012). Alda-1, une petite molécule activatrice des ALDH, a permis de mettre en évidence l'implication de l'ALDH2 dans la bioactivation des nitrates thérapeutiques (Chen et al. 2002). Elle permet de protéger l'ALDH2 d'une inactivation et empêche en cela la tolérance qui survient normalement dans les thérapies de nitroglycérine sur le long terme (Perez-Miller et al. 2010) pour les patients traités pour les ischémies ou pour les maladies coronaires. En plus d'un rôle dans les actions de vasodilatation induites par la bioactivation de la nitroglycérine, dans le traitement des angines et des insuffisances cardiaques (Chen et al. 2006), ALDH2 peut aussi protéger le myocarde ischémié. En effet, un traitement à l'Alda-1 permet aussi de

maintenir l'activité de l'ALDH2 qui détoxifie de l'aldéhyde 4-hydroxynonanal (4-HNE) produit par le myocarde ischémié.

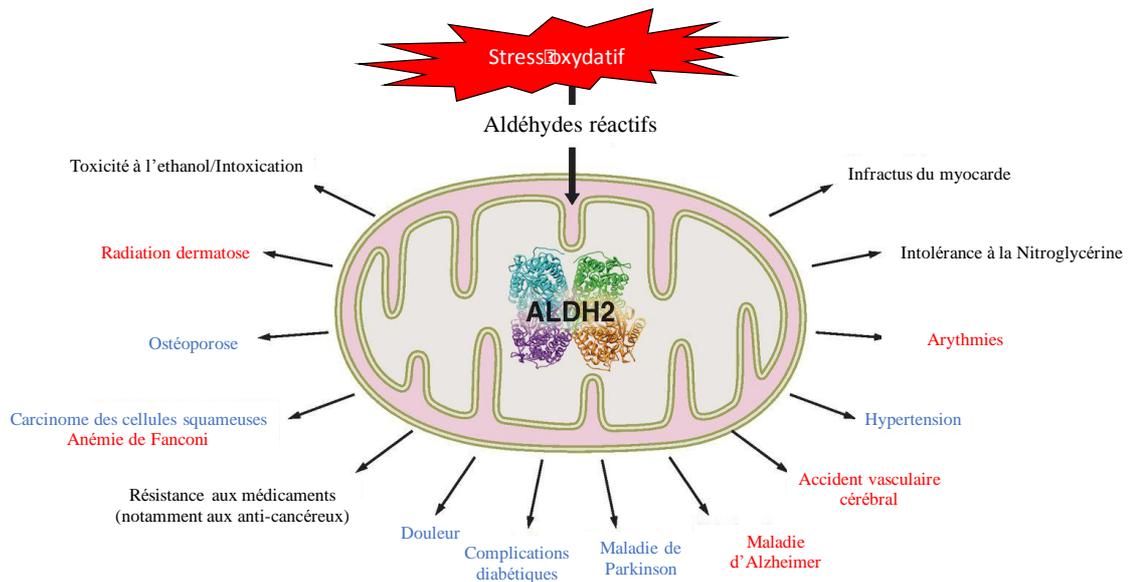


Figure 24 : Pathologies dans lesquelles l'activation de l'ALDH2 pourrait être bénéfique. Le rôle de l'ALDH2 a été démontré dans des pathologies après des études précliniques de preuves de concept (rouge), proposé après des études pré-cliniques et des études épidémiologiques ou pathophysiologiques humaines (en noir) et supposé sur la base d'observation des symptômes cliniques (en bleu). Figure adaptée de [Chen et al. 2014](#).

323. La famille des ALDH3

La famille des ALDH3 revêt des intérêts considérables pour la recherche contre le cancer d'une part, et pour son rôle dans la formation et la stabilité de la sphère oculaire d'autre part. L'enzyme ALDH3A1 est un homodimère dont les unités cytosoliques font 50,4kDa. Elle est exprimée de façon constitutive à de très forts niveaux dans la cornée et le cristallin, représentant 10-40% des protéines hydrosolubles appelées ici spécifiquement « cristallins » de plusieurs espèces de mammifères dont l'Homme. Les souris déficientes en ALDH3A1 (*Aldh3a1*^{-/-}) ou en ALDH1A1 et ALDH3A1 (*Aldh1a1*^{-/-}:*Aldh3a1*^{-/-}) développent une caractacte, un mois après la naissance alors que les souris déficientes pour ALDH1A1 (*Aldh1a1*^{-/-}) la développent seulement à 6 à 9 mois ([Lessen et al. 2007](#)). Ces isoenzymes jouent donc un rôle dans la protection de l'œil des dommages induits par les radiations ultraviolettes, au travers de leurs fonctions catalytiques. En effet, elles détoxifient les aldéhydes induits par les UV, dont ceux issus de la peroxydation des lipides ainsi que le 4-Hydroxy-nonéanal, métabolisé en malondialdéhyde par l'ALDH3A1 ([Pappa et al. 2003](#)). A noter, l'ALDH1A1 est capable de compenser l'absence de l'ALDH3A1 ([Manzer et al. 2003](#)).

Elle oxyde aussi les lipides de chaînes moyennes et les aldéhydes aromatiques comme l'hexanal et le benzaldéhyde. Elle utilise le NADP⁺ plutôt que le NAD⁺ comme cofacteur (Vasiliou et Pappa, 2000). Elle est faiblement exprimée dans les tissus voire à des niveaux indétectables dans le foie normal.

L'ALDH3A2 est une enzyme microsomale homodimère dont les sous-unités font 54,8kDa. Elle a une forte activité d'oxydation des aldéhydes aliphatiques de chaînes moyennes, des aldéhydes gras issus de lipides contenant 16 à 18 carbones (Rizzo et al. 2001). Deux variants d'épissage ont été répertoriés : l'isoforme majoritaire est localisée dans le réticulum endoplasmique tandis que l'isoforme mineure est dans le peroxyosome (Ashibe et al. 2007). Plusieurs mutations du gène *ALDH3A2* entraînent une maladie génétique sévère, le syndrome de Sjögren-Larsson (SLS), caractérisé par une naissance avant-terme, des symptômes neuro-cutanés, un retard mental, une spasticité, une déficience respiratoire et des ichtyoses (De Laurenzi et al. 1996 ; Demozay et al. 2004).

L'ALDH3B1 est une enzyme homodimère qui métabolise les aldéhydes issus de la peroxydation des lipides (Marchitti et al. 2010).

L'ALDH3B2 humaine homodimère manquerait de 94 acides aminés dans sa région N-terminale par-rapport à la protéine murine. L'absence d'activité enzymatique suggère que ce soit un pseudogène (Marchitti et al. 2008).

L'ALDH3B3 est présente dans l'espèce murine mais pas humaine.

324. La famille des ALDH4

L'ALDH4A1 est une enzyme mitochondriale homodimère de 61,7kDa aussi connue sous le nom de déhydrogénase pyrroline-5-carboxylate (P5C). Elle convertit le P5C issu de la proline et l'ornithine, en glutamate (GABA) (Hu et al. 1996). Plusieurs substrats enzymatiques ont été répertoriés : les semialdéhydes glutamiques, succiniques, glutariques, et les sémialdéhydes adipiques (Forte, McRobbie et Pietrusko 1986). La perte de fonction de l'ALDH4A1 conduit à l'apparition de l'hyperprolinémie de type II. Cette maladie autosomale récessive est caractérisée par une accumulation plasmatique de proline et du Δ -1-pyrroline-5-carboxylate qui entraînent des manifestations neurologiques telles que des crises de type épileptique et un retard mental (Valle et al. 1974 ; Yoshada et al. 1998). Des études récentes ont montré une activation transcriptionnelle du gène *ALDH4A1* par p53 pour probablement protéger du stress cellulaire.

325. La famille des ALDH5

L'ALDH5A1 est une protéine tétramérique majoritairement mitochondriale dont les sous-unités font 58,6kDa, aussi connue sous le nom de la succinate semialdéhyde déshydrogénase (SSADH). Elle catalyse l'oxydation du succinate semialdéhyde en succinate (Kang et al. 2005) lequel sera ensuite transformé en glutamate. Ce dernier sera éventuellement réutilisé pour une nouvelle synthèse de GABA (Testore et al. 1999). Le succinate créé peut aussi intégrer le cycle de Krebs aussi appelé cycle de l'acide citrique. Une infime fraction du succinate est produite par la SSADH cytosolique (l'enzyme étant minoritaire dans le cytoplasme). Les mutations dans les régions codantes ou non-codantes du gène entraînent la production d'un ARNm non-fonctionnel et conduisent à une maladie rare autosomale récessive métabolique de dégradation de l'acide 4-aminobutyrique caractérisée par une accumulation de GABA et d'acide 4-hydroxybutyrique. Néanmoins, ces accumulations sont aussi retrouvées dans de nombreuses maladies neurologiques dont les phénotypes sont modérés ou sévères, dont les retards mentaux, l'ataxie et les crises convulsives, sans qu'il y ait de dysfonction du gène. La souris déficiente en ALDH5A1 présente des niveaux élevés de GABA et d'acide 4-hydroxybutyrique dans l'urine, le foie et le cerveau. Elle développe une ataxie, un faible poids, une myoclonie et des crises convulsives avec un statut épileptique semblable à celui observé chez les patients humains déficients en ALDH5A1.

326. La famille des ALDH6

L'ALDH6A1 est un tétramère mitochondrial dont les sous-unités font 57,8kDa, aussi connu sous le nom de méthylmalonate semialdéhyde déshydrogénase (MSDH). Elle catalyse la décarboxylation oxydative du malonate et du méthylmalonate en acétyl-CoA et propionyl-CoA. Elle est aussi impliquée dans le catabolisme de la valine et de la pyrimidine. Elle oxyde de façon irréversible la décarboxylation du malonate et du méthylmalonate semialdéhyde en acétyl et propionyl-CoA. A la différence de la majorité des ALDH humaines qui catalysent l'oxydation des aldéhydes de façon irréversible en acides carboxyliques correspondants, l'ALDH6A1 génère un produit CoA thioester. Elle possède une fonction enzymatique estérase lui permettant d'hydrolyser l'acétate p-nitrophényle pour générer l'acétyl-CoA, lui-même utilisé dans le cycle de Krebs.

Un défaut d'activité ALDH6A1 entraîne des niveaux élevés de β -alanine, d'acide 3-hydroxypropanoïque et des deux isomères d'acides 3-amino et 3-hydroxyisobutyrique dans

l'urine. Il en résulte un retard du développement. Néanmoins, seuls quelques cas ont été recensés (Gibson et al. 1993 ; Gray et al. 1987 ; Pollitt et al. 1985).

327. La famille des ALDH7

L'ALDH7A1 aussi connue sous le nom de l'Antiquitine, est très ubiquitaire. Elle est retrouvée dans le cytosol, le noyau et les mitochondries. Elle partage 60% d'homologie avec la « protéine de 26 grammes du pois vert de jardin » (« 26g garden green Pea ») impliquée dans la régulation de la pression de turgescence dans le règne végétal. Leur proximité suggère un rôle dans la régulation de la pression de turgescence cellulaire humaine. Toutefois, son rôle exact n'est pas encore identifié. Elle pourrait jouer un rôle dans la détoxification des aldéhydes générées lors du métabolisme de l'alcool puisqu'elle partage 69% d'homologie avec l'ALDH2 (faible affinité pour l'acétaldéhyde) et lors de la peroxydation des lipides. L'ALDH7A1 est très impliquée dans le développement oculaire et dans la morphogénèse chez le poisson-zèbre où elle participe à la formation des nageoires (Babcook et al. 2014).

328. La famille des ALDH8

L'ALDH8A1 est une enzyme homotétramérique cytosolique dont les sous-unités font 53,4kDa. C'est le quatrième membre des ALDH intervenant dans le métabolisme de l'AR, à partir de l'oxydation du rétinaldéhyde. Elle a une préférence pour le 9-cis-rétinal (40 fois plus d'activité) par-rapport au *tout-trans-retinal*, contrairement aux autres isoenzymes impliquées dans la biosynthèse de l'AR (Lin et al. 2003).

329. La famille des ALDH9

L'ALDH9A1 est une enzyme cytosolique homotétramérique, dont les sous-unités font 53,8kDa et aussi connue sous le nom γ - triméthylaminobutyraldéhyde déshydrogénase. Elle est extrêmement étudiée pour sa fonction supposée dans la synthèse alternative du neurotransmetteur GABA majoritaire dans le cerveau des mammifères (Gibson et al. 2005). ($K_m = 5-14 \mu M$) à partir de l'oxydation du 4-aminobutyraldéhyde (Kinkonyogo et Pietruszko, 1996).

Elle catalyse aussi l'oxydation de l'aldéhyde bêtaïne en bêtaïne qui peut servir comme un groupe méthyle donneur pour la biosynthèse de méthionine. La bêtaïne joue aussi un rôle osmoprotecteur pour la cellule (Vaz et al. 1999). Elle pourrait être impliquée dans la régulation de l'osmolarité rénale (Grunewald et Eckstein 1995). ALDH9A1 est impliquée

dans une étape de la biosynthèse de la carnitine, un transporteur des acides gras activés à travers la membrane interne de la mitochondrie pour la β -oxydation (Vaz et al. 1999 ; Vaz et al. 2000).

3221. La famille des ALDH16

L'*ALDH16A1* code pour une protéine humaine de 802 acides aminés dont la fonction reste inconnue bien qu'elle ne semble pas avoir d'activité catalytique (Vasiliou et al. 2013). Ce membre découvert plus récemment contient 2 domaines de site actifs aux ALDH, 4 domaines transmembranaires et un domaine spirale-enroulé. Chez la grenouille, et chez des invertébrés (acnidie plissée, anémone de mer, oursin, urochordés) ou des bactéries, la protéine contient une cystéine importante pour la catalase (Cys-302) absente chez les mammifères (Vasiliou et al. 2013).

3222. La famille des ALDH18

Le gène *ALDH18A1* code pour une enzyme de la membrane interne des mitochondries. Les monomères de 87,1kDa utilisent l'ATP ou la NAD(P)H pour des activités enzymatiques comme la γ -glutamyl kinase ou la γ -glutamyl phosphate réductase (Smith et al. 1980). L'*ALDH18A1* est aussi connue sous le nom de Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS). Elle fait partie des 7 enzymes qui synthétisent de façon synchrone l'arginine et la proline à partir du glutamate précurseur endogène. Elle catalyse aussi la réduction du L-glutamate en acide glutamique γ -sémialdéhyde (Hu et al. 1999). Une dysfonction de la P5CS entraîne une maladie génétique associée à une hyperélasticité de la peau, une cataracte et un retard mental (Aral et al. 1996). Elle pourrait être bénéfique dans certaines approches thérapeutiques ou dans le traitement de certaines maladies.

La présentation de la superfamille des ALDH humaine renseigne sur le niveau de complexité qui peut se mettre en place entre les différents membres pour assurer soit des fonctions spécifiques soit des fonctions communes, en fonction de l'étape de développement embryonnaire ou de la situation physiopathologique (**Tableau 3**).

Isozymes ALDH	Localisation tissulaire	Localisation subcellulaire	Substrat préféré	Fonctions, syndromes cliniques ou maladies associées	Localisation chromosomique
ALDH1A1	Foie, Reins , Érythrocytes, Muscles squelettiques, Poumons, Seins, Estomac, Mucoses, Cerveau, Pancréas, Testicules, Ovaires	Cytoplasmique	Rétinaldéhyde	Sensibilité à l'alcool, Alcoolisme, Syndrome de Parkinson associé dans des souris déficientes en ALDH1A1 et ALDH2	9q21.13
ALDH1A2	Testicules , Foie, Reins	Cytoplasmique	Rétinaldéhyde	Augmentation du risque des défauts dans le tube neural	15q21.3
ALDH1A3	Reins , Muscles squelettiques, Poumons, Seins, Testicules, Mucose gastrique, Glandes salivaires	Cytoplasmique	Rétinaldéhyde	Létalité embryonnaire des animaux knockout	15q26.3
ALDH1B1	Foie, Reins , Cœur, Muscles squelettiques, Cerveau, Prostate, Poumon, Testicules, Placenta	Mitochondriale	Aldéhydes aliphatiques	Inconnu	9q11.1
ALDH1L1	Foie , Reins, Muscles squelettiques	Cytoplasmique	acide 10-formyltétrahydrofolique	Défauts de formation du tube neural, Diminution du folate hépatique dans et faible fertilité dans les souris KO	3q21.3
ALDH1L2	Inconnue	Mitochondriale	Inconnu	Inconnu	12q23.3
ALDH2	Foie, Reins , Cœur, Muscles squelettiques, Poumons, rétine, Cerveau, Pancréas, Prostate, Rate	Mitochondriale	Acétyldéhyde, 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE), Malondialdéhyde (MDA)	Voir Figure 24	12q24.2
ALDH3A1	Mucose gastrique, Cornée , Seins, Poumons , Rétine, (Esophage, Glandes salivaires, Peau	Cytoplasmique	Aldéhydes aromatiques et aliphatiques	Cataracte dans les animaux modèles	17p11.2
ALDH3A2	Foie, Rein , Cœur, Muscles squelettiques , Poumons, Cerveau, Pancréas , Placenta	Microsomique	Aldéhydes gras	Syndrome Sjögren-Larsson	17p11.2
ALDH3B1	Reins, Poumons , Pancréas, Placenta	Cytoplasmique	Inconnu	Inconnu mais locus associé à une schizophrénie paranoïaque	11q13
ALDH3B2	Glande parotide	Cytoplasmique	Inconnu	Inconnu	11q13
ALDH4A1	Foie, Reins , Cœur, Muscles squelettiques , Cerveau, Placenta, Poumons, Pancréas, Rate	Mitochondriale	Glutamate α -sémialdéhyde	Hyperprolinémie de type II	1p36
ALDH5A1	Foie, Reins , Cœur, Muscles squelettiques , Cerveau	Mitochondriale	Succinate semialdéhyde	acidurie 4-hydroxybutyrique	6p22
ALDH6A1	Foie, Rein , Cœur, Muscles squelettiques	Mitochondriale	Malonate semialdéhyde	Retard du développement, Anomalies métaboliques, acidémie méthylmalonique	14q24.3
ALDH7A1	Foie fœtal, Rein, Cœur , Poumon, Cerveau, Ovaires, œil, Cochlée , Rate, corde spinal adulte	Cytoplasmique	Acide α -aminoadipic semialdéhyde	Épilepsie dépendant de la pyridoxine, Locus associé à l'ostéoporose	5q31
ALDH8A1	Foie, Reins , Cerveau, Seins, Testicules	Cytoplasmique	Rétinaldéhyde	Inconnue	6q23.2
ALDH9A1	Foie, Reins, Cœur, Muscles squelettiques , Cerveau, Pancréas, Glandes surrénales, Moelle épinière	Cytoplasmique	γ -aminobutyraldéhyde	Polymorphisme dans le traitement résistant à la dyskésie tardive chez les patients schizophrènes japonais	1q23.1
ALDH16A1	Inconnue	Cytoplasmique et Transmembranaires	Inconnu	Association possible avec la goutte	19q13.33
ALDH18A1	Reins, Cœur, Muscles squelettiques, Pancréas, Testicules, Prostate, Rate, Ovaires, Thymus	Mitochondriale	Glutamate α -sémialdéhyde	Hyperammoniémie, Hypoprolinémie, Neurodégénérescence, Cataracte	10q24.4

Tableau 3 : Caractéristiques principales des 19 ioenzymes d'ALDH humaines. Tableau réalisé à partir des données de Normam et Sladek 2002 ; Pors et Moreb 20014.

33. Les fonctions des ALDH

331. Les fonctions catalytiques particulières

Outre leurs fonctions de métabolisation d'aldéhydes et de détoxification, certaines isoenzymes présentent des activités catalytiques particulières. Les ALDH1A1, ALDH1L1, ALDH2 et ALDH9A1 peuvent ainsi intervenir dans la bioactivation des nitrates organiques grâce à leur activité enzymatique estérase (c'est une fonction particulièrement importante pour l'ALDH2, vue plus haut) (Blatter et al. 1992 ; Marchitti et al. 2008) tandis que l'ALDH1A1, l'ALDH1B1 et l'ALDH2 ont aussi une activité réductase pour le nitrate.

La voie de signalisation de l'AR joue un rôle important aussi bien dans les cellules souches musculaires embryonnaires (Chanda et al. 2013) que dans les cellules cancéreuses (Qiu et al, 2015) (Figure 25). En effet, l'AR et ses dérivés, le *tout-trans*-RA (ATRA), le 9-cis-RA et le 13-cis-RA, sont impliqués dans la régulation génique, dans la morphogenèse et dans le développement (Appel et al. 2003 ; Duester et al. 2003 ; Zhao et al. 1996). L'alimentation est la seule source de vitamine A (ou rétinol, nom dérivé alcoolique et appellation habituelle) possible pour les animaux qui sont incapables de la produire. Elle provient de la vitamine A préformée ou de carotène convertis dans l'organisme selon l'origine alimentaire animale ou végétale :

- La vitamine A issue des aliments d'origine animale (principalement le beurre, les œufs, le lait, la viande, certains poissons) est l'une des vitamines A les plus actives : la vitamine A préformée ou rétinol.
- La vitamine A issue des fruits et légumes comme les épinards, les amarandes, les mangues, les tomates, les carottes ou les légumes jaunes comme le potiron, est appelée « caroténoïde provitamine A ». Le β -carotène est le plus important pour l'alimentation humaine et le plus aisément converti en rétinol.

Les cellules épithéliales de l'intestin absorbent le rétinol et les β -carotènes produits par l'organisme ; elles oxydent les β -carotènes en rétinaldéhydes, forme plus solubles, avant de les réduire en rétinol. L'ensemble du rétinol est ré-estérifié et incorporé aux lipoprotéines chylomicrons qui passent dans la circulation lymphatique avant de rejoindre la circulation générale (Blomhoff et al. 1994). La plupart des chylomicrons sont transportés vers le foie, le

principal organe de stockage du rétinol (Hussain et al. 1991) bien que certains tissus en captent quelques-uns via leurs récepteurs de surface cellulaire pour une action rapide des rétinoïdes (Blomhoff et al. 1992).

Dans le plasma, le rétinol se lie au Retinol Binding Protein 4 (RBP4) pour activer son récepteur « Stimulated by retinoic acid » à la surface des cellules (STR6). Liposoluble et insoluble dans l'eau, le rétinol se lie à des des protéines de transport Cellular retinol binding protein (CRBP), dans le cytoplasme des cellules cibles (Folli et al. 2002). Les CRBP vont ensuite délivrer le rétinol à l'alcool déshydrogénase (ADH) aussi appelée retinol dehydrogénase pour l'oxyder en rétinaldéhyde. Cette réaction est réversible grâce à des déshydrogénases de rétinol (RDH). De plus, le rétinol lié au CRBP peut aussi être catalysé par la rétinol acyltransférase (LRAT) pour être stockée sous forme estérifiée. Cette action est aussi réversible puisque l'ester de rétinol est catalysé par des hydrolases d'ester de rétinol (REH) (Chen et al. 2003a). Le rétinaldéhyde est ensuite oxydé de façon irréversible en acide rétinoïque par les aldéhydes déshydrogénases de la famille ALDH1A (ALDH1A1, ALDH1A2, ALDH1A3) et l'ALDH8A1, aussi appelées Rétinaldéhyde déshydrogénases (RALDH). L'AR produit lie son récepteur Cellular Retinoic Acid Binding Protein (CRABP), migre dans le noyau pour lier ses récepteurs pour activer la transcription de ses gènes cibles. Des enzymes telles que les cytochromes P450 hydroxylases (CYP26) sont chargées de dégrader l'acide rétinoïque (Petkovic et al. 2001) pour maintenir un taux plasmique d'AR humain autour de 1 à $2 \cdot 10^{-8}M$ (De Leenheer et al. 1982 ; Napoli et al. 1986). Néanmoins, il est possible que dans certains tissus ce taux soit beaucoup plus élevé du fait de la présence d'enzymes impliquées dans la synthèse de l'AR.

Deux récepteurs de la superfamille des récepteurs d'hormones nucléaires - les récepteurs à l'acide rétinoïque (RAR) et les récepteurs rétinoïdes X (RXR) - permettent l'induction génique à partir de la voie de signalisation des rétinoïdes. Le muscle squelettique est une cible de la voie de signalisation des rétinoïdes et exprime des récepteurs RAR et RXR. L'AR est un morphogène indispensable au cours de l'embryogenèse musculaire, où sa synthèse est régulée spatialement et temporellement, et parce qu'elle induit ou régule la synthèse de protéines régulatrices de la myogenèse comme MyoD ou myogénine (Froeschlé et al. 1998).

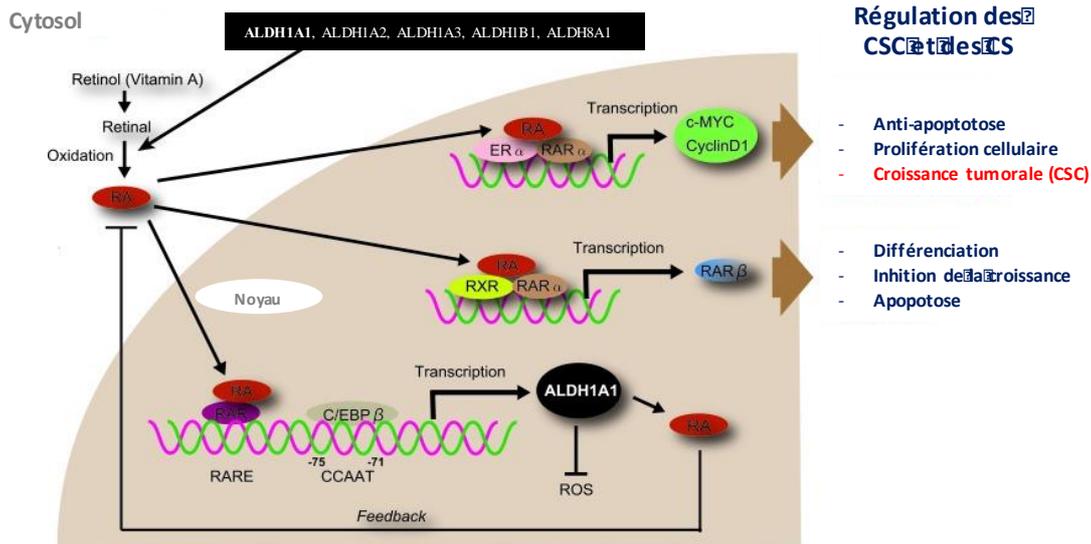


Figure 25 : Régulation et fonctions des ALDH dans les cellules souches normales ou cancéreuses. Plusieurs ALDH participent au métabolisme de l'acide rétinoïque (RA), un facteur qui intervient directement dans l'autorenouvellement, la différenciation ou la résistance tumorale des cellules souches normales (SC) ou cancéreuses (CSC). Le rétinol est absorbé par les cellules qui le métabolisent en rétinol lorsqu'elles expriment la famille des ALDH1 (ALDH1A1, ALDH1A2, ALDH1A3, ALDH1B1) ou l'ALDH8A1. RA est capable de lier ses dimères de récepteurs (RAR ou RXR), d'être transloqué au noyau pour activer la transcription de ses gènes cibles dont le RAR β . Dans les cellules qui expriment des récepteurs à l'œstrogène (ER α), RA peut s'y lier conjointement avec le RXR pour induire c-MyC et la cycline D, des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et tumorale et l'inhibition de l'apoptose. ALDH1A1 est aussi capable de participer à la détoxification des aldéhydes toxiques comme les espèces activées de l'oxygène (ROS). Figure adaptée de Tomita et al. 2016.

332. Les principales fonctions non-catalytiques

Nous avons vu plus haut que quelques ALDH jouent des rôles dans la structure et l'homéostasie du système oculaire (**Figure 26**). Certaines protéines des sous-familles ALDH1A1 et ALDH3A1, en plus d'une activité de détoxification d'aldéhydes toxiques formés par l'impact des rayons UV solaires avec le système oculaire, jouent un rôle directement structural. Ces protéines en effet sont hydrosolubles et participent à la transparence des lentilles (cornée, cristallin). L'ALDH3A1 est le filtre majeur d'absorption des UVR, qui peuvent induire des inactivations enzymatiques, des défauts de repliements (de configuration 3D), et des agrégations non naturelles (Estey et al. 2007), dont les conséquences peuvent conduire à l'accumulation de protéines agrégées observables lors de la formation de la cataracte (Bloemendal et al. 2004). De plus, le NAD(P)H produit par le métabolisme de l'activité des ALDH contribue comme antioxydant dans ce système. En effet, il absorbe directement les radiations UV et constitue l'agent de réduction utilisé pour la régénération des antioxydants tels que le glutathion (Lessen et al. 2008).

Plusieurs ALDH ont été identifiées comme des protéines de liaison pour des composés endogènes ou exogènes. L'ALDH1A1 est ainsi capable de se lier aux androgènes, à l'hormone thyroïdienne et au cholestérol (Chen et al. 2011). Elle interagit aussi avec des médicaments tels que la quinolone, la daunorubicine et les flavopyridoles (Chen et al. 2011). De telles interactions moléculaires sont probablement médiées par des domaines spirales-enroulées, des motifs d'oligomérisation très stables, retrouvés dans de nombreuses protéines de régulation génique, de communication cellulaire, de fusion membranaire et d'extrusion de médicaments (Mason et al. 2004). Ces domaines sont formés par les résidus 81-89, 114-144 et 172-183 de l'ALDH1A1. D'autres ALDH comme l'ALDH3A1 et l'ALDH16A1 en contiennent également.

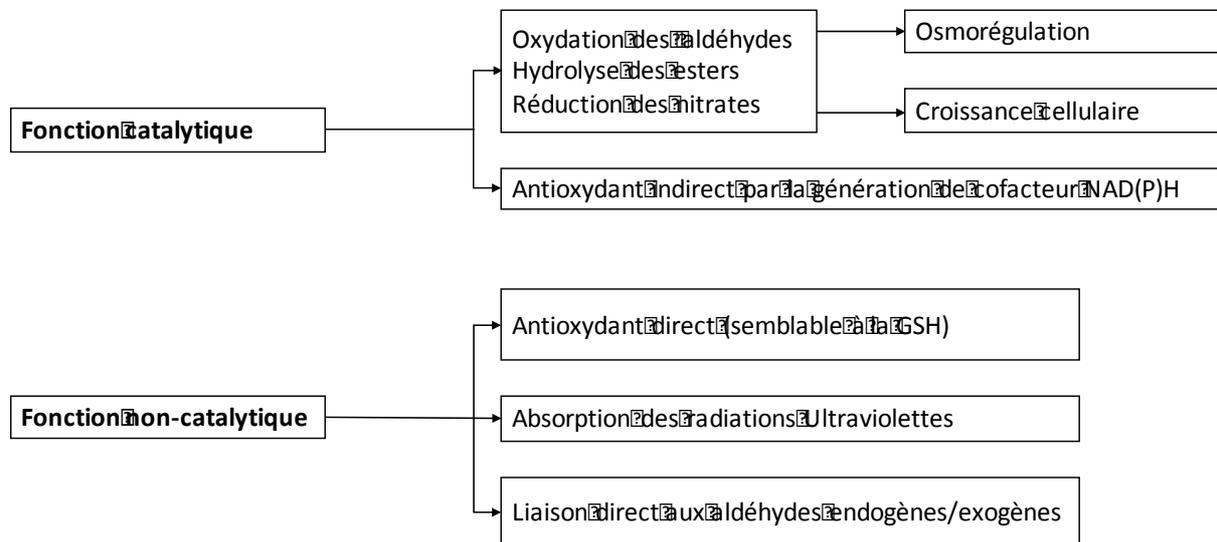


Figure 26 : Principales fonctions catalytiques et non-catalytiques des ALDH. Figure adaptée de Vasiliou et Norbert 2005.

34. Les cellules ALDH^{Br} dans les différents tissus

34.1. Les cellules ALDH dans les tissus hématopoïétiques

Les cellules ALDH^{Br} de la moelle osseuse ou du sang de cordon représentent environ 1% des cellules mononucléées (Christ et al. 2007 ; Gentry et al. 2007) alors qu'elles sont 10 fois moins nombreuses dans le sang périphérique non-mobilisé (0,1%). Elles présentent des capacités fonctionnelles de cellules souches hématopoïétiques (CSH). *In vitro*, les cultures donnent plusieurs lignages à court terme (myéloïde, lymphocytaire, érythrocytaire, mégacaryocytaire) et révèlent la présence de progéniteurs à fort potentiel prolifératif à long terme. *In vivo*, des cellules ALDH^{Br} injectées dans des souris immunodéficientes irradiées

mortellement participent aux reconstructions myéloïdes rapidement, et lymphoïdes plus tardivement (Christ et al. 2007 ; Gentry et al. 2007 ; Pearce et al. 2007 ; Storms et al. 1999 ; Storms et al. 2005).

Plusieurs populations de cellules ALDH^{Br} peuvent être distinguées sur la base d'expression de marqueurs extracellulaires (principalement, CD34 et CD133). Dans le sang de cordon ou de la moelle osseuse, les cellules ALDH⁺/CD34⁺ présentent une forte activité proliférative et un potentiel de différenciation myéloïde *in vitro* ; elles contribuent à la reconstitution médullaire *in vivo*. Liu et al. (2010) ont démontré la possibilité de différenciation de cellules ALDH⁺/CD34⁺ en lymphocytes T. De plus, chez certains patients, la rapidité et l'efficacité de greffe médullaire à court et à long terme dépend de la dose de cellules ALDH^{Br}/CD34⁺ transplantées. Les cellules ALDH^{Lo}/CD34⁺ correspondent à une population au potentiel de différenciation myéloïde restreint mais riche en progéniteurs lymphocytaires capables de se différencier en cellules Natural Killer (Pearce et al. 2005 ; Storms 2005). Il apparaît donc un schéma dans lequel les cellules humaines expriment le CD34 et les ALDH dans les premières étapes de différenciation myéloïde avant que l'expression des ALDH ne s'éteigne pour permettre une différenciation lymphocytaire. L'injection d'une dizaine de cellules ALDH⁺/CD34⁻ est capable de reconstituer l'ensemble de l'hématopoïèse chez la souris à long terme (Mirabelli et al. 2008 ; Pearce et al. 2007 ; Storms et al. 2005). Ce résultat pointe l'efficacité particulière qui correspondrait à une population primitive. Plus récemment, l'étude de cellules Lin⁻/ALDH⁺/CD133⁺ quiescentes et positives à 95% pour le CD34, a confirmé un caractère primitif par la reconstitution totale de l'hématopoïèse à long terme lors d'expériences de transplantations secondaires en série (Boxall et al. 2009 ; Hess et al. 2006 ; Hess et al. 2008).

L'inhibition de l'activité des ALDH1A dans les cellules humaines de la moelle osseuse ou dans le sang de cordon ombilical CD34⁺/CD38⁻/Lin⁻ entraîne la formation d'une plus forte proportion de cellules primitives CD34⁺. La voie de l'AR est importante pour la différenciation des cellules hématopoïétiques (Chute et al. 2006), mais le rôle précis des différentes isoenzymes est encore controversé.

Les populations ALDH^{Br} issues de la moelle osseuse (Gentry et al. 2007 ; Keller et al. 2009), de sang périphérique (Povsic et al. 2009) ou de sang de cordon (Nagano et al. 2010 ; Sondergaard et al. 2010) renferment également des progéniteurs non-hématopoïétiques, tels que les progéniteurs endothéliaux ou les cellules souches mésenchymateuses multipotentes. L'hétérogénéité en cellules primitives et la richesse des potentiels de différenciation présentent un réel potentiel thérapeutique, qui a été testé *in vivo* dans plusieurs modèles

expérimentaux. Ainsi, la transplantation de cellules ALDH^{Br} issues de sang de cordon dans un fémur fracturé murin induit une réparation rapide des tissus osseux (Nagano et al. 2010). L'injection intraveineuse de cellules ALDH^{Br} humaines médullaires dans des modèles d'ischémie périphérique murine induit la restauration du flux sanguin et augmente la densité des capillaires sanguins (Capoccia et al. 2009 ; Keller et al. 2009). L'administration intraveineuse de cellules ALDH^{Br} de sang de cordon dans un modèle murin d'infarctus du myocarde induit une augmentation significative de la densité capillaire au niveau de la zone infarctée, bien qu'aucune cellule ALDH^{Br} n'ait suivi de différenciation cardiaque et que seules quelques-unes aient intégré le tissu vasculaire (Sondegard et al. 2010). Dans tous les types d'ischémie, le potentiel thérapeutique des cellules ALDH^{Br} humaines est lié à un recrutement temporaire au site d'hypoxie et à un effet trophique pro-angiogénique sur les tissus en régénération. Enfin, l'administration de cellules ALDH^{Br} humaines de sang de cordon dans un modèle murin de dégénérescence hépatique favorise l'hépatogénèse par un effet trophique (Zhou et al. 2009).

342. Les cellules ALDH dans le cancer

L'environnement des tumeurs cancéreuses est composé de cellules hétérogènes dans lesquelles une petite population de cellules est capable d'augmenter ses capacités d'autorenouvellement, d'initiation de tumeur, de propagation, de résistance au traitement et de récurrence à la maladie. Elles ont été appelées Cellules Souches Cancéreuses (CSC). Certaines ont une ou plusieurs activités ALDH (Tanei et al. 2009) qui leur permettent de résister à certains traitements par des agents anti-cancéreux. L'activité ALDH devient un marqueur fiable, indicatif, de la présence de cellules souches au sein de tissus présentant des transformations malignes. Il a été proposé, dans certains cas, que la présence de certaines isoenzymes puisse être utilisée comme une aide au pronostic (Ginestier et al. 2007).

Ainsi de nombreuses CSC de tumeurs solides (notamment sein, poumon, foie, colon, pancréas, ovaires, tête, cou, et prostate) présentent une forte activité ALDH (Alison et al. 2010), ou une expression abondante de certaines isoenzymes. La détection des isoenzymes est souvent réalisée par des techniques d'histologie, qui permettent de mettre en rapport les protéines suspectées, et la localisation anatomique. Cependant, la situation peut s'avérer complexe, puisque des contributions de multiples isoenzymes d'ALDH distinctes peuvent être observées en fonction du tissu tumoral considéré (Douville et al. 2009 ; Ginestier et al. 2007 ; Marcato et al. 2011). Quasiment toutes les isoenzymes ont été corrélées à des types de cancers

(sein, prostate, colon, rectum, estomac, oesophage, pancréas, vessie, poumon, système hématopoïétique) et il est encore nécessaire de bien définir la nature de l'isoenzyme responsable de la forte activité ALDH dans chaque type de cancer (Pors et al. 2014).

343. Les cellules ALDH dans les autres tissus

a) Les cellules ALDH dans le système nerveux

Chez la Souris ou le Rat, différentes populations cellulaires ALDH^{Br} ont été identifiées à partir de neurosphères ou de tissu neural (cerveau, moelle épinière) (Corti et al. 2006) et de différentes sous-populations de cellules souches neurales issues de la zone sous-ventriculaire cérébrale ou de la moelle épinière, distinguées sur la base de l'expression du CD133, et de CD15 (Obermai et al. 2010). La transplantation de cellules ALDH^{Br} dans le ventricule latéral du cerveau de souris a suggéré des capacités de migration et d'intégration. Certaines cellules se sont engagées dans différents lignages neuronaux avec une activité fonctionnelle propre à leur localisation anatomique. Par ailleurs, la transfusion de cellules ALDH^{Br} de la moelle épinière dans le canal neural de modèles murins d'amyotrophie spinale (SMA) a généré des motoneurons fonctionnels localisés dans la moelle épinière ventrale. Ceci retarde la progression de la maladie et augmente la durée de vie des souris. Les cellules ALDH^{Br} neurales pourraient donc constituer un nouvel outil d'étude dans le traitement de certaines maladies neurodégénératives (Corti et al. 2008).

b) Les cellules ALDH dans le pancréas

Une forte activité de l'ALDH1A1 a été retrouvée dans des cellules pancréatiques humaines en développement. Celles-ci expriment aussi des marqueurs de cellules souches comme les facteurs de transcription endocrine et des marqueurs extracellulaires (CD117 ou c-kit et CD133). Lors de la différenciation, l'activité de l'ALDH1A1 diminue. L'inhibition pharmacologique de cette activité dans les cellules des îlots au stade foetal conduit à une diminution de la différenciation des cellules endocrines et une augmentation de l'apoptose cellulaire (Li et al. 2014). Ceci peut être compensé par un co-traitement avec des agonistes des récepteurs RAR/RXR. De plus, l'inhibition par siRNA de l'ALDH1A1 diminue l'expression des RAR et induit de l'apoptose cellulaire par la suppression de la voie des phosphoinositide 3-kinas (PI3K) et l'activation des cascades de signalisation. Plus récemment, des cellules β -pancréatiques ont été isolées sur la base de l'activité ALDH, mettant en évidence l'importance des isoenzymes ALDH1A3 et ALDH1B1. Les cellules

centroacineuses ALDH^{Br} murines isolées à partir de pancréas sains expriment des marqueurs embryonnaires et forment des pancréatophères capable de différenciations exocrine et endocrine spontanées (Rovira et al. 2010 ; Ionannou et al. 2013).

c) Les cellules ALDH dans la prostate

Les cellules ALDH^{Br} humaines et murines issues de l'épithélium prostatique génèrent des canaux luminaux et basaux fonctionnels après transplantation *in vivo* dans des capsules rénales (Balber et al. 2011 ; Yao et al. 2010).

334. Les cellules ALDH dans les muscles squelettiques

Intrigué par les descriptions de progéniteurs identifiés au sein de certains tissus par ce nouveau marqueur, le laboratoire d'accueil a recherché et identifié des progéniteurs présentant une forte activité ALDH, au sein des muscles squelettiques et cardiaques humains. Caractérisés par un petit diamètre, ils représentent 2 à 4 % des cellules mononucléées obtenues à partir d'une dissociation enzymatique à la collagénase d'une biopsie de muscle tenseur du Fascia Lata. Deux sous-populations peuvent être distinguées sur la base de l'expression ou l'absence d'expression du marqueur extracellulaire CD34 (**Figure 25**). Ces sous-populations présentent des capacités de différenciation distinctes *in vitro*. Les cellules ALDH⁺/CD34⁺ représentent environ deux tiers des cellules musculaires à activité ALDH et sont des précurseurs de cellules adipogéniques et ostéogéniques au contraire des cellules ALDH⁺/CD34⁻ qui se différencient en cellules myogéniques ou ostéogéniques.

Des injections des deux sous-populations obtenues après tri par cytométrie de flux (FACS) dans des muscles de souris immunodéficiences, après nécrose musculaire et irradiation pour créer localement une dégénérescence musculaire, ont mis en lumière une capacité des cellules ALDH⁺/CD34⁻ à proliférer puis à participer à la régénération musculaire avec une très bonne efficacité tandis que les cellules ALDH⁺/CD34⁺ ont majoritairement disparu ou sont restées dans l'endomysium (Vauchez et al. 2009).

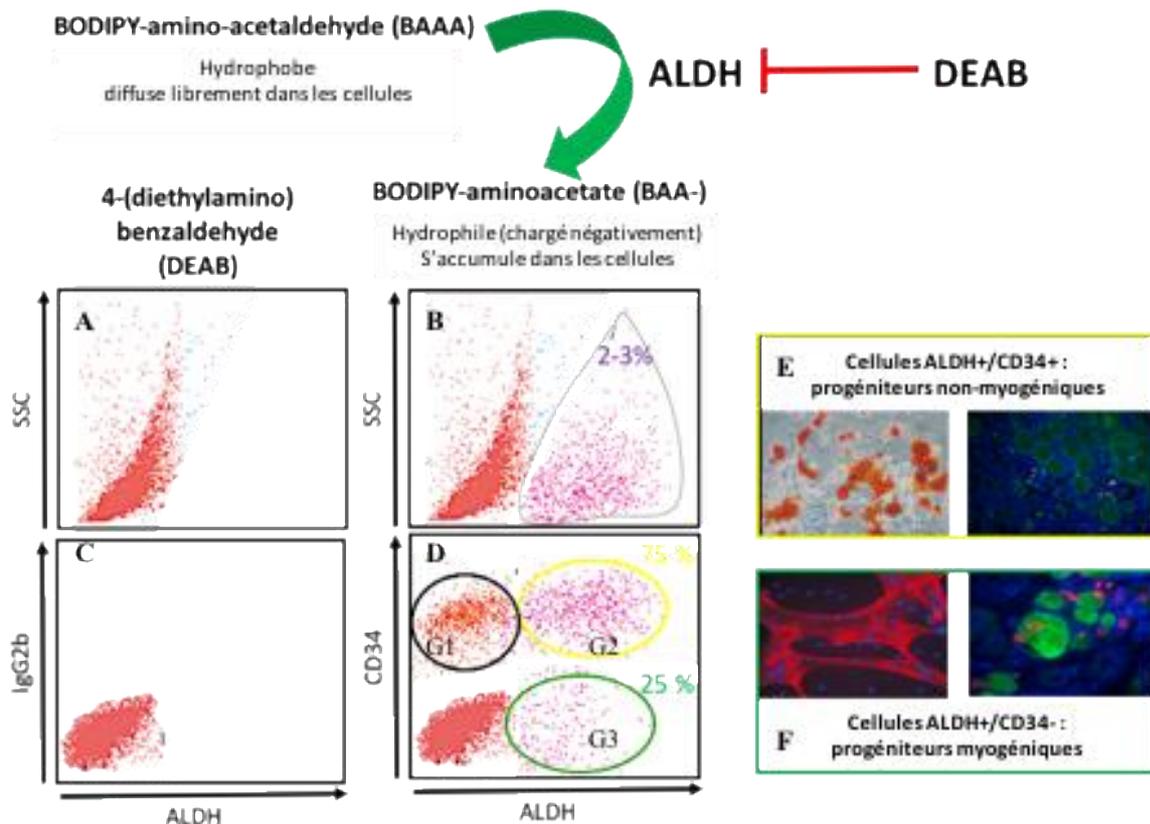


Figure 27 : Caractérisation des cellules ALDH positives musculaires par cytométrie de flux et capacité de régénération. Les cellules musculaires mononuclées obtenues après dissociation enzymatique d'une biopsie sont incubées en présence d'Aldéfluor, et d'un anticorps dirigé contre un marqueur transmembranaire, CD34, couplée à l'allophycyanine (APC). Le déplacement de fluorescence identifie la population ALDH positive (B) puisqu'elle est perdue lors de la pré-incubation d'un inhibiteur de l'activité des ALDH, le DEAB (A). Quatre sous-populations sont distinguées (D) ALDH-/CD34+ (G1), ALDH+/CD34+ (G2), ALDH+/CD34- (G3) et ALDH-/CD34- (non marquées) par rapport à l'isotype contrôle (C). Alors que les cellules en G3 sont capables d'entamer un programme de différenciation *in vitro* et de participer à la régénération musculaire dans une souris immunodéprimée *in vivo* (F), les cellules en G2 sont des progéniteurs adipeux *in vitro*, qui disparaissent ou demeurent dans l'endomysium *in vivo* (E). Les noyaux humains sont détectés en fluorescence rouge, les mitochondries humaines en vert et la laminine délimite les membranes des fibres musculaires et nerveuses. Figure adaptée de [Vauchez et al. 2009](#).

Jean et al. (2011) et El Heddad et al. (2012) ont décrit une catégorie de myoblastes issue de cultures primaires de muscles squelettiques humains présentant une forte activité ALDH (identifiée par l'Aldefluor) qu'ils ont attribuée à l'ALDH1A1 (El Heddad et al. 2012 ; Jean et al. 2011). Cette activité ALDH conférait à ces cellules un avantage de survie en réponse aux stress oxydatifs induit *in vitro* ou après transplantation cellulaire *in vivo*. Des résultats similaires ont été retrouvés à partir de myoblastes murins par une autre équipe (Vella et al. 2011). Toutefois, les myoblastes triés sur la base d'une faible ou forte activité ALDH présentaient les mêmes capacités de différenciation myogéniques *in vitro*. Il semblerait donc

qu'en culture, des cellules musculaires expriment des ALDH, identifiées par l'Aldefluor, et que ces cellules voient ainsi leurs capacités de survie augmentées. Les travaux de l'équipe d'accueil, et ceux rapportés ci-dessus, suggèrent donc qu'au sein du tissu musculaire d'abord, puis en culture primaire ensuite, des isoenzymes ALDH jouent des rôles dans la différenciation ou la survie cellulaire. Néanmoins, il se pourrait que l'activité ALDH ait une fonction distincte en fonction que son expression soit intrinsèque ou induite. Peu d'éléments nous renseignent concernant la présence de ces cellules ALDH, leur nature, ou les types des isoenzymes exprimées.

Etude 1

Contexte, présentation du travail, objectifs

Différentes approches de thérapie cellulaire ont été mises en œuvre au cours des deux décennies passées dans la perspective du traitement des myopathies et des cardiopathies. Des résultats mitigés ou décevants ont amené à remettre en question la nature des cellules employées, avant même que de s'attaquer aux voies d'administrations de ces cellules. De nombreuses équipes ont entrepris l'identification et la caractérisation de progéniteurs myogéniques, à partir du muscle squelettique ou d'autres tissus, ce qui a amené à la découverte, par exemple, des mésoangioblastes de la famille des péricytes. Le laboratoire d'accueil, intrigué par l'utilisation d'un nouveau réactif, l'Aldéfluor®, pour l'identification de cellules dites souches au sein des tissus hématopoïétiques, a identifié des populations de cellules myogéniques dans les tissus musculaires (Vauchez et al. 2009). L'aldéfluor® est un réactif permettant de caractériser certaines activités enzymatiques ALDH. Cependant, la spécificité de l'Aldéfluor® n'est pas connue, ou est au mieux controversée. Dans ce contexte, il semblait intéressant de caractériser, d'une façon aussi exhaustive que possible (mais dans les limites des possibilités offertes par un contrat doctoral), à la fois les cellules exprimant ce marqueur, ainsi que les différentes isoenzymes qu'elles contenaient. Dans le but d'utiliser ultérieurement ces populations de cellules pour des expériences de régénération, pour les connaître et les identifier de manière fonctionnelle, il semblait également intéressant de rechercher des marqueurs associés à ces populations. Enfin, dans la mesure du possible, le rôle des isoenzymes d'ALDH dans la régénération musculaire pouvait commencer d'être abordé. La très grande majorité des études présentées ici a été réalisée à l'aide de matériels issus de Primates, humains et non humains. Cette source possède l'immense avantage de faciliter, par la suite, la transposition des découvertes à des domaines précliniques et cliniques ; elle présente cependant l'inconvénient important de la variabilité biologique, auquel nous nous sommes heurtés fréquemment. Plusieurs aspects de l'existence et des propriétés des cellules exprimant les ALDHs ont donc été considérés, ainsi que précisé ci-dessous.

Les populations de cellules ALDH+ persistent-elles en dépit du vieillissement ?

Au cours du vieillissement, et de manière accélérée dans certains cas pathologiques, les cellules responsables de la régénération décroissent en nombre, ou en capacité régénérative, ou leur équilibre de capacités prolifératives-régénératives est altéré. L'ampleur de ce phénomène est peut-être différente de celle qui est observée pour des progéniteurs classiques (cellules satellites, myoblastes). L'obtention de biopsies humaines à partir de sujets de différents âges permettrait d'évaluer les richesses relatives en progéniteurs, aux différents âges de la vie. Une condition essentielle est que la méthode de préparation des cellules soit assez standardisée, et que les biopsies proviennent du même territoire musculaire. Il est possible de se focaliser sur un seul marqueur mais cela risque d'être insuffisant. Nous avons vu précédemment que les ALDH+ sont radicalement différentes selon qu'elles expriment le CD34 ou pas. Il serait donc intéressant d'étudier les sous-populations et leurs rapports entre elles, qui peuvent refléter les conversions qui se déroulent au sein du tissu dans des situations normales ou pathologiques.

Les populations de cellules ALDH+ sont-elles affectées par une pathologie musculaire ?

Les populations des cellules exprimant l'ALDH peuvent être déséquilibrées dans ces pathologies, que cela soit une cause ou une conséquence de celles-ci. Parmi les principales insuffisances marquant ces pathologies, il faut souligner la sénescence ou l'incapacité des progéniteurs et le développement de la fibrose. Ces causes pourraient être reflétées par la nature et la proportion de cellules exprimant l'ALDH au sein des tissus. On pourrait ainsi s'attendre à ce que, dans des tissus très atteints, la proportion de progéniteurs musculaires diminue, et que la proportion de cellules à caractère fibro-adipeux augmente. Les équilibres des sous-populations pourront donc être étudiés. Le sujet s'adressera au premier chef au cas de la DMD et pourrait dans l'avenir être comparé à la situation dans d'autres pathologies telles que la DMFSH, la DMOP... Enfin, des modèles animaux existent et dans certains cas des biopsies peuvent être obtenues, en particulier chez le Chien GRMD.

Trouve-t-on également ces cellules ALDH dans différents territoires ?

La richesse en progéniteurs peut être liée au territoire étudié. Il a été rapporté que les cellules satellites par exemple étaient plus nombreuses dans les muscles lents que dans les

muscles rapides. Cela peut se comprendre du fait de la position, de la fonction, de l'origine anatomique et embryologique des groupes musculaires. Cette richesse peut être explorée si des biopsies de différents territoires peuvent être obtenues. S'il ne peut en être question chez l'Homme, cette recherche est faisable chez les Primates non-humains (Macaques), dont des prélèvements post-sacrificiels sont disponibles. Outre un intérêt fondamental, la richesse relative d'un territoire donné peut être indicatrice du territoire à prélever pour des approches de thérapie cellulaire.

Peut-on identifier des marqueurs associés ?

La caractérisation de marqueurs, dont au moins une partie est extracellulaire, améliore l'identification des cellules, permet éventuellement de créer des sous-populations qui peuvent être comparées entre elles. La caractérisation phénotypique est un bon complément de la recherche histologique, car elle apporte une dimension quantitative, en permettant de chiffrer le nombre absolu de cellules positives (le cas échéant) et la proportion que cela représente au sein d'un groupe donné (une biopsie...). Cela permet aussi le cas échéant de comparer des tissus différents, ou, pour un tissu donné, des origines anatomiques différentes. Ainsi, l'étude présentée ici a été menée dans le muscle squelettique humain, mais une étude similaire à laquelle j'ai participé a été menée en parallèle dans le muscle cardiaque de Primate. Enfin, des marqueurs qui apparaîtraient en situation pathologique pourraient faire l'objet d'une recherche distincte, le cas échéant. Certains marqueurs sont très standardisés, et disponibles parfois en grade clinique. Le phénotypage par cytométrie permettrait la sélection ultérieure de ces populations, qui pourront être testées et comparées pour leurs capacités myogéniques (ou cardiogéniques, ostéogéniques, adipogéniques...).

Quelles sont les isoenzymes exprimées par les cellules musculaires ?

Parmi les 19 isoenzymes exprimées chez l'Homme, quelles sont celles qui seraient présentes dans les tissus musculaires, et susceptibles d'y jouer des rôles soit spécifiques (différenciation musculaire) soit moins spécifiques (augmentation de la survie) ? L'Aldefluor® ne peut pas réellement renseigner sur ces points. Ces isoenzymes peuvent être identifiées, à l'intérieur des cellules perméabilisées, par des anticorps visualisés par fluorocytométrie de flux, cytofluorescence, ou immunofluorescence. Ces méthodologies seront utilisées pour tenter de définir des populations d'intérêt à partir de biopsies dissociées ou de cultures (formant des populations désorganisées), et de localiser les positions

anatomiques de ces cellules au sein du tissu musculaire organisé. En particulier, l'analyse histologique permettra à la fois d'identifier les protéines exprimées, et l'emplacement des cellules qui les expriment (ce qui peut être un premier renseignement sur leur fonction).

Quels sont les niveaux d'expression des différentes isoenzymes ?

Le caractère qualitatif de l'analyse d'expression génique confirme ou infirme les observations réalisées au niveau protéique, et son caractère quantitatif permet de comparer simultanément plusieurs tissus ou variétés de cellules, et de suivre l'évolution des expressions au cours du temps du développement, de la régénération le cas échéant, ou après implantation de cellules. Cependant cette méthode restera globale (entre nos mains) car nous ne maîtrisons pas les techniques spécifiques d'analyses de cellules isolées. Nous nous attendons à ce que certaines isoenzymes émergent, mais beaucoup d'isoenzymes pourraient être exprimées compte-tenu de la diversité de leurs fonctions.

Peut-on modéliser les évolutions des isoenzymes d'ALDH en situation myogénique ?

Le rôle des ALDH dans la myogénèse n'est pas réellement connu. Si l'acide rétinolique est probablement impliqué, l'isoenzyme responsable n'est pas connue (1A1, 1A2, 1A3, 3B1, 8A1 ...) et d'autres isoenzyme peuvent également intervenir. Certaines étapes peuvent être modélisées en culture, à partir de biopsies humaines ou de Singe. La présence d'isoenzymes ALDH, l'expression et l'activité des isoenzymes, peuvent être suivis par les différentes méthodes mises en place précédemment, éventuellement liées à des marqueurs extracellulaires de lignage. Les mesures peuvent être faites en phases de prolifération, à l'issue desquelles le caractère myogénique est marqué, ou en phases de différenciation. Les mesures de cytométrie peuvent s'accompagner de mesures par Q-PCR, qui sont plus globales, mais qui peuvent rester précises dans la mesure où les populations sont très homogènes.

L'ensemble des résultats obtenus en travaillant sur **l'axe 1** de ce travail de thèse, réalisé pour tenter d'apporter des éléments de réponses aux différentes questions énoncées ci-dessus, a permis d'écrire l'article présenté ci-après, dont la soumission sera faite très prochainement.

Several aldehyde dehydrogenase isoenzymes participate to skeletal muscle homeostasis in Human, Macaque and Dog.

Jessy Etienne^a, Pierre Joanne^b, Cyril Catelain^a, Stéphanie Riveron^a, Jérémy Lafable^a, Anne-Sophie Pellen^a, Isabel Punzon^c, Stéphane Blot^c, Onnik Agbulut^b, Jean-Thomas Vilquin^{a,*}

^a: Sorbonne Universités UPMC Univ Paris 06, Inserm UMRS974, CNRS FRE3617, Myology Research Center, Association Institute of Myology, Pitié Salpêtrière Hospital, Paris, France.

^b : Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS), UMR CNRS 8256, Biological Adaptation and Ageing, 75005, Paris, France.

^c : Inserm IMRB U955-E10, 94000 Créteil - Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort (ENVA), 94700 Maisons-Alfort - Université Paris-Est Créteil, France.

* : Corresponding author - Myology Research Center, UMRS974 Sorbonne Universités UPMC Univ Paris 06, INSERM, CNRS FRE3617, Association Institute of Myology, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Bâtiment Babinski, 47 Boulevard de l'Hôpital, 75651 Paris Cedex 13, France. Jt.vilquin@institut-myologie.org

Abstract

Aldehyde deshydrogenases (ALDH) are involved in metabolism and detoxification of aldehydes, they play important roles in cell survival and differentiation and are considered a marker of stem cells detectable using the fluorescent substrate Aldefluor. Skeletal muscle tissue contains a population of ALDH⁺/CD34⁻ cells harboring high myogenic capacities amenable to use in cell therapy. Exploring the presence of these cells in distinct physiopathological contexts, we observed their persistence in human and non-human primates and dogs through ageing and muscular dystrophy. Phenotypic characterization indicated that ALDH⁺/CD34⁻ cells are mainly associated with the extracellular markers CD9, CD36, CD49a, CD49c, CD49f, CD106, CD146, CD184, delineating the most myogenic populations. Histological and cytological analysis identified cell populations expressing isoenzymes (ALDH1A1, ALDH1A2, ALDH1A3, ALDH2, ALDH3A1, ALDH3A2, ALDH3B1, ALDH3B2, ALDH4A1, ALDH7A1, ALDH8A1), and analysis of gene expressions suggested that, at least, ALDH1A1, ALDH1A3, ALDH1B1, ALDH2, ALDH3A2, ALDH7A1, ALDH8A1 and ALDH9A1 isoenzymes are involved in muscle homeostasis in situ or in vitro. This study therefore unveils the importance of the ALDH family in skeletal muscle physiology.

Introduction

Aldehyde dehydrogenases (ALDH) constitute a large family of enzymes that forged their diversity throughout evolution (Black 2009; Jackson 2011). In Man, 19 isoenzymes arbor different functions involved in ontogenesis, development, regeneration, homeostasis (Balber; Jackson 2011, 2015; Ma; Marchitti; Sobreira; Vasiliou; Yoshida). While most ALDH catalyze the transformation of aldehyds into the corresponding carboxylic acids, some also present structural or non-enzymatic activities (Jackson 2015, Vasiliou). Substrate specificities dictate the role of ALDH isoenzymes towards detoxification of endogenic or xenogenic aldehyds resulting from catabolic reactions or oxidative stress, or towards the production of essential molecules such as retinoic acid (ALDH1A1, ALDH1A2, ALDH1A3, ALDH1B1, ALDH8A1) (Vasiliou), gamma aminobutyric acid (ALDH5A1) (Marchiti), betaïne (ALDH9A1) (Marchitti, Sladek). The protection against oxidative stress may be conferred directly by the ALDH enzyme, or indirectly through the production of retinoic acid able to activate other detoxifying enzymes such as Gluthation peroxidase (El Haddad). Both activities confer resistance against cytotoxicity, mutagenicity, genotoxicity and carcinogenesis but they may be responsible also for the resistance of some cells expressing ALDHs against chemotherapeutic agents that confer them a status of cancer stem cells (Moreb). The localization of several ALDHs isoenzymes within adult tissues and their evolution during ageing are far from exhaustive yet, although some studies have focused on specific tissues in normal or pathologic conditions (pancreas, breast, colon, brain) (Ioannou, Nguyen, revoir les refs).

The coordinated expression of some ALDHs (namely ALDHs 1A1, 1A2, 1A3, 1B1, 8A1) is finely tuned during ontogenesis as it precedes the production of retinoic acid involved in the formation of several tissues such as skeletal and cardiac muscles, pancreas, lungs, breast, colonic, hematopietic and prostatic cells... (Babcock, Begemann, Dey, Dolle, Fan, Froeschle, Gentry, Hamade, Ioannou, Keegan, Mic, Niederreither, Rodriguez-Guzman, Unguryte). Their activity and efficacy depend on the cellular environment, on the presence of upstream and downstream enzymatic partners, on specific substrates (Napoli) and may be partly interchangeable (Niederreither). Several isoenzymes (especially ALDH1A3) are also involved in the maintenance or expansion of cancer stem cells or cancerous tissues (Marcato, Muzio, Pors, Saw, Sladek).

The fluorescent Aldefluor reagent (ALDF) has been developed to allow the identification and selection of cell populations expressing some ALDHs (Balber, Stroms). Upon oxidation, Aldefluor becomes hydrophilic and is trapped within cells which can be discriminated using

flow fluorocytometry or fluorescence microscopy. This reagent is widely used to identify populations of stem cells from various tissues (Corti, Dolle, Gentry, Konninkx, Roehrich, Rovira, Storms, Unguryte), including skeletal muscle (Jean, Vauchez, Vella). The exact nature of isoenzymes able to metabolize the Aldefluor, however, is partly unknown, the selectivity being controversial. Most studies agree about the reactivity of ALDH1A1 and eventually ALDH1A2 and/or ALDH1A3 (Balber, Jean, Marcato, Moreb, Unguryte), other claim for the oxidation of ALDF by ALDH2, ALDH3A1, ALDH9A1 (Levi, Marcato), and even ALDH4A1, ALDH6A1, ALDH 7A1 (Marcato). Therefore, a selection based on ALDF shows functional efficacy and may be sufficient to produce cell populations as therapeutic tools, but it remains pragmatic on the mechanistic point of view.

The skeletal muscle tissue gathers several cell populations devoted to different functions (strength, resistance, elasticity, perfusion...) (Bentzinger) implying that processes of homeostasis and regeneration may be displayed, but the role played by specific ALDHs in these mechanisms is still poorly documented (Sladek), while the expression of some isoenzymes has been reported at the RNA level at the time of their discovery (Aral, Chambliss, Chang, Hong, Hu, Lin, Stewart). Likely, several ALDH isoenzymes are expressed successively or simultaneously in different cell types constituting the muscle tissue according to their functions. Previously, we described well-defined sub-populations of SSC^{lo}/ALDH^{br} cells extracted from dissociated biopsies of skeletal and cardiac muscles of mice, dogs, primates (including Human) (Vauchez). Two main sub-populations were discriminated according to the co-expression of CD34 marker. Upon sorting, ALDH⁺/34⁻ cells from skeletal muscle developed *in vitro* as a population of CD56⁺ myoblasts able to form myotubes and participated efficiently to muscle regeneration *in vivo* in SCID mice, while ALDH⁺/CD34⁺ cells did not. No study, however, documented the persistency of these cell types with ageing, or in pathological conditions such as Duchenne muscular dystrophy (DMD), although several progenitors are reputed to decrease under these conditions (Dimmeler, Povsic, Verdijk). Also, no study identified the different isoenzymes expressed in parallel by muscle cells *in vivo* and *in vitro* at the protein and mRNA levels, excepted for ALDH1A1 (Sterrenburg, Jean).

In this study, we first assessed the content and characteristics of ALDF-positive cell populations harvested from healthy patients of different ages, and we extended the characterization of extracellular markers associated with expression of ALDH activity. We compared the richness of different muscle territories harvested from young healthy non-human primates (NHP). Then we paralleled the proportions of ALDF-positive cells extracted from muscles of DMD patients, of healthy donors, and of the Golden Retriever dog model

(GRMD) of the disease. While no significant variation was observed with ageing or between anatomical territories, important changes were manifested between healthy and pathological tissues. ALDF-positive cells were associated to several markers, some of which are predictive of myogenicity. In a second step, we identified the isoenzymes expressed in Primate muscles both *ex vivo* upon dissociation and *in vitro* under conditions of proliferation and differentiation. These characterizations called for flow fluorocytometry, quantitative PCR and immunohistofluorescence to account for protein and gene expression. A large panel of isoenzymes are expressed by myogenic and non-myogenic cells extracted from skeletal muscles, while quantitative and qualitative variations were observed in pathological conditions.

Results

Assessment of cells metabolizing ALDF.

In the first part of the study, we assessed the contents and characteristics of skeletal muscle cells defined as ALDH-positive on the basis of their capacity to metabolize ALDF.

Does ageing impact the proportion of ALDF⁺ cells?

Muscle biopsies were collected as surgical wastes from several patients undergoing hip replacement and dissociated by mechanical and enzymatic treatments. In this cohort, the proportion of males and females was equivalent (24 women, 25 men). This kind of surgery is typically performed as a consequence of hip ageing, therefore the number of biopsies from young donors was lower than that from old or very old patients. Nevertheless, the cohort extended from 28 to 93 years-old, and three groups were constituted according to ages of donors: 28-48 years, 51-69 years, over 70 years. The presence and proportion of cells metabolizing ALDF were analyzed in presence (Figure 1A) and in the absence (figure 1B) of the inhibitor DEAB, and in association of CD34 when any (Figure 1C). Variability was noted in the proportions of ALDF⁺ cells, especially in the groups of patients aged of more than 50 (Figure 1D-F). Interestingly, however, the proportions of ALDF-positive cells did not change significantly over the years, whether associated to CD34 or not (Figure 1E, F). No significant difference was noted according to gender (Figure 1G). When splitted into its two components, ALDF⁺/CD34⁺ and ALDF⁺/CD34⁻, the proportion did not change significantly in these healthy patients free from myopathic pathologies. Finally, the ratio of the ALDF⁺/CD34⁻ cells, considered as the most myogenic ones, over the total ALDF⁺ positive cells, was slightly increased in the youngest patients but stable beyond 50, however the slopes of the curve did not show significant difference (Figure 1H, I).

Does anatomical origin influence the proportions of ALDF⁺ cells?

We next investigated whether differences in cell populations would be observed among anatomical territories. Muscle biopsies of similar sizes were obtained from NHP Macacca fascicularis at the time of their necropsy, and we compared the populations of ALDF⁺ cells, associated or not with CD34 (Figure 2A), contained in the following groups: diaphragm (Dia), pharyngeal constrictors (Pha), masseter (Mas), paravertebral multifidus spinae (Para), biceps brachii (Bic), tibialis anterior (Tib), gastrocnemius (Gas), vastus medialis (Vas). Although the initial proportion of total ALDF⁺ cells was higher than that observed in Human and reached 8.51 +/- 0.97%, we did not observed significant differences, but only slight trends

between muscle groups (Figure 2B, C). Hence, the groups could be ranked according to decreasing mean proportion as: Dia > Tib > Pha > Para > Mas > Bic > Vas > Gas. The population of ALF⁺/CD34⁺ cells represented the majority, as in Human patients (6.35 +/- 1.68%, i.e. 75% of all ALDF⁺) and the groups could be ranked as: Dia > Tib > Pha > Para > Vas > Bic > Gas > Mas. The population of ALDF⁺/CD34⁻ represented the minority (1.81 +/- 0.58%, i.e. 25% of all ALDF⁺) and the groups were ranked as: Mas > Tib > Gas > Bic > Dia > Vas > Pha > Para. The embryologic origin of these muscles, i.e. somatic or facial, did not influence significantly the proportions of ALDF⁺ cells. Interestingly, the two muscle groups containing the highest proportion of ALDF⁺/CD34⁻ cells and the lowest proportion of ALDF⁺/CD34⁺ (considered as being respectively myogenic and non myogenic in Humans) were the diaphragm and the masseter, which are not postural or locomotor muscles.

Does a pathologic condition change the proportion of ALDF⁺ cells?

The stable situation observed above was drastically modified when studying muscle tissue prepared from DMD patients who underwent orthopedic spine surgery. In these patients, muscle function is highly altered and muscle tissue is replaced by adipo-fibrotic infiltration. Paravertebral muscle biopsies from these young patients (n = 9; median age 15.4 y.o) were compared to those harvested from young healthy patients (n = 5; median age 13.75 y.o) operated for idiopathic scoliosis. The proportion of ALDF⁺ cells was dramatically increased in DMD patients, essentially due to the increase in ALDF⁺/CD34⁺ population (Figure 3A) which was mainly considered as non-myogenic, Meanwhile, the proportion of ALDF⁺/CD34⁻ population remained stable, and as a consequence the ratio of the ALDF⁺/CD34⁻ cells over the total ALDF⁺ cells, was decreased.

GRMD dogs are a large animal model of DMD, because of a lack of dystrophin, and they develop the progressive myopathy on both clinical and histological aspects. Here again, the proportion of ALDF⁺ cells extracted from *Biceps femoris* biopsies dramatically increased (n = 4) as compared to control dogs (n = 4), due to the combined increase in the ALDF⁺/CD34⁺ and ALDF⁺/CD34⁻ populations (Figure 3B). It should be noted that GRMD dogs are still young animals who, at time of surgery, still present ongoing muscle tissue remodeling, which is not the case in DMD patients who suffer from fixed, established myopathy. Hence the increase in the population of ALDF⁺/CD34⁻ in GRMD dogs may reflect the ongoing regenerative activity of the muscle tissue.

Are there extracellular markers associated with the populations of ALDF⁺ cells?

To refine the identification of human cell populations and, if any, define markers allowing the selection of the most myogenic ones, we analyzed the presence of several extracellular antigens alone and / or in association with ALDF⁺/CD34⁺ or ALDF⁺/CD34⁻ clusters. Figure 4A exemplifies the steps followed to evaluate the proportions of populations and sub-populations illustrated by the labeling of CD9. Triple labeling identifies cells metabolizing ALDF (FL1 channel, X axis), expressing CD9 (FL2 channel, Y axis), and/or CD34 (FL4 channel, Y axis). Cell populations are first defined by ALDF metabolism and CD34 expression, then the expression of CD9 or CD49e is investigated among cells within these populations. Figure 4B shows that the expression of several antigens may discriminate the populations (n = 7). Hence, The ALDF⁺/CD34⁺ cells are frequently expressing CD10 (CALAA), CD49e (Integrin alpha5), CD140b (PDGF beta receptor), while the ALDF⁺/CD34⁻ cells are preferentially associated with CD9 (MRP-1), CD31 (PECAM), CD36 (PAS IV), CD49a (integrin alpha1), CD49c (integrin alpha3), CD49f (integrin alpha6), CD71 (transferrin receptor), CD106 (VCAM), CD140a (PDGF alpha receptor), CD146 (MCAM), CD184 (CXCR4). Of note, ALDF⁺/CD34⁻ cells are frequently associated to some myogenic markers (such as CD9, CD106, CD184) but not all since CD56 (NCAM) is expressed by a minority of them. Finally, some markers do not look exclusive of one population, e.g. CD29, CD44, CD47, CD61, CD105, CD143, CD309 are expressed by similar percentages of ALDF⁺/CD34⁺ and ALDF⁺/CD34⁻ cells.

The characterization was repeated with cell populations extracted from DMD patients biopsies, focusing on the most discriminating markers identified above (CD9, CD10, CD31, CD36, CD49c, CD49e, CD49f, CD140b, CD146, CD184, Figure 4C). No major differences were observed between control muscles extracted from TFL and paravertebral biopsies, excepted for the population of ALDF⁺/CD34⁻/49f⁺ cells that was decreased in the paravertebral samples. However, differences were observed between control (n = 4) and DMD (n = 5) paravertebral biopsies. All CD9⁺ populations were increased in DMD biopsies; Total CD49e were increased in DMD biopsies. As above, extracellular markers were associated to ALDF⁺ DMD cell populations, whether associated to CD34 or not. In these DMD samples, ALDF⁺/CD34⁻ cell populations are mainly associated to CD9, CD10, CD31, CD36, CD49c, CD49f and CD146. ALDF⁺/CD34⁻/CD31⁺ and ALDF⁺/CD34⁻/CD49e⁺ populations were increased in DMD biopsies. Only one population, ALDF⁺/CD34⁻/CD184⁺ cells, was increased in control biopsies as compared to DMD.

Expansion of ALDF⁺ populations in culture

We analyzed the expression of ALDF and of the CD56 myogenic marker in cultures of human cells upon expansion to third passage. The proliferation was obtained in a medium previously described (Vilquin) (custom modified MCDB-120 supplemented with SVF, bFGF, dexamethasone and gentamycin). As soon as in first passage (7 days in culture), the majority of cells were ALDF⁺, whatever the age of donors, and the proportion raised close to 100% in second (14 d) and third (21 d) passages. These proportions were paralleled regarding the expression of CD56 (95% in second passage) (Figures 5A, B). As a consequence, most cells were both positive for ALDF and CD56.

These results were confirmed by fluorescence microscopy (Figure 5C) showing the fluorescence emitted by myogenic cells in proliferation and myotubes upon differentiation in presence of ALDF in vitro. Taken together, these results suggest that several isoenzymes are increased in culture, at least the ones metabolizing ALDF, and may be therefore involved in myogenesis and/or cell survival in vitro.

Myogenic capacities of ALDF⁺ sorted cell populations.

Several populations of ALDF⁺ cells were defined by the expression of specific extracellular marker (Figure 4). NHP cells were extracted, reacted in ALDF reagent, labelled using antibodies directed against CD9, CD10, CD49e, CD56, and FACS-sorted. These markers are especially associated with at least 30% of ALDF⁺/CD34⁺ or ALDF⁺/CD34⁻ cells. Moreover, ALDF⁺/CD34⁺ and ALDF⁺/CD34⁻ cells were sorted as historical controls (Vauchez). Selected cells were grown, expanded once for amplification, then committed to differentiation. Upon methanol fixation, the proportions of myogenic cells, and the fusion indexes were counted after desmin immunostaining (a cytoskeletal marker of myogenic cells, both myoblasts and myotubes). Depending on the associated extracellular marker, the proportions of unfused cells and the percentages of cells participating to fusion, and the numbers of nuclei per myotube were changing (Figure 6A). Indeed, the culture performed from CD34⁺ and CD49e⁺ cells were the less myogenic ones and contained the smallest number of myotubes. On the opposite, the cultures associated to CD9⁺, CD56⁺, CD34⁻ were the most myogenic. Cultures performed from CD10 cells presented intermediate values of myogenicity (Figure 6B).

Characterization of ALDH isoenzymes.

Identification of the isoenzymes expressed by mononucleated cells extracted from biopsies.

ALDF substrate may be metabolized by several, although not identified isoenzymes, and some isoenzymes are unable to metabolize ALDF thus escaping this detection. Therefore we attended the identification of the main isoenzymes, on the proteic side, using 12 commercially-available antibodies. Muscle biopsies were processed from healthy and DMD donors, NHP, healthy and GRMD dogs.

Two major groups of isoenzymes could be constituted, based arbitrarily on the proportion of cells stained (Figure 7A). In the first group, less than 5% of the extracted cells were labelled, and this group included ALDH1A1, ALDH1A2, ALDH1A3, ALDH3A2, ALDH3B2, ALDH4A1. In the second group, more than 5% (even up to 20%) of the extracted cells were stained, and the group included ALDH2, ALDH3A1, ALDH3B1, ALDH7A1, ALDH8A1. Because the percentage of ALDF⁺ cells extracted from a biopsy rarely exceeds 5%, it is likely that the isoenzymes in the group of ALDH2, ALDH3A1, ALDH3B1, ALDH7A1, ALDH8A1 do not metabolize efficiently ALDF. Similar results were obtained from healthy Human, Dog (not shown) and NHP samples (Figure 7B). ALDH2, ALDH7A1, ALDH8A1 were increased in TFL muscle biopsies as compared to paravertebral muscles. ALDH3A1 was increased in paravertebral muscle. A few differences were noted, upon study of cells extracted from DMD patients and GRMD dogs (not shown due to the lack of controls of the same age). Essentially, ALDH1A1 and ALDH2 were increased in DMD samples.

Identification of the isoenzymes expressed by myogenic cells in culture.

As observed with ALDF⁺ populations in culture, the proportion of cells expressing one or several ALDH isoenzymes increased in culture. Notably, ALDH1A1, ALDH2, ALDH3A2, ALDH3B1, ALDH7A1 and ALDH8A1 were increased considerably in human cell cultures, reaching up to 90% of cells, whether produced from healthy or DMD muscle biopsies (Figure 8A). The proportions of cells expressing other isoenzymes were more variably increased : ALDH1A2, ALDH1A3, ALDH3A1, ALDH3B2, ALDH4A1. The situation is still more dramatic in cultures of NHP, since almost all isoenzymes were found drastically increased, excepted ALDH1A3, ALDH3B2, ALDH4A1 (Figure 8B).

The cellular localization of the isoenzymes was assessed using immunocytofluorescence. Healthy human cells were grown in proliferation or in differentiation medium, fixed and stained for the expression of isoenzymes showing the strongest expression using flow cytometry (9 isoenzymes selected), and for the myogenic marker desmin. In proliferating

cultures, most isoenzymes labelled both myogenic and non myogenic cells (Figure 9A), and none seemed restricted to non-myogenic cells. Most presented a cytoplasmic staining, while other showed a nuclear (ALDH3A2) or a perinuclear staining (ALDH3B1, ALDH3B2). In differentiating cultures (Figure 9B), most isoenzymes labeled preferentially the myotubes, but sometimes with a very weak intensity (ALDH2, ALDH7A1) and sometimes strongly (ALDH3A1, ALDH3B2, ALDH9A1). Qualitative changes were noted between proliferating and differentiating cultures. Under differentiation, ALDH1A1 stained only myotubes and no non-myogenic cells ; ALDH2 staining was dramatically reduced and appeared mainly nuclear ; ALDH3A2 was no longer expressed in cytoplasm but was concentrated in nuclei ; ALDH3B1 stained only myotubes ; the staining intensity of ALDH7A1 was low ; the staining intensity of ALDH9A1 was dramatically increased. Changes in staining patterns and intensities suggest some roles for several isoenzymes in the course of differentiation in vitro.

Histological localization of cell populations expressing isoenzymes.

While several isoenzymes can be detected upon extraction of muscular cells, this does not imply a myogenic capacity. We attempted the localization of different sub-populations by immunohistology using snap-frozen muscle biopsies of healthy patients, with a focus on isoenzymes first detected by cytofluorimetry. Cryostat sections were immunolabelled to assess the presence of isoenzymes and the position of the cells relative to muscle fibres and basement membranes or microvasculature. Laminin staining was used to delineate the basal lamina of muscle fibers and DAPI staining to ascertain the presence of nuclei. As expected, cell populations could be observed at several sub-anatomical places (Figure 10), and labeling was sometimes reminiscent to the observations in cell culture. ALDHs reported to be especially or exclusively expressed in mitochondria were more difficult to localize in histological sections (e.g. ALDH2, ALDH7A1...). In some instances also some isoenzymes seemed diffusely expressed within the cytosol of the giant muscle fibers, making difficult to identify specific localizations and expressions.

ALDH1A1 was expressed by single cells located in the endomyisum, or close to the muscle fibers. ALDH2 was expressed by several types of endothelial-like cells either neighboring fibers or grouped as small vessels (arterioles, veinules) where they participated to the inner layer. As endothelial cells are numerous within the muscle tissue, their association with ALDH2 expression may explain the high proportion of ALDH2-positive cells obtained by cytometric analyzes. ALDH3A1 was expressed as a diffuse endomysial labeling, and stained nuclei essentially located inside fibers. ALDH3A2 was expressed in several (but not all)

nuclei, inside and outside the muscle fibers, as previously observed in cell culture. ALDH3B1 was expressed by rare endomysial structures, and in nuclei inside the muscle fibers. ALDH3B2 was principally expressed in endomysial structures, delineating small arterioles and veinules-like vessels between fibers. Some positively labeled cells were in a position reminiscent of satellite cells (i.e. below the basal lamina) that could not be confirmed in the absence of a labeling of the muscle fiber membrane. ALDH7A1 was expressed by single endomysial cells, however the labeling was essentially cloudy and of low intensity. ALDH8A1 was mainly expressed in endothelial-like cells involved in the formation of small vessels (arterioles, veinules). ALDH9A1 was expressed by small vessel-like structures between fibers, and by structures overlapping nuclei. Immunostainings with antibodies directed against, ALDH1A2, ALDH1B1, ALDH4A1, ALDH5A1, ALDH6A1 were not informative (although some of these antibodies were useful in cell labeling in the context of flow cytometry).

Expression of isoenzymes at mRNA level

The study of isoenzyme expression at the protein level, assessed using antibodies, was completed by the quantifications of mRNAs by Q-PCR. These were extracted from crude human muscle biopsies, dissociated muscle cells, proliferating and differentiating cells in culture (Figure 11).

Expression of isoenzymes in crude tissues.

Human Muscle (n=4), liver and kidney (n=2) biopsies were analyzed concomitantly for the expression of the genes coding for the 18 isoenzymes (Figure 11A). As expected, the liver contains the highest levels of ALDH isoenzymes, followed by the kidney. Almost all isoenzymes are also expressed in skeletal muscle tissue, at various levels. ALDH2 is the most expressed, followed by ALDH1A1, ALDH1B1 (both involved in retinoic acid metabolism), ALDH3A2, ALDH5A1, ALDH6A1, ALDH9A1. Some isoenzymes are expressed at very low levels (ALDH1L2, ALDH3A1, ALDH3B1, ALDH3B2). This profile is clearly distinct from that of liver and kidney and may serve to characterize the skeletal muscle.

Expression of isoenzymes by dissociated muscle cells.

Dissociated muscle cells (n=4) mainly express ALDH1A1, ALDH2, then ALDH9A1, ALDH1A2, ALDH1A3, ALDH3A2, ALDH6A1, ALDH7A1, ALDH1B1, ALDH4A1 (Figure 11B). This profile is slightly different from that observed in crude muscle, and it should be

noted that most isoenzymes involved in retinoic acid metabolism are among the most expressed (ALDH1A1, ALDH1A2, ALDH1A3, ALDH1B1). Of note, ALDH1L1 is no longer expressed in the dissociated cells, suggesting that this isoenzyme is mainly located in muscle fibers, and then lost upon their dissociation.

Expression of isoenzymes in cell cultures.

As for muscle tissues and cells, most isoenzymes are detected at various levels (Figure 11C). ALDH1A1, ALDH1B1, ALDH9A1, ALDH7A1, ALDH2 and ALDH3A2 are the most expressed, but the profile may change between proliferation and differentiation. ALDH1A1 and ALDH1L1 decrease upon differentiation, while ALDH2 increases, suggesting a role for these isoenzymes during the formation or the stabilisation of myotubes. ALDH3B2 and ALDH8A1 could not be detected but they were already weakly expressed in the other preparations. All these observations suggest different potential roles for these isoenzymes.

Discussion

This study reports the presence of ALDH-expressing cells in skeletal muscle in control and pathological situations. It is both performed on the side of ALDF, a convenient marker for the purpose of functional exploitation of myogenic progenitors, and on the side of isoenzymes expression in view of delineating fundamental aspects of muscle homeostasis.

We first investigated the presence and proportions of these populations of cells able to metabolize ALDF within cohorts of healthy donors. Some variations were noted between patients, although most results were grouped. The clinical and physical conditions of the patients, donors of muscle wastes at the time of hip surgery, and their associated pathologies (diabetes, obesity...) were unknown and may account for these variabilities. We observed a slight trend towards decrease with ageing, although not significant. While it was reported that circulating progenitors are generally decreased with ageing or in pathological conditions (e.g. in association with cardiovascular diseases), (Dimmeler, Povsic), our situation resembles the absence of decrease observed in populations of medullary cells expressing ALDH (Povsic 2010). The skeletal muscle tissue may constitute a protective niche for ALDH⁺ cells, as does the medullar environment. Oxidative remnants and aldehyds normally progressively accumulate during ageing but their detoxification would protect ALDH-expressing cells as compared to ALDH-negative cells such as hematopoietic cells or circulating endothelial progenitors (Dimmeler 2008), as suggested in several models (Brocker, Jean, Vasiliou, Vella). Indeed ALDHs may exert direct or indirect intracellular protective effects. Several isoenzymes have dedicated substrates (e.g. ALDH2 metabolizes acetaldehyds and 4-hydroxy-2-nonenal, ALDH7A1 detoxifies peroxidated lipids...), therefore the diversity of isoenzymes allows metabolizing several substrates, and several isoenzymes may be expressed by a single cell population, as observed in our results in primary cultures. Overall their efficacy against oxidative stress has been demonstrated in a variety of models and tissues (Bell, Brocker, Dey, Jean, Vasiliou, Vella, Zhou). In an indirect manner, the production of active metabolites such as retinoic acid by dedicated isoenzymes (ALDH1A1, ALDH1A2, ALDH1A3, ALDH1B1, ALDH8A1) may trigger the expression of detoxifying cascades such as glutathion peroxidase, superoxide dismutase (Bell, El Haddad) in autocrine or paracrine fashions. Retinoic acid may indeed diffuse in vitro and in vivo from a small subset of ALDH⁺ cells, thus extending a protective area around small territories or niches. Paracrine mechanisms are also used upon cardiogenic differentiation in vivo (Keegan, Niederreither, Xavier Neto), and several isoenzymes exert complementarities as their coordinated expression is necessary to fulfill these physiological functions (Kumar, Wang, Xavier-Neto).

The proportions of ALDF⁺ cell populations were compared between muscle groups in NHP. Although the animals were of the same origin, same gender and similar age, variabilities were important and precluded the observation of a significant difference between muscle groups involved in different physiological functions (positioning, breathing, jawing, swallowing) or of different embryological origins (trunk, head and neck). Of note, Pax7 cells proportions would not differ between territories (Xu). Some trends could still be drawn, e.g. these results suggest that the lowest proportion of ALDF⁺/CD34⁻ population relates to the paravertebral muscles, as suggested earlier in Humans (Vauchez). These results suggest that, in the purpose of cell therapy approaches, several muscle territories could be envisaged as equivalent sources of donor cells.

The situation in healthy donors contrasts strikingly with the strong increase in the proportion of ALDF-positive cells observed in biopsies from DMD patients and GRMD dogs, thus underlining the important remodeling undergoing in muscular dystrophy. Biopsies from DMD patients were obtained as surgical waste at the time of orthosis placement, i.e. at a time when muscle regeneration has been exhausted by the cycles of the disease and a fatty fibrotic tissue is replacing the healthy one. The population of ALDF⁺/CD34⁺ cells may be involved in fibrotic replacement during regeneration, as it was associated previously to a mesenchymal-like behavior (Vauchez). This imbalance is also observed in biopsies from GRMD dogs, which are obtained at earlier stages of the disease while muscle is still vigorously regenerating. Whether the population imbalance participates actively to the extension of the disease, or is the final reflect of muscle remodeling, is unknown at this point. Interestingly, the population of ALDH⁺/34⁻ cells, which is supposed to be myogenic, is not drastically depleted in human patients nor in GRMD dogs. This observation may constitute an important clue for the future use of this population in therapeutic perspective. The evaluation of the differentiation capacities of ALDF⁺34⁻ cells extracted from dystrophic patients remains to be established.

In culture, the proportion of cells exhibiting high ALDF metabolism increased dramatically, either observed in single cells by flow fluorocytometry or in myotubes by live microscopic examination, and most frequently these cells demonstrated high myogenic commitment such as expression of CD56 and ability to fuse. These observations are supported later on by the identification of several individual isoenzymes expressed in culture, and they suggest an important role played by enzymes of this family in muscle cell proliferation, regeneration and differentiation. A similar trend is observed in some tissues (i.e. pancreatic cells, cardiac cells, hematopoietic cells) (Gentry, Ioannou, Roehrich) but not all (cartilage) (Urytge).

ALDF metabolism, however, is not a pure marker of myogenicity, because subsets of ALDF⁺ cells did not co-express myogenic markers. This underlines a first limitation of the use of ALDF alone to characterize or prepare myogenic populations, and this mandated the search for associated markers directed against extracellular antigens.

Among freshly dissociated cells, we have observed previously that a specific population of ALDF⁺ cells, i.e. ALDF⁺/CD34⁻ was much more myogenic than the ALDF⁺/CD34⁺ counterpart (Vauchez). In this instance, the selection of the population was based on a negative criteria (absence of a marker), which is less reliable and comfortable than selection based on pure positive selection. In the present study, dissociated cells were prepared using only cell culture-grade collagenase and no extra trypsin. This methodology yielded higher amounts of cells (data not shown) and may spare some extracellular domains of antigens expressed by the cells. Several markers could be associated to populations of dissociated muscle cells, some of which being especially linked to ALDF⁺/34⁺ or ALDF⁺/34⁻ populations. The markers mainly associated to ALDF⁺/CD34⁺ were CD10, CD49e, CD140b. Even more were mainly associated to ALDF⁺/34⁻ : CD9, CD31, CD36, CD49a, CD49c, CD49f, CD71, CD106, CD140a, CD146, CD184. Of note, CD9, CD49c, CD49f, CD106, CD146, and CD184 have been previously associated to cells presentic myogenic capacities, whether myogenic or perivascular (Boldrin, Brzoska, Cerletti, Cerletti, Dellavalle, Tachibana, Przewozniak, Wilschut). Strikingly, the association between ALDF and CD56, considered as a marker of satellite cells and myoblasts, was not constant in preparations of Human dissociated cells, but was more frequent in preparations of non human primate cells.

In a next step, we compared the myogenic capacities of some populations selected on the basis of their association with ALDF (CD9, CD10, CD34, CD49e, CD56). Our results suggested that selected populations could be ranked, in decreasing order of myogenicity, as CD9⁺>CD34⁻>CD56⁺>CD49e⁺>CD10⁺>CD34⁺. Therefore, cell selections based on the metabolism of ALDF and the positive expression of specific markers (CD9, CD56, CD49e) may allow to prepare cell populations, in a way that may be amenable to preclinical and clinical applications (use of FACS, or magnetic bead selection...). These results also consolidate and extend our previous observation regarding the existence of distinct muscle cell sub-populations distinguishable on the basis of ALDF metabolism. They provide new cellular candidates for testing of myogenic integration in vivo.

The use of ALDF reagent allows selecting populations of myogenic cells. However, the exact nature of isoenzymes able to metabolize ALDF is not known, and may depend on the tissue and cell population. Indeed, ALDF was thought to be metabolized by ALDH2, ALDH3A1 ,

ALDH9A1 (Levi, Marcato), ALDH1A1 (Balber, Jean, Marcato), ALDH1A2, ALDH2 (Moreb), ALDH1A2, ALDH1A3 (Unguryte), ALDH1A3 (Balber, Marcato), ALDH1B1, ALD4A1, ALDH6A1, ALDH7A1 (Marcato) but several of the evidences provided were indirect ones. ALDF characterization does not allow describing all populations expressing various ALDH isoenzymes contributing to the detoxification of aldehyds and derivatives, although this resistance would play important roles in muscle biology, in regeneration, and in the survival of cells in the context of cell therapy approaches. Moreover, ALDF is a small soluble molecule that remains trapped in living cells and, as it is not a protein, cannot be cross-linked and fixed using classical protocols, hampering the co-localization of ALDF and other intracellular markers. To have a broader picture about the presences and roles of ALDH in skeletal muscles, we attempted the characterization of several isoenzymes in different situations : in crude skeletal muscle tissue, in muscle cells obtained after tissue dissociation and elimination of fibers, and in primary cultures on third passage. Some discrepancies were noted between the results of protein detection (cytofluorimetry, cytofluorecence, immunohistology) and mRNA expression (Q-PCR), that may be due to the nature and sensitivities of the reagents and methodologies. Nevertheless, overlapping of the results was most frequently encountered, at least on the qualitative point of view. Of note, ALDH1B1, ALDH1L2, ALDH2, ALDH4A1, ALDH5A1, ALDH6A1, ALDH18A1 and to some extent ALDH7A1 are expressed in the mitochondrial compartment, not in cytosol (Pors 2014), and may be more difficult to identify by immunohistology and even cytofluorimetry than by Q-PCR.

In crude human skeletal muscle tissues, isoenzymes ALDH1A1, ALDH2, ALDH3A1, ALDH3A2, ALDH3B1, ALDH3B2, ALDH7A1, ALDH9A1 were identified both by histological and Q-PCR methodologies, although at lower levels by histology regarding ALDH1A1, ALDH2 and ALDH7A1. ALDH1B1, ALDH5A1, ALDH1L1 were observed at mRNA level but not by immunocytology. Conversely ALDH8A1 provided nice immunohistology but was nearly absent as assessed by Q-PCR. Our data confirm, overall, the initial Northern blot expression studies that reported the presence in crude skeletal muscle tissue of ALDH1A1 (Stewart 1996), ALDH1L1 (Hong 1999), ALDH2 (Stewart 1996), ALDH3A2 (Chang 1997), ALDH4A1 (Hu 1996), ALDH5A1 (Chambliss 1995), ALDH9A1 (Lin 1996), ALDH18A1 (Aral 1996). At variance, we also observed the expression of ALDH1A3, ALDH1B1, ALDH6A1, likely because of methodological refinements since the early description, or due to the difference in tissue source.

In dissociated muscle cells, ALDH1A1, ALDH1A2, ALDH1A3, ALDH2, ALDH3A2, ALDH3B2, ALDH4A1, ALDH7A1 were identified both by cytofluorimetry and Q-PCR methodologies. ALDH1B1, ALDH6A1, ALDH9A1 were observed at mRNA level but not by cytofluorimetry (as observed above regarding ALDH1B1). ALDH3A1, ALDH3B1, ALDH8A1 were identified by cytofluorimetry but not by Q-PCR (as observed above regarding ALDH8A1). We noticed that ALDH1A2, and ALDH1A3 were increased (relatively to the reporter gene) in dissociated cells, suggesting that these isoenzymes maybe more relevant to mononucleated cells. Conversely, ALDH1L1, ALDH2, ALDH3A1 and ALDH3B1 are decreased in the mononucleated cell population, suggesting that these isoenzymes are involved in the homeostasis of muscle fibers, which are destroyed upon dissociation.

Primary cultures were highly enriched in myogenic progenitors expressing CD56. In these cultures, isoenzymes ALDH1A1, ALDH1A3, ALDH2, ALDH3A2, ALDH3B1 and ALDH7A1 were identified by cytofluorescence and Q-PCR. As observed above, ALDH1B1, ALDH6A1 and ALDH9A1 were identified by Q-PCR but not by cytology and conversely ALDH1A2, ALDH3A1, ALDH3A2, ALDH3B2, ALDH4A1, ALDH8A1 were identified by cytofluorimetry but not by Q-PCR (as observed above regarding ALDH3A1 and ALDH8A1). These results suggest that several isoenzymes are increased in culture, and may be therefore involved in myogenesis and/or cell survival in vitro. Expansion of cells expressing ALDF or specific isoenzymes while keeping a progenitor status have been also observed in cultures of pancreatic beta cells (Ionanou, Rovira, Liu) or of cardiac resident progenitors (Roehrich). Conversely, ALDH activity progressively declined in primary cultures of human articular chondrocytes, although it is considered a characteristic marker of collagen-II producing chondrocytes upon initial dissociation. (Unguryte). As previously described by other groups, ALDH1A1 was expressed in our primary muscle cultures (Gonnet, Jean, Sterrenburg, Vella). But we also noticed the strong increase in ALDH1B1 and the moderate increases in ALDH7A1 and ALDH9A1 in primary cell cultures when compared to isolated mononucleated cells, suggesting that these isoenzymes maybe positively involved in myogenesis in vitro. Meanwhile, ALDH2 was decreased and ALDH1A2 almost cancelled in culture, then may not be specifically involved in myogenesis, but rather in homeostasis of other cell types. Little is known regarding the nature and chronology of involvement of the isoenzymes during myogenesis, that we have modeled using cultures of human muscles. Retinoic acid should be involved (Duester, Froeschlé, Hamade, Keegan, Mic, Ryan, Zhao), however several isoenzymes may participate to its production and regulation (ALDH1A1, ALDH1A3,

ALH1B1, ALDH8A1), and may compensate each other as illustrated in knock-out animal models (Fan, Kumar, Niederreither).

Histological analysis suggested that isoenzymes were located in different structures. Cells expressing isoenzymes were located in the endomysium (ALDH1A1, ALDH2, ALDH3B1, ALDH7A1), or close to muscle fibers in position reminiscent to capillaries (ALDH2, ALDH3B2, ALDH9A1), or associated to small veinules or arterioles (ALDH2, ALDH3B2, ALDH8A1). Frequently, isoenzymes labelled nuclei, preferentially inside muscle fibers (ALDH3A1, ALDH3B1), or outside the fibers (ALDH9A1) or both (ALDH3A2). A nuclear localization has been previously observed with ALDH3A1 and ALDH7A1 isoenzymes, where it would directly participate to cell cycle regulation, resistance to DNA damage, facilitation of repair and reduction of apoptosis (Marchitti). Nuclear localizations therefore suggest unique roles in cellular physiology played by some ALDH isoenzymes.

Taken together, these results suggest that, supplementary to ALDH1A1 that was previously described, several isoenzymes take part to skeletal muscle homeostasis, being present in both myogenic and non-myogenic cells, and to muscle regeneration in culture, and would help defining an identity card of this tissue. Minimally, ALDH1A3, ALDH1B1, ALDH2, ALDH3A2, ALDH7A1, ALDH8A1 and ALDH9A1 deserve future investigations, given their high expression level and association to muscle structures and cells, *ex vivo* and *in vitro*. They may also exert complementary roles.

Specific roles of some isoenzymes have been pointed in dedicated tissues, but the skeletal muscle has been rarely investigated if any (excepted for Northern blot analysis several years ago). ALDH1A1 is involved in the metabolism of retinoic acid, then indirectly in several embryological pathways such as formation of neural, hematopoietic or cardiac tissues, and myogenesis (Gonnet, Jean, Sterrenburg, Vella). It participates to the metabolism of acetaldehyde and peroxidized lipids (Marchitti). ALDH1A3 is also involved in the metabolism of retinoic acid and especially involved in cardiopulmonary system formation during embryogenesis. It is involved in the formation and maintenance of ocular systems (retina, crystallin) through enzymatic and non-enzymatic functions. The Roles of ALDH1B1 are being unveiled more recently. ALDH1B1 is involved in the formation, maintenance and expansion of pancreatic progenitors (Ioannou), and therefore may be linked to the metabolism of ALDF by subsets of pancreatic cells (Rovira). ALDH1B1 is now recognized as involved in the metabolism of retinaldehyde and acetaldehyde (Singh, Stagos). Whether a parallel can be drawn between its unique role in pancreas development and regeneration and the roles in skeletal muscle suggested by our studies is unknown yet. ALDH2 plays important roles in

detoxification of acetaldehyde, and several mutations have underlined its role in intolerance to alcohol in numerous populations (Chen). ALDH2 is involved in the metabolism of nitric oxide, hence plays roles in vascular adaptation and reactivity (Chen) and protection of large vessels against ischemia especially in the heart. In our hands, cells expressing ALDH2 are mainly located inside vessel walls, or in positions reminiscent to that of endothelial cells. The expression of ALDH2 by endothelial cells would explain the high proportion of ALDH2⁺ cells extracted from muscle biopsies, and the relative decrease in their proportion in culture under myogenic conditions. ALDH3A2 is involved in the oxidation of fatty aldehydes and, indirectly, in stabilisation of cellular lipid membranes. ALDH7A1 is involved in the formation of zebrafish eyes and fins (Babcock) through the proliferation of progenitors, together with ALDH2, and ALDH1A2 (Begemann). The role of ALDH7A1 is crucial for the scavenging of peroxidized lipids (Brocker), semialdehydes, acetaldehyde, benzaldehyde. It is involved in the production of osmolytes (Brocker). ALDH8A1 is involved in retinaldehyde metabolism, specifically the 9-cis retinal, and in oxidation of aliphatic aldehydes and glutaraldehyde. ALDH9A1 is involved in oxidation of gamma-aminobutyraldehyde to GABA, and oxidation of DOPAL and acetaldehyde. All these isoenzymes are expressed in various types of cancers through the participation to survival, maintenance and proliferation of cancer stem cells.

Further studies are mandated to associate these isoenzymes to a capacity to metabolize ALDF. One may anticipate that, if a given isoenzyme is present in a proportion of cells that exceeds by far the proportion of cells labelled using ALDF in a given tissue, this isoenzyme should not be naturally recognized by ALDF in this tissue. As shown in Figures 7, 8 and 11, at least ALDH2, ALDH7A1 and ALDH8A are expressed in two to three times more cells than the proportions labelled using ALDF, suggesting that these isoenzymes are not naturally reacting with ALDF substrate in muscle cells. Conversely, ALDH1A1, ALDH1A2, ALDH1A3, ALDH3A2, ALDH3B2, ALDH4A1 are expressed at levels compatible with the percentage of cells metabolizing ALDF. This approach helps to discard some isoenzymes, however it is not sufficient to certify the recognition of all other isoenzymes that are present in smaller proportions, because several isoenzymes can be present simultaneously within the same cells, in which case the reactivity becomes additive.

This study was hampered by some technical or methodological limitations. They were represented by the biological variability of the skeletal muscle samples, extracted from human patient whose status were, intrinsically, variable. These limitations were also represented by

the small sizes of the samples, compared to the high number of isoenzymes to evaluate. They were also met using some of the antibodies showing variable reactivities between methodologies (flow cytometry, immunohistology, cytofluorescence). This study, however, is the first to assess the presence and putative role of the ALDH isoenzymes family in skeletal muscle in situ and in vitro. Through their presence within several populations in the tissue, their expression in native condition and in culture, their presence in all muscle groups, and their persistence with ageing and in pathological conditions, ALDH isoenzymes are proposed to play roles in skeletal muscle homeostasis. Furthermore, ALDF⁺ cell populations, in association with dedicated markers, may constitute new promising candidates for regenerative therapy approaches.

Materials and Methods

Biological samples

Skeletal muscle samples were obtained as post-surgical *res nullus via* the Tissue Bank for Research (Myobank) of the French Association against Myopathies (AFM), in agreement with the French bioethical law (Law n° 94-654 of the 29 July 1994, modified the 22 January 2002) upon informed consent. The healthy donors were adults, they had no clinical signs of muscular disease, and they underwent uneventful hip surgery allowing harvesting tensor fascia latae (TFL) samples. Males and females of similar ages were equally represented. Samples were provided in transport medium (DMEM supplemented with Gentamycin) for use as fresh tissue for dissociation and culture, or snap-frozen in isopentane cooled in liquid nitrogen for immunohistochemical analysis, or snap frozen in liquid nitrogen for analysis of RNA expression. Pathological paravertebral samples were obtained from young boys presenting with DMD, aged 13-16 year and undergoing spinal orthosis surgery. Healthy controls for this group were young patients of both genders presenting with idiopathic scoliosis. Human liver and kidney samples were provided snap-frozen in liquid nitrogen upon necropsy by the Department of Neuropathology R. Escourolle.

Samples of Biceps femoris muscles were obtained from Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD verifier l'utilisation antérieure de l'abréviation) and healthy dogs were provided by Ecole Nationale Vétérinaire (Alfort). Macaque biopsies were obtained from *Macaca Fascicularis* by the Institut du Cerveau et de la Moelle (Paris) and harvested from several distinct anatomical localizations. Dogs and monkeys were obtained at the time of sacrifice of these animals involved in unrelated protocols.

Muscle dissociations

The human muscle biopsies were processed within 24 hours after collection due to a shortened transportation procedure. They were sliced, finely minced and digested for 1 hour at 37°C using 0.2% type II collagenase (Worthington) in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum. Mechanical dissociation was completed by passage of the cell dissociate through a 10 ml pipette, and an 18G needle. The suspension was filtrated through 100 then 40µm cell strainers (Becton-Dickinson). The resulting cell suspensions were centrifuged, washed, and frozen in a medium containing 10% DMSO, 20% Defined fetal bovine serum (DFBS, Hyclone) and 70% DMEM for later use. NHP muscle biopise were dissociated within 12h after collection.

Cell cultures and expansion

Upon thawing, the dissociated cells were washed once in PBS supplemented with 2% DFBS, then seeded in 25cm² flasks (100-200 mg of the initial suspension) in the proliferation medium containing : 80% of modified MCDB medium (custom-made by Hyclone-Perbio), 20% DFBS, 25µg/ml Gentamycin (Gibco), 10 ng/ml human recombinant bFGF (R&D), 1µM dexamethasone (Merck). After the medium were changed on the following days, cultures were grown for 10-15 days to reach 60% confluence, then cells were harvested by trypsinisation and further expanded before reaching 80% confluence for three passages. Aliquots were analysed for ALDF activity, CD56 expression, or differentiation studies.

ALDF and Extracellular markers characterisation by Flow cytometry

Following thawing and washing, cell suspensions were incubated with the ALDF substrate Aldefluor® (1µM) for 20 min (human and NHP cells) or 30 min (dog cells), at 37°C (Stemcell Technologies). Controls were obtained by prior incubation of cells with 50mM of the specific ALDF inhibitor DEAB. Cells were centrifuged, kept on ice, labeled with antibodies directed against extracellular markers (Supplemental Table 1) and analyzed by flow fluorocytometry (FacsCalibur, BD) using the Cell Quest Software.

Cell surface antigens were detected by incubation with Allophycocyanin (APC) - labeled CD34, Becton-Dickinson, or Phycoerythrin (PE) – labeled CD9, CD10, CD29, CD31, CD36, CD45, CD47, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD56, CD61, CD71, CD105, CD106, CD140b, CD146, CD184, CD309) (1/100, 15 minutes, 4°C, BD). Cells were analysed using FACSCalibur (BD) and the CellQuest Software (3.10³ to 10⁴ events analysed). Non-specific fluorescence was determined using negative isotype controls (BD). Cell viability was ascertained by propidium iodide exclusion.

Cell sorting and myogenesis differentiation assay

Aldefluor® labeling was used for cell sorting in combination with labeling of CD34 (see below). Populations were sorted using a BD FACS Aria cell sorter on the basis of ALDF activity, APC – labeled CD34, and PE – labeled CD9, CD10, CD49e or CD56. Cells were seeded into 12-wells plates, grown for one week in proliferation medium and expanded. Upon reaching confluence, differentiation was induced using DMEM (Invitrogen) supplemented with 10% Horse serum (AbCys). Four to five days later, cells were permeabilized using methanol (-20°C, 10 min). The expression of desmin in committed myoblasts and differentiated myotubes was assessed using anti-desmin mAb (clone D33,

1/300, 1 hour, RT, Dako) followed by goat anti-mouse IgG Ab (Alexa Fluor 568, 1/1,000, 1 hour, RT). Nuclei were labelled with DAPI in mounting medium (Vectashield + DAPI, AbCys).

Muscle subcellular localization of ALDH isoenzymes by immunohistofluorescence

Six μm transverse cryostat sections were prepared from samples frozen in isopentane and fixed (Paraformaldehyde, 10 minutes, -20°C), permeabilized (0,1% saponine in PBS, 10 min, RT) and nonspecific labelling was blocked using 10% Goat serum in PBS (30 min, RT, Hyclone-Perbio). Human ALDH1A1, ALDH1A2, ALDH1A3, ALDH2, ALDH3A1, ALDH3A2, ALDH3B1, ALDH3B2, ALDH4A1, ALDH7A1, ALDH8A1 and ALDH9A1 were labelled using Rabbit monoclonal or polyclonal Ab (1/100 – 1/500, overnight, 4°C , supplemental table 2). Then sections were incubated with a mouse polyclonal anti-laminin Ab (1/200, 1 hour, RT, Abcam), followed by goat anti-mouse immunoglobulin G (IgG) Ab (Alexa fluor 488, 1/400, 1 hour, RT, Abcam) to delineate skeletal muscle fibers. Nuclei were labelled with DAPI in mounting medium (Vectashield, AbCys). Negative controls were obtained by omitting primary Abs. Sections were observed using a Zeiss fluorescence microscope, images were captured using a Sony CCD cooled camera and the Metaview® software and final figures were made using Adobe Photoshop®.

Localization of ALDH isoenzymes in primary cell cultures

The cell layers were washed in PBS, fixed in PFA (4% in PBS, 10 min, RT), permeabilized using triton (0.2% in PBS, 10 min, RT), rinsed in PBS and incubated using rabbit Ab directed against isoenzymes as above followed by the secondary Goat anti-Rabbit Ab linked to a fluorophore (Alexa 568, 1/300 in PBS, 30 min at 4°C). Simultaneously, cells were incubated with mouse anti-desmin Ab (1/300, 1 hour, RT, Dako), followed by goat anti-mouse IgG Ab (Alexa fluor 488, 1/400, 1 hour, RT) to define the myogenic structures. Nuclei were labeled using DAPI. Images were captured using a Sony CCD cooled camera and the Metaview® software and final figures were made using Adobe Photoshop®.

mRNA expression analysis by Q-PCR

The primers were designed using the OLIGO Primer Analysis Version 7, with a size between 18-23 NT, annealing temperature of 60°C (Supplemental Table 3). Primers were designed containing an intron sequence for specific cDNA amplification, and reactions were performed with appropriate negative template-free controls.

Total mRNA were isolated from snap frozen tissue biopsies (100mg) or cell pellets (100 000 cells at least) using Trizol. Concentration and purity were evaluated with NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (labtech).

First-strand cDNA was synthesised in using 250 ng of total mRNA and 1 µL random hexamer primers supplemented with RNase free water to 12 µL. Mixes were incubated 65°C for 5 min to eliminate secondary structures. Reactions were performed (10 min at 25°C, 50 min at 37°C and 15 min at 70°C) using Reverse Transcription Reagents (Reaction Buffer, Riboblock RNase Inhibitor 20 U/µL, dNTP 10mM and RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase) (Invitrogen).

Quantitative PCR was carried out in 384 wells dishes on cDNA products 1/25 in duplicate using SYBR Green (Roche) for LightCycler® 480 with the following parameters using 1 µM of each couple of primers: initial enzymatic activation for one step cycling (95 °C, 5 min), then 40 cycles denaturation (95 °C, 30 sec) and annealing / extension (60 °C for 15 sec, 72°C for 15 sec) for 40 cycles. Srp72 was used as the reference gene.

The ratio between the amounts of a target gene and the endogenous reference gene was determined then compared between samples. The amplification efficiencies between genes were compared by preparing a dilution series for genes from cDNA samples. Each dilution series was amplified in RT-qPCR and the C_T values obtained were used to construct standard curves for targets. The amplification efficiency (E) for each target was calculated according to the following equation: $E = 10^{(-1/S)} - 1$ (where S = slope of the standard curve).

Acknowledgments

This work was supported in part by the DIM-STEMPOLE from Région Ile-de-France (J. Etienne), by the Association Française contre les Myopathies (AFM, C. Catelain, S. Riveron, J. Lafable), and by grants from the Duchenne Parent Project from the Netherlands (DPP), from the Ligue contre la Cardiomyopathie, and from the Agence de Biomédecine. Our group is supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the AFM, the Université Pierre et Marie Curie-Paris 6 (UPMC).

We thank M. Stéphane Vasseur and Ms. Maud Chapart, and MYOBANK (the AFM Tissue bank for research, Paris, France), for their invaluable help and expertise in providing human muscle biopsies. We thank Dr. Veronique Sazdovitch for the providing of human kidney and liver tissues (Département de Neuropathologie R. Escourrolle, Paris, France). We thank Dr. Chantal François and Ms. Elodie Laffrat (Institut du Cerveau et de la Moelle, Paris, France), Dr. Marjorie Lagrevol and Dr. Kevin Thibault-Duprey (SANOFI, Alfortville, France), Dr. Claire-Maëlle Fovet (MIRCen-CEA, Fontenay-aux-Roses, France) and Dr. P. Pradeau (IMASSA, France) for the kind gift of Macaque biopsies. We thank Mrs. Catherine Blanc and Mrs. Brigitte Hoarau (Flow Cytometry Core CyPS, Pierre & Marie Curie University, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris) for invaluable help in cell sorting, and Dr. Valérie Vanneaux (Cell Therapy Laboratory, Saint Louis Hospital, Paris) for her FACS expertise, Drs. Valérie Allamand, Sonia Berrih-Aknin, Raphaëlle Grifone, Martine Oloko, Frédérique Truffault for their expert skills, advices and discussions.

References

- Aral B, Schlenzig JS, Liu G, Kamoun P. Database cloning human delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) cDNA: a bifunctional enzyme catalyzing the first 2 steps in proline biosynthesis. *C R Acad Sci III*. 1996 Mar;319(3):171-8.
- Babcock HE, Dutta S, Alur RP, Brocker C, Vasiliou V, Vitale S, Abu-Asab M, Brooks BP. *aldh7a1* regulates eye and limb development in zebrafish. *PLoS One*. 2014 Jul 8;9(7):e101782.
- Balber AE. (2011) Concise review: aldehyde dehydrogenase bright stem and progenitor cell populations from normal tissues: characteristics, activities, and emerging uses in regenerative medicine. *Stem Cells*. ;29(4):570-5.
- Begemann G, Schilling TF, Rauch GJ, Geisler R, Ingham PW. The zebrafish neckless mutation reveals a requirement for *raldh2* in mesodermal signals that pattern the hindbrain. *Development*. 2001 Aug;128(16):3081-94.
- Bell GI, Meschino MT, Hughes-Large JM, Broughton HC, Xenocostas A, Hess DA. Combinatorial human progenitor cell transplantation optimizes islet regeneration through secretion of paracrine factors. *Stem Cells Dev*. 2012 Jul 20;21(11):1863-76.
- Bentzinger CF, Wang YX, Rudnicki MA. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012; 4: a008342.
- Black WJ, Stagos D, Marchitti SA, Nebert DW, Tipton KF, Bairoch A, Vasiliou V. Human aldehyde dehydrogenase genes: alternatively spliced transcriptional variants and their suggested nomenclature. *Pharmacogenet Genomics*. 2009 Nov;19(11):893-902.
- Blau HM, Cosgrove BD, Ho AT. The central role of muscle stem cells in regenerative failure with aging. *Nat Med*. 2015 Aug;21(8):854-62.
- Boldrin L, Zammit PS, Morgan JE. Satellite cells from dystrophic muscle retain regenerative capacity. *Stem Cell Res*. 2015 Jan;14(1):20-9.
- Boldrin L, Muntoni F, Morgan JE. Are human and mouse satellite cells really the same? *J Histochem Cytochem*. 2010 Nov;58(11):941-55.
- Brocker C, Cantore M, Failli P, Vasiliou V. Aldehyde dehydrogenase 7A1 (ALDH7A1) attenuates reactive aldehyde and oxidative stress induced cytotoxicity. *Chem Biol Interact*. 2011 May 30;191(1-3):269-77.
- Brzóška E, Bello V, Darribère T, Moraczewski J. Integrin alpha3 subunit participates in myoblast adhesion and fusion in vitro. *Differentiation*. 2006 Mar;74(2-3):105-18.
- Capoccia BJ, Robson DL, Levac KD, Maxwell DJ, Hohm SA, Neelamkavil MJ, Bell GI, Xenocostas A, Link DC, Piwnicka-Worms D, Nolte JA, Hess DA. Revascularization of ischemic limbs after transplantation of human bone marrow cells with high aldehyde dehydrogenase activity. *Blood*. 2009 May 21;113(21):5340-51.
- Catelain C, Riveron S, Papadopoulos A, Mougnot N, Jacquet A, Vauchez K, Yada E, Pucéat M, Fisman M, Butler-Browne G, Bonne G, Vilquin JT. Myoblasts and embryonic stem cells differentially engraft in a mouse model of genetic dilated cardiomyopathy. *Mol Ther*. 2013 May;21(5):1064-75.

- Cerletti M, Jurga S, Witczak CA, Hirshman MF, Shadrach JL, Goodyear LJ, Wagers AJ. Highly efficient, functional engraftment of skeletal muscle stem cells in dystrophic muscles. *Cell*. 2008 Jul 11;134(1):37-47.
- 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 Aug 1;119(Pt 15):3117-27.
- Chambliss KL, Caudle DL, Hinson DD, Moomaw CR, Slaughter CA, Jakobs C, Gibson KM. Molecular cloning of the mature NAD(+)-dependent succinic semialdehyde dehydrogenase from rat and human. cDNA isolation, evolutionary homology, and tissue expression. *J Biol Chem*. 1995 Jan 6;270(1):461-7.
- Chang C, Yoshida A. Human fatty aldehyde dehydrogenase gene (ALDH10): organization and tissue-dependent expression. *Genomics*. 1997 Feb 15;40(1):80-5.
- Chen CH, Ferreira JC, Gross ER, Mochly-Rosen D. Targeting aldehyde dehydrogenase 2: new therapeutic opportunities. *Physiol Rev*. 2014 ; 94 :1-34.
- 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 Apr;24(4):975-85.
- 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 Mar;9(3):255-67.
- Dey D, Pan G, Varma NR, Palaniyandi SS. Sca-1⁺ cells from fetal heart with high aldehyde dehydrogenase activity exhibit enhanced gene expression for self-renewal, proliferation, and survival. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:730683.
- Dimmeler S, Leri A. Aging and disease as modifiers of efficacy of cell therapy. *Circ Res*. 2008 Jun 6;102(11):1319-30.
- Dollé L, Best J, Empsen C, Mei J, Van Rossen E, Roelandt P, Snykers S, Najimi M, Al Battah F, Theise ND, Streetz K, Sokal E, Leclercq IA, Verfaillie C, Rogiers V, Geerts A, van Grunsven LA. Successful isolation of liver progenitor cells by aldehyde dehydrogenase activity in naïve mice. *Hepatology*. 2012 Feb;55(2):540-52.
- Douville J, Beaulieu R, Balicki D. ALDH1 as a functional marker of cancer stem and progenitor cells. *Stem Cells Dev*. 2009 Jan-Feb;18(1):17-25.
- Duester G . Retinoic Acid Synthesis and Signaling during Early Organogenesis. *Cell* 2008, 134 (6): 921–31.
- Duester G, Mic FA, Molotkov A. Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue-specific metabolism to retinoic acid. *Chem Biol Interact*. 2003 Feb 1;143-144:201-10.
- El Haddad M, Jean E, Turki A, Hugon G, Vernus B, Bonniou A, Passerieux E, Hamade A, Mercier J, Laoudj-Chenivresse D, Carnac G. Glutathione peroxidase 3, a new retinoid target gene, is crucial for human skeletal muscle precursor cell survival. *J Cell Sci*. 2012 Dec 15;125(Pt 24):6147-56.
- Fan X, Molotkov A, Manabe S, Donmoyer CM, Deltour L, Foglio MH, Cuenca AE, Blaner WS, Lipton SA, Duester G. Targeted disruption of Aldh1a1 (Raldh1) provides evidence

- for a complex mechanism of retinoic acid synthesis in the developing retina. *Mol Cell Biol* 2003 Jul;23(13):4637-48.
- Foo LC, Dougherty JD. Aldh1L1 is expressed by postnatal neural stem cells in vivo. *Glia*. 2013 Sep;61(9):1533-41.
- Froeschlé A, Alric S, Kitzmann M, Carnac G, Auradé F, Rochette-Egly C, Bonniou A. Retinoic acid receptors and muscle b-HLH proteins: partners in retinoid-induced myogenesis. *Oncogene*. 1998 Jul 2;16(26):3369-78.
- Gentry T, Deibert E, Foster SJ, Haley R, Kurtzberg J, Balber AE. Isolation of early hematopoietic cells, including megakaryocyte progenitors, in the ALDH-bright cell population of cryopreserved, banked UC blood. *Cytotherapy* 2007; 9(6): 569-576.
- Gentry T, Foster S, Winstead L, Deibert E, Fiordalisi M, Balber A. Simultaneous isolation of human BM hematopoietic, endothelial and mesenchymal progenitor cells by flow sorting based on aldehyde dehydrogenase activity: implications for cell therapy. *Cytotherapy* 2007; 9(3): 259-274.
- Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer CG, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha MS, Dontu G. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*. 2007 Nov;1(5):555-67.
- Gonnet F, Bouazza B, Millot GA, Ziaei S, Garcia L, Butler-Browne GS, Mouly V, Tortajada J, Danos O, Svinartchouk F. Proteome analysis of differentiating human myoblasts by dialysis-assisted two-dimensional gel electrophoresis (DAGE). *Proteomics*. 2008 Jan;8(2):264-78.
- Hamade A, Deries M, Begemann G, Bally-Cuif L, Genêt C, Sabatier F, Bonniou A, Cousin X. Retinoic acid activates myogenesis in vivo through Fgf8 signalling. *Dev Biol*. 2006 Jan 1;289(1):127-40.
- Haselbeck RJ, Hoffmann I, Duyster G. Distinct functions for Aldh1 and Raldh2 in the control of ligand production for embryonic retinoid signaling pathways. *Dev Genet*. 1999;25(4):353-64.
- Hong M, Lee Y, Kim JW, Lim JS, Chang SY, Lee KS, Paik SG, Choe IS. Isolation and characterization of cDNA clone for human liver 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase. *Biochem Mol Biol Int*. 1999 Mar;47(3):407-15.
- Hu CA, Lin WW, Valle D. Cloning, characterization, and expression of cDNAs encoding human delta 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase. *J Biol Chem*. 1996 Apr 19;271(16):9795-800.
- Ioannou M, Serafimidis I, Arnes L, Sussel L, Singh S, Vasiliou V, Gavalas A. ALDH1B1 is a potential stem/progenitor marker for multiple pancreas progenitor pools. *Dev Biol*. 2013 Feb 1;374(1):153-63.
- Jackson B, Bocker C, Thompson DC, Black W, Vasiliou K, Nebert DW, Vasiliou V. Update on the aldehyde dehydrogenase gene (ALDH) superfamily. *Hum Genomics*. 2011 May;5(4):283-303.
- Jackson BC, Thompson DC, Charkoftaki G, Vasiliou V. Dead enzymes in the aldehyde dehydrogenase gene family: role in drug metabolism and toxicology. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2015;11(12):1839-47.

- Jean E, Laoudj-Chenivesse D, Notarnicola C, Rouger K, Serratrice N, Bonniou A, Gay S, Bacou F, Duret C, Carnac G. Aldehyde dehydrogenase activity promotes survival of human muscle precursor cells. *J Cell Mol Med*. 2011 Jan;15(1):119-33.
- Keegan BR, Feldman JL, Begemann G, Ingham PW, Yelon D. Retinoic acid signaling restricts the cardiac progenitor pool. *Science*. 2005 Jan 14;307(5707):247-9.
- Koninckx R, Daniëls A, Windmolders S, Mees U, Macianskiene R, Mubagwa K, Steels P, Jamaer L, Dubois J, Robic B, Hendrikx M, Rummens JL, Hensen K. The cardiac atrial appendage stem cell: a new and promising candidate for myocardial repair. *Cardiovasc Res*. 2013 Mar 1;97(3):413-23.
- Koppaka V, Thompson DC, Chen Y, Ellermann M, Nicolaou KC, Juvonen RO, Petersen D, Deitrich RA, Hurley TD, Vasiliou V. Aldehyde dehydrogenase inhibitors: a comprehensive review of the pharmacology, mechanism of action, substrate specificity, and clinical application. *Pharmacol Rev*. 2012 Jul;64(3):520-39.
- Kotlors M, Kirschner J. Elevated satellite cell number in Duchenne muscular dystrophy. *Cell Tissue Res*. 2010 Jun;340(3):541-8.
- Kumar S, Sandell LL, Trainor PA, Koentgen F, Duester G. Alcohol and aldehyde dehydrogenases: retinoid metabolic effects in mouse knockout models. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Jan;1821(1):198-205.
- Lecourt S, Marolleau JP, Fromigué O, Vauchez K, Andriamanalijaona R, Ternaux B, Lacassagne MN, Robert I, Boumédiene 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*. *Exp Cell Res*. 2010 Sep 10;316(15):2513-26.
- Levi BP, Yilmaz OH, Duester G, Morrison SJ. Aldehyde dehydrogenase 1a1 is dispensable for stem cell function in the mouse hematopoietic and nervous systems. *Blood*. 2009 Feb 19;113(8):1670-80.
- Lin SW, Chen JC, Hsu LC, Hsieh CL, Yoshida A. Human gamma-aminobutyraldehyde dehydrogenase (ALDH9): cDNA sequence, genomic organization, polymorphism, chromosomal localization, and tissue expression. *Genomics*. 1996 Jun 15;34(3):376-80.
- Lin M, Zhang M, Abraham M, Smith SM, Napoli JL. Mouse retinal dehydrogenase 4 (RALDH4), molecular cloning, cellular expression, and activity in 9-cis-retinoic acid biosynthesis in intact cells. *J Biol Chem*. 2003 Mar 14;278(11):9856-61.
- Liu Y, Jiang X, Zeng Y, Zhou H, Yang J, Cao R. Proliferating pancreatic beta-cells upregulate ALDH. *Histochem Cell Biol*. 2014 Dec;142(6):685-91.
- Ma I, Allan AL. The role of human aldehyde dehydrogenase in normal and cancer stem cells. *Stem Cell Rev*. 2011;7:292-306.
- Marcato P, Dean CA, Giacomantonio CA, Lee PW. Aldehyde dehydrogenase: its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform. *Cell Cycle*. 2011 May 1;10(9):1378-84.
- Marcato P, Dean CA, Pan D, Araslanova R, Gillis M, Joshi M, Helyer L, Pan L, Leidal A, Gujar S, Giacomantonio CA, Lee PW. Aldehyde dehydrogenase activity of breast cancer stem cells is primarily due to isoform ALDH1A3 and its expression is predictive of metastasis. *Stem Cells*. 2011 Jan;29(1):32-45.
- Marchitti SA, Brocker C, Stagos D, Vasiliou V. Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert Opin*. 2008; 4:697-720.

- McKay BR, Toth KG, Tarnopolsky MA, Parise G. Satellite cell number and cell cycle kinetics in response to acute myotrauma in humans: immunohistochemistry versus flow cytometry. *J Physiol*. 2010 Sep 1;588(Pt 17):3307-20.
- Mic FA, Sirbu IO, Duester G. Retinoic acid synthesis controlled by Raldh2 is required early for limb bud initiation and then later as a proximodistal signal during apical ectodermal ridge formation. *J Biol Chem*. 2004 Jun 18;279(25):26698-706.
- Moore SA, Baker HM, Blythe TJ, Kitson KE, Kitson TM, Baker EN. Sheep liver cytosolic aldehyde dehydrogenase: the structure reveals the basis for the retinal specificity of class 1 aldehyde dehydrogenases. *Structure*. 1998 Dec 15;6(12):1541-51.
- Moreb JS, Ucar D, Han S, Amory JK, Goldstein AS, Ostmark B, Chang LJ. The enzymatic activity of human aldehyde dehydrogenases 1A2 and 2 (ALDH1A2 and ALDH2) is detected by Aldefluor, inhibited by diethylaminobenzaldehyde and has significant effects on cell proliferation and drug resistance. *Chem Biol Interact*. 2012 Jan 5;195(1):52-60.
- Muzio G, Maggiora M, Paiuzzi E, Oraldi M, Canuto RA. Aldehyde dehydrogenases and cell proliferation. *Free Radic Biol Med*. 2012 Feb 15;52(4):735-46.
- Napoli JL. Physiological insights into all-trans-retinoic acid biosynthesis. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Jan;1821(1):152-67.
- 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.
- Nguyen PH, Giraud J, Chambonnier L, Dubus P, Wittkop L, Belleannée G, Collet D, Soubeyran I, Evrard S, Rousseau B, Dugot-Senant N, Mégraud F, Mazurier F, Varon C. Characterization of biomarkers of tumorigenic and chemoresistant cancer stem cells in human gastric carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2016 Sep 12.
- Niederreither K, Fraulob V, Garnier JM, Chambon P, Dollé P. Differential expression of retinoic acid-synthesizing (RALDH) enzymes during fetal development and organ differentiation in the mouse. *Mech Dev*. 2002 Jan;110(1-2):165-71.
- Perin EC, Murphy M, Cooke JP, Moyé L, Henry TD, Bettencourt J, Gahremanpour A, Leeper N, Anderson RD, Hiatt WR, Lima JA, Venkatesh B, Sayre SL, Vojvodic RW, Taylor DA, Ebert RF, Hirsch AT; Cardiovascular Cell Therapy Research Network. Rationale and design for PACE: patients with intermittent claudication injected with ALDH bright cells. *Am Heart J*. 2014 Nov;168(5):667-73.
- Pors K, Moreb JS. Aldehyde dehydrogenases in cancer: an opportunity for biomarker and drug development? *Drug Discov Today*. 2014; 19: 1953-63.
- Povsic TJ, Zhou J, Adams SD, Bolognesi MP, Attarian DE, Peterson ED. Aging is not associated with bone marrow-resident progenitor cell depletion. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2010 Oct;65(10):1042-50.
- 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 Dec 4;50(23):2243-8.
- Przewoźniak M, Czaplicka I, Czerwińska AM, Markowska-Zagrajek A, Moraczewski J, Stremińska W, Jańczyk-Ilach K, Ciemerych MA, Brzoska E. Adhesion proteins--an impact on skeletal myoblast differentiation. *PLoS One*. 2013 May 6;8(5):e61760.

- Rodriguez-Guzman M, Montero JA, Santesteban E, Gañan Y, Macias D, Hurlé JM. Tendon-muscle crosstalk controls muscle bellies morphogenesis, which is mediated by cell death and retinoic acid signaling. *Dev Biol*. 2007 Feb 1;302(1):267-80.
- Roehrich ME, Spicher A, Milano G, Vassalli G. Characterization of cardiac-resident progenitor cells expressing high aldehyde dehydrogenase activity. *Biomed Res Int*. 2013;2013:503047. doi: 10.1155/2013/503047.
- Rovira M, Scott SG, Liss AS, Jensen J, Thayer SP, Leach SD. Isolation and characterization of centroacinar/terminal ductal progenitor cells in adult mouse pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jan 5;107(1):75-80.
- Ryan T, Liu J, Chu A, Wang L, Blais A, Skerjanc IS. Retinoic acid enhances skeletal myogenesis in human embryonic stem cells by expanding the premyogenic progenitor population. *Stem Cell Rev*. 2012 Jun;8(2):482-93.
- Saw YT, Yang J, Ng SK, Liu S, Singh S, Singh M, Welch WR, Tsuda H, Fong WP, Thompson D, Vasiliou V, Berkowitz RS, Ng SW. Characterization of aldehyde dehydrogenase isozymes in ovarian cancer tissues and sphere cultures. *BMC Cancer*. 2012 Aug 1;12:329.
- Singh S, Chen Y, Matsumoto A, Orlicky DJ, Dong H, Thompson DC, Vasiliou V. ALDH1B1 links alcohol consumption and diabetes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Aug 7;463(4):768-73.
- Sobreira TJ, Marlétaz F, Simões-Costa M, Schechtman D, Pereira AC, Brunet F, Sweeney S, Pani A, Aronowicz J, Lowe CJ, Davidson B, Laudet V, Bronner M, de Oliveira PS, Schubert M, Xavier-Neto J. Structural shifts of aldehyde dehydrogenase enzymes were instrumental for the early evolution of retinoid-dependent axial patterning in metazoans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jan 4;108(1):226-31.
- Stagos D, Chen Y, Brocker C, Donald E, Jackson BC, Orlicky DJ, Thompson DC, Vasiliou V. Aldehyde dehydrogenase 1B1: molecular cloning and characterization of a novel mitochondrial acetaldehyde-metabolizing enzyme. *Drug Metab Dispos*. 2010 Oct;38(10):1679-87.
- Sterrenburg E, Turk R, 't Hoen PA, van Deutekom JC, Boer JM, van Ommen GJ, den Dunnen JT. Large-scale gene expression analysis of human skeletal myoblast differentiation. *Neuromuscul Disord*. 2004 Sep;14(8-9):507-18.
- Stewart MJ, Malek K, Crabb DW. Distribution of messenger RNAs for aldehyde dehydrogenase 1, aldehyde dehydrogenase 2, and aldehyde dehydrogenase 5 in human tissues. *J Invest Med*. 1996 Feb;44(2):42-6.
- Storms RW, Trujillo AP, Springer JB, Shah L, Colvin OM, Ludeman SM, Smith C. Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Aug 3;96(16):9118-23.
- Tachibana I, Hemler ME. Role of transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins CD9 and CD81 in muscle cell fusion and myotube maintenance. *J Cell Biol*. 1999 Aug 23;146(4):893-904.
- Unguryte A, Bernotiene E, Bagdonas E, Garberyste S, Porvaneckas N, Jorgensen C. Human articular chondrocytes with higher aldehyde dehydrogenase activity have stronger expression of COL2A1 and SOX9. *Osteoarthritis Cartilage*. 2016 May;24(5):873-82.

- Valentine BA, Winand NJ, Pradhan D, Moise NS, de Lahunta A, Kornegay JN, Cooper BJ. Canine X-linked muscular dystrophy as an animal model of Duchenne muscular dystrophy: a review. *Am J Med Genet.* 1992 Feb 1;42(3):352-6.
- Vasiliou V, Thompson DC, Smith C, Fujita M, Chen Y. Aldehyde dehydrogenases: from eye crystallins to metabolic disease and cancer stem cells. *Chem Biol Interact.* 2013 Feb 25;202(1-3):2-10.
- Vaucheux K, Marolleau JP, Schmid M, Khattar P, Chapel A, Catelain C, Lecourt S, Largh ero J, Fiszman M, Vilquin JT. Aldehyde dehydrogenase activity identifies a population of human skeletal muscle cells with high myogenic capacities. *Mol Ther.* 2009 Nov;17(11):1948-58.
- Vella JB, Thompson SD, Bucsek MJ, Song M, Huard J. Murine and human myogenic cells identified by elevated aldehyde dehydrogenase activity: implications for muscle regeneration and repair. *PLoS One.* 2011;6(12):e29226.
- Verdijk LB, Snijders T, Drost M, Delhaas T, Kadi F, van Loon LJ. Satellite cells in human skeletal muscle; from birth to old age. *Age (Dordr).* 2014 Apr;36(2):545-7.
- 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 Ther.* 2005 Nov;12(22):1651-62.
- Wang C, Kane MA, Napoli JL. Multiple retinol and retinal dehydrogenases catalyze all-trans-retinoic acid biosynthesis in astrocytes. *J Biol Chem.* 2011 Feb 25;286(8):6542-53.
- Wilschut KJ, van Tol HT, Arkesteijn GJ, Haagsman HP, Roelen BA. Alpha 6 integrin is important for myogenic stem cell differentiation. *Stem Cell Res.* 2011 Sep;7(2):112-23.
- Xavier-Neto J, Sousa Costa  M, Figueira AC, Caiaffa CD, Amaral FN, Peres LM, da Silva BS, Santos LN, Moise AR, Castillo HA. Signaling through retinoic acid receptors in cardiac development: Doing the right things at the right times. *Biochim Biophys Acta.* 2015 Feb;1849(2):94-111.
- Xu X, Wilschut KJ, Kouklis G, Tian H, Hesse R, Garland C, Sbitany H, Hansen S, Seth R, Knott PD, Hoffman WY, Pomerantz JH. Human Satellite Cell Transplantation and Regeneration from Diverse Skeletal Muscles. *Stem Cell Reports.* 2015 Sep 8;5(3):419-34.
- Yoshida A, Rzhetsky A, Hsu LC, Chang C. Human aldehyde dehydrogenase gene family. *Eur J Biochem* 1999; 251(3): 549-557. Si ce n'est pas trop vieux...
- Zhao X, Sirbu IO, Mic FA, Molotkova N, Molotkov A, Kumar S, Duester G. Retinoic acid promotes limb induction through effects on body axis extension but is unnecessary for limb patterning. *Curr Biol.* 2009 Jun 23;19(12):1050-7.
- Zhou P, Hohm S, Olusanya Y, Hess DA, Nolte J. (2009). Human progenitor cells with high aldehyde dehydrogenase activity efficiently engraft into damaged liver in a novel model. *Hepatology* ; 49 : 1992-2000.

Figure Legends

Figure 1. Flow cytometry characterization of ALDF⁺/CD34⁺ and ALDF⁺/CD34⁻ populations of cells extracted from patients of different ages. Dissociated cells from human TFL muscle biopsies were incubated with Aldefluor substrate in presence of DEAB inhibitor (A) or in its absence (B), then with APC-labeled anti-CD34 (C). Representative cytograms are shown. The specificity of Aldefluor signal is ascertained by the pre-incubation of test tubes with the inhibitor DEAB (A). The expression of CD34 can be represented as a function of ALDF⁺ cells, providing an upper right quarter containing the ALDF⁺/CD34⁺ cells, and a lower right quarter containing the ALDF⁺/CD34⁻ cells, in which the proportions can be estimated (C). Three cohorts of patients have been designed according to their ages (24-48 y ; 51-69 y ; 71-93 y), and results have been plotted accordingly. No significant difference was observed between cohorts in the proportions of total ALDF (D), of ALDF⁺/CD34⁺ (E) or ALDF⁺/CD34⁻ (F), nor in the ratio of these populations (H), although a non-significant tendency was observed towards a decrease (I). No significant difference was demonstrated between the cohorts of men and women (G). Datas are percentages (mean, SD) of cells positive for the indicated marker.

Figure 2. Flow cytometry evaluation of cell populations extracted from distinct anatomic territories. Cells were dissociated from muscle biopsies harvested from several territories of non-human primates (Macaques) of similar ages (n=7). Cells were incubated with Aldefluor substrate then with APC-labelled anti-CD34 allowing distinguishing the Macaque cell populations, i.e. ALDF⁺/CD34⁺ in upper right quarter and ALDF⁺/CD34⁻ in lower right quarter (A). The contents in total ALDF⁺ (B) and in ALDF⁺/CD34⁻ (C) populations were compared and presented variations, and no significant difference between muscle groups could be established. N indicates the number of samples for each muscle group.

Figure 3. Flow cytometry evaluation of cell populations extracted from healthy and DMD patients, and from control and GRMD dogs. Cells were dissociated from muscle biopsies harvested from healthy (n=9) and DMD patients (n=5) (panel A) or control (n=4) and GRMD dogs (n=4) (Panel B). Cells were incubated with Aldefluor substrate and APC-labeled anti-CD34 allowing distinguishing ALDF⁺/CD34⁺ and ALDF⁺/CD34⁻ populations. Representative cytograms are shown, mean and SD are plotted on histograms (right panels). Total ALDF⁺ cells are increased in DMD patients and GRMD dogs (p<0.01), the ALDF⁺/CD34⁺ population is significantly increased in DMD patients (p<0.05) but not in GRMD dogs, while the ALDF⁺/CD34⁻ population is significantly increased in GRMD dogs (p<0.05) but not in DMD patients.

Figure 4. Identification of markers associated with ALDF⁺ cell populations. Dissociated cells from Human control TFL muscle biopsies were incubated with Aldefluor substrate, then with APC-labeled anti-CD34 antibody and a second PE-labeled marker. Panel A shows the example of CD9 analysis. The first cytogram defines the CD9 population. The second cytogram defines the ALDF⁺/CD34⁺ and ALDF⁺/CD34⁻ populations. The

ALDF⁺/CD34⁺ population is projected on the CD9 population in the third cytogram, showing an equivalent distribution in CD9⁺ and CD9⁻ cells. The ALDF⁺/CD34⁻ population is projected on the CD9 population in the fourth cytogram, showing the main distribution in CD9⁺ cells. This was repeated for all markers. The values associated to the combinations are translated in histograms and data are percentages (mean, SD) of positive cells for the indicated markers. Panel B analyzes cells from TFL muscles of healthy controls (n=7). The proportion of a dedicated marker among the whole content of mononucleated cells is presented in grey. The proportions of cells expressing a dedicated marker within the ALDF⁺/CD34⁺ population and within the ALDF⁺/CD34⁻ population are presented in blue and in green, respectively. This representation suggests that, for example, CD9 and CD184 are especially co-expressed with ALDF⁺/CD34⁻ cells from skeletal muscles. Panel C compares some selected markers expressed by cells extracted from healthy (blue, n=4) and DMD (red, n=5) paravertebral muscles. For each marker, the 3 sub-populations are individualized (all cells, ALDF⁺/CD34⁺, ALDF⁺/CD34⁻). Significant differences were observed regarding DMD cell populations expressing CD9, CD31, CD49e, and healthy cell populations expressing CD184.

Figure 5: Expression of ALDH activity in culture. Cells were extracted from muscle biopsies of human donors of different ages and grown in culture in proliferating medium. Seven, 14 and 21 days after onset of cultures, ALDH expression was assessed using Aldefluor and the percentage of myogenic cells assessed using PE-labelled anti-CD56 antibody. In panel A, increased proportions of cells express ALDF and CD56 over time, and a few cells remain CD56⁺/ALDF⁻. This behaviour is observed whatever the ages of donors (panels B and C). The microscopic cytofluorescence observation of cultures following induction of cell differentiation indicates that Aldefluor is also oxidized and accumulates in both myoblasts and myotubes (which cannot be analyzed by flow cytometry due to their size) (Panel D).

Figure 6 : Isolation and differentiation of sorted ALDF sub-populations. Non human primate cells (n=4 animals) were incubated with Aldefluor substrate, then with APC-labeled anti-CD34 antibody and a second PE-labeled marker : CD9 (n=4), CD10 (n=2), CD56 (n=4) or CD49e (n=4), then sorted using a FACSDiva. The selected populations were grown in culture in proliferating medium for 2 passages (top panel), then differentiated, fixed and labelled for desmin expression (green) and DAPI staining (blue) (middle panel). Fusion indexes were calculated (n=4 fields per well). Cells selected on CD9 and CD56 were the most myogenic, while cells selected on CD49e were significantly the less myogenic (p<0.01) (bottom panel). Datas are presented as mean and SD.

Figure 7 : identification of isoenzymes expressed by cells freshly dissociated from (A) Human TFL and (B) non-human Primate vastus lateralis muscles. Cells were fixed using PAF and permeabilized using saponin, then incubated with antibodies directed against the ALDH isoenzymes indicated, then incubated with a secondary antibody labelled with FITC, and analyzed by flow cytofluorimetry. The baseline was obtained by omitting the first antibody. Some isoenzymes are expressed by a few cells, while other are expressed by larger populations. Datas are presented as mean and SD (n=4).

Figure 8 : Identification of isoenzymes expressed in primary muscle cell cultures. Cells were extracted from muscle biopsies of human donors (n=3) and non human primates (n=3) and grown in culture in proliferating medium for 2 passages. Cells were harvested, fixed using PAF and permeabilized using saponin, then incubated with antibodies directed against ALDH isoenzymes, then a secondary antibody labelled with FITC, and analyzed by flow cytometry. The control was obtained by incubations without the first antibody and allowed drawing the gate for characterization of positive cells. (A) Representative cytograms of human cells show the different populations according to their expression of isoenzymes. (B) Cytograms summarize the isoenzymes expressed by human and non human primate cells. Datas are presented as mean and SD.

Figure 9 : Immunocytological phenotyping of primary muscle cells in culture. Human cells were extracted from TFL muscles of healthy donors and grown in culture in proliferation medium (2 passages, panel A) or in proliferation (2 passages) then in differentiation medium (4 days, panel B). Cells were fixed using PAF and permeabilized using saponin, then incubated with antibodies directed against ALDH isoenzymes, and desmin, then incubated with labelled secondary antibodies. Nuclei were stained using DAPI (blue). In proliferation (A), the number of cells expressing isoenzymes (red, first column) generally exceeded the number of cells expressing desmin (green, second column) (ALDH3A2, ALDH3B2, ALDH7A1, ALDH8A1, ALDH9A1, arrows) excepted for ALDH1A1 where some desmin⁺ cells were negative for the isoenzyme. ALDH3A2 stained strongly some nuclei. Following differentiation (B), myotubes were generally labelled with a stronger intensity than mononucleated cells (ALDH3A1, ALDH3B1, ALDH9A1). The intensities of ALDH1A1 and ALDH2 labeling were decreased as compared to cells in proliferation. Several nuclei strongly expressed ALDH3A2, suggesting a translocation from cytoplasm to nucleus. Original magnifications: 40X.

Figure 10 : Immunohistological localization of isoenzyme-expressing cells *in situ* on cryostat sections. Human skeletal muscle sections were fixed with PAF and labeled for expression of several isoenzymes (red) and laminin delineating the basal lamina of muscle fibers (green). Nuclei are stained in blue with DAPI. Pictures were obtained by confocal microscopy. Representative pictures are shown, inserts delineate higher magnifications. Most cells express isoenzymes in their cytoplasm, excepted for ALDH3A2 labeling that is concentrated in most but not all nuclei. Most labelled cells are located in the endomysium, but some are also associated to vessels (ALDH2, ALDH3B2, ALDH8A1, ALDH9A1). Some isoenzymes look more diffusely expressed in the endomysial tissue (ALDH3A1, ALDH8A1). Original magnification: 40X (100x for inserts).

Figure 11. Expression of isoenzymes mRNAs in skeletal muscle tissue and cells. (A) The expression of isoenzymes was assessed and compared in human muscle (green, n=2), liver (red, n=2) and kidney (blue, n=2) biopsies by Q-PCR, underlining the presence of ALDH1A1, ALDH1B1, ALDH1L1, ALDH2, ALDH3A2, ALDH5A1, ALDH6A1, ALDH9A1. (B) The expression was analyzed in the total population of freshly dissociated cells from human biopsies highlighting the presence of isoenzymes involved in the

metabolism of retinoic acid (ALDH1A1, ALDH1A2, ALDH1A3, ALDH1B1), and of ALDH2, ALDH3A2, ALDH6A1, ALDH7A1 and ALDH9A1. (C) The expression was analyzed and compared in primary cell cultures in proliferation and in differentiation (n=4), underlining the presence of ALDH1A1, ALDH1A3, ALDH1B1, ALDH2, ALDH3A2, ALDH7A1, ALDH9A1. No significant differences were observed between the proliferation and differentiation stages. Datas are presented as mean and SD.

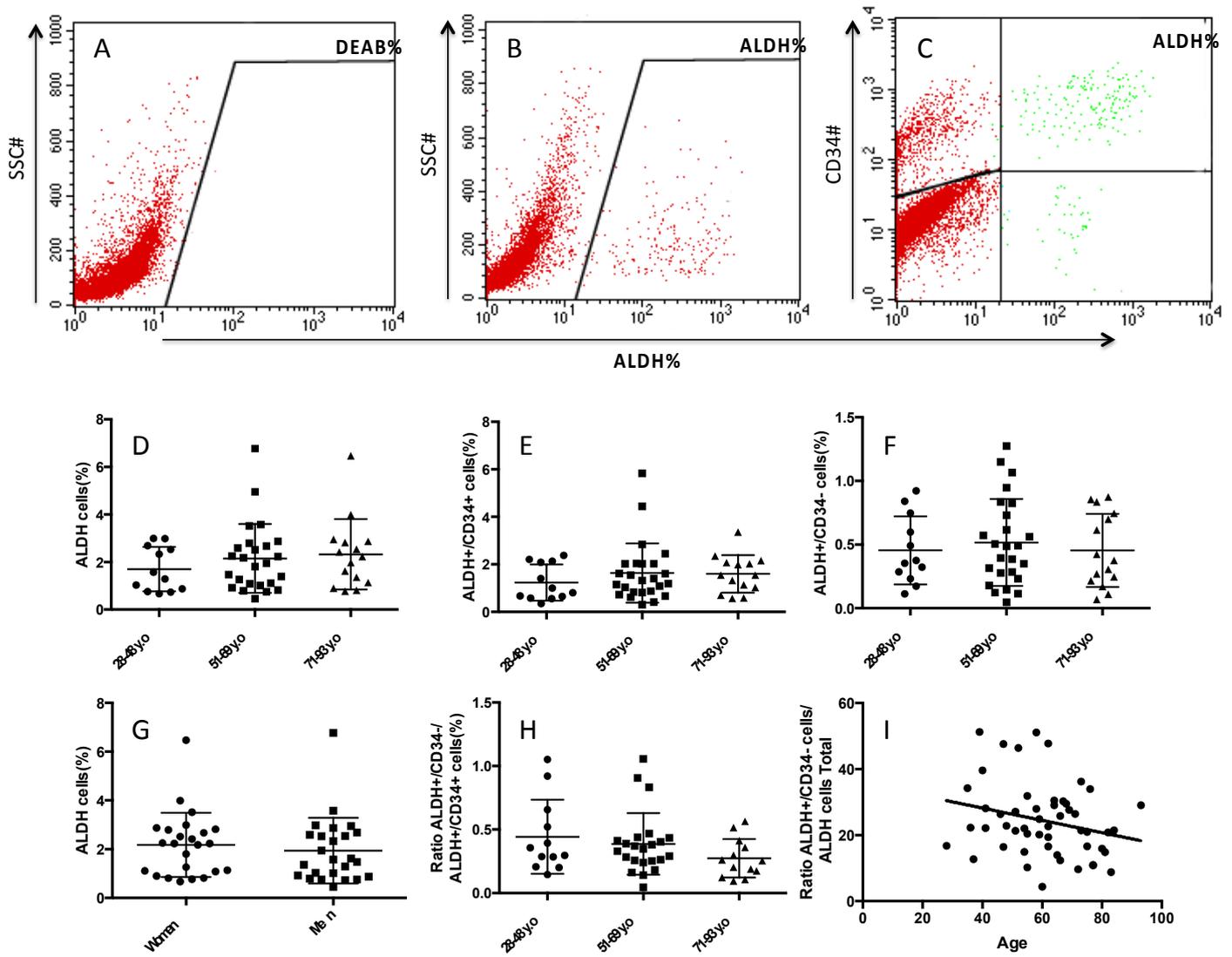


Figure 1 Etienne et al. 2016

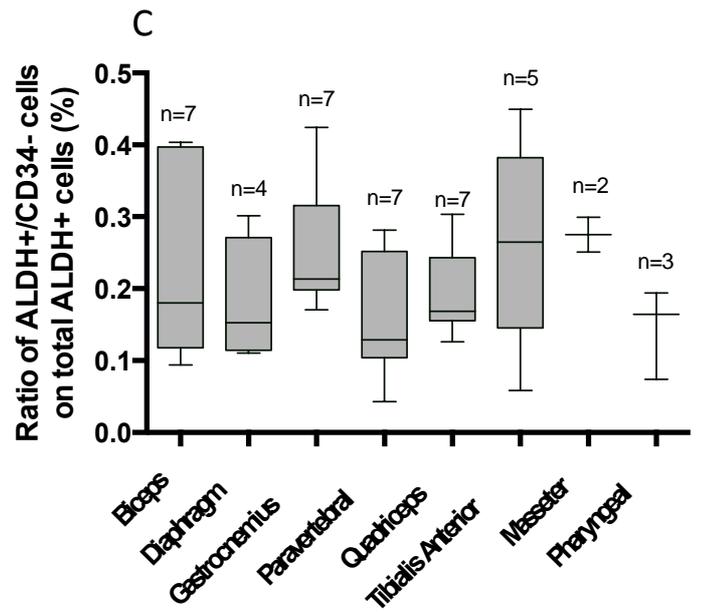
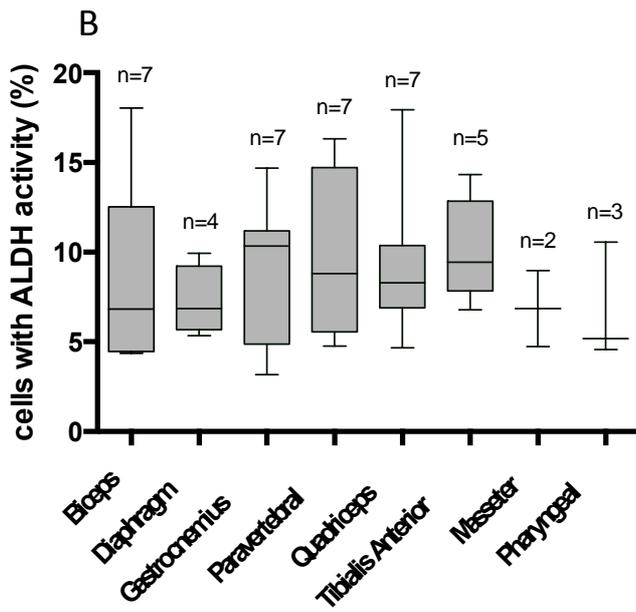
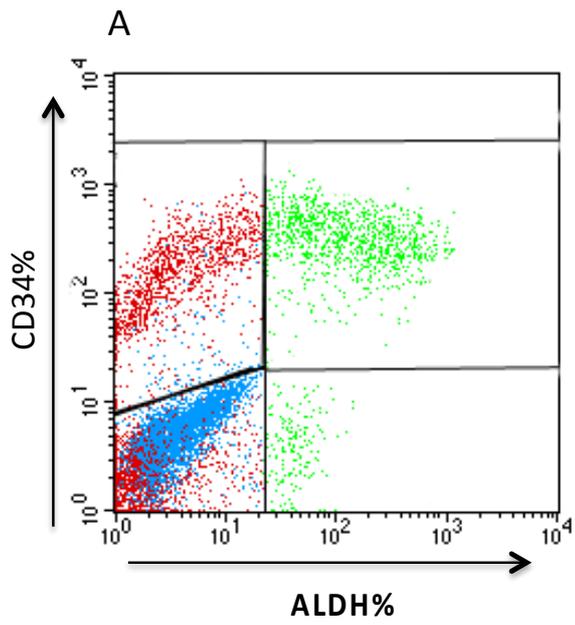


Figure 2 Etienne et al. 2016

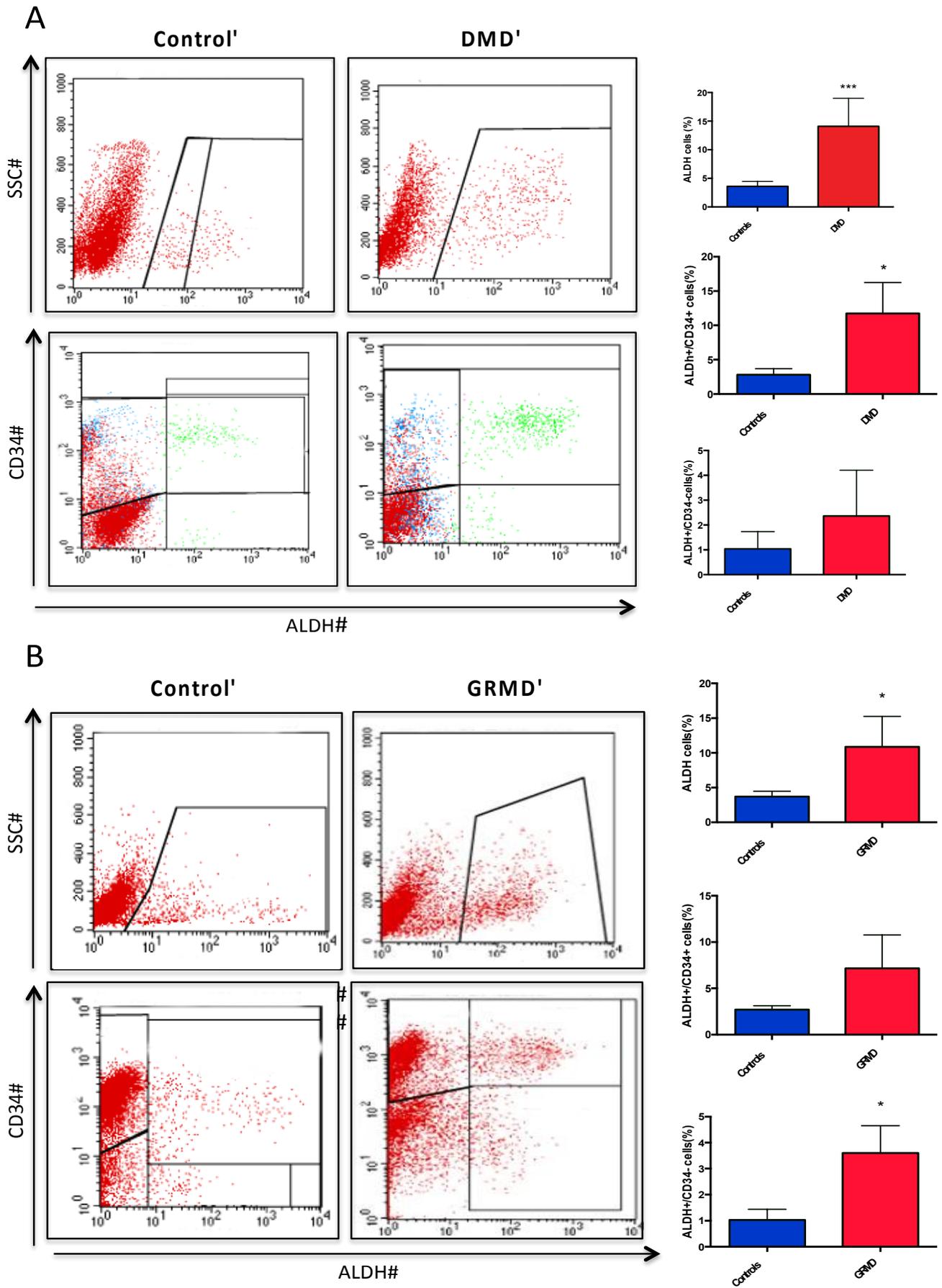


Figure 3 Etienne et al. 2016

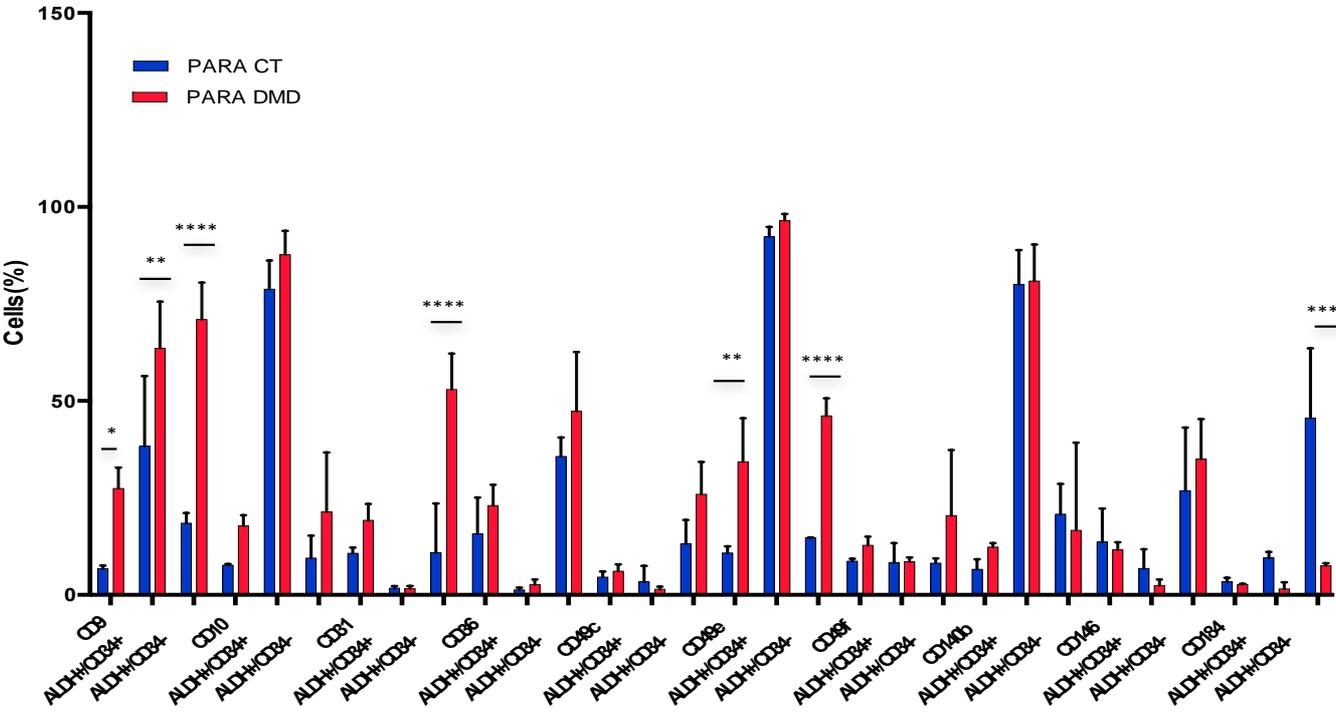
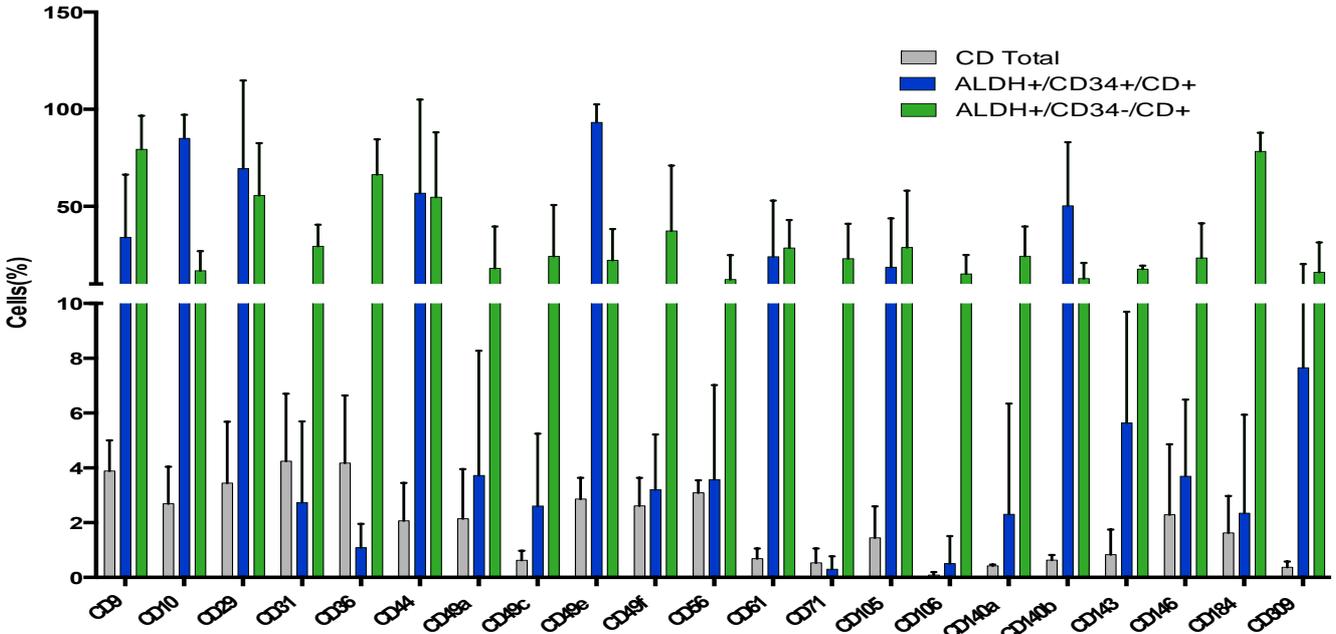
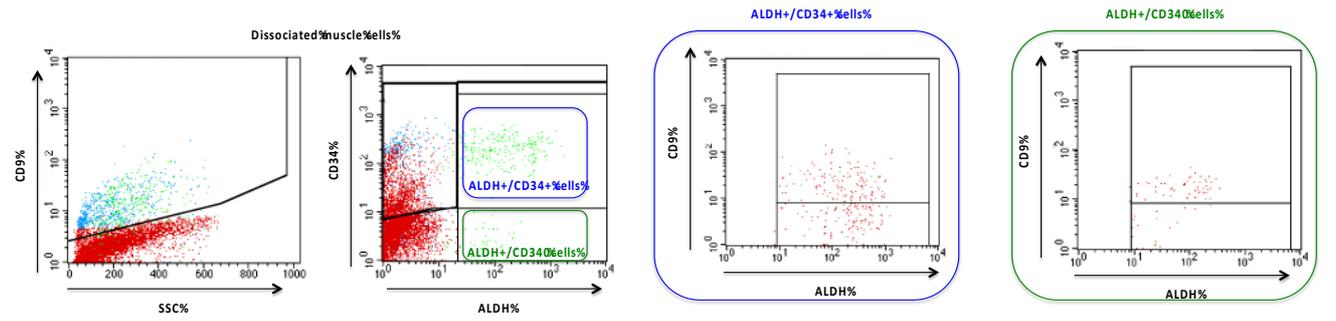


Figure 4 Etienne et al. 2016

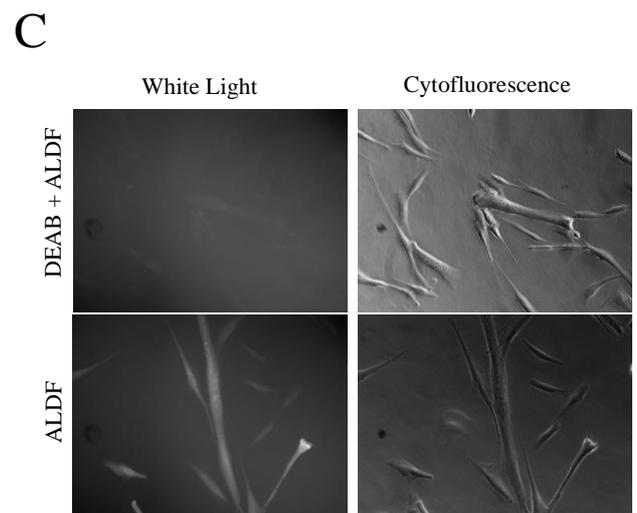
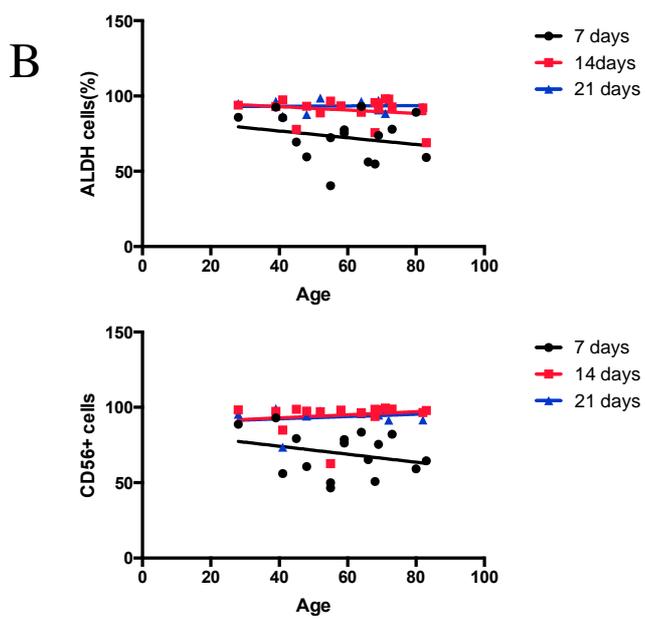
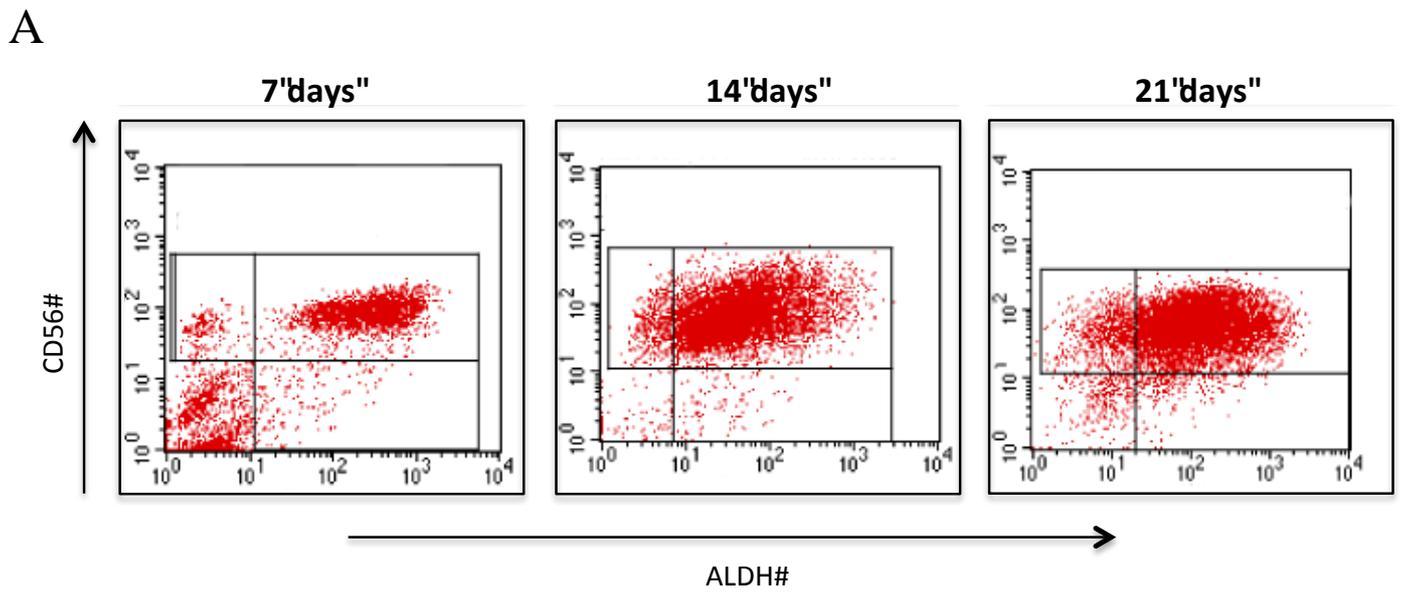


Figure 5 Etienne et al. 2016

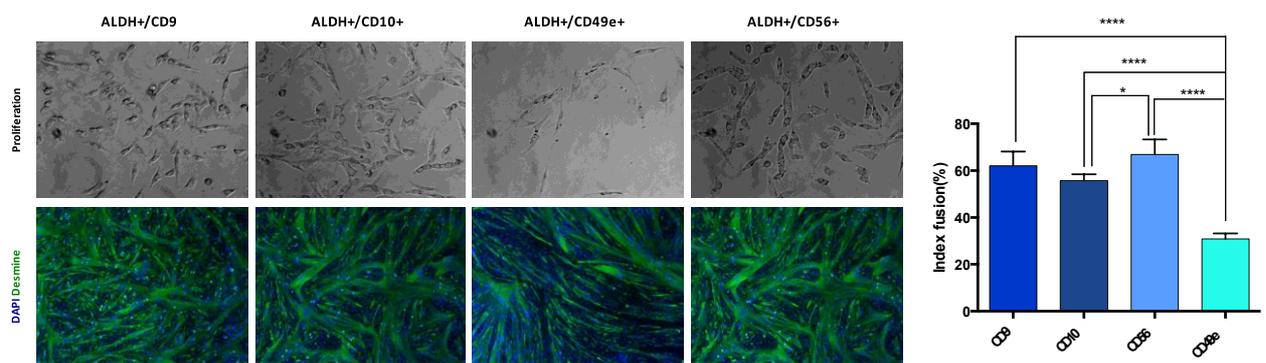


Figure 6 Etienne et al. 2016

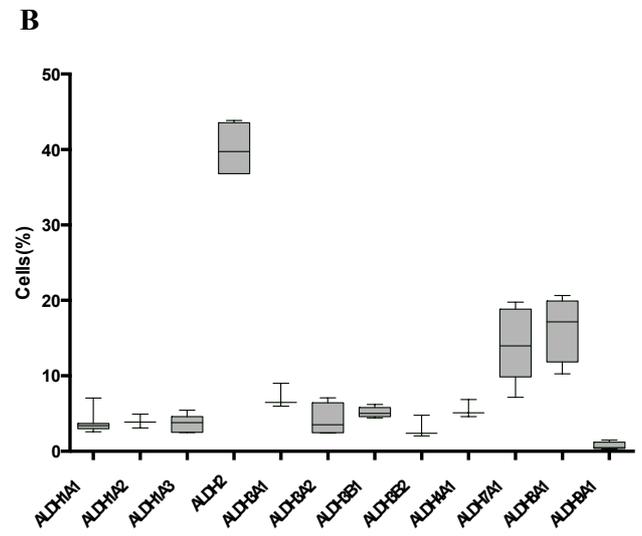
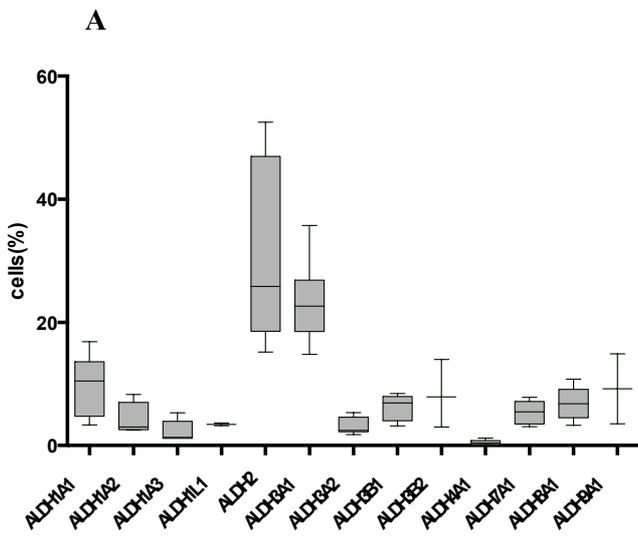


Figure 7 Etienne et al. 2016

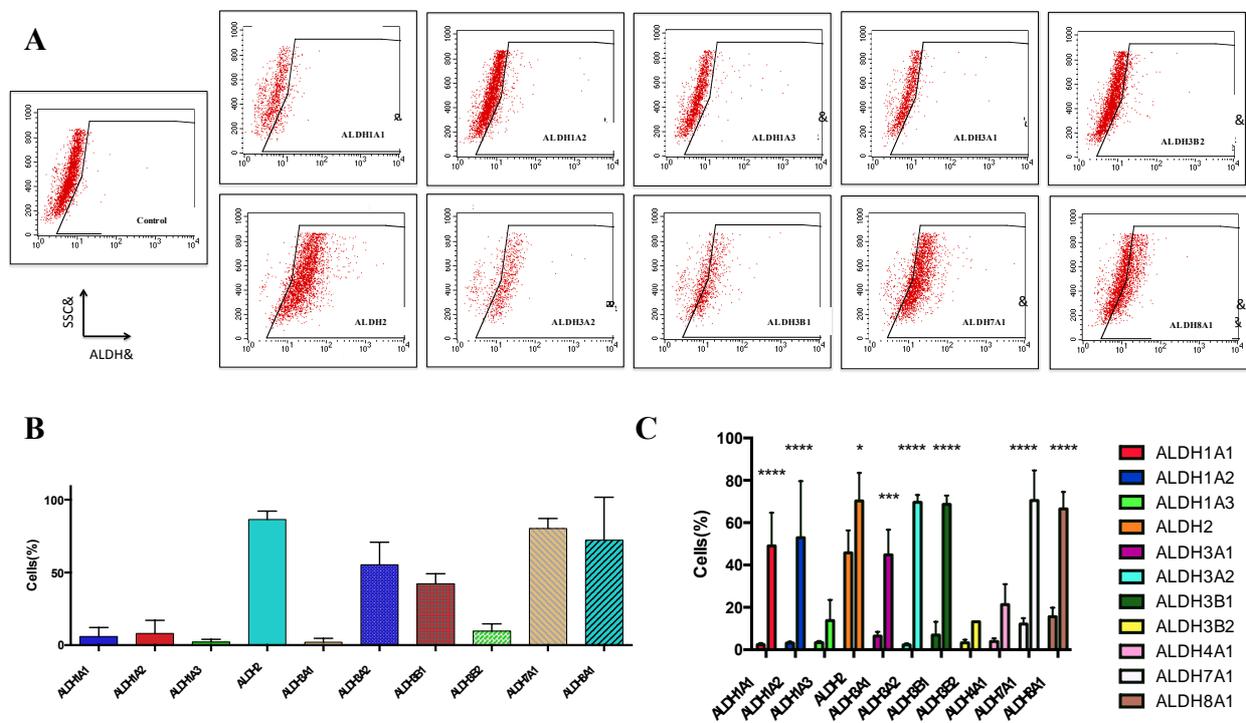


Figure 8 Etienne et al. 2016

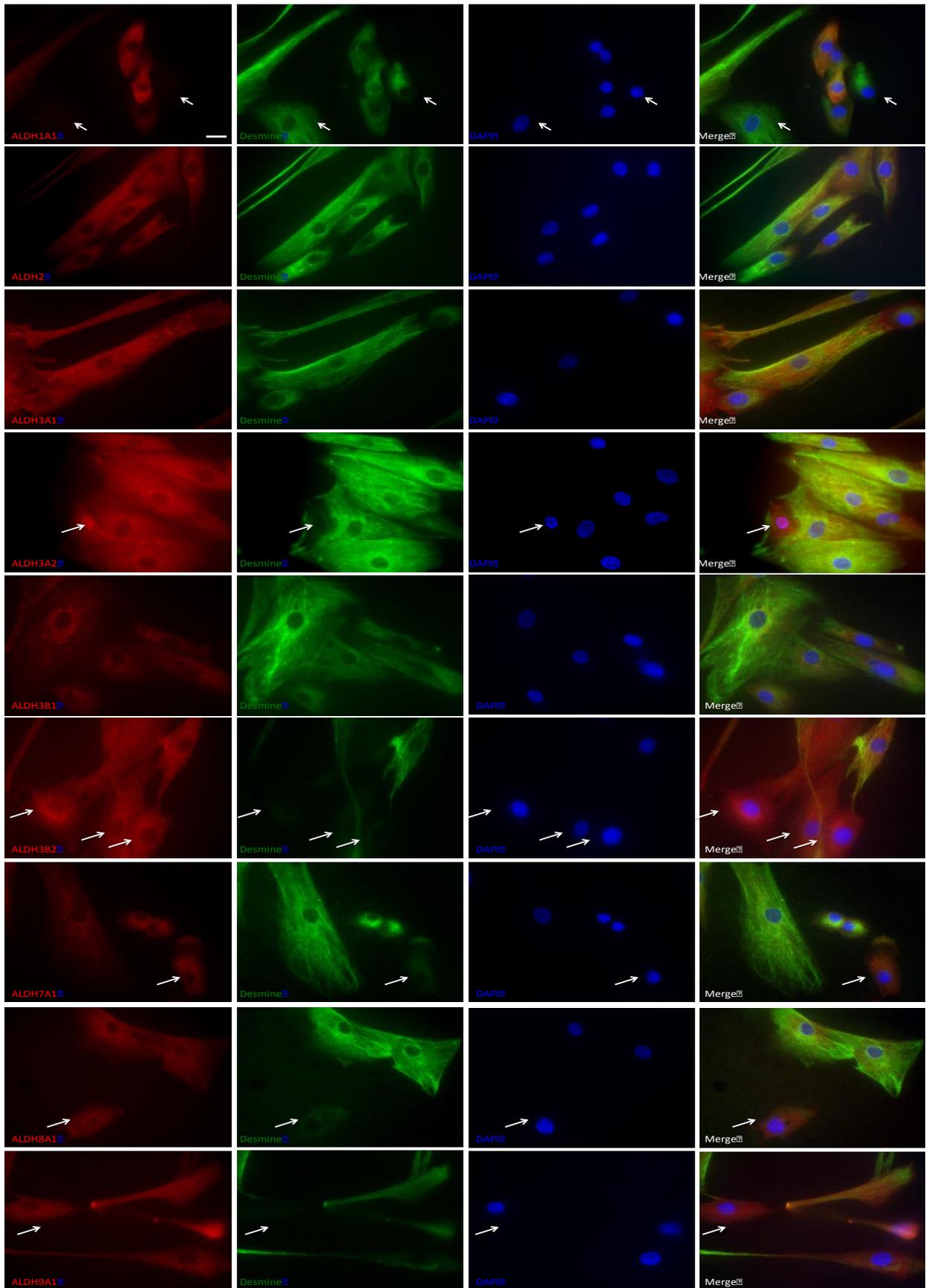


Figure 9 Etienne et al. 2016

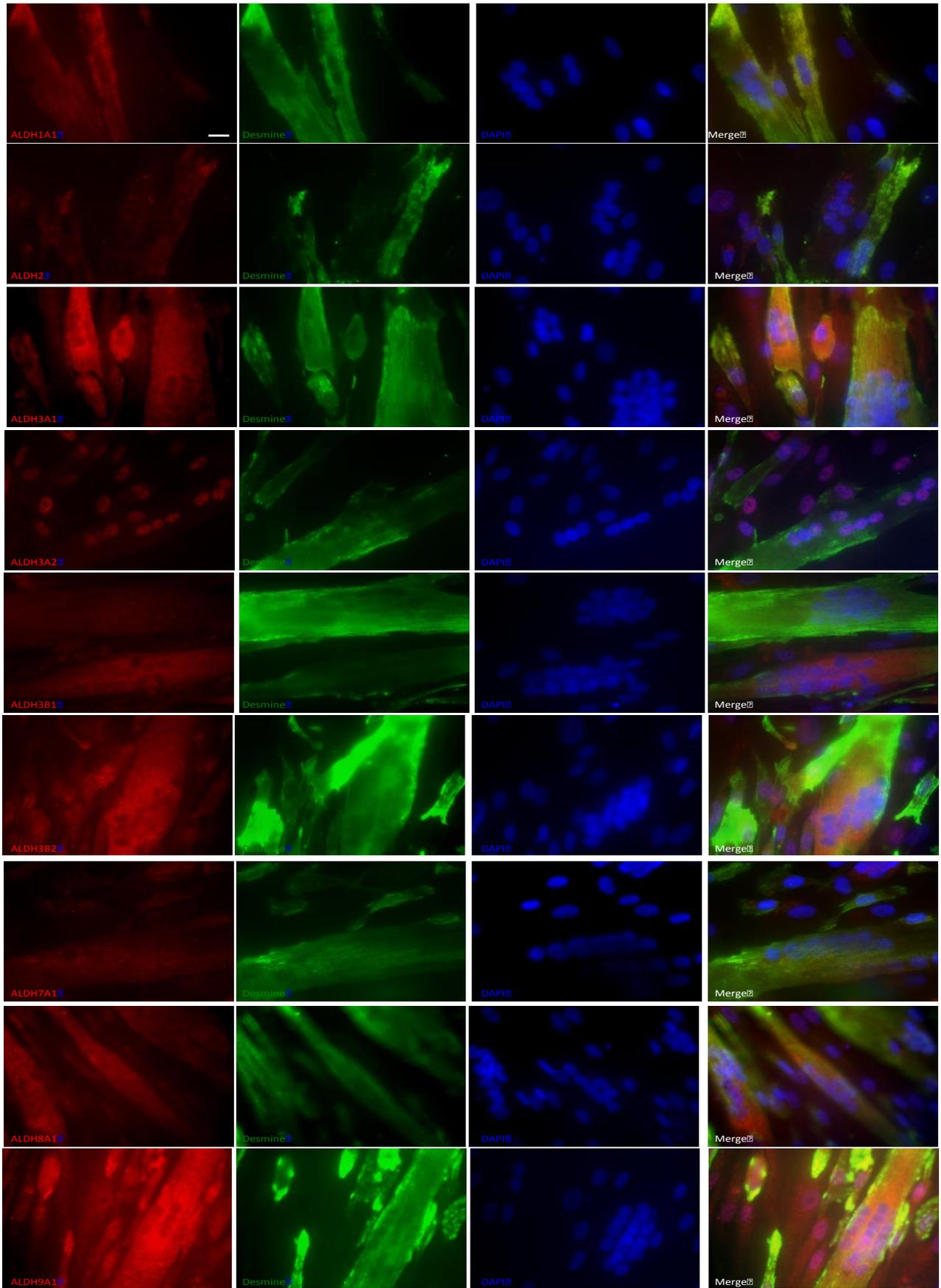


Figure 9 Etienne et al. 2016

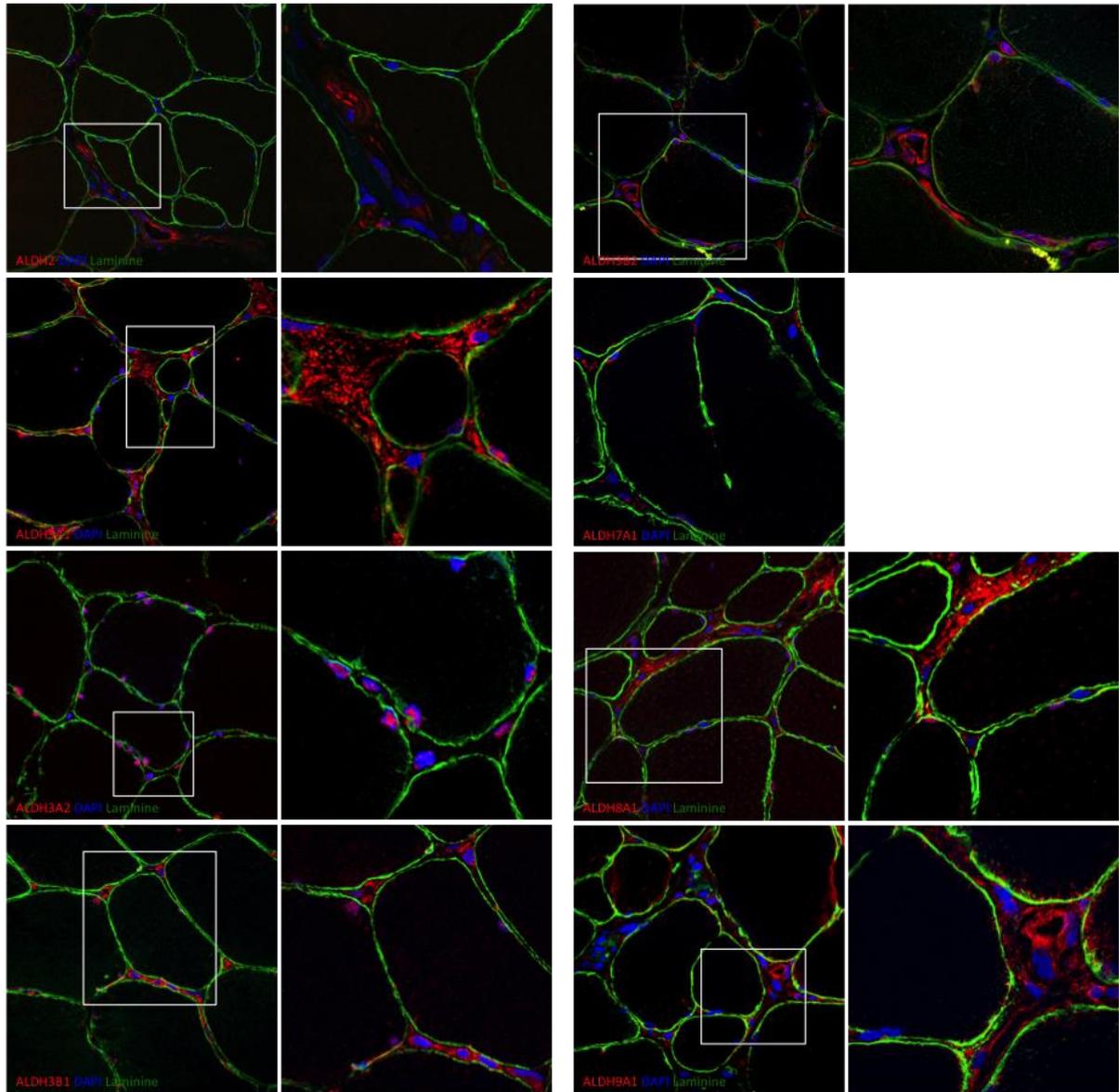


Figure 10 Etienne et al. 2016

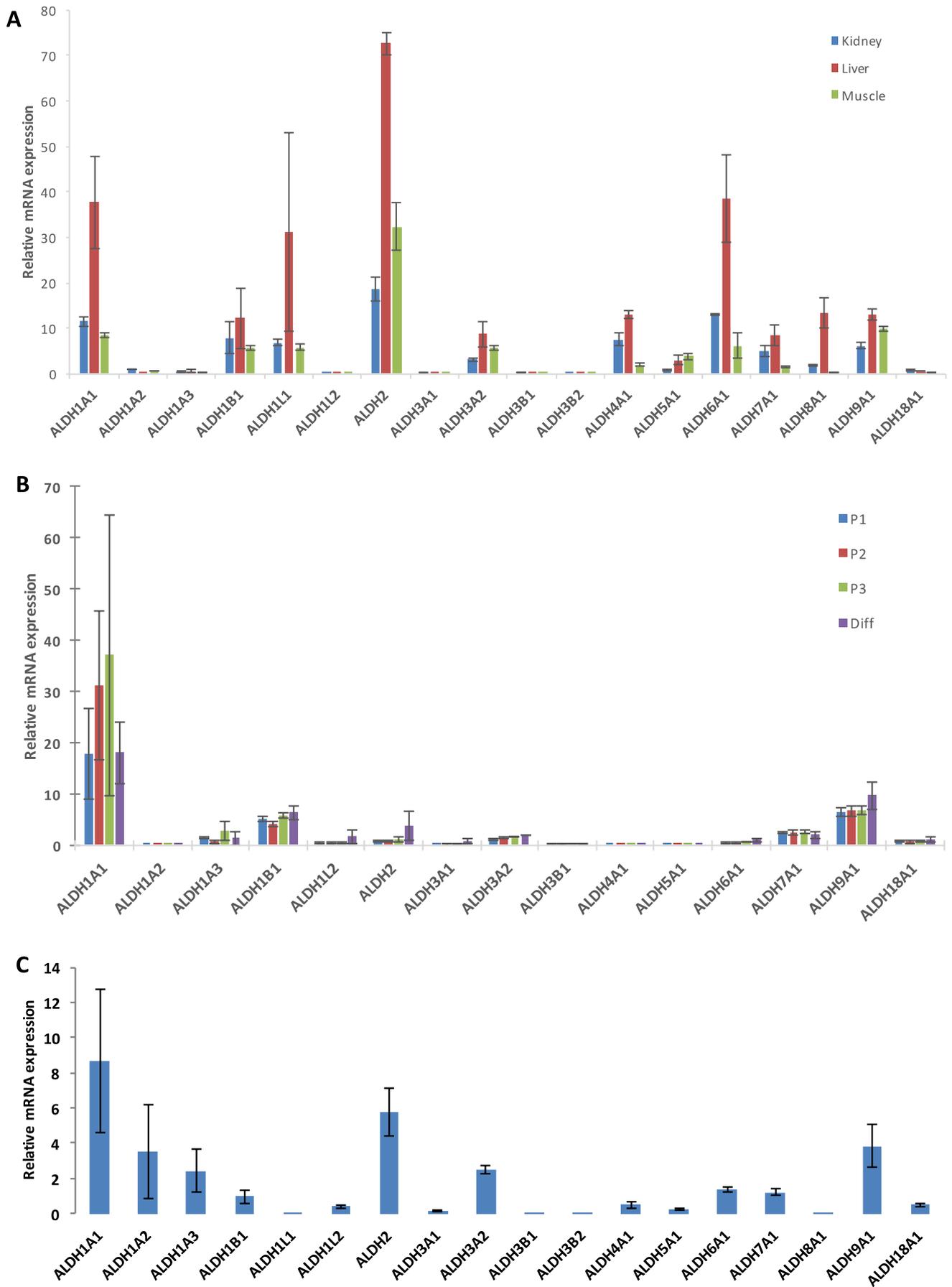


Figure 11 Etienne et al. 2016

Tables

Table 1 Reference of markers used in the study

CD / alternate name(s)/ (function)	Clone #
CD9 / TSPAN29 / (cell adhesion and migration)	M-L13
CD10 / CALLA / (neutral endopeptidase)	HI10a
CD29 / ITGB1 / (cell adhesion)	MAR4
CD31 / PECAM-1 / (component of endothelial cell intercellular junctions)	WM59
CD34 / gp105-120, Sialomucin / (cell-cell adhesion factor)	581
CD36 / FAT / (receptor for selective cholesteryl ester uptake)	CB38
CD44 / HCELL / (cell adhesion and migration)	515
CD45 / LCA / (tyrosine phosphatase)	HI30
CD49a / α 1 integrin / (cell-surface receptor for collagen and laminin)	SR84
CD49c / α 3 integrin	C3 II.1
CD49e / α 5 integrin	C3 II.1
CD49f / α 6 integrin	GoH3
CD56 / NCAM / (cell-cell adhesion)	My31
CD61 / β 3 integrin	VI-PL2
CD71 / Transferrin receptor protein 1	M-A712
CD105 / Endoglin / (part of the TGF beta receptor complex)	166707
CD106 / Vascular cell adhesion protein 1 / (cell adhesion)	51-10C9
CD140a / PDGF Receptor a	α R1
CD140b // PDGF Receptor b	28D4
CD143 / Angiotensin-converting enzyme	BB9
CD146 / MCAM / (marker for endothelial cell lineage)	PIH12
CD184 / CXCR4 / (receptor specific for stromal-derived-factor-1 SDF-1)	12G5
CD309 / Flk-1/ (vascular endothelial growth factor receptor 2)	89106
Mouse IgG ₁ , κ	MOPC-21
Mouse IgG ₁ , κ	MOPC-21
Mouse IgG _{2a}	X39
Mouse IgG _{2b} , κ	27-35
Mouse IgM, κ	G155-228
Desmin	D33
Laminin	???

All antibodies from BD Pharmingen, excepted for CD105 and CD309 from R&D System, and Desmin and Laminin from Dako System.

Table 2 : Antibodies directed against isoenzymes

Isoenzyme	Species	Clone	Reactivity	Provider
ALDH1A1	Rabbit	Ab23375	Hu, Ms, Rat, Dog, Goat, Shp	Abcam
ALDH1A2	Rabbit	sc-367527		Santa Cruz
ALDH1A3	Rabbit	AP7847a	Hu, Ms, Rat	Abgent
ALDH1B1	Goat			
ALDH2	Rabbit	3221-S	Hu, Ms, Rat	Epitomics
ALDH3A1	Rabbit	sc-67309	Ms, Rat	Santa Cruz
ALDH3A2	Rabbit	Ab113111	Hu, Ms, Rat	Abcam
ALDH3B1	Rabbit	AP8706c	Hu	Abgent
ALDH3B2	Rabbit			
ALDH4A1	Rabbit	Ab59011	Hu, Ms, Rat	Abcam
ALDH7A1	Rabbit	2300-1	Hu, Ms, Rat	Epitomics
ALDH8A1	Rabbit	sc-130686	Hu, Ms, Rat	Santa cruz
ALDH9A1	Rabbit	AP7850a	Hu, Ms, Rat	Abgent

Table 3 : Human primers

h/ALDH1A1	F: GGCCCTCAGATTGACAAGGA R: ATGATTTGCTGCACTGGTCC
h/ALDH1A2	F: AAGCTGGGACTGTTTGGATCA R: TACTCCCGCAAGCCAAATTC
h/ALDH1A3	F: ACGGTCTGGATCAACTGCTA R : CCGTCCGATGTTTGAGGAAG
h/ALDH1B1	F : AGACGGTCACCATCAAGGTT R : AGCATTCGTCAAGGTGGTTG
h/ALDH1L1	F : AGACCTTCCGCTACTTTGCT R : ATGATGCCACAAACCCCAAC
h/ALDH1L2	F : GCTTTCCAAAGGGGGTTCATC R :GCTAACAGCACAGCTCTTCAT
h/ALDH2	F : GGGAGAGCCAACAATTCCAC R :CCACTCCCCGACATCTTGTA
h/ALDH3A1	F : ATCGCCTGGGGGAAATTCAT R : AGTCCCGGGATTTCTTAGCA
h/ALDH3A2	F : TTGGTACTTCCCAGGGCTAC R :GGTCAAGTCCTTGAGTCCCA
h/ALDH3B1	F : CTTTTGGAGGAGTGGGTGC R : GCGTTGAGCTTCTCCATCC
h/ALDH3B2	F : CCACTACCCACCCTATAACCG R : GTGAGTTGGGAGCATAAGCC
h/ALDH4A1	F : AGCCTCTGGAACCAATGACA R : CACCTGGACGGACAGACAG
h/ALDH5A1	F : GACGAAGCACCTTCCTTTCC R :ATAGCTTCCCAGTGGCTCAA
h/ALDH6A1	F : TCACCGCTTTTGGTTGATCC R : TGTGGGATAAAAGAGGGGCT
h/ALDH7A1	F : GGTTGCCCTTGGATCTGTTC R : TGA ACTTTGCCAGCTCTCT
h/ALDH8A1	F : GCAGGGAACACTGTGATAGC R :GGTGGAACACCTGCTTTATCC
h/ALDH9A1	F : AGACGACATGACCTGTGTGA R : CCGTTGGATGTCCCTGGTAA
h/ALDH18A1	F : CCTGCAGGGGGTAAATGTTATT R : TCACAGACTGCTGATCTCCG

Expériences complémentaires

Des variations inter-individuelles nombreuses sont apparues au cours de l'**étude I**, aussi bien avec les échantillons humains que de primates non humains (PNH). Etant donné le traitement rapide des biopsies de PNH après prélèvement (dans l'heure qui suivait), il nous apparaissait que l'influence éventuelle de l'état de conservation de l'échantillon sur la présence et les capacités des 2 sous-populations de cellules musculaires ALDH+ était très faible. Les variations observées peuvent donc être intrinsèques aux patients et modèles étudiés et pourraient renseigner sur leur état physiopathologique. Afin de mener des études encore plus standardisées, nous avons donc utilisé des Souris modèles (BL6 et mdx) pour apprécier l'effet du vieillissement et/ou de l'atteinte pathologique représentée par l'évolution de la DMD dans ce modèle animal, sur la présence de cellules ALDH+ dans le muscle cardiaque et squelettique.

Les populations ALDH humaines et de Macaque sont-elles identiques aux populations ALDH murines ?

Le marquage concomitant par l'Aldéfluor® et le marqueur transmembranaire CD34 nous a permis d'identifier au moins deux sous-populations de cellules musculaires en cytométrie de flux : des progéniteurs myogéniques (ALDH+/CD34-) et des progéniteurs non myogéniques (ALDH+/CD34+) que nous avons pu suivre en fonction de l'âge des patients ou de l'atteinte par la DMD. Une différence majeure est apparue d'emblée dans le protocole utilisé chez la Souris par-rapport à celui utilisé chez l'Homme et le Macaque. En effet, le marqueur CD34 est beaucoup plus pléiotrope chez la Souris et identifie aussi bien des cellules hématopoïétiques que musculaires. Il n'est donc malheureusement pas aussi fiable dans ce modèle pour séparer les sous-populations.

Nous avons donc choisi de suivre l'évolution de l'ensemble de la population ALDH musculaire.

Nous avons observé que les muscles quadriceps des souris contrôles ou mdx de 10 semaines ou de 80 semaines contiennent les mêmes pourcentages de cellules ALDH positives (**Figure 28**). Le vieillissement naturel ou pathologique ne semble donc pas affecter la présence des cellules d'intérêt. Néanmoins, ce pourcentage augmente de façon significative au sein des souris mdx dès 10 semaines et se maintient au cours du vieillissement (80 semaines), par comparaison aux contrôles d'âges respectifs.

Nous nous sommes aussi intéressés au muscle diaphragme, l'un des muscles les plus précocément et profondément affectés au sein de ce modèle. Contrairement au muscle quadriceps où nous avons noté une augmentation, ici, nous avons observé une diminution significative du pourcentage de cellules ALDH chez les souris mdx de 10 semaines comparées aux souris contrôles du même âge (**Figure 28**).

Avec la même approche a été conduite dans le muscle cardiaque. Elle nous a permis de mettre en évidence une augmentation significative des cellules ALDH positives uniquement dans les muscles cardiaques des souris mdx âgés, contrairement à l'augmentation observée dès le plus jeune âge dans le muscle des souris mdx (**Figure 29**).

L'ensemble de ces résultats doit cependant être confirmé en augmentant le nombre de souris.

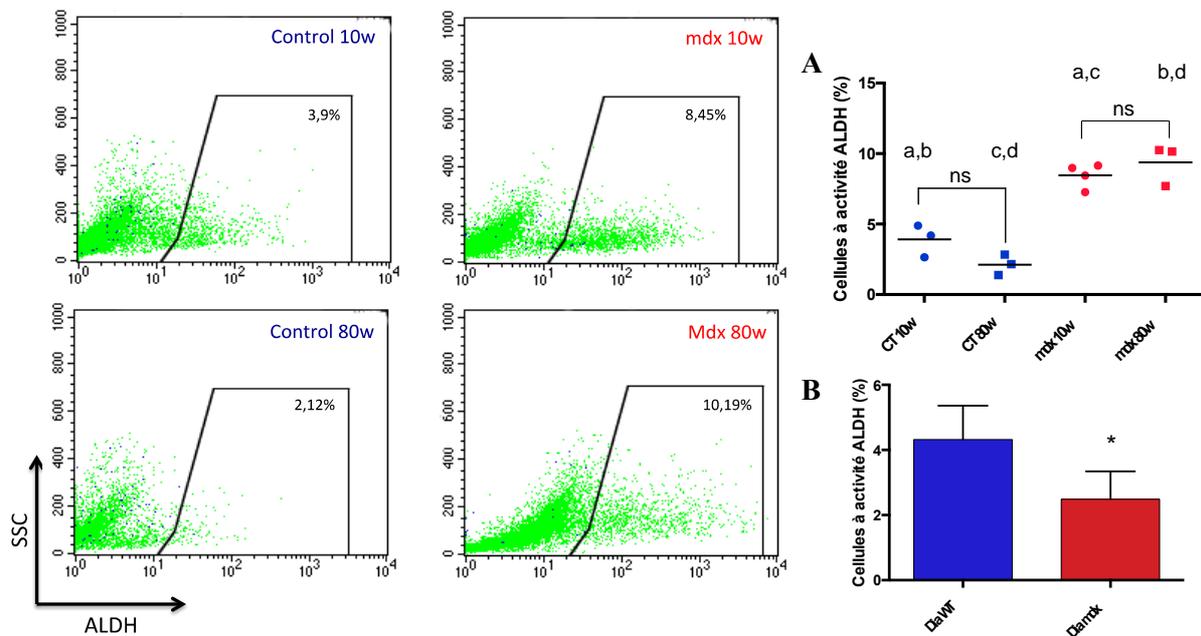


Figure 28 : Caractérisation des cellules ALDH+ dans des muscles de quadriceps et de diaphragme de souris contrôles et mdx. (A) En utilisant la cytométrie de flux et le substrat fluorescent des ALDH, l'Aldéfluor®, le pourcentage de cellules ALDH dans le muscle quadriceps de jeunes souris contrôles (10 semaines, n=3) a été comparé à celui des muscles de souris âgées (80 semaines, n=3). Les différences sont non significatives (NS). Des résultats similaires ont été obtenus avec de jeunes souris mdx (10 semaines, n=3) ou âgées (80 semaines, n=3). Néanmoins, le pourcentage de cellules ALDH est significativement différent entre les jeunes souris contrôles et mdx et cette différence se maintient au cours du vieillissement. a,c p<0,01 ; b,d p<0,001. (B) Contrairement au muscle de quadriceps, où le pourcentage de cellules ALDH positives augmente dans les souris mdx, dans le muscle de diaphragme, ce pourcentage diminue significativement (p<0,05) dans une jeune souris de 10 semaines par-rapport au contrôle de même âge.

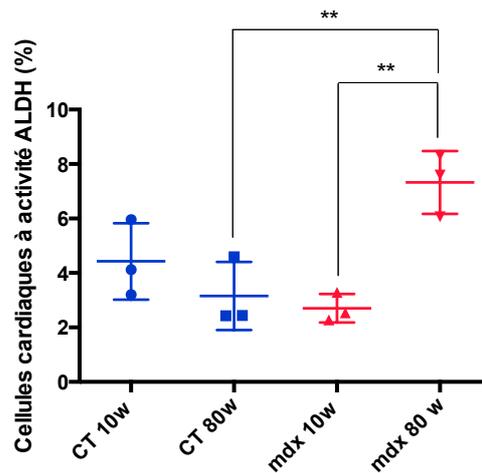


Figure 29 : Caractérisation des cellules ALDH+ dans des muscles cardiaques de souris contrôles et mdx. En utilisant la cytométrie de flux et le substrat fluorescent des ALDH, l'Aldéfluor®, le pourcentage de cellules ALDH dans le muscle cardiaque de jeunes souris contrôles (10 semaines, n=3) a été comparé à celui de muscle cardiaque de souris âgées (80 semaines, n=3). Les différences sont significatives uniquement chez la souris mdx âgée de 80 semaines par rapport au contrôle âgé de 80 semaines ou de la souris jeune de 10 semaines. $p < 0,01$.

Des ALDH sont-elles impliquées dans la régénération musculaire ?

Indépendamment du caractère purement myogène, la régénération musculaire implique, nous l'avons vu, de nombreux acteurs cellulaires, tels que les cellules inflammatoires, les cellules angiogéniques, des cellules mésenchymateuses, des fibroblastes... Cette régénération pourra être étudiée de manière plus globale en utilisant des modèles animaux. Des cycles de dégénérescence peuvent être induits par des agents myonécrosants, forçant à une réparation aigüe. Il existe aussi des modèles où la dégénérescence est chronique, spontanée, et peut être étudiée de manière longitudinale (souris mdx).

Nous avons commencé à rechercher l'implication des cellules ALDH et des isoenzymes d'ALDH dans l'homéostasie musculaire. Pour cela, nous avons utilisé des souris dites « mdx4cv » plus atteintes sur le plan histologique que les souris mdx classiques. Après injection de notexine dans les muscles gastrocnémiens, des prélèvements ont été effectués à 1, 5 et 12 jours, pour collecter un éventail d'information sur le processus de régénération. Un jour après injection de notexine, nous avons mis en évidence une diminution significative du pourcentage de cellules ALDH+ dans les muscles gastrocnémiens, par rapport à une situation d'homéostasie contrôle. Au bout de 5 jours, ce pourcentage revient à la normale puisque nous n'avons pas observé de différence significative sans injection de notexine, 5 ou 12 jours après injection (**Figure 30**). Dans une prochaine expérience, il faudrait sûrement avoir des muscles de souris contrôles (pas de fond mdx) et tester des temps plus rapprochés pour mieux analyser

les variations des populations ALDH tout au long de la régénération musculaires (1 jours, 2 jours, 3 jours après régénération).

Des isoenzymes des ALDH jouent-elles un rôle dans la prolifération et la différenciation des cellules myogéniques ?

En nous basant sur les expériences d'inhibitions permettant de mettre en évidence les spécificités du marquage ALDH, nous pouvons inhiber l'activité des ALDH, bien que nous ne sachions pas encore précisément lesquelles. En effet, le DEAB et le disulfuram sont des molécules pharmacologiques efficaces pour cibler les cellules ALDH⁺ puisque leur addition inhibe le métabolisme de l'Aldéfluor, ainsi qu'attesté par l'absence de déplacement de fluorescence en cytométrie de flux. Malheureusement, la nature de toutes les isoenzymes ciblées par ces molécules n'est pas encore connue. Ainsi nous devons reconnaître en préalable : que la nature des isoenzymes reconnues par l'Aldéfluor n'est pas connue avec précision ; et que la nature des isoenzymes ciblées par les principaux inhibiteurs n'est pas connue de manière exhaustive.

Nous avons cependant commencé à étudier la réponse cellulaire à ces molécules à des doses différentes pour établir une courbe dépendant de la dose (**Figure 32**). Nos résultats, encore très préliminaires, ne nous ont pas encore permis de pointer un rôle des ALDH dans la prolifération des cellules myogéniques alors que d'autres études ont mis en évidence une diminution de la différenciation myogénique par ajout d'AR dans le milieu de culture ou par extinction de l'expression spécifique de l'ALDH1A1 (El Heddad et al. 2012). L'une des différences majeures peut résider dans les milieux de prolifération utilisés dans nos études respectives.

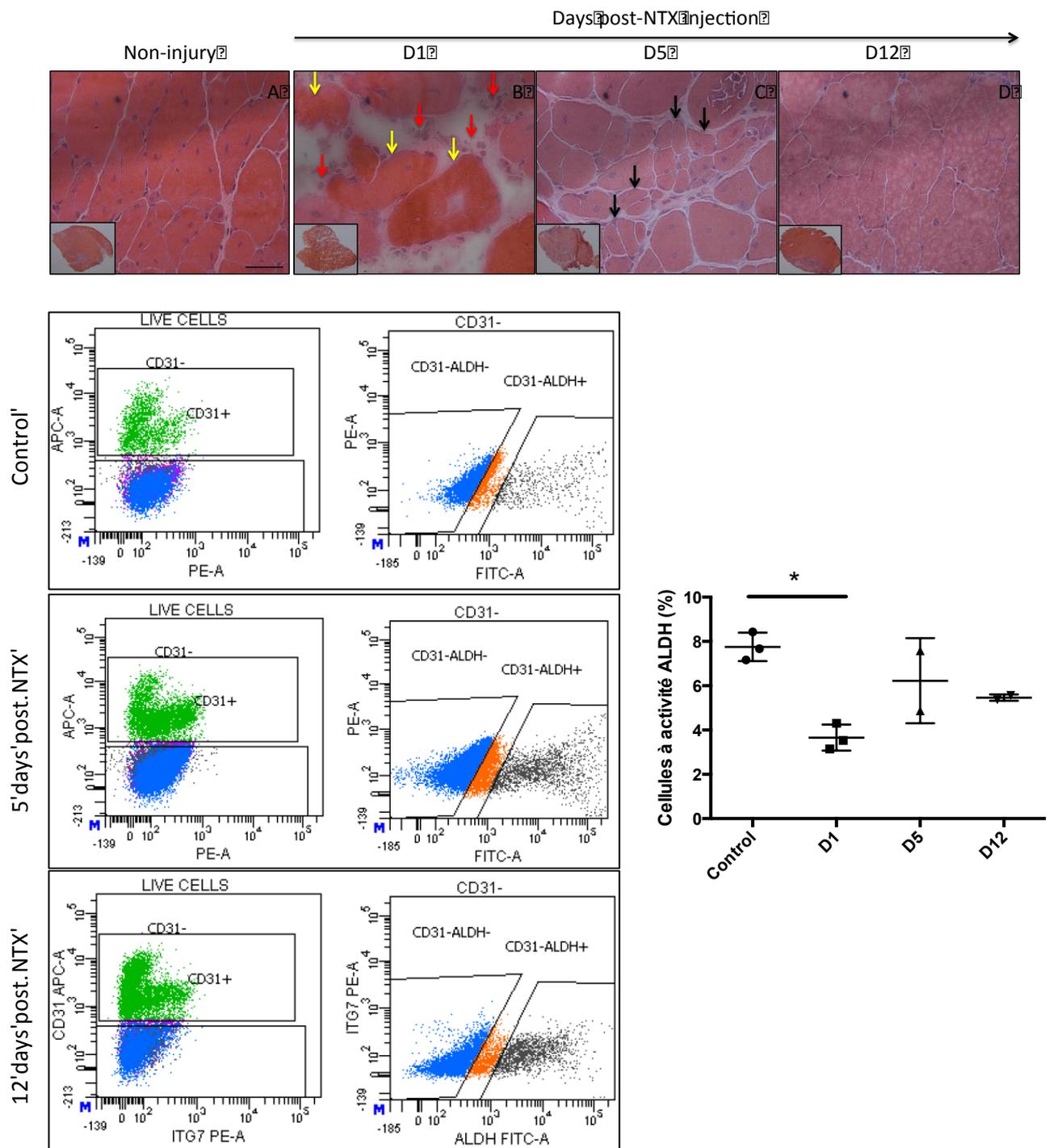


Figure 30 : Evolution des cellules ALDH au cours de la régénération musculaire. Après avoir confirmé par des marquages à l'hématoxyline-héosine, nous avons recherché par cytométrie de flux, la présence de cellules ALDH à différents temps de régénération musculaire (0, 1, 5, 12 jours après injection de notexine). Une diminution significative de cellules ALDH est retrouvée dès le premier jour de ce processus et revient à la normale au bout de 5 jours.

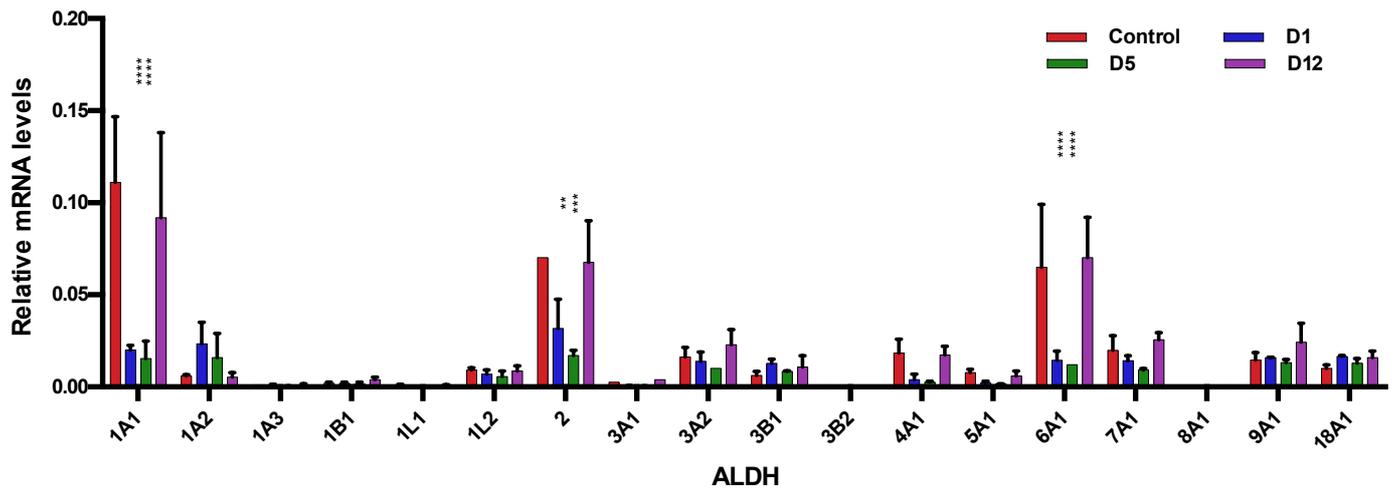


Figure 31 : Evolution des niveaux d'ARNm au cours de la régénération musculaire. Différents temps de la régénération musculaire, après injection de notexine dans le muscle gastrocnémien, ont été investigués un potentiel rôle des ALDH dans ce processus, au sein de souris mdx4cv (n=2). Dans le contrôle (sans injection de notexine) et après 12 jours de régénération, les ARNm d'isoenzymes d'ALDH majoritaires sont les ALDH1A1, ALDH2 et ALDH6A1. Elles semblent donc être impliquées dans l'homéostasie tissulaire. Aucun ARNm d'isoenzymes n'a été observé comme augmenté dans les premiers jours après régénération, comme il a été démontré pour les cellules myogéniques Pax7 positives.

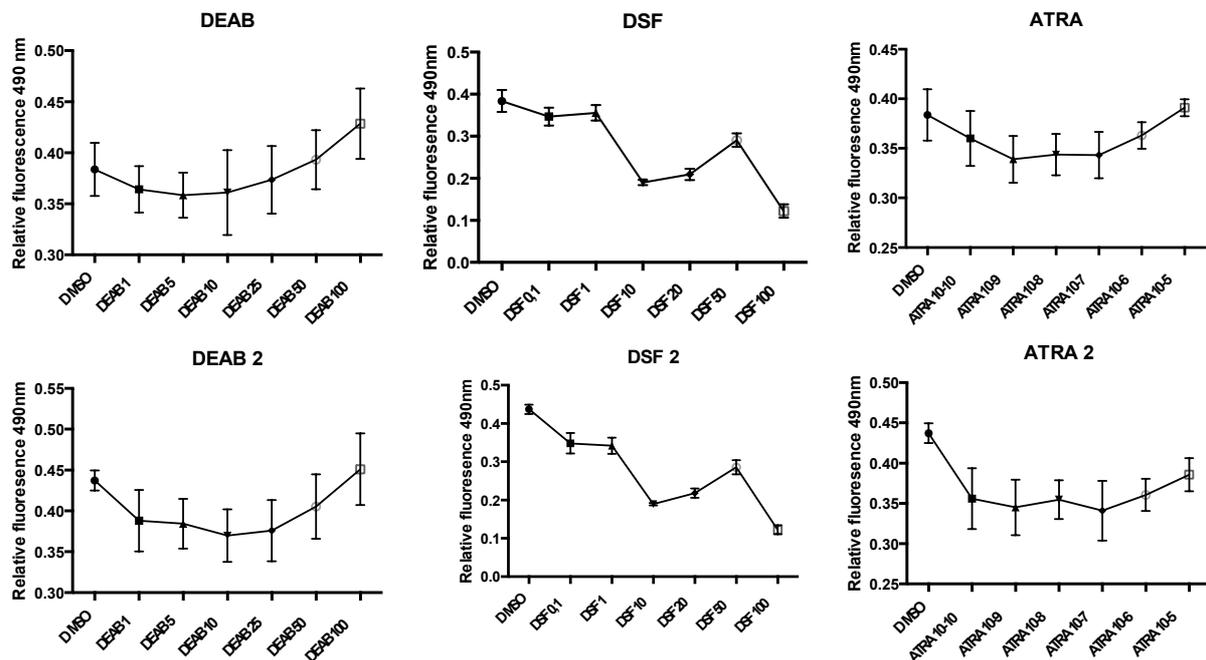


Figure 32 : Effets de molécules pharmacologiques sur la prolifération cellulaire des cellules myogéniques. 48h après ensemencement des cellules dans une plaque de 395 puits (5.103/puits), et 24h de traitements de différentes concentrations en inhibiteur (DEAB, DSF) ou activateur de les ALDH, la fluorescence a été mesurée. Elle est proportionnelle à la quantité de cellules présentes dans le puit, ce qui permet d'évaluer la toxicité et l'effet sur la prolifération des composés pharmacologiques en fonction de la concentration. (n=4 par condition).

Discussion

Les cellules satellites sont considérées comme les principaux progéniteurs myogéniques dans les muscles adultes, mais leur utilisation en thérapie cellulaire se heurte à plusieurs limitations et leur efficacité est limitée à la colonisation de petits territoires. Les péricytes (ou les mésangioblastes) n'ont pas encore fait la preuve de leur efficacité, de leur biodisponibilité et de leur innocuité chez les patients. Ces constats ont amené plusieurs équipes à rechercher de nouveaux candidats cellulaires aptes à la différenciation myogénique *in vitro* et *in vivo*.

Dans le système hématopoïétique, des progéniteurs ont été découverts, sur la base de l'expression d'un marqueur de l'activité ALDH, l'Aldéfluor®, et de l'absence ou de la présence du marqueur CD34. En se basant sur la même technique, le laboratoire d'accueil a découvert des cellules à activité ALDH dans les muscles cardiaques et squelettiques. Deux sous-populations distinctes ont pu être mises en évidence : alors que les cellules ALDH+/CD34- (25% des cellules ALDH) sont des progéniteurs myogéniques capables d'entamer un programme de différenciation *in vitro* et *in vivo*, les cellules ALDH+/CD34+ se différencient en cellules adipogéniques et chondrogéniques mais pas musculaires (Vauchez et al. 2009). Au cours de mon travail de thèse, j'ai donc évalué la présence de ces cellules dans différents contextes physio-pathologiques et établi une carte des marqueurs transmembranaires et des isoenzymes exprimées dans le but de sélectionner la meilleure population myogénique. Ce travail a été réalisé dans une double perspective : (i) définir les contenus, natures et rôles éventuels joués par les ALDHs au sein des muscles squelettiques humains, et (ii) définir des populations cellulaires pouvant ultérieurement présenter un intérêt thérapeutique.

Principales limites de l'étude

Au cours de cette étude, nous nous sommes heurtés à certaines limites, parfois frustrantes, qui pouvaient être d'ordres méthodologiques, techniques et conceptuelles.

Une limite importante a été représentée par la nature biologique du matériel utilisé pour nos recherches, à savoir essentiellement des tissus provenant de Primates humains, de Primates non humains et de Chiens. A la différence des Souris, ces espèces ne sont pas congéniques, leurs fonds génétiques sont variables, d'un individu à l'autre. De plus, chez l'Homme, des pathologies sous-jacentes (diabète, obésité, pathologies cardio-vasculaires) ou

des habitudes de vie (tabagisme) peuvent être sources de variabilités or celles-ci ne nous sont pas connues. Les âges des patients étaient souvent avancés, justifiant les interventions chirurgicales au décours desquelles nous pouvions obtenir des déchets opératoires musculaires. Par nature également, ces biopsies étaient de taille limitée, fournissant donc peu de cellules, parmi lesquelles les cellules progénitrices sont rares, ce qui pouvait rendre certaines expérimentations délicates (cytométrie, tri cellulaire, analyses de différenciation, extraction d'ARNs pour Q-PCR...), et certains résultats difficiles à interpréter. Des limitations ont également été rencontrées dans l'utilisation de certains anticorps, quelques-uns ne permettant pas d'obtenir un marquage probant, ou satisfaisant, parfois en désaccord avec les résultats d'analyses d'expression par Q-PCR. Dans certains cas, des marquages positifs en cytométrie de flux s'avéraient bien plus délicats en immunohistofluorescence, et vice-versa, sans qu'une explication puisse être avancée. Ces anticorps ont été testés dans des conditions classiques de fixation et perméabilisation (PAF, ou PAF-triton, ou méthanol). Certaines de ces limitations ont été exacerbées de manière intrinsèque au projet : les isoenzymes constituant une grande famille, il fallait tester de nombreuses conditions expérimentales, à l'aide de tissus uniques et en petites quantités... ce qui nous a parfois amenés à écarter d'emblée les isoenzymes les moins représentées lors des analyses. Le petit nombre de cellules rendait aussi un peu plus aigu le problème de spécificité, lié aux débris musculaires produits par la dissociation du tissu. En immunohistofluorescence, certains marquages pouvaient présenter un bruit de fond important, et le choix d'espèce productrice des anticorps était restreint.

Les cultures cellulaires n'ont pas représenté une limitation au sens strict, puisque nous disposons de milieux particulièrement efficaces pour la promotion de la myogénèse, et validés antérieurement dans des expériences cliniques. Nos échecs de culture ont été assez peu nombreux, qu'il s'agisse d'étudier la prolifération ou la différenciation. Il faut cependant garder à l'esprit que la culture en elle-même perturbe (ou sélectionne) le comportement cellulaire, en particulier aux niveaux d'oxygène ambiants. Il est nécessaire de recourir à des milieux particuliers permettant l'enrichissement ou un certain degré de sélection, à l'aide de cytokines ou d'hormones, ce qui peut introduire des biais conceptuels dans les stimulations d'expression des isoenzymes ou marqueurs.

Enfin, des limitations conceptuelles sont nécessairement rencontrées : le domaine est encore peu exploré, et les candidats sont nombreux (19 isoenzymes chez l'Homme). Le fort regain d'intérêt pour les cellules exprimant les ALDH aussi bien dans le contexte des recherches sur et contre le cancer que sur les cellules souches, permet de mettre en évidence

progressivement leurs fonctions, mais aussi différents variants possibles, des combinaisons rares de monomères, des compensations entre isoenzymes... qui pourront peut-être remettre un jour en questions certaines des observations de ce travail. Pour tenter de cerner au mieux ces systèmes, nous avons donc associé plusieurs approches, bien conscients qu'aucune n'est parfaite ou complète : (i) recherche de l'activité enzymatique (Aldefluor®), (ii) identification de marqueurs associés et, dans certains cas, (iii) capacités myogéniques *in vitro*, (iv) recherche des isoenzymes exprimées, (v) analyse des expressions des gènes les codant, (vi) localisation des populations *in situ*, (vii) évolutions en culture.

Présence de progéniteurs dans des contextes physiopathologiques particuliers

Nous avons recherché la présence de populations cellulaires exprimant l'ALDH (capables de métaboliser l'Aldefluor®), au sein de biopsies musculaires de patients, et rangés par groupes d'âges croissants. Avec l'avancée en âge, nous observons une légère tendance à la baisse de proportion des cellules ALDH⁺/34⁻ (les plus myogéniques), sans que cela soit significatif. De plus, la variabilité était importante. Globalement, ces populations se maintiennent donc malgré une tendance à la diminution des progéniteurs musculaires et une augmentation des progéniteurs non-musculaires. Ces résultats pourraient rejoindre plusieurs études, parfois controversées ou contradictoires, qui pointent tantôt une persistance des cellules satellites au cours du vieillissement tantôt leur diminution ([Chakkalakal et al. 2012](#) ; [Conboy et al. 2003](#) ; [Shefer et al. 2010](#)). Il est remarquable que, dans certains tissus tels que le cartilage, une baisse des progéniteurs du cartilage à activité ALDH a pu être associée à l'avancée en âge ([Unguryte et al. 2015](#)), alors que ceci n'est pas constaté dans notre étude. Cette différence peut être due aux structures des cohortes, mais elle peut être le reflet de l'inégalité des patients devant la rapidité du développement de la sarcopénie.

Il est généralement rapporté une diminution de la fréquence des progéniteurs circulants avec l'avancée en âge ou le développement de certaines pathologies ([Dimmeler et al. 2008](#)). Cependant, nos résultats se rapprochent davantage de ceux observés concernant les progéniteurs médullaires exprimant les ALDH ([Povsic et al. 2010](#)). Il est tout à fait concevable que les cellules exprimant les ALDH soient intrinsèquement protégées contre différents produits toxiques ou issus du stress oxydatif dont les effets s'accumulent avec l'âge. Cet effet protecteur a été observé dans d'autres modèles non liés au vieillissement ([Bell et al. 2012](#), [Brocker et al. 2011](#), [Dey et al. 2015](#), [Jean et al. 2011](#), [Vasiliou et al. 2013](#), [Zhou et al.](#)

2009). De manière indirecte, la production d'AR par certaines isoenzymes déclenche l'expression de cascades de détoxification (production de glutathion peroxidase, de superoxide dismutase...) (Bell et al. 2012, El Haddad et al. 2012) qui peuvent se mettre en place de manière autocrine ou paracrine. L'expression de ces ALDH par ces populations cellulaires pourraient leur conférer un statut plus privilégié, dont on retrouve une contrepartie morbide mais réelle dans le statut particulier des cellules souches cancéreuses exprimant les ALDH.

Puis, nous avons choisi d'étudier la présence de nos cellules d'intérêt dans les muscles de patients atteints de DMD. Ici, au contraire, une augmentation drastique (3 fois le pourcentage retrouvé en conditions normales) des cellules à activité ALDH est principalement associée à une augmentation des progéniteurs ALDH+/CD34+, dont le caractère non myogénique a été montré précédemment et qui pourraient participer au développement du tissu fibro-adipeux. Récemment en effet, des progéniteurs fibro-adipogéniques ont été identifiés chez l'Homme, sur la base de l'expression de CD34, de CD15, et de CD140a (Arrighi et al. 2015), et présentent la capacité de se différencier en cellules adipogéniques, ou fibrogéniques, particulièrement dans des environnements de régénération musculaire. De manière surprenante, nous avons observé un relatif maintien de la proportion des cellules myogéniques ALDH+/CD34- parmi l'ensemble des cellules extraites de ces biopsies. Néanmoins, des variabilités importantes ont été observées. Elles peuvent être le reflet de l'atteinte musculaire des patients, bien qu'ils aient tous été dans un stade avancé nécessitant le recours à une intervention chirurgicale. Ce résultat est surprenant et les capacités myogéniques de cellules ALDH+/34- devraient être comparées à celles issues de tissus non pathologiques du même âge dans l'avenir. Si l'efficacité de cette population se maintient, elle pourrait devenir un atout ou un candidat intéressant pour des stratégies de thérapie cellulaire, les cellules satellites étant généralement considérées comme sénescents dans ces environnements de régénérations répétées. Des résultats similaires ont été retrouvés dans les deux animaux modèles de la DMD les plus utilisés, la souris mdx et le chien GRMD. Chez le Chien, la proportion de cellules ALDH+/34- est augmentée, par rapport à des animaux contrôles (la variabilité reste importante), peut-être parce que ces animaux, au moment du prélèvement, sont encore très jeunes, comparativement à des patients atteints de DMD et parce que leurs tissus musculaires sont encore en pleine phase de régénération et remodelage. Cependant, on note également une importante augmentation de la population ALDH+/34+.

Localisation dans différents groupes musculaires chez le Singe.

Nous avons recherché la présence de cellules à activité ALDH dans des biopsies de muscles issus de primates non-humains (*Macaca Fascicularis*) majoritairement impliqués dans la locomotion ou le maintien de la posture (biceps, gastrocnémien, paravertébral, quadriceps, tibial antérieur) mais aussi dans la mastication et la déglutition (masséter, pharyngé), ou la respiration (diaphragme). Malgré une tendance pointant un enrichissement différent, tous les groupes de muscles semblent contenir un pourcentage de cellules à activité ALDH équivalent. Ainsi, tous les muscles pourraient constituer des sources équivalentes de cellules dans le cadre d'approches de thérapie cellulaire. Ce résultat semble en accord avec une étude (Xu et al. 2015) qui a mis en évidence des proportions de cellules exprimant Pax7 à peu près équivalentes dans les différents territoires explorés chez l'Homme. Les résultats concernant les cellules satellites sont un peu plus controversés dans la littérature, la richesse étant peut-être liée à la nature des fibres musculaires en jeu. Il serait donc intéressant de comparer à présent les potentiels d'auto-renouvellement, de prolifération et de différenciation des cellules myogéniques ALDH issues de ces différents territoires.

Augmentations des activités ALDH en culture primaire.

Il est à noter qu'en culture primaire myogénique, une forte augmentation de la proportion de cellules métabolisant l'Aldéfluor® est observée rapidement. Cette augmentation sera aussi observée concernant différentes isoenzymes, au niveau protéique et génique. Ceci suggère une implication, une régulation de l'expression des ALDH en culture de cellules musculaires, que ces isoenzymes soient impliquées dans la différenciation par la voie de l'AR, ou dans la survie par leurs actions détoxifiantes. Des observations similaires ont été réalisées dans d'autres tissus (cellules pancréatiques, cardiaques, hématopoïétiques) (Gentry et al. 2007 ; Ioannou et al. 2013 ; Roehrich et al. 2013) mais pas toutes (cartilage) (Unguryte et al. 2015). L'expression de ALDH1A1 a déjà été décrite par d'autres en culture cellulaire et nos données la confirment (Jean et al. 2011 ; Vella et al. 2011 ; Gonnet et al. 2008 ; Sterrenburg et al. 2004). Nous avons aussi observé une forte augmentation de ALDH1B1 et une augmentation modérée de ALDH7A1 et ALDH9A1, ce qui suggère une implication de ces isoenzymes dans la myogénèse. Par contraste, ALDH2 et ALDH1A2 sont diminuées ou abolies. Leur implication dans l'homéostasie globale du muscle pourrait donc s'expliquer par leur expression par des types cellulaires distincts des cellules myogéniques (cellules endothéliales, péricytes). Peu de choses sont connues concernant l'éventuelle implication des ALDH dans la

myogénèse. L'AR est impliqué (Duester et al. 2003 ; Duester et al. 2008 ; Froeschlé et al. 1998 ; Keegan et al. 2005 ; Hamade et al. 2006, Mic et al. 2004 ; Ryan et al. 2012 ; Zhao et al. 2009), mais plusieurs isoenzymes participent à sa formation et à sa régulation (ALDH1A1, ALDH1A3, ALH1B1, ALDH8A1), et pourraient se compenser ou se compléter, comme cela a été montré dans des modèles animaux (Fan et al. 2003, Kumar et al. 2012 ; Niederreither et al. 2002).

Dans ces cultures extrêmement myogéniques, certaines cellules, cependant, peuvent exprimer CD56 sans métaboliser l'Aldéfluor®. Ceci souligne une première limitation de ce réactif, l'Aldéfluor, dont on ne connaît pas exactement toutes les cibles.

Recherche et comparaison de marqueurs associés.

La recherche de ces marqueurs avait deux objectifs principaux. Le premier, est de participer à la caractérisation des cellules, d'établir, si possible, une carte d'identité de populations, ainsi qu'il est réalisé pour d'autres types cellulaires tels que les cellules souches mésenchymateuses par exemple. Le second est de faciliter, ultérieurement, les approches de sélections des populations. La combinaison de marqueurs permet une plus grande spécificité des sélections. Jusqu'à présent, la population la plus myogénique se définissait par un critère négatif, à savoir l'absence de marqueur CD34 (ALDH+/CD34-) ; il est préférable de caractériser des cellules par la présence d'un antigène plutôt que par son absence. Enfin, la présence d'un marqueur extracellulaire permet de mettre en oeuvre des tris à l'aide de billes magnétiques couplées à des anticorps, ce qui est moins dommageable pour les cellules que le tri par cytométrie de flux, dans une veine liquide sous pression.

Les principaux marqueurs associés aux cellules ALDH+/CD34+ étaient CD10, CD49e, CD140b. Un nombre plus important est associé aux cellules ALDH+/34- : CD9, CD31, CD36, CD49a, CD49c, CD49f, CD71, CD106, CD140a, CD146, CD184. Il faut noter en particulier que CD9, CD49c, CD49f, CD106, CD146, et CD184 ont été associés précédemment à des capacités myogéniques (Boldrin et al. 2010 ; Brzóška et al. 2006 ; Cerletti et al. 2006, Cerletti et al. 2008, Dellavalle et al. 2007, Przewozniak et al. 2013, Sherwood et al. 2004, Tachibana et Hemler 1999, Wilschut et al. 2011).

Nous avons comparé les capacités myogéniques *in vitro* de cellules exprimant CD9, CD10, CD34, CD49e, CD56, triées par cytométrie de flux, comme preuve de concept de cette possibilité d'améliorer tris et identifications. Les capacités myogéniques (indice de fusion) se sont établies dans cet ordre: CD9+>CD34->CD56+>CD49e+>CD10+>CD34+. Dans l'avenir, il sera intéressant de tester également les capacités myogéniques des autres candidats,

particulièrement ceux exprimant CD36, CD49f, CD106, CD146, CD184 (les autres marqueurs étant habituellement liés à des caractéristiques endothéliales ou mésenchymateuses).

Comparaison avec les cellules progéniteurs « classiques ».

Nous avons tenté également de comparer la présence de nos cellules myogéniques ALDH avec les cellules satellites, qui expriment habituellement CD56. Néanmoins, les anticorps testés présentaient des marquages non spécifiques très importants en cytométrie de flux, vraisemblablement non représentatifs. De manière irrégulière, variable, une petite population de cellules ALDH+/CD56+ a été retrouvée au sein des cellules musculaires humaines, et plus fréquemment au sein des cellules dissociées de Primate non humain. Ces résultats contredisent en partie nos observations initiales (Vauchez et al. 2009), qui considéraient que les cellules ALDH+/CD34- n'exprimaient pas le CD56. Dans notre présente étude, un protocole de dissociation enzymatique plus doux que précédemment a été utilisé, évitant l'action prolongée de la trypsine et protégeant mieux les marqueurs transmembranaires, ce qui pourrait expliquer ce marquage d'une partie des cellules. Néanmoins, toutes les cellules myogéniques ALDH+/CD34- ne sont pas CD56+ ce qui peut laisser présumer qu'une sous-population de cellules CD56 seulement métabolise l'Aldéfluor. Les cellules satellites, nous l'avons vu, sont très hétérogènes en terme des marqueurs de surface et de capacités de différenciation. Nous pourrions dans l'avenir tenter de comparer ces populations ou utiliser de nouveaux outils et modèles pour relier l'expression d'un phénotype myogénique et l'expression de certaines isoenzymes.

Caractérisation des isoenzymes exprimées par les populations.

L'utilisation de l'Aldéfluor®, nous l'avons vu, est commode, rapide, et relativement efficace ; cependant, la nature des isoenzymes réactives n'est pas réellement connue, et sujette à controverse, et probablement dépendante du type cellulaire étudié (Balber 2011 ; Jean et al. 2011 ; Levi et al. 2009 ; Mercato, Moreb et al. 2012 ; Unguryte et al. 2015). Nous avons donc abordé la caractérisation directe des isoenzymes, en utilisant des anticorps, et l'analyse de l'expression génique. Quelques discordances ont été relevées entre les résultats de ces études, qui peuvent être dues aux réactifs (anticorps), aux sensibilités des méthodes, à la différence de nature des informations (les anticorps reconnaissant les protéines, la Q-PCR analysant l'expression des gènes), ou à la localisation des informations (certaines isoenzymes,

ALDH1B1, ALDH1L2, ALDH2, ALDH4A1, ALDH5A1, ALDH6A1, ALDH18A1, ALDH7A1, sont concentrées dans les mitochondries et de ce fait sont plus difficiles à visualiser qualitativement et quantitativement) (Pors 2014). Mais ces résultats nous permettent de dresser une première « carte d'identité » des tissus et cellules musculaires, à l'état natif, à l'état dissocié, et en culture.

L'étude histologique suggère que les isoenzymes sont exprimées dans des cellules faisant partie de différentes structures. Certaines cellules sont dans l'endomysium (ALDH1A1, ALDH2, ALDH3B1, ALDH7A1), ou proches des fibres musculaires et ressemblant à des capillaires (ALDH2, ALDH3B2, ALDH9A1), ou associées à de petites veinules ou artérioles (ALDH2, ALDH3B2, ALDH8A1). L'association au noyau est fréquente (ALDH3A1, ALDH3A2, ALDH3B1, ALDH9A1). La localisation nucléaire des ALDH (ALDH3A1, ALDH7A1) participerait directement à la régulation du cycle cellulaire, à la résistance aux endommagements de l'ADN, à la réduction de l'apoptose (Marchitti et al. 2008), et plaiderait en faveur d'un rôle important joué dans la physiologie cellulaire.

Ces résultats suggèrent donc que, en plus de l'ALDH1A1 déjà décrite précédemment, plusieurs isoenzymes prennent part à l'homéostasie musculaire, en étant exprimées dans des cellules myogéniques et non myogéniques. Au minimum, les isoenzymes ALDH1A1, ALDH1A3, ALDH1B1, ALDH2, ALDH3A2, ALDH7A1, ALDH8A1 and ALDH9A1 mériteront des études plus détaillées, compte-tenu de leur haut niveau d'expression et de leur association à des structures musculaires *ex vivo* et *in vitro*. Elles pourraient aussi exercer des fonctions complémentaires.

Perspectives

Les études présentées ici ouvrent des perspectives, dans différentes directions, que l'on s'intéresse à la biologie fondamentale du muscle, à sa réparation, aux approches de thérapie cellulaire, ou à différents aspects des ALDHs. A l'issue de ce travail, certaines peuvent même paraître un peu frustrantes... et pourront être développées par des successeurs au laboratoire.

Quelles pourraient être les capacités fonctionnelles des populations d'ALDH extraites dans différents contextes physiopathologiques ?

Notre étude a démontré la présence, voire la persistance, de populations de cellules exprimant les ALDHs, aussi bien dans différents territoires musculaires chez le Primate non humain, que chez les sujets humains jeunes et âgés, et même atteints de DMD. Les marqueurs associés ne sont pas altérés. Cependant, les capacités fonctionnelles de ces cellules peuvent avoir changé subtilement au cours du vieillissement, ou lors de l'évolution de la maladie, comme il semble que ce soit le cas pour les cellules satellites. Les cultures cellulaires réalisées à partir de ces biopsies ne dévient pas dramatiquement en fonction de l'âge, mais ces biopsies ont des contenus hétérogènes. Il serait par conséquent tout à fait intéressant de trier les populations de cellules ALDH+, afin de comparer en culture leurs paramètres de croissance et de différenciation. Compte-tenu de la faible taille des biopsies récoltées, et du petit nombre de cellules contenues, cela nécessiterait de miniaturiser les outils expérimentaux (rendant difficile la mise en œuvre de la cytométrie et de la Q-PCR), cependant ces données seraient très instructives concernant la disponibilité de progéniteurs myogéniques efficaces au sein de tissus de patients DMD, ou de patients âgés, dans des perspectives de thérapie cellulaire autologue ou après correction génique *in vitro*.

Pourrait-on comparer les populations exprimant des ALDH avec d'autres catégories de progéniteurs myogéniques ?

Les cellules ALDH sont des progéniteurs myogéniques à fort potentiel *in vitro* et *in vivo*. Il semblerait pertinent de les comparer aux progéniteurs connus. Cependant des données sont contradictoires, concernant l'expression par ces cellules de marqueurs réputés myogéniques, tels que CD56, Pax7, CD49g. Il semble qu'une petite sous-population de cellules ALDH+ exprime le CD56, mais cela ne semble pas constant d'une biopsie à l'autre, et surtout cela ne semble pas avoir la même importance d'une espèce à l'autre (cette population étant surtout

présente chez le Macaque). Les résultats ont été inconstants en utilisant CD49g. Le marquage de Pax7 requiert la fixation et la perméabilisation des cellules ce qui n'est pas compatible avec l'utilisation de l'Aldéfluor. Certains marqueurs peuvent aussi apparaître au cours de la différenciation, ou disparaître, en particulier chez le Chien, où des isoformes différentes de CD56 semblaient exprimées entre un statut de cellule quiescente et un statut de cellule en prolifération. Enfin, cela semble dépendre des anticorps utilisés. Nous avons tenté cette comparaison au cours de notre étude, mais sans succès probant. L'analyse de cytofluorescence après cytopspin, la miniaturisation des analyses par Q-PCR pourraient être des pistes techniques à explorer. Dans des cas très particuliers, tels que l'expression de Pax7, on pourrait tirer partie de l'apparition de nouveaux outils et modèles. En effet, il existe des modèles de souris exprimant un marqueur fluorescent vert GFP sous contrôle du promoteur de Pax7. Et récemment, un réactif de type Aldéfluor a été mis au point émettant dans le spectre rouge (non disponible commercialement). Il devrait être possible d'analyser ainsi conjointement ces différents marqueurs et de trier des sous-populations dans l'avenir.

Les populations identifiées pourraient-elles avoir un intérêt thérapeutique ?

Comment se comportent-elles *in vivo* ?

Les capacités de distribution et migration des cellules vont limiter ou promouvoir leur utilisation thérapeutique potentielle. Les myoblastes migrent peu, et ne sont pas capables de franchir les barrières vasculaires, ce qui limite leur emploi à des indications localisées. Par contre, les mésoangioblastes (péricytes) sont réputés migrer au travers des vaisseaux, au moins dans certains modèles animaux ; toutefois, employés chez l'Homme, ils ont entraîné des résultats plutôt mitigés. Il sera important, chaque fois qu'un nouveau type de progéniteur sera mis en évidence, que des tests soient réalisés concernant leurs aptitudes à la migration, au franchissement endothélial, à la colonisation du tissu musculaire. Ce principe vaut pour les populations cellulaires exprimant les ALDH, arborant des marqueurs spécifiques (par exemple, CD9, CD10, CD184...). Plusieurs voies peuvent être testées et comparées (intramusculaire, intraveineuse, intra-artérielle). Le territoire musculaire peut être intact, ou en phase de régénération induite (par l'injection d'un agent myonécrosant), ou spontanée (utilisation d'un modèle animal de myopathie dégénérative). Les cellules pourront être suivies par l'utilisation d'un anticorps caractéristique d'espèce (dans le contexte de la greffe xénogénique) ou après incorporation d'un marqueur ou d'un radio-traceur.

Les ALDHs participent-elles à la myogénèse *in vivo*, lors du développement, de la croissance et de la régénération ?

Certaines ALDH sont impliquées dans le développement (stades embryonnaires et fœtaux, et probablement également post-nataux) par leur rôle dans le métabolisme de l'acide rétinoïque. Certaines isoenzymes dans certains modèles sont déjà réputées associées à des voies ou facteurs (ALDH1A2 dans le cœur et le muscle squelettique, ALDH2 dans le cœur, ALDH7A1 dans la myogénèse chez le Poisson) mais ce domaine est encore peu exploré. Les outils dont nous disposons pourraient nous permettre d'explorer l'implication de certaines isoenzymes dans le développement musculaire squelettique. L'implication peut être étudiée *in situ* sur coupes de tissus humains ou animaux à différents stades, à l'aide d'anticorps. La co-expression au niveau cellulaire pourrait être étudiée en cytométrie, après perméabilisation, la Q-PCR étant une méthode plus globale. L'avenir de ces marquages pourrait résider dans les nouvelles méthodologies de CyTOF (un appareillage est en cours de développement sur le site hospitalier). Il existe également quelques modèles animaux mutés dans lesquels des isoenzymes ont été inactivées. Dans ces modèles, certains tissus ont été analysés (principalement le cœur) mais pas nécessairement les muscles squelettiques. L'implication des isoenzymes peut être aussi étudiée dans des modèles de régénération musculaire, induite par un agent myonécrosant, ou spontanée du fait d'une maladie. Un inhibiteur des ALDH disponible en clinique, le Disulfiram, pourrait être utilisé afin d'antagoniser la régénération, le cas échéant. Enfin, nous pourrions étudier l'évolution des populations et isoenzymes en fonction de la croissance, dans des modèles animaux (souris, de la naissance à l'âge adulte).

Ces caractérisations pourraient-elles s'étendre à d'autres tissus ?

Les ALDH ont été décrites dans un nombre important de tissus, mais pas toujours de manière très précise, en particulier en ce qui concerne la nature des isoenzymes exprimées. Le foie et le rein en contiennent beaucoup, au titre d'organes de détoxification. Mais dans de nombreux tissus les cellules ont été mises en évidence et associées à un rôle progéniteur (système nerveux central ; moelle osseuse ; foie ; pancréas...). De plus, ces cellules pourraient appartenir à la catégorie des cellules souches cancéreuses, dont la découverte au sein des tissus est souvent de mauvais augure, et à ce titre, elles font l'objet de recherches de traitements (utilisations d'antagonistes de l'acide rétinoïque ou d'inhibiteurs d'ALDH) complémentaires des chimiothérapies. Bien que la recherche avance vite (Pors et al. 2014), les isoenzymes impliquées ne sont pas encore toutes connues, et certaines catégories de tumeurs n'ont

semble-t-il pas encore été répertoriées. Les outils que nous avons utilisés peuvent être améliorés (la batterie d'anticorps n'est pas tout à fait complète) mais pourraient être utilisés pour des caractérisations systématiques.

Ces outils de caractérisation, d'extraction, de tri, pourraient aussi être mis à profit, pour explorer plus finement les capacités de progéniteurs contenus dans différents tissus.

De telles approches ont commencé d'être abordées, à propos du tissu cardiaque. Ainsi, dans l'article présenté en annexe (auquel j'ai contribué et qui est en phase de finalisation), des cellules exprimant les ALDHs ont été identifiées dans différentes structures cardiaques (oreillettes, parois des ventricules, septum) et une caractérisation de marqueurs associés a été réalisée. La nature des isoenzymes reste inconnue. En revanche, ces cellules n'ont pas semblé détenir de capacité cardiogénique *in vitro*.

Les cellules ALDH peuvent-elles avoir d'autres capacités de différenciation ?

Dans ce même article (voir paragraphe ci-dessus), nous avons pu déclencher un début de différenciation cardiogénique au sein de populations de cellules ALDH+/CD34- issues de muscles squelettiques, et non de muscle cardiaque. Ces cellules sont capables de s'incorporer au sein du tissu cardiaque de souris saines. Les isoenzymes impliquées ne sont pas connues. Il faut noter cependant que l'acide rétinoïque est impliqué dans plusieurs voies de différenciation, dont la myogénèse squelettique et la myogénèse cardiaque, et nous avons vu au cours de notre étude que les isoenzymes participant à la synthèse de l'acide rétinoïque sont particulièrement exprimées par les cellules ALDH musculaires initiales et/ou en culture (ALDH1A1, ALDH1A3, ALDH1B1, ALDH8A1). Tout un travail de caractérisation et de proposition mécanistique reste donc à réaliser dans ce domaine.

La présence de cellules cardiogéniques dans le tissu musculaire squelettique a été démontrée ou suggérée par plusieurs équipes, dont celle d'Anne Fernandez. Au cours de ce doctorat, une petite collaboration a été entreprise entre nos laboratoires, malheureusement elle n'a pas pu mettre en évidence de lien entre les cellules ALDH musculaires et les cellules cardiogéniques produites *in vitro*.

Quels sont les rôles joués par des isoenzymes individuelles ?

Certaines isoenzymes d'ALDH sont liées à des maladies génétiques (souvent métaboliques et/ou touchant la sphère neurologique), ou à des déficits enzymatiques

tolérables chez l'Homme (problème de métabolisation de l'alcool dans des populations asiatiques). Par ailleurs, certaines isoenzymes sont impliquées dans le métabolisme de l'acide rétinoïque et joueraient un rôle prépondérant au cours de la morphogénèse dans de nombreux tissus. Certaines isoenzymes sont aussi plus particulièrement dédiées à un métabolisme particulier dans un territoire donné (cristallin). Dans les situations qui nous intéressent, nous ne savons pas encore si des isoenzymes particulières sont impliquées de manière prépondérante dans la myogénèse ou la cardiogénèse, et leurs homéostasies, et nous ne disposons que de pistes de recherche à l'issue de cette étude. Les formes ALDH1A1, ALDH1A2, ALDH1A3, ALDH2, ALDH7A1 sont citées chez la Souris et les poissons. Des animaux mutants ont été générés, menant dans certains cas à des déficits ou des malformations, surtout cardiaques (ALDH1A2, ALDH1A3). L'identification d'isoenzymes particulières au sein des cellules musculaires initiales, puis au sein de cellules myogéniques en culture, peut nous conduire à tenter de caractériser davantage le rôle de telle ou telle isoenzyme. Ces approches sont basées sur les caractérisations antérieures, en couplant l'expression d'isoenzymes données à des marqueurs de voies moléculaires ou de différenciation (expression de Pax7, de MyoD, de CD56, de CD31). Ces études peuvent inclure des manipulations d'inhibition spécifiques de certaines isoenzymes ciblées (utilisation de siRNA), des analyses d'expression en présence de molécules agonistes ou antagonistes (acide rétinoïque, DEAB, DSF).

Pourrait-on appréhender plus finement certains mécanismes moléculaires de la myogénèse ?

L'activité de certaines ALDH mène à la synthèse d'acide rétinoïque. En parallèle à des études d'expression des gènes et des protéines, le blocage de l'activité globale, ou le mimétisme de la voie rétinoïque, pourraient éclairer sur le rôle de l'ALDH (en général) sur la myogénèse, sur ses versants de prolifération et/ou de différenciation. Des modèles cellulaires de prolifération ou de différenciation pourraient être soumis à l'action d'inhibiteurs tels que le disulfiram, ou le DEAB, ou de l'AR lui-même. La capacité de prolifération, la vitesse de prolifération, l'expression d'ALDH, les natures des isoenzymes, la proportion de cellules exprimant des marqueurs myogéniques, pourraient être déterminées à l'aide des outils que nous avons utilisés.

Références bibliographiques

-A-

- Abu-Baker A, Rouleau GA. (2007) Oculopharyngeal muscular dystrophy : recent advances in the understanding of the molecular pathogenic mechanisms and treatment strategies. *Biochim Biophys Acta*. **1772** : 173-185
- Albelda SM, Olivier PD, Romer LH, Buck CA. (1990) EndoCAM : a novel endothelial cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol*. **110** : 1227-1237
- Aldi S, Marino A, Tomita K, Corti F, Anand R, Olson KE, Marcus AJ, Levi R (2015) E-NTPDase1/CD39 modulates renin release from heart mast cells during ischemia/reperfusion: a novel cardioprotective role. *FASEB J*. **29**: 61-69
- Alexander MR, Owens GK. (2012) Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease. *Annu. Rev. Physiol*. **74** : 13-40
- Alison MR, Guppy NJ, Lim SM, Nicholson LJ. (2010) Finding cancer stem cells: are aldehyde dehydrogenases fit for purpose? *J Pathol*. **222**: 335-344
- Andersson DC, Betzenhauser MJ, Reiken S, Meli AC, Umanskaya A, Xie W, Shiomi T, Zalk R, Lacampagne A, Marks AR. (2011) Ryanodine receptor oxidation causes intracellular calcium leak and muscle weakness in aging. *Cell Metab*. **14**: 196–207
- Aoki Y, Yokota T, Nagata T, Nakamura A, Tanihata J, Saito T, et al. (2012) Bodywide skipping of exons 45–55 in dystrophic mdx52 mice by systemic antisense delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 13763–1376
- Appel B, Eisen JS. (2003) Retinoids run rampant: multiple roles during spinal cord and motor neuron development. *Neuron*. **40**: 461-464
- Aral B, Schlenzig JS, Liu G, Kamoun P. (1996) Database cloning human delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) cDNA : a bifunctional enzyme catalyzing the first 2 steps in proline biosynthesis. *C R Acad Sci III*. **319** : 171-178
- Armulik A, Genové G, Betsholtz C. (2011) Pericytes : developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell* **21** : 193-215
- Arnett AL, Chamberlain JR, Chamberlain JS. (2009) Therapy for neuromuscular disorders. *Curr Opin Genet Dev*. **19**: 290-297
- Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, Gherardi RK, Chazaud B (2007) Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med* **204** : 1057–1069
- Arrighi N, Moratal C, Clément N, Giorgetti-Peraldi S, Peraldi P, Loubat A, Kurzenne JY, Dani C, Chopard A, Dechesne CA. (2015) Characterization of adipocytes derived from fibro/adipogenic progenitors resident in human skeletal muscle. *Cell Death Dis* : **6** : e1733
- Ashibe B, Hirai T, Higashi K, Sekimizu K, Motojima KJ. (2007) Dual subcellular localization in the endoplasmic reticulum and peroxisomes and a vital role in protecting against oxidative stress of fatty aldehyde dehydrogenase are achieved by alternative splicing. *J Biol Chem*. **282**: 20763–20773

- Aulehla A, Pourquie O. (2010) Signaling gradients during paraxial mesoderm development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2** : a000869

-B-

- Babcock HE, Dutta S, Alur RP, Brocker C, Vasiliou V, Vitale S, Abu-Asab M, Brooks BP. (2014) *aldh7a1* regulates eye and limb development in zebrafish. *PLoS One*. **9** : e101782

- Bach JR, Martinez D. (2011) Duchenne muscular dystrophy : continuous noninvasive ventilatory support prolongs survival. *Respir Care*. **56** : 744-750

- Balber AE. (2011) Concise review: aldehyde dehydrogenase bright stem and progenitor cell populations from normal tissues: characteristics, activities, and emerging uses in regenerative medicine. *Stem Cells*. **29** : 570-575

- Bardin N, Francès V, Lesaule G, Horschowshi N, George F, Sampol J. (1996) Identification of the S-Endo 1 endothelial-associated antigen. *Biochem Biophys Res Commun*. **218** : 210-216

- Bardin N, Anfosso F, Masse JM, Cramer E, Sabatier F, Le Bivic A, et al. (2001) Identification of CD146 as a component of the endothelial junction involved in the control of cell-cell adhesion. *Blood*. **98** : 3677-3684

- Barnham KJ, Masters CL, Bush AI. (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov*. **3**: 205-214

- Barton-Davis ER, Shoturma DI, Musaro A, Rosenthal N, Sweeney HL. (1998) Viral mediated expression of insulin-like factor I blocks the aging-related loss of skeletal muscle function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** : 15603-15607

- Baumhater S, Singer MS, Henzel W, et al. (1993) Binding of L-selectin to the vascular sialomucin CD34. *Science*. **262** : 436-438

- Beauchamp JR, Heslop L, Yu DS, et al. (2000) Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *J Cell Biol*. **151** : 1221-1234

- Beauchamp P, Choby C, Desplantez T, de Peyer K, Green K, Yamada KA, Weingart R, Saffitz JE, Kléber AG. (2004) Electrical propagation in synthetic ventricular myocyte strands from germline connexin43 knockout mice. *Circ Res*. **95**: 170-178

- Begemann G, Schilling TF, Rauch GJ, Geisler R, Ingham PW. (2001) The zebrafish neckless mutation reveals a requirement for *raldh2* in mesodermal signals that pattern the hindbrain. *Development*. **128** : 3081-3094

- Beiner JM, Jokl P, Cholewicki J, Panjabi MM (1999) The effect of anabolic steroids and corticosteroids on healing of muscle contusion injury. *Am J Sports Med* **27** : 2-9

- Bell GI, Meschino MT, Hughes-Large JM, Broughton HC, Xenocostas A, Hess DA. (2012) Combinatorial human progenitor cell transplantation optimizes islet regeneration through secretion of paracrine factors. *Stem Cells Dev*. **21** :1863-1876

- Belles-Isles M, Roy R, Dansereau G, Goulet M, Roy B, Bouchard JP, Tremblay JP (1993) Rapid selection of donor myoblast clones for muscular dystrophy therapy using cell surface expression of NCAM. *Eur J Histochem* **37**: 375-380

- Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. (2003) Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. **114**: 763-776

- Bentzinger CF, Wang YX, Rudnicki MA. (2012) Building muscle : molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**
- Berditchevski F, Bazzoni G, Hemler ME. (1995) Specific association of CD63 with the VLA-3 and VLA-6 integrins. *J Biol Chem.* **270**: 17784-17790
- Berkemeier F et al. (2011) Fast-folding alpha-helices as reversible strain absorbers in the muscle protein myomesin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **108** : 14139-14144
- Bernet JD, et al. (2014) p38 MAPK signaling underlies a cell-autonomous loss of stem cell self-renewal in skeletal muscle of aged mice. *Nat Med.* **20** : 265–271
- Bertolotto A, Palmucci L, Doriguzzi C, Mongini T, Gagnor E, Del Rosso M, Tarone G. (1983) Laminin and fibronectin distribution in normal and pathological human muscle. *J Neurol Sci.* **60** : 377-382
- Bertolotto A, Palmucci L, Mongini T, Schiffer D, Caterson B. (1987) Chondroitin, chondroitin 6-sulphate, chondroitin 4-sulfate and dermatan sulphate proteoglycans in normal and pathological human muscle. *J. Neuro. Sci.* **81** : 247-259
- Bione S, Maestrini E, Rivella S, Mancini M, Regis S, Romeo G, Toniolo D. (1994) Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet.* **8** : 323-327
- Biressi S, Rando TA. (2010) Heterogeneity in the muscle satellite cell population. *Semin. Cell Dev. Biol.* **21** : 845-854
- Bjarnegard M, Enge M, Norlin J, Gustafsdottir S, Fredriksson S, Abramsson A, Takemoto M, Gustafsson E, Fässler R, Betsholtz C. (2004) Endothelium-specific ablation of PDGFB leads to pericyte loss and glomerular, cardiac and placental abnormalities. *Development.* **131**: 1847-1857
- Black WJ, Stagos D, Marchitti SA, Nebert DW, Tipton KF, Bairoch A, Vasiliou V. (2009) Human aldehyde dehydrogenase genes: alternatively spliced transcriptional variants and their suggested nomenclature. *Pharmacogenet Genomics.* **19**: 893-902
- Blanpain C, Lowry WE, Geoghegan A, et al. (2004) Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell.* **118** : 635–648
- Blatter EE, Abriola DP, Pietruszko R. (1992) Aldehyde dehydrogenase: covalent intermediate in aldehyde dehydrogenase and ester hydrolysis. *Biochem. J.* **282**, 353-360
- Blau HM, Cosgrove BD, Ho AT. (2015) The central role of muscle stem cells in regenerative failure with aging. *Nat Med.* **21**: 854-862
- Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF. (2000) Role of transforming growth factor beta in human disease. *The New England journal of medicine* **342** : 1350-1358
- Bloemendal H, de Jong W, Jaenicke R, Lubsen NH, Slingsby C, Tardieu A. (2004) Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins. *Prog Biophys Mol Biol.* **86**: 407-485
- Blomhoff HK, Smeland EB, Erikstein B, Rasmussen AM, Skrede B, Skjønberg C, Blomhoff R. (1992) Vitamin A is a key regulator for cell growth, cytokine production, and differentiation in normal B cells. *J Biol Chem.* **267**: 23988-23992
- Blomhoff R. (1994) Transport and metabolism of vitamin A. *Nutr Rev.* **52**: S13-23
- Boldrin L, Elvassore N, Malerba A, Flaibani M, Cimetta E, Piccoli M, Baroni MD, Gazzola MV, Messina C, Gamba P, Vitiello L, De Coppi P. (2007) Satellite cells delivered by micro-

- patterned scaffolds: a new strategy for cell transplantation in muscle diseases. *Tissue Eng.* **13**: 253-262
- Boldrin L, Muntoni F, Morgan JE. (2010) Are human and mouse satellite cells really the same ? *J Histochem Cytochem.* **58** : 941-955
 - Boldrin L, Zammit PS, Morgan JE. (2015) Satellite cells from dystrophic muscle retain regenerative capacity. *Stem Cell Res.* **14**: 20-29
 - Boldrin L, Zammit PS, Muntoni F, Morgan JE. (2009) Mature adult dystrophic mouse muscle environment does not impede efficient engrafted satellite cell regeneration and self-renewal. *Stem Cells.* **27**: 2478–2487
 - Bonaldo P, Sandri M. (2013) Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Dis Model Mech.* **6**: 25-39
 - Bonne G, Di Barletta MR, Varnous S, Bécane HM, Hammouda EH, Merlini L, Muntoni F, Greenberg CR, Gary F, Urtizbera JA, Duboc D, Fardeau M, Toniolo D, Schwartz K. (1999) Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet.* **21** : 285-288
 - Bönnemann CG. Congenital muscular dystrophy. (2009) *Encyclopedia of Neuroscience.* 67-74
 - Borchin B, Chen J, Barberi T. (2013) Derivation and FACS-Mediated Purification of PAX3+/PAX7+ Skeletal Muscle Precursors from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports.* **1**: 620–631
 - Boxall SA, Cook GP, Pearce D, Bonnet D, El-Sherbiny YM, Blundell MP, Howe SJ, Leek JP, Markham AF, de Wynter EA. (2009) Haematopoietic repopulating activity in human cord blood CD133+ quiescent cells. *Bone Marrow Transplant.* **43**: 627-635
 - Boyett MR, Dobrzynski H. (2007) The sinoatrial node is still setting the pace 100 years after its discovery. *Circ Res.* **100**: 1543-1545
 - Brack AS, Conboy MJ, Roy S, Lee M, Kuo CJ, Keller C, Rando TA. (2007) Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis. *Science* **317** : 807-810
 - Brais B, Bouchard JP, Xie YG, Rochefort D L, Chrétien N, Tomé FM, et al. (1998) Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy. *Nat. Genet.* **18**:164–167
 - Braun R, Wang Z, Mack D, Childers M. (2014) Gene therapy for inherited muscle diseases: where genetics meets rehabilitation medicine. *Am J Phys Med Rehabil.* **93**: 97–107
 - Braun T, Bober E, Winter B, Rosenthal N, Arnold HH. (1990) Myf-6, a new member of the human gene family of myogenic determination factors : Evidence for a gene cluster on chromosome 12. *EMBO J* **9** : 821-831
 - Braun T, Buschhausen-Denker G, Bober E, Tannich E, Arnold HH. (1989) A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts. *EMBO J* **8** : 701-709
 - Braun T, Rudnicki MA, Arnold HH, Jaenisch R. (1992) Targeted inactivation of the muscle regulatory gene Myf5 results in abnormal rib development and perinatal death. *Cell.* **71** : 369- 38
 - Breen L, Phillips SM. (2011) Skeletal muscle protein metabolism in the elderly: Interventions to counteract the ‘anabolic resistance’ of ageing. *Nutr. Metab. (Lond)* **8**:68

- Brocker C, Cantore M, Failli P, Vasiliou V. (2011) Aldehyde dehydrogenase 7A1 (ALDH7A1) attenuates reactive aldehyde and oxidative stress induced cytotoxicity. *Chem Biol Interact.* **191** : 269-277
- Bruno S, Bussolati B, Grange C, Collino F, Graziano ME, Ferrando U, Camussi G. (2006) CD133+ Renal Progenitor Cells Contribute to Tumor Angiogenesis. *Am J Pathol.* **169**: 2223–2235
- Bruusgaard JC, Liestol K, Ekmark M, Kollstad K, Gundersen K. (2003) Number and spatial distribution of nuclei in the muscle fibers of normal mice studied in vivo. *J. Physiol (Lond.)* **551** : 467-478
- Brzóška E, Bello V, Darribère T, Moraczewski J. (2006) Integrin alpha3 subunit participates in myoblast adhesion and fusion in vitro. *Differentiation.* **74** : 105-118
- Buckingham M, Bajard L, Chang T, Daubas P, Hadchouel J, Meilhac S, Montarras D, Rocancourt D, Relaix F. (2003) The formation of skeletal muscle : from somite to limb. *J. Anat.* **202** : 59-68
- Buckingham M. (1992) Making muscle in mammals. *Trends Genet* **8** : 144–148
- Buckingham M. (2006) Myogenic progenitor cells and skeletal myogenesis in vertebrates. *Curr Opin Genet Dev* **16** : 525-532
- Bulfield G, Siller WG, Wight PA, Moore KJ. (1984) X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA.* **81** : 1189-1192
- 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. (2010) Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1 : diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol.* **9** : 77–93
- Bushby K, Muntoni F, Urtizberea A, Hughes R, Griggs R. (2004) Report on the 124th ENMC International Workshop. Treatment of Duchenne muscular dystrophy ; defining the gold standards of management in the use of corticosteroids. *Neuromuscul Disord.* **14** : 526–534
- Butcher EC, Picker LJ. (1996) Lymphocyte homing and homeostasis. *Science.* **272**: 60-66

-C-

- Cao B, Zheng B, Jankowski RJ, Kimura S, Ikezawa M, Deasy B, Cummins J, Epperly M, Qu-Petersen Z, Huard J. (2003) Muscle stem cells differentiate into haematopoietic lineages but retain myogenic potential. *Nat Cell Biol.* **5**: 640-646
- Capoccia BJ, Robson DL, Levac KD, Maxwell DJ, Hohm SA, Neelamkavil MJ, Bell GI, Xenocostas A, Link DC, Piwnicka-Worms D, Nolte JA, Hess DA. (2009) Revascularization of ischemic limbs after transplantation of human bone marrow cells with high aldehyde dehydrogenase activity. *Blood.* **113**: 5340-5351
- Carr L, Steele D, Steele S, Wagner D, Pruchnic R, Jankowski R, et al. (2008) 1-year follow-up of autologous muscle-derived stem cell injection pilot study to treat stress urinary incontinence. *Int Urogynecol J* **19**: 881–883
- Castillo A, Nowak R, Littlefield KP, Fowler VM, Littlefield RS. (2009) A nebulin ruler does not dictate thin filament lengths. *Biophys. J.* **96** : 1856-1865

- Catelain C, Riveron S, Papadopoulos A, Mougenot N, Jacquet A, Vauchez K, Yada E, Pucéat M, Fiszman M, Butler-Browne G, Bonne G, Vilquin JT. (2013) Myoblasts and embryonic stem cells differentially engraft in a mouse model of genetic dilated cardiomyopathy. *Mol Ther.* **21**: 1064-1075
- Cerletti M, Jurga S, Witczak CA, Hirshman MF, Shadrach JL, Goodyear LJ, Wagers AJ. (2008) Highly efficient, functional engraftment of skeletal muscle stem cells in dystrophic muscles. *Cell.* **134** : 37-47
- Cerletti M, Molloy MJ, Tomczak KK, Yoon S, Ramoni MF, Kho AT, Beggs AH, Gussoni E. (2006) Melanoma cell adhesion molecule is a novel marker for human fetal myogenic cells and affects myoblast fusion. *J Cell Sci.* **119**: 3117-3127
- Chakkalakal JV, Jones KM, Basson MA, Brack AS. (2012) The aged niche disrupts muscle stem cell quiescence. *Nature.* **490** : 355–360
- Chal J, Oginuma M, Al Tanoury Z, Gobert B, Sumara O, Hick A, Bousson F, Zidouni Y, Mursch C, et al. (2015) Differentiation of pluripotent stem cells to muscle fiber to model Duchenne muscular dystrophy. *Nat Biotechnol.* **33**: 962-969
- Chal J, Oginuma M, Tanoury ZA, Gobert B et al. (2016) Generation of human muscle fibers and satellite-like cells from human pluripotent stem cells *in vitro*. *Nature Protocols* **11**: 1833–1850
- Chambliss KL, Caudle DL, Hinson DD, Moomaw CR, Slaughter CA, Jakobs C, Gibson KM. (1995) Molecular cloning of the mature NAD(+)-dependent succinic semialdehyde dehydrogenase from rat and human. cDNA isolation, evolutionary homology, and tissue expression. *J Biol Chem.* **270** : 461-467
- Chan EC, Jiang F, Peshavariya HM, Dusting GJ. (2009) Regulation of cell proliferation by NADPH oxidase-mediated signaling : potential roles in tissue repair, regenerative medicine and tissue engineering. *Pharmacol Ther* **122** : 97-108
- Chanda B, Ditadi A, Iscove NN, Keller G. (2013) Retinoic Acid Signaling Is Essential for Embryonic Hematopoietic Stem Cell Development. *Cell.* **115**: 215–227
- Chang C, Yoshida A. (1997) Human fatty aldehyde dehydrogenase gene (ALDH10) : organization and tissue-dependent expression. *Genomics.* **40** : 80-85
- Charrin S, Latil M, Soave S, Polesskaya A, Chretien F, Boucheix C, et al. (2013) Normal muscle regeneration requires tight control of muscle cell fusion by tetraspanins CD9 and CD81. *Nat Commun.* **4** : 1674
- Chazaud B (2014) Macrophages : supportive cells for tissue repair and regeneration. *Immunobiology* **219** : 172–178
- Chazaud B, Sonnet C, Lafuste P, Bassez G, Rimaniol AC, Poron F, Authier FJ, Dreyfus PA, Gherardi RK (2003) Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. *J Cell Biol* **163** : 1133–1143
- Cheifetz C, Bellon T, Cales C, Vera S, Bernabeu C, Massague J, et al. (1992) Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *The journal of biological chemistry.* **267** : 19027-19030
- Chen CH, Ferreira JC, Gross ER, Mochly-Rosen D. (2014) Targeting aldehyde dehydrogenase 2: new therapeutic opportunities. *Physiol Rev.* **94** : 1-34
- Chen JJ, Yu BP. (1996) Detoxification of reactive aldehydes in mitochondria: effects of age and dietary restriction. *Aging* **8**: 334–340

- Chen M, Thomson AB, Tsin AT, Basu TK. (2003a) The hepatic retinyl ester hydrolase activity is depressed at the onset of diabetes in BB rats. *Br J Nutr.* **89**: 231-238
- Chen Y, Orlicky DJ, Matsumoto A, Singh S, Thompson DC, Vasiliou V. (2011) Aldehyde dehydrogenase 1B1 (ALDH1B1) is a potential biomarker for human colon cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* **405**: 173-179
- Chen Z, Stamler JS. (2006) Bioactivation of nitroglycerin by the mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Trends Cardiovasc Med* **16**: 259–265
- Chen Z, Zhang J, Stamler JS. (2002) Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 8306–8311
- Christ O, Lucke K, Imren S. (2007) Improved purification of hematopoietic stem cells based on their elevated aldehyde dehydrogenase activity. *Haematologica.* **92**: 1165-1172
- Christman KL, Vardanian AJ, Fang Q, Sievers RE, Fok HH, Lee RJ. (2004) Injectable fibrin scaffold improves cell transplant survival, reduces infarct expansion, and induces neovasculature formation in ischemic myocardium. *J Am Coll Cardiol* **44** : 654-660
- Christman KL, Vázquez-Dorbatt V, Schopf E, Kolodziej CM, Li RC, Broyer RM, Chen Y, Maynard HD. (2008) Nanoscale growth factor patterns by immobilization on a heparin-mimicking polymer. *J Am Chem Soc.* **130**: 16585-16591
- Chute JP, Muramoto GG, Whitesides J, et al. (2006) Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**: 11707–11712
- Civin CI, Strauss LC, Brovall C, et al. (1984) Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol.* **133** : 157–165
- Clement A, Nguyen M, Roberts E, Garcia M, Boillée S, Rule M, et al. (2003) Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science.* **302**: 113–117
- Cobessi D, Tête-Favier F, Marchal S, Branlant G, Aubry A. (2000) Structural and biochemical investigations of the catalytic mechanism of an NADP-dependent aldehyde dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *J Mol Biol* **300** : 141–152
- Colby TD, Bahnson BJ, Chin JK, Klinman JP, Goldstein BM. (1998) Active site modifications in a double mutant of liver alcohol dehydrogenase : structural studies of two enzyme-ligand complexes. *Biochemistry.* **37** : 9295–9304
- Collins CA, Olsen I, Zammit PS, Heslop L, Petrie A, Partridge TA, Morgan JE. (2005) Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell.* **121**: 289-301
- Collins CA, Zammit PS, Ruiz AP, Morgan JE, Partridge TA. (2007) A population of myogenic stem cells that survives skeletal muscle aging. *Stem Cells* **25** : 885–894
- Conboy IM ; Conboy MJ, Smythe GM, Rando TA. (2003) Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle. *Science.* **302** : 1575–1577
- Corselli M, Chen CW, Crisan M, et al. (2010) Perivascular ancestors of adult multipotent stem cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* **30** : 1104-1109
- Corti S, Locatelli F, Papadimitriou D, Donadoni C, Salani S, Del Bo R, Strazzer S, Bresolin N, Comi GP. (2006) Identification of a primitive brain-derived neural stem cell population based on aldehyde dehydrogenase activity. *Stem Cells.* **24**: 975-985

- Corti S, Nizzardo M, Nardini M, Donadoni C, Salani S, Ronchi D, Saladino D, et al. (2008) Neural stem cell transplantation can ameliorate the phenotype of a mouse model of spinal muscular atrophy. *J Clin Invest.* **118**: 3316–3330
- Cosgrove BD, et al. (2014) Rejuvenation of the muscle stem cell population restores strength to injured aged muscles. *Nat Med.* **20** : 255–264
- Cossu G, Molinaro M, Pacifici M. (1983) Differential response of satellite cells and embryonic myoblasts to a tumor promoter. *Dev. Biol.* **98**: 520–524
- Cossu G, Previtali SC, Napolitano S, Cicalese MP, Tedesco FS, Nicastrò F, Noviello M, Roostalu U, Natali Sora MG, Scarlato M. (2015) Intra-arterial transplantation of HLA-matched donor mesoangioblasts in Duchenne muscular dystrophy. *EMBO Mol Med.*
- Covas DT, Panepucci RA, Fontes AM, Silva WA Jr, Orellana MD, Freitas MC, Neder L, Santos AR, Peres LC, Jamur MC, Zago MA. (2008) Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. *Exp Hematol.* **36**: 642-654
- 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, Bühring HJ, Giacobino JP, Lazzari L, Huard J, Péault B. (2008) A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell.* **3**: 301-313
- Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, Boirie Y, Cederholm T, Landi F, Martin FC, Michel JP, Rolland Y, Schneider SM et al. (2010) European Working Group on Sarcopenia in Older People. (2010) Sarcopenia : European consensus on definition and diagnosis : Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing* **39** : 412-423

-D-

- D'Ambrosio K, Pailot A, Talfournier F, Didierjean C, Benedetti E, Aubry A, Branlant G, Corbier C. (2006) The first crystal structure of a thioacylenzyme intermediate in the ALDH family : new coenzyme conformation and relevance to catalysis. *Biochemistry.* **45** : 2978–2986
- Darabi R, Baik J, Clee M, et al. (2009) Engraftment of embryonic stem cell-derived myogenic progenitors in a dominant model of muscular dystrophy. *Exp Neurol* **220** : 212-216.
- Darabi R, Pan W, Bosnakovski D, et al. (2011) Functional Myogenic Engraftment from Mouse iPS Cells. *Stem Cell Rev* **7** : 948-957
- Darby IA, Zakuan N, Billet F, Desmouliere A. (2016) The myofibroblast, a key cell in normal and pathological tissue repair. *Cell Mol Life Sci* **73** : 1145–1157
- Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. (1987) Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* **51** : 987–1000
- Davis TA, Fiorotto ML. (2009) Regulation of muscle growth in neonates. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **12** : 78–85
- De Laurenzi V, Rogers GR, Hamrock DJ, Marekov LN, Steinert PM, Compton JG, Markova N, Rizzo WB. (1996) Sjogren-Larsson syndrome is caused by mutations in the fatty aldehyde dehydrogenase gene. *Nat. Genet.* **12**: 52-57

- De Leenheer AP, Lambert WE, Claeys I. (1982) All-trans-retinoic acid: measurement of reference values in human serum by high performance liquid chromatography. *J Lipid Res.* **9**:1362-1367
- Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ (1997) Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* **324**: 1–18
- Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. (1997) Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J.* **324** : 1-18
- Deasy BM, BM Gharaibeh JB Pollett, MM Jones, MA Lucas, Y Kanda, J Huard. (2005). Long-term self-renewal of postnatal muscle-derived stem cells. *Mol. Biol. Cell.* **16**: 3323–3333
- Deasy BM, Feduska JM, Payne TR, Li Y, Ambrosio F, Huard J. (2009) Effect of VEGF on the regenerative capacity of muscle stem cells in dystrophic skeletal muscle. *Mol Ther* **17** : 1788–1798
- Deitrich RA. (1971) Genetic aspects of increase in rat liver aldehyde dehydrogenase induced by phenobarbital. *Science.* 334-336
- 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. (2007) Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat Cell Biol.* **9** : 255-267
- Demontis F, Piccirillo R, Goldberg AL, Perrimon N. (2013) Mechanisms of skeletal muscle aging: insights from *Drosophila* and mammalian models. *Dis Model Mech.* **6**: 1339–1352
- Demozay D, Rocchi S, Mas JC, Grillo S, Pirola L, Chavey C, Van Obberghen E. (2004) Fatty aldehyde dehydrogenase: Potential role in oxidative stress protection and regulation of its gene expression by insulin. *J. Biol. Chem.* **279**: 6261-6270
- Desmouliere A, Gabbiani G. (1995) Myofibroblast differentiation during fibrosis. *Exp Nephrol* **3** : 134–139
- Despoix N, Walzer T, Jouve N, Blot-Chabaud M, bardin N, Paul P et al. (2008) Mouse CD146/MCAM is a marker of natural killer cell maturation. *Eur J immunol.* **28** : 2855-2864
- Dey D, Pan G, Varma NR, Palaniyandi SS. (2015) Sca-1+ cells from fetal heart with high aldehyde dehydrogenase activity exhibit enhanced gene expression for self-renewal, proliferation, and survival. *Oxid Med Cell Longev.* **2015**: 730683
- Díaz-Manera J, Touvier T, Dellavalle A, Tonlorenzi R, Tedesco FS, Messina G, Meregalli M, Navarro C, Perani L, Bonfanti C, Illa I, Torrente Y, Cossu G. (2010) Partial dysferlin reconstitution by adult murine mesoangioblasts is sufficient for full functional recovery in a murine model of dysferlinopathy. *Cell Death Dis.* **1**: e61
- Dimmeler S, Leri A. (2008) Aging and disease as modifiers of efficacy of cell therapy. *Circ Res.* **102** : 1319-1330
- Dmitrieva RI, Minullina IR, Bilibina AA, Tarasova OV, Anisimov SV, Zaritskey AY. (2012) Bone marrow-and subcutaneous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells : differences and similarities. *Cell Cycle.* **11** : 377-383
- Dollé L, Best J, Empsen C, Mei J, Van Rossen E, Roelandt P, Snykers S, Najimi M, Al Battah F, Theise ND, Streetz K, Sokal E, Leclercq IA, Verfaillie C, Rogiers V, Geerts A, van Grunsven LA. (2012) Successful isolation of liver progenitor cells by aldehyde dehydrogenase activity in naïve mice. *Hepatology.* **55** : 540-552

- Douglas AG, Wood MJ. (2013) Splicing therapy for neuromuscular disease. *Mol Cell Neurosci.* **56** : 169-185
- Douville J, Beaulieu R, Balicki D. (2009) ALDH1 as a functional marker of cancer stem and progenitor cells. *Stem Cells Dev.* **18**: 17-25
- Drew E, Merzaban JS, Seo W, et al. (2005) CD34 and CD43 inhibit mast cell adhesion and are required for optimal mast cell reconstitution. *Immunity.* **22** : 43–57
- Duester G, Mic FA, Molotkov A. (2003) Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue-specific metabolism to retinoic acid. *Chem Biol Interact.***143-144** :201-210
- Duester G. (2001) Genetic dissection of retinoid dehydrogenases. *Chem. Biol. Interact.* **130–132**: 469-480
- Duester G. (2008) Retinoic Acid Synthesis and Signaling during Early Organogenesis. *Cell.* **134**: 921–931
- Duff SE, Li C, Garland JM, Kuman S. (2003) CD105 is important for angiogenesis : evidence and potential applications. *FASEB journal : official publication of the Federal of American Societies for Experimental Biology* **17** : 984-992
- Dupas T, Rouaud T, Rouger K, et al. (2011) Fetal muscle contains different CD34+ cell subsets that distinctly differentiate into adipogenic, angiogenic and myogenic lineages. *Stem Cell Res.* **7** : 230–243
- Dupé V, Matt N, Garnier JM, Chambon P, Mark M, Ghyselinck NB. (2003) A newborn lethal defect due to inactivation of retinaldehyde dehydrogenase type 3 is prevented by maternal retinoic acid treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 14036–14041
- Durbeej M, Campbell KP. (2002) Muscular dystrophies involving the dystrophin-glycoprotein complex : an overview of current mouse models. *Curr Opin Genet Dev.* **12** : 349-361

-E-

- Edmondson DG, Olson EN. (1989) A gene with homology to the myc similarity region of MyoD1 is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program. *Genes Dev* **3** : 628–640
- El Haddad M, Jean E, Turki A, Hugon G, Vernus B, Bonnieu A, Passerieux E, Hamade A, Mercier J, Laoudj-Chenivresse D, Carnac G. (2012) Glutathione peroxidase 3, a new retinoid target gene, is crucial for human skeletal muscle precursor cell survival. *J Cell Sci.* **125** : 6147-6156
- Elshal MF, Khan SS, Raghavachari N, Takahashi Y, Barb J, Bailey JJ, et al. (2007) A unique population of effector memory lymphocytes identified by CD146 having a distinct immunophenotypic and genomic profile. *BMC Immunol.* **8** : 29
- Emery A. (2002) The muscular dystrophies. *Lancet* **2** : 687-895
- English K, Barry FP, Field-Corbett CO, Lahon BP. (2007) IFN-gamma and TNF-alpha differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. *Immunol Lett* **110** : 91-100
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med.* **11** : 81-128

- Estey T, Cantore M, Weston PA, Carpenter JF, Mark J, Petrash JM, Vasiliou V (2007) Mechanisms Involved in the Protection of UV-induced Protein Inactivation by the Corneal Crystallin ALDH3A1. *The Journal of Biological Chemistry*. **282**: 4382-4392
- Estigoy, C.B., Pontén, F., Odeberg, J. et al. (2009) Intercalated discs: multiple proteins perform multiple functions in non-failing and failing human hearts. *Biophys Rev*. **1**: 43

-F-

- Fan X, Molotkov A, Manabe S, Donmoyer CM, Deltour L, Foglio MH, Cuenca AE, Blaner WS, Lipton SA, Duester G. (2003) Targeted disruption of *Aldh1a1* (*Raldh1*) provides evidence for a complex mechanism of retinoic acid synthesis in the developing retina. *Mol Cell Biol*. **23** : 4637-4648
- Farrés J, Moreno A, Crosas B, Peralba JM, Allali-Hassani A, Hjelmqvist L, Jörnvall H, Parés X. (1994) Alcohol dehydrogenase of class IV (sigma sigma-ADH) from human stomach. cDNA sequence and structure/function relationships. *Eur J Biochem*. **224**: 549-557
- Felschow DM, McVeigh ML, Hoehn GT, et al. (2001) The adapter protein CrkL associates with CD34. *Blood*. **97** : 3768–3775.
- Ferreira JC, Mochly-Rosen D. (2012) Nitroglycerin use in myocardial infarctions patients. *Circ J* **76** :15-21
- Filshie RJ, Zannettino AC, Makrynika V, Gronthos S, Henniker AJ, Bendall LJ, Gottlieb DJ, Simmons PJ, Bradstock KF. (1998) MUC18, a member of the immunoglobulin superfamily, is expressed on bone marrow fibroblasts and a subset of hematological malignancies. *Leukemia* **12** : 414-421
- Fina L, Molgaard HV, Robertson D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D, Sutherland DR, Baker MA, Greaves MF. (1990) Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood*. **75**: 2417-2426
- Finkel T, (2001) Reactive oxygen species and signals transduction. *IUBMB Life* **52** : 3-6
- Fleischer S, Ogunbunmi EM, Dixon MC, Flee EA. (1985) Localisation of Ca²⁺ release channels with ryanodine in junction terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum of fast skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82** : 7256-7259
- Folli C, Calderone V, Ramazzina I, Zanotti G, Berni R. (2002) Ligand binding and structural analysis of a human putative cellular retinol-binding protein. *J Biol Chem*. **277**: 41970-41977
- Fonsatti E, Altomonte M, Nicotra MR, Natali PG, Maio M. (2003) Endoglin (CD105) : a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenic blood vessels. *Oncogene* **22** : 6557-6563
- Foo LC, Dougherty JD. (2013) *Aldh1L1* is expressed by postnatal neural stem cells in vivo. *Glia*. **61** : 1533-1541
- Forte-McRobbie CM, Pietruszko R. (1986) Purification and characterization of human liver “high Km” aldehyde dehydrogenase and its identification as glutamic gamma-semialdehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem*. **261**: 2154-2163
- Frangogiannis NG, Lindsey ML, Michael LH, Youker KA, Bressler RB, Mendoza LH, Spengler RN, Smith CW, Entman ML. (1998) Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF-alpha, initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation*. **98**: 699-710

- Frank E, Fischbach GD. (1979) Early events in neuromuscular junction formation in vitro : induction of acetylcholine receptor clusters in the postsynaptic membrane and morphology of newly formed synapses. *J. Cell. Biol.* **83** : 143-158
- Franzini-Armstrong C, Protasi F, Ramesh V. (1999) Shape, size, and distribution of Ca(2+) release units and couplons in skeletal and cardiac muscles. *Biophys. J.* **77** : 1528-1539
- Frey SP, Jansen H, Raschke MJ, Meffert RH, Ochman S. (2012) VEGF improves skeletal muscle regeneration after acute trauma and reconstruction of the limb in a rabbit model. *Clin Orthop Relat Res* **470** : 3607–3614
- Froeschlé A, Alric S, Kitzmann M, Carnac G, Auradé F, Rochette-Egly C, Bonniou A. (1998) Retinoic acid receptors and muscle b-HLH proteins: partners in retinoid-induced myogenesis. *Oncogene*.**16** : 3369-3378
- Fukada S, Higuchi S, Segawa M, Koda K, Yamamoto Y, Tsujikawa K, et al. (2004) Purification and cell-surface marker characterization of quiescent satellite cells from murine skeletal muscle by a novel monoclonal antibody. *Exp. Cell Res.* **296**: 245–255
- Fukada S, Ma Y, Ohtani T, Watanabe Y, Murakami S, Yamaguchi M. (2013) Isolation, characterization, and molecular regulation of muscle stem cells. *Front Physiol.* **4**: 317
- Fukada S, Uezumi A, Ikemoto M, Masuda S, Segawa M, Tanimura N, et al. (2007) Molecular signature of quiescent satellite cells in adult skeletal muscle. *Stem Cells.* **25**: 2448–2459

-G-

- Garcia AM, Calder RB, Dollé ME, Lundell M, Kapahi P, Vjig J. (2010) Age- and temperature-dependent somatic mutation accumulation in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet.* **6** : e1000950
- Gentry T, Deibert E, Foster SJ, Haley R, Kurtzberg J, 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
- Gentry T, Foster S, Winstead L, Deibert E, Fiordalisi M, 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
- Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, Jeltsch M, Mitchell C, Alitalo K, Shima D, Betsholtz C. (2003) VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol.* **161**: 1163-1177
- Gibson KM, Lee CF, Bennett MJ, Holmes B, Nyhan WL. (1993) Combined malonic, methylmalonic and ethylmalonic acid semialdehyde dehydrogenase deficiencies: an inborn error of beta-alanine, L-valine and L-alloisoleucine metabolism? *J Inherit Metab Dis.* **16**: 563–567
- Gibson KM. (2005) Gamma-hydroxybutyric aciduria: a biochemist's education from a heritable disorder of GABA metabolism. *J Inherit Metab Dis.* **28**: 247-265
- Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Klier CG, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha MS, Dontu G. (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
- Giordani J, Bajard L, Demignon J, Daubas P, Buckingham M, Maire P. (2007) Six proteins regulate the activation of Myf5 expression in embryonic mouse limbs. *Proc Natl Acad Sci* **104** : 11310-11315
 - Giraud MN, Ayuni E, Cook S, Siepe M, Carrel TP, Tevæearai HT. (2008) Hydrogel-based engineered skeletal muscle grafts normalize heart function early after myocardial infarction. *Artif Organs* **32** : 692-700
 - Goemans N, Tulinius M, van den Akker J, Burm B., Ekhart P, Heuvelmans N, et al. (2011) Systemic administration of PRO051 in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med* **364**: 1513–1522
 - Gokhin DS, et al. (2010) Tropomodulin isoforms regulate thin filament pointed-end capping and skeletal muscle physiology. *J. Cell. Biol.* 189 : 95-109
 - Goldberg IJ, Trent CM, Schulze PC. (2012) Lipid Metabolism and Toxicity in the Heart. *Cell Metab.***15**: 805–812
 - Goldspink G, Harridge SD. (2004) Growth factors and muscle ageing. *Exp. Gerontol.* **39** : 1433-1438
 - Gong MC et al. (2006) Calcium-independent phospholipase A2 modulates cytosolic oxidant activity and contractile function in murine skeletal muscle cells. *J. Appl. Physiol.* **100** : 399-405
 - Gonnet F, Bouazza B, Millot GA, Ziaei S, Garcia L, Butler-Browne GS, Mouly V, Tortajada J, Danos O, Svinartchouk F. (2008) Proteome analysis of differentiating human myoblasts by dialysis-assisted two-dimensional gel electrophoresis (DAGE). *Proteomics*. **8** : 264-278
 - Goulding MD, Chalepakis G, Deutsch U, Erselius JR, Gruss P. (1991) Pax-3, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis. *EMBO J* **10** : 1135–1147
 - Gourdie RG, Green CR, Severs NJ. Gap junction distribution in adult mammalian myocardium revealed by an anti-peptide antibody and laser scanning confocal microscopy. *J Cell Sci.* **99**: 41-55
 - Goyert SM, Ferrero EM, Seremetis SV, Winchester RJ, Silver J, Mattison AC. (1986) Biochemistry and expression of myelomonocytic antigens. *J Immunol.* **137** : 3909-3814
 - Gray RG, Pollitt RJ, Webley J. (1987) Methylmalonic semialdehyde dehydrogenase deficiency: demonstration of defective valine and beta-alanine metabolism and reduced malonic semialdehyde dehydrogenase activity in cultured fibroblasts. *Biochem Med Metab Biol.* **38**: 121–124
 - Grifone R, Demignon J, Giordani J, Niro C, Souil E, Bertin F, Laclef C, Xu PX, Maire P. (2007) Eya1 and Eya2 proteins are required for hypaxial somitic myogenesis in the mouse embryo. *Dev Biol* **302** : 602-616
 - Grifone R, Demignon J, Houbron C, Souil E, Niro C, Seller MJ, Hamard G, Maire P. (2005) Six1 and Six4 homeoproteins are required for Pax3 and Mrf expression during myogenesis in the mouse embryo. *Development* **132** : 2235-2249
 - Grunewald RW, Eckstein A. (1995) Osmotic regulation of the betaine metabolism in immortalized renal cells. *Kidney Int.* **48**: 1714-20
 - Gurtner GC, Davis V, Li H, McCoy MJ, Sharpe A, et al. (1995) Targeted disruption of the murine VCAM1 gene : essential role of VCAM-1 in chorioallantoic fusion and placentation. *Genes Dev* **9** : 1-14

- Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, Kunkel LM, Mulligan RC. (1999) Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature*. **401**: 390-394

-H-

- Hamade A, Deries M, Begemann G, Bally-Cuif L, Genêt C, Sabatier F, Bonniou A, Cousin X. (2006) Retinoic acid activates myogenesis in vivo through Fgf8 signalling. *Dev Biol*. **289**: 127-140

- Hamdi H, Furuta A, Bellamy V, *et al.* (2009) Cell delivery : intramyocardial injections or epicardial deposition ? A head-to-head comparison. *Ann Thorac Surg* **87** :1196-1203

- Harman D. (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*. **11**: 298-300 - Haselbeck RJ, Hoffmann I, Duester G. (1999) Distinct functions for Aldh1 and Raldh2 in the control of ligand production for embryonic retinoid signaling pathways. *Dev Genet*. **25** : 353-364

- Hasty P, Bradley A, Morris JH, Edmondson DG, Venuti JM, Olson EN, Klein WH. (1993) Muscle deficiency and neonatal death in mice with targeted mutation in the myogenin gene. *Nature*. **364** : 501-506

- Hawke TJ, Garry DJ. (2001) Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* **91**: 534-551

- Hayashi T, *et al.* (2009) Three-dimensional electron microscopy reveals new details of membrane systems for Ca²⁺ signaling in the heart. *J. Cell. Sci.* **122** : 1005-1013

- Healy L, May G, Gale K, *et al.* (1995) The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA*. **92** : 12240–12244

- Heanue TA, Davis RJ, Rowitch DH, Kispert A, McMahon AP, Mardon G, Tabin CJ. (2002) *Dach1*, a vertebrate homologue of *Drosophiladach-shund*, is expressed in the developing eye and ear of both chick and mouse and is regulated independently of Pax7 and Eya gene. *Mech Dev* **111** : 75-87

- Helderma-van den Enden A, Straathof C, Aartsma-Rus A, den Dunnen J, Verbist B, Bakker E, *et al.* (2010) Becker muscular dystrophy patients with deletions around exon 51; a promising outlook for exon skipping therapy in Duchenne patients. *Neuromuscul Disord* **20**: 251–225

- Hellström M, Kalén M, Lindahl P, Abramsson A, Betsholtz C. (1999) Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development*. **126**: 3047-3055

- Hess DA, Craft TP, Wirthlin L, *et al.* (2008) Widespread nonhematopoietic tissue distribution by transplanted human progenitor cells with high aldehyde dehydrogenase activity. *Stem cells*. **26**: 611-620

- Hess DA, Wirthlin L, Craft TP, Herrbrich PE, Hohm SA, Lahey R, Eades WC, Creer MH, Nolte JA. (2006) Selection based on CD133 and high aldehyde dehydrogenase activity isolates long-term reconstituting human hematopoietic stem cells. *Blood*. **107**: 2162–2169

- Higuchi S, Matsushita S, Murayama M, Takagi S, Hayashida M. (1995) Alcohol and aldehyde dehydrogenase polymorphisms and the risk for alcoholism. *Am J Psychiatry*. **152**: 1219-1221

- Hoffman EP, Brown RH Jr, Kunkel LM. (1987). Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* **51**: 919–928
- Hoffmann M, Schuster-Gossler K, Watabe-Rudolph M, Aulehla A, Herrmann BG, Gossler A. (2004) WNT signaling, in synergy with T/TBX6, controls Notch signaling by regulating Dll1 expression in the presomitic mesoderm of mouse embryos. *Genes Dev* **18** : 2712-2717
- Hong IK, Kim YM, Jeoung DI, Kim KC, Lee H. (2005) Tetraspanin CD9 induces MMP-2 expression by activating p38 MAPK, JNK and c-Jun pathways in human melanoma cells. *Exp Mol Med.* **37** : 230–239
- Hong M, Lee Y, Kim JW, Lim JS, Chang SY, Lee KS, Paik SG, Choe IS. (1999) Isolation and characterization of cDNA clone for human liver 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase. *Biochem Mol Biol Int.* **47** : 407-415
- Horwitz J, Ding L, Vasiliou V, Cantore M, Piatigorsky J. (2006) Scallop lens Omega-crystallin (ALDH1A9): a novel tetrameric aldehyde dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun.* **348**: 1302-1309
- Hsu LC, Chang WC, Hoffmann I, Duyster G. (1999) Molecular analysis of two closely related mouse aldehyde dehydrogenase genes: Identification of a role for Aldh1, but not Aldh-pb, in the biosynthesis of retinoic acid. *Biochem. J.* **339**: 387-395
- Hu CA, Lin WW, Valle D. (1996) Cloning, characterization, and expression of cDNAs encoding human delta 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase. *J Biol Chem.* **271** : 9795-800
- Hu CA, Lin WW, Obie C, Valle D. (1999) Molecular enzymology of mammalian Delta1-pyrroline-5-carboxylate synthase. Alternative splice donor utilization generates isoforms with different sensitivity to ornithine inhibition. *J Biol Chem.* **274**: 6754-6762
- Huard J, Cao B, Qu-Petersen Z. (2003) Muscle-derived stem cells: potential for muscle regeneration. *Birth Defects Res C Embryo Today.* **69**: 230-237
- Hussain MM, Maxfield FR, Más-Oliva J, Tabas I, Ji ZS, Innerarity TL, Mahley RW. (1991) Clearance of chylomicron remnants by the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor. *J Biol Chem.* **266**: 13936-13940
- Hutcheson DA, Zhao J, Merrel A, Haldar M, Kardon G. (2009) Embryonic and fetal limb muogenic cells are derived from developmentally distinct progenitors and have different requirements for b-catenin. *Genes Dev* **23** : 997-1013
- Hutcheson DA, Zhao J, Merrel A, Haldar M, Kardon G. (2009) Embryonic and fetal limb muogenic cells are derived from developmentally distinct progenitors and have different requirements for b-catenin. *Genes Dev.* **23** : 997-1013

-I-

- Illa I, Leon-Monzon M, Dalakas MC. (1992) Regenerating and denervated human muscle fibers and satellite cells express neural cell adhesion molecule recognized by monoclonal antibodies to natural killer cells. *Ann Neurol.* **31**: 46-52
- Ioannou M, Serafimidis I, Arnes L, Sussel L, Singh S, Vasiliou V, Gavalas A. (2013) ALDH1B1 is a potential stem/progenitor marker for multiple pancreas progenitor pools. *Dev Biol.* **374**: 153-163

- Issarachai S, Priestley GV, Nakamoto B, Papayannopoulou T. (2002) Cells with hemopoietic potential residing in muscle are itinerant bone marrow-derived cells. *Exp. Hematol.* **30**: 366–373

-J-

- Jackson B, Brocker C, Thompson DC, Black W, Vasiliou K, Nebert DW, Vasiliou V. (2011) Update on the aldehyde dehydrogenase gene (ALDH) superfamily. *Hum Genomics.* **5** : 283-303

- Jackson BC, Thompson DC, Charkoftaki G, Vasiliou V. (2015) Dead enzymes in the aldehyde dehydrogenase gene family: role in drug metabolism and toxicology. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* **11** : 1839-1847

- Jackson k, Majka S, Wang H, Pocius J, Hartley C, Majesky M, et al. (2001) Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* **107**: 1395–1402

- Jackson KA, Mi T, Goodell MA. (1999) Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**: 14482–14486

- Jarvinen TA, Jarvinen TL, Kaariainen M, Kalimo H, Jarvinen M (2005) Muscle injuries : biology and treatment. *Am J Sports Med* **33** : 745–764

- Jean E, Laoudj-Chenivresse D, Notarnicola C, Rouger K, Serratrice N, Bonnieu A, Gay S, Bacou F, Duret C, Carnac G. (2011) Aldehyde dehydrogenase activity promotes survival of human muscle precursor cells. *J Cell Mol Med.* **15** : 119-133

- Jiménez-Moreno R, Wang ZM, Gerring RC, Delbono O. (2008). Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release declines in muscle fibers from aging mice. *Biophys. J.* **94**: 3178–3188

- Johnson MA, Polgar J, Weightman D, Appleton D. (1973) Data on the distribution of fibre types in thirty-six human muscles. An autopsy study. *J. Neuro. Sci.* **18** : 11-129

- Jostes B, Walther C, Gruss P. (1990) The murine paired box gene, Pax7, is expressed specifically during the development of the nervous and muscular system. *Mech Dev* **33** : 27–37

-K-

- Kang MJ, Ahn HS, Lee SS. (2005) Effects of polyunsaturated/saturated fatty acid ratio and antioxidant supplementation on hepatic TBARS and enzyme activities under the maintenance of dietary peroxidizability index value in young and adult rats. *Ann Nutr Metab.* **49**: 304-311

- Kassar-Duchossoy L, Giacone E, Gayraud-Morel B, Jory A, Gomes D, Tajbakhsh S. (2005) Pax3/Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development. *Genes Dev* **19** : 1426-1431

- Kastan MB, Schlaffer E, Russo JE, Colvin OM, Civin CI, Hilton J. (1990) Direct demonstration of elevated aldehyde dehydrogenase in human hematopoietic progenitor cells. *Blood.* **75** : 947-1950

- Kathmann EC, Lipsky JJ. (1997) Cloning of a cDNA encoding a constitutively expressed rat liver cytosolic aldehyde dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**: 527-531

- Kathmann EC, Naylor S, Lipsky JJ. (2000) Rat liver constitutive and phenobarbital-inducible cytosolic aldehyde dehydrogenases are highly homologous proteins that function as distinct isozymes. *Biochemistry*. **39**: 11170-11176
- Kawakimi K, Sato S, Ozaki H, Ikeda K. (2000) Six family genes-structure and function as transcription factors and their roles in development. *Bioessays*. **22** : 616-626
- Kazmi SM, Li D, Koop K, Conant J, Lau CY. (1992) Role of aldehyde dehydrogenase in the biological activity of spermine dialdehyde, a novel immunosuppressive/purging agent. *Pharmacol Res* **25** : 383–392
- Kazuki Y, Hiratsuka M, Takiguchi M, Osaki M, Kajitani N, Hoshiya H, Hiramatsu K, Yoshino T, Kazuki K, Ishihara C, Takehara S, Higaki K, Nakagawa M, Takahashi K, Yamanaka S, Oshimura M. (2010) Complete genetic correction of ips cells from Duchenne muscular dystrophy. *Mol Ther*. **18**: 386-393
- Keegan BR, Feldman JL, Begemann G, Ingham PW, Yelon D. (2005) Retinoic acid signaling restricts the cardiac progenitor pool. *Science*. **307**: 247-249
- Keller LH (2009) Bone marrow-derived aldehyde dehydrogenase-bright stem and progenitor cells for ischemic repair. *Congest Heart Fail*. **15**: 202-206
- Kenyon CJ. (2010) The genetics of ageing. *Nature*. **464** : 504-512
- Khan MU, Czamecka AM, Duchnosha R, Kukwa, Szczylik C (2014) Metastases-Initiating Cells in Renal Cancer. *Current signal transduction therapy* **8** : 240-246
- Kiefer JC, Hauschka SD. (2001) Myf-5 is a transiently expressed in non-muscle mesoderm and exhibits dynamic regional changes within the presegmented mesoderm and somites I-IV. *Dev Bio* **232** : 77-90
- Kieny P, Chollet S, Delalande P, Le Fort M, Magot A, Pereon Y, Perrouin Verbe B. (2013) Evolution of life expectancy of patients with Duchenne muscular dystrophy at AFM Yolaine de Kepper centre between 1981 and 2011. *Ann Phys Rehabil Med*. **56** : 443-454
- Kikonyogo A, Pietruszko R. (1996) Aldehyde dehydrogenase from adult human brain that dehydrogenates gamma-aminobutyraldehyde: purification, characterization, cloning and distribution. *Biochem J*. **316**: 317-324
- King G, Holmes RS. (1997) Human corneal aldehyde dehydrogenase: purification, kinetic characterization and phenotypic variation. *Biochem. Mol. Biol. Intl*. **31**: 49-63
- Klumpp D, Horch RE, Kneser U, Beier JP. (2010) Engineering skeletal muscle tissue—new perspectives *in vitro* and *in vivo*. *J Cell Mol Med* **14** : 2622-2629
- Klymiuk N, Blutke A, Graf A, Krause S, Burkhardt K, Wuensch A, Krebs S, Kessler B, Zakhartchenko V, Kurome M, Kemter E, Nagashima H, Schoser B, Herbach N, Blum H, Wanke R, Aartsma-Rus A, Thirion C, Lochmüller H, Walter MC, Wolf E. (2013) Dystrophin-deficient pigs provide new insights into the hierarchy of physiological derangements of dystrophic muscle. *Hum Mol Genet*. **22**: 4368–4382
- Kobinger G, Louboutin J, Barton E, Sweeney H, Wilson J. (2003) Correction of the dystrophic phenotype by *in vivo* targeting of muscle progenitor cells. *Hum Gene Ther* **14**: 1441–1449
- Kokovay E, Wang Y, Kusek G, Wurster R, Lederman P, Lowry N, Shen Q, Temple S. (2012) VCAM1 is essential to maintain the structure of the SVZ niche and acts as an environmental sensor to regulate SVZ lineage progression. *Cell Stem Cell*. **11**: 220–230

- Konieczny P, Swiderski K, Chamberlain JS. (2013) Gene and cell-mediated therapies for muscular dystrophy. *Muscle Nerve*. **47**: 649–663
- Koninckx R, Daniëls A, Windmolders S, Mees U, Macianskiene R, Mubagwa K, Steels P, Jamaer L, Dubois J, Robic B, Hendriks M, Rummens JL, Hensen K. (2013) The cardiac atrial appendage stem cell: a new and promising candidate for myocardial repair. *Cardiovasc Res*. **97** : 413-423
- Koppaka V, Thompson DC, Chen Y, Ellermann M, Nicolaou KC, Juvonen RO, Petersen D, Deitrich RA, Hurley TD, Vasiliou V. (2012) Aldehyde dehydrogenase inhibitors: a comprehensive review of the pharmacology, mechanism of action, substrate specificity, and clinical application. *Pharmacol Rev*. **64** : 520-539
- Kornegay JN, Bogan JR, Bogan DJ, Childers MK, Li J, Nghiem P, Detwiler DA, Larsen CA, Grange RW, Bhavaraju-Sanka RK, Tou S, Keene BP, Howard JF Jr, Wang J, Fan Z, Schatzberg SJ, Styner MA, Flanigan KM, Xiao X, Hoffman EP. (2012) Canine models of Duchenne muscular dystrophy and their use in therapeutic strategies. *Mamm Genome*. **23** : 85-108
- Kotha J, Longhurst C, Appling W, Jennings LK. (2008) Tetraspanin CD9 regulates beta 1 integrin activation and enhances cell motility to fibronectin via a PI-3 kinase-dependent pathway. *Exp Cell Res*. **314** : 1811-1822
- Kottlors M, Kirschner J. (2010) Elevated satellite cell number in Duchenne muscular dystrophy. *Cell Tissue Res*. **340** : 541-548
- Krause DS, Ito T, Fackler MJ, et al. (1994) Characterization of murine CD34, a marker for hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood*. **84** : 691–701
- Kuang S, Kuroda K, Le Grand F, Rudnicki MA. (2007) Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell*. **129**: 999-1010
- Kühn U, Gündel M, Knoth A, Kerwitz Y, Rüdell S, Wahle E. (2009) Poly(A) tail length is controlled by the nuclear poly(A)-binding protein regulating the interaction between poly(A) polymerase and the cleavage and polyadenylation specificity factor. *J. Biol. Chem*. **284**: 22803–22814
- Kumar S, Sandell LL, Trainor PA, Koentgen F, Duester G. (2012) Alcohol and aldehyde dehydrogenases: retinoid metabolic effects in mouse knockout models. *Biochim Biophys Acta*. **1821** : 198-205
- Kutcher ME, Herman IM. (2009) The pericyte: cellular regulator of microvascular blood flow. *Microvasc Res*. **77**: 235-246
- Kwee L, Baldwin HS, Shen HM, Stewart CL, Buck C et al. (1995) Defective development of the embryonic and extraembryonic systems in vascular cell adhesion molecule (VCAM1) deficient mice. *Development* **121** : 489-503
- Yamanaka S, Takahashi K. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblast cultures. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*. **51**: 2346-2251

-L-

- Larcher T, Lafoux A, Tesson L, Remy S, Thepenier V, François V, Le Guiner C, Goubin H, Dutilleul M, Guigand L, Toumaniantz G, De Cian A, Boix C, Renaud JB, Cherel Y,

- Giovannangeli C, Concordet JP, Anegon I, Huchet C. (2014) Characterization of dystrophin deficient rats: a new model for duchenne muscular dystrophy. *PLoS One*. **9** :e110371
- Larson HN, Weiner H, Hurley TD. (2005) Disruption of the coenzyme binding site and dimer interface revealed in the crystal structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase “Asian” variant. *J Biol Chem* **280** : 30550–30556
- Lassen N, Bateman JB, Estey T, Kuszak JR, Nees DW, Piatigorsky J, Duester G, Day BJ, Huang J, Hines LM, Vasiliou V. (2007) Multiple and additive functions of ALDH3A1 and ALDH1A1: cataract phenotype and ocular oxidative damage in *Aldh3a1(-)/Aldh1a1(-)* knock-out mice. *J Biol Chem*. **282**: 25668-25676
- Lassen N, Black WJ, Estey T, Vasiliou V. (2008) The role of corneal crystallins in the cellular defense mechanisms against oxidative stress. *Semin. Cell Dev. Biol.* **19**: 100–112
- Latroche C, Gitiaux C, Chrétien F, Desguerre I, Mounier R, Chazaud B. (2015) Skeletal Muscle Microvasculature: A Highly Dynamic Lifeline. *Physiology*. **30**: 417-427
- Lecourt S, Marolleau JP, Fromigue O, et al. (2010) Characterization of distinct mesenchymal-like cell populations from human skeletal muscle in situ and in vitro. *Exp Cell Res*. **316** : 2513–2526
- Lee CM, Weindruch R, Aiken JM. (1997) Age-associated alterations of the mitochondrial genome. *Free Radic. Biol. Med.* **22** :1259–1269
- Lee IT, Yang CM. (2012) Role of NADPH oxidase/ROS in pro-inflammatory mediators-induced airway and pulmonary diseases. *Biochem Pharmacol.* **84** : 581-590
- Lee JY, Qu-Petersen Z, Cao B, et al. (2000) Clonal isolation of muscle-derived cells capable of enhancing muscle regeneration and bone healing. *J Cell Biol.* **150** : 1085–1100
- Lee S, et al. (2012) Global mapping of translation initiation sites in mammalian cells at single-nucleotide resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **109** : E2424-2432
- Lehman W, Rosol M, Tobacman LS, Craig R. (2001) Troponin organization on relaxed and activated thin filaments revealed by electro microscopy and three-dimensional reconstruction. *J. Mol. Biol.* **307** : 739-744
- Lehto M, Sims TJ, Bailey AJ. (1985) Skeletal muscle injury–molecular changes in the collagen during healing. *Res Exp Med* **185** : 95–106
- Lemmers RJ, Tawil R, Petek LM, Balog J, Block GJ, Santen GW, Amell AM, van der Vliet PJ, Almomani R, Straasheijm KR, Krom YD, Klooster R, et al. (2012) Digenic inheritance of an SMCHD1 mutation and an FSHD-permissive D4Z4 allele causes facioscapulohumeral muscular dystrophy type 2. *Nat Genet.* **44** : 1370–1374
- Lemmers RJ, van den Boogaard ML, van der Vliet PJ, Donlin-Smith CM, Nations SP, Ruivenkamp CA, Heard P, Bakker B, Tapscott S, Cody JD, Tawil R, van der Maarel SM. (2015) Hemizygoty for SMCHD1 in Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy Type 2 : Consequences for 18p Deletion Syndrome. *Hum Mutat.* **36** : 679-683
- Lemmers RJ, van der Vliet PJ, Klooster R, Sacconi S, Camano P, Dauwerse JG, Snider L, Straasheijm KR, van Ommen GJ, Padberg GW, Miller DG, Tapscott SJ, et al. (2010a) A Unifying Genetic Model for Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy. *Science.* **329** : 1650–1653
- Lemos DR, Babaeijandaghi F, Low M, Chang CK, Lee ST, Fiore D, Zhang RH, Natarajan A, Nedospasov SA, Rossi FM. (2015) Nilotinib reduces muscle fibrosis in chronic muscle

injury by promoting TNF-mediated apoptosis of fibro/adipogenic progenitors. *Nat Med* **21** : 786–794

- Levéen P, Pekny M, Gebre-Medhin S, Swolin B, Larsson E, Betsholtz C. (1994) Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes Dev.* **8**: 1875-1887

- Levi BP, Yilmaz OH, Duyster G, Morrison SJ. (2009) Aldehyde dehydrogenase 1a1 is dispensable for stem cell function in the mouse hematopoietic and nervous systems. *Blood.* **113** : 1670-1680

- Li H, et al. (2002) Reverse engineering of the giant muscle protein titin. *Nature* **418** : 998-1002

- Li J, Feng ZC, Yeung FS, Wong MR, Oakie A, Fellows GF, Goodyer CG, Hess DA, Wang R. (2014) Aldehyde dehydrogenase 1 activity in the developing human pancreas modulates retinoic acid signalling in mediating islet differentiation and survival. *Diabetologia.* **57**: 754-764

- Li J, Imitola J, Snyder E, Sidman R. (2006) Neural stem cells rescue nervous Purkinje neurons by restoring molecular homeostasis of tissue plasminogen activator and downstream targets. *J Neurosci.* **26**: 7839–7848

- Li Y, Huard J. (2002) Differentiation of muscle-derived cells into myofibroblasts in injured skeletal muscle. *Am J Pathol* **161** : 895–907

- Liadaki K, Casar JC, Wessen M, Luth ES, Jun S, Gussoni E, Kunkel LM. (2012) β 4 integrin marks interstitial myogenic progenitor cells in adult murine skeletal muscle. *J Histochem Cytochem.* **60**: 31-44

- Light N, Champion AE (1984) Characterization of muscle epimysium, perimysium and endomysium collagens. *Biochem J.* **219** : 1017-1026

- Lin CS, Ning H, Lin G, et al. (2012) Is CD34 truly a negative marker for mesenchymal stromal cells ? *Cytotherapy.* **14** : 1159–1163

- Lin M, Zhang M, Abraham M, Smith SM, Napoli JL. (2003) Mouse retinal dehydrogenase 4 (RALDH4), molecular cloning, cellular expression, and activity in 9-cis-retinoic acid biosynthesis in intact cells. *J Biol Chem.* **278** : 9856-9861

- Lin SW, Chen JC, Hsu LC, Hsieh CL, Yoshida A. (1996) Human gamma-aminobutyraldehyde dehydrogenase (ALDH9): cDNA sequence, genomic organization, polymorphism, chromosomal localization, and tissue expression. *Genomics.* **34**: 376-380

- Lindahl P, Hellström M, Kalen M, Karlsson L, Pekny M, Pekna M, Soriano P, Betsholtz C. (1998) Paracrine PDGF-B/PDGF-R β signaling controls mesangial cell development in kidney glomeruli. *Development* **125**: 3313–3322

- Lindahl P, Johansson BR, Levéen P, Betsholtz C. (1997a) Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* **277**: 242–245

- Lindström M., Thornell L.E. (2009) New multiple labelling method for improved satellite cell identification in human muscle: application to a cohort of power-lifters and sedentary men. *Histochem. Cell Biol.* **132**: 141–157

- Liu L, Cheung TH, Charville GW, Hurgo BM, Leavitt T, Shih J, Brunet A, Rando TA. (2013) Chromatin modifications as determinants of muscle stem cell quiescence and chronological aging. *Cell reports.* **4**: 189–204

- Liu WS, Chen CT, Foo NH, Huang HR, Wang JJ, Chen SH, Chen TJ. (2009) Human umbilical cord blood **cells** protect against hypothalamic apoptosis and systemic inflammation response during heatstroke in rats. *Pediatr Neonatol.* **50**: 208-216
- Liu Y, Jiang X, Zeng Y, Zhou H, Yang J, Cao R. (2014) Proliferating pancreatic beta-cells upregulate ALDH. *Histochem Cell Biol.* **142** : 685-691
- Liu ZJ, Hempel J, Sun J, Rose J, Hsiao D, Chang WR, Chung YJ, Kuo I, Lindahl R, Wang BC. (1997) Crystal structure of a class 3 aldehyde dehydrogenase at 2.6 Å resolution. *Adv Exp Med Biol* **414** : 1–7
- Lowe ED, Gao GY, Johnson LN, Keung WM. (2008) Structure of daidzin, a naturally occurring anti-alcohol-addiction agent, in complex with human mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *J Med Chem* **51** : 4482–4487
- Lowe G, Bland R, Greenman J, Kirkpatrick N, Lowe G. (2001) Progressive **muscle** relaxation and secretory immunoglobulin A. *Psychol Rep.* **88**: 912-914
- Luczak SE, Elvine-Kreis B, Shea SH, Carr LG, Wall TL. (2002) Genetic risk for alcoholism relates to level of response to alcohol in Asian-American men and women. *J Stud Alcohol.* **63**: 74-82
- Luo Y, Zheng C, Zhang J, Lu D, Zhuang J, Wing S, et al. (2012) Recognition of CD146 as an ERM-binding protein offers novel mechanisms for melanoma cell migration. *Oncogene.* **31** : 306-321
- Lyon AR, Sato M, HajjarRJ, Samulski RJ, Harding SE. (2008) Gene therapy: Targeting the myocardium. *Heart.* **94**: 89-99

-M-

- Ma I, Allan AL. (2011) The role of human aldehyde dehydrogenase in normal and cancer stem cells. *Stem Cell Rev.* **7** : 292-306
- Maly IP, Crotet V, Toranelli M. (2003) The so-called “testis-specific aldehyde dehydrogenase” corresponds to type 2 retinaldehyde dehydrogenase in the mouse. *Histochem. Cell. Biol.* **119**: 169-174
- Mann CJ, Perdiguero E, Kharraz Y, Aguilar S, Pessina P, Serrano AL, Munoz-Canoves P. (2011) Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. *Skelet Muscle* **1** : 21
- Mansouri A, Muller FL, Liu Y, Ng R, Faulkner J, Hamilton M, Richardson A, Huang TT, Epstein CJ, Van Remmen H. (2006) Alterations in mitochondrial function, hydrogen peroxide release and oxidative damage in mouse hind-limb skeletal muscle during aging. *Mech. Ageing Dev.* **127**: 298–306
- Manzer R, Pappa A, Estey T, Sladek N, Carpenter JF, Vasiliou V. (2003) Ultraviolet radiation decreases expression and induces aggregation of corneal ALDH3A1. *Chem Biol Interact.* **143-144**: 45-53
- Maqbool T, Jagla K. (2007) Genetic control of muscle development: Learning from *Drosophila*. *J Muscle Res Cell Motil* **28**: 397-407
- Marcato P, Dean CA, Giacomantonio CA, Lee PW. (2011) Aldehyde dehydrogenase: its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform. *Cell Cycle.* **10**: 1378-1384

- Marcato P, Dean CA, Pan D, Araslanova R, Gillis M, Joshi M, Helyer L, Pan L, Leidal A, Gujar S, Giacomantonio CA, Lee PW. (2011) Aldehyde dehydrogenase activity of breast cancer stem cells is primarily due to isoform ALDH1A3 and its expression is predictive of metastasis. *Stem Cells*. **29**: 32-45
- Marchitti SA, Brocker C, Orlicky DJ, Vasiliou V. (2010) Molecular characterization, expression analysis, and role of ALDH3B1 in the cellular protection against oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. **49**: 1432-1443
- Marchitti SA, Brocker C, Stagos D, Vasiliou V. (2008) Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert Opinion*. **4**: 697-720
- Marselos M, Strom SC, Michalopoulos G. (1987) Effect of phenobarbital and 3-methylcholanthrene on aldehyde dehydrogenase activity in cultures of HepG2 cells and normal human hepatocytes. *Chem. Biol. Interact*. **62**: 75-88
- Martin-Rendon E, Sweeney D, Lu F, Girdlestone J, Navarrete C, Watt SM. (2008) 5-Azacytidine-treated human mesenchymal stem/progenitor cells derived from umbilical cord, cord blood and bone marrow do not regenerate cardiomyocytes in vitro at high frequencies. *Vox Sang* **95**:137-148
- Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. (2008) Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* **13** : 453-461
- Mason CM, Dobard E, Zhang P, Nelson S. (2004) Alcohol exacerbates murine pulmonary tuberculosis. *Infection and Immunity*. **72**: 2556–2563
- Massari ME, Murre C. (2000) Helix-loop-helix proteins: Regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol* **20**: 429-440
- Mauro A. (1961) Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol*.
- McArdle A, Pattwell D, Vasilaki A, Griffiths RD, Jackson MJ. (2001) Contractile activity-induced oxidative stress: cellular origin and adaptive responses. *Am. J. Physiol., Cell Physiol*. **280**: C621-627
- McKay BR, Toth KG, Tarnopolsky MA, Parise G. (2010) Satellite cell number and cell cycle kinetics in response to acute myotrauma in humans: immunohistochemistry versus flow cytometry. *J Physiol*. **588**: 3307-3320
- McKenzie D, Bua E, McKiernan S, Cao Z, Aiken JM, Wanagat Jonathan. (2002) Mitochondrial DNA deletion mutations: a causal role in sarcopenia. *Eur. J. Biochem*. **269**: 2010–2015
- McLennan IS (1996) Degenerating and regenerating skeletal muscles contain several subpopulations of macrophages with distinct spatial and temporal distributions. *J Anat*. **188**: 17–28
- Melov S, Shoffner JM, Kaufman A, Wallace DC. (1995) Marked increase in the number and variety of mitochondrial DNA rearrangements in aging human skeletal muscle. *Nucleic Acids Res*. **23**: 4122–4126
- Melton LJ, III, Khosla S, Crowson CS, O'Connor MK, O'Fallon WM, Riggs BL. (2000) Epidemiology of sarcopenia. *Journal of the American Geriatrics Society* **48**: 625–630
- Ménasché P, Alfieri O, Janssens S, McKenna W, Reichenspurner H, Trinquart L, et al. (2008) The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation*. **117**: 1189-1200

- Ménasché P. Cardiac cell therapy: lessons from clinical trials. (2011) *J Mol Cell Cardiol.* **50**: 258-265
- Mendell J, Campbell K, Rodino-Klapac L, Sahenk Z, Shilling C, Lewis S, et al. (2010) Dystrophin immunity in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med* **363**: 1429–1437
- Mendell J, Clark K. (2006) Challenges for gene therapy for muscular dystrophy. *Curr Neurol Neurosci Rep* **6**: 47–56
- Meng J, Adkin KF, Xu S, Muntoni F, Morgan JE. (2011) Contribution of Human Muscle-Derived Cells to Skeletal Muscle Regeneration in Dystrophic Host Mice. *PloS One.* **6**: e17454
- Messaed C, Rouleau GA. (2009) Molecular mechanisms underlying polyalanine diseases. *Neurobiol Dis.* **34**: 397-405
- Mic FA, Sirbu IO, Duester G. (2004) Retinoic acid synthesis controlled by Raldh2 is required early for limb bud initiation and then later as a proximodistal signal during apical ectodermal ridge formation. *J Biol Chem.* **279**: 26698-27706
- Miller BH, Olson SL, Turek FW, Levine JE, Horton TH, Takahashi JS. (2004) Circadian clock mutation disrupts estrous cyclicity and maintenance of pregnancy. *Curr Biol.* **14**: 1367-73
- Min H, Shane B, Stokstad EL. (1988) Identification of 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase-hydrolase as a major folate binding protein in liver cytosol. *Biochim Biophys Acta.* **967**: 348–353
- Miner JH, Wold B. (1990) Herculín, a fourth member of the MyoD family of myogenic regulatory genes. *Proc Natk Acad Sci* **87**: 1089-1093
- Mirabelli P, Di Noto R, Lo Pardo C, Morabito P, Abate G, Gorrese M, Raia M, Pascariello C, Scalia G, Gemei M, Mariotti E, Del Vecchio L. (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
- Mitchell KJ, Pannérec A, Cadot B, Parlakian A, Besson V, Gomes ER, Marazzi G, Sassoon DA (2010) Identification and characterization of a non-satellite cell muscle resident progenitor during postnatal development. *Nat Cell Biol.* **12**: 257-266
- Mittelbronn M, Sullivan T, Stewar, CL, Bornemann A. (2008). Myonuclear degeneration in LMNA null mice. *Brain Pathol.* **18**: 338–343
- Mizrak D, Brittan M, Alison M. (2008) CD133: molecule of the moment. *The journal of pathology.* **214**: 3-9
- Mizuno Y, Chang H, Umeda K, et al. (2010) Generation of adult skeletal muscle stem/progenitor cells from murine induced pluripotent stem cells. *FASEB J* **24**: 2245-2253
- Montarras D, Morgan J, Collins C, Relaix F, Zaffran S, Cumano A, Partridge T, Buckingham M. (2005) Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration. *Science.* **309**: 2064–2067
- Moore SA, Baker HM, Blythe TJ, Kitson KE, Kitson TM, Baker EN. (1998) Sheep liver cytosolic aldehyde dehydrogenase: the structure reveals the basis for the retinal specificity of class 1 aldehyde dehydrogenases. *Structure.* **6**: 1541-1551
- Moreb JS, Ucar D, Han S, Amory JK, Goldstein AS, Ostmark B, Chang LJ. (2012) The enzymatic activity of human aldehyde dehydrogenases 1A2 and 2 (ALDH1A2 and ALDH2)

- is detected by Aldefluor, inhibited by diethylaminobenzaldehyde and has significant effects on cell proliferation and drug resistance. *Chem Biol Interact.* **195**: 52-60
- Morosetti R, Gidaro T, Broccolini A, *et al.* (2011) Mesoangioblasts from facioscapulohumeral muscular dystrophy display *in vivo* a variable myogenic ability predictable by their *in vitro* behavior. *Cell Transplantation* **20**: 1299-1313
 - Moxley RT 3rd, Pandya S, Ciafaloni E, Fox DJ, Campbell K. (2010) Change in natural history of Duchenne muscular dystrophy with long-term corticosteroid treatment: implications for management. *J Child Neurol.* **25**: 1116-1129
 - Mueller GM, O'Day T, Watchko JF, Ontell M. (2002) Effect of injecting primary myoblasts versus putative muscle-derived stem cells on mass and force generation in mdx mice. *Hum. Gene Ther.* **13**: 1081–1090
 - Muller WA, Ratti CM, McDonnell SL, Cohn ZA. (1989) A human endothelial cell-restricted externally disposed plasmalemmal protein enriched in intercellular junctions. *J. Exp. Med.* **170**: 399-414
 - Munoz-Canoves P, Serrano AL. (2015) Macrophages decide between regeneration and fibrosis in muscle. *Trends Endocrinol Metab* **26**: 449–450
 - Muntoni F, Wells D. (2007) Genetic treatments in muscular dystrophies. *Curr Opin Neurol.* **20**: 590-594
 - Musarò A, McCullagh K, Paul A, Houghton L, Dobrowolny G, Molinaro M, Barton ER, Sweeney HL, Rosenthal N. (2001) Localised Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nat. Genet.* **27**: 195-200
 - Muzio G, Maggiora M, Paiuzzi E, Oraldi M, Canuto RA. (2012) Aldehyde dehydrogenases and cell proliferation. *Free Radic Biol Med.* **52**: 735-746

-N-

- Nagano M, Kimura K, Yamashita T, Ohneda K, Nozawa D, Hamada H, Yoshikawa H, Ochiai N, Ohneda O. (2010) Hypoxia responsive mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood are effective for bone repair. *Stem Cells Dev.* **19**: 1195-1210
- Nair KS. (2005) Aging muscle. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**: 953-963
- Nakagawa T, *et al.* (2005) Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* **434**: 652-658
- Nakayama H, Enzan H, Miyazaki E, *et al.* (2000) Differential expression of CD34 in normal colorectal tissue, peritumoral inflammatory tissue, and tumour stroma. *J Clin Pathol.* **53**: 626–629
- Napoli JL. (1986) Retinol metabolism in LLC-PK1 Cells. Characterization of **retinoic** acid synthesis by an established mammalian cell line. *J Biol Chem.* **261**: 13592-13597
- Neary MT, Ng KE, Ludtmann MH, Hall AR, Piotrowska I, Ong SB, Hausenloy DJ, Mohun TJ, Abramov AY, Breckenridge RA. (2014) Hypoxia signaling controls postnatal changes in cardiac mitochondrial morphology and function. *J Mol Cell Cardiol.* **74**: 340-352
- Negroni E, Riederer I, Chaouch S *et al.* (2009) *In vivo* myogenic potential of human CD133+ muscle-derived stem cells: A quantitative study. *Mol Ther* **17**: 1771–1778

- Negroni E, Vallese D, Vilquin JT, Butler-Browne G, Mouly V, Trollet C. (2011) Current advances in cell therapy strategies for muscular dystrophies. *Expert Opin Biol Ther.* **11**: 157-176
- Nguyen PH, Giraud J, Chambonnier L, Dubus P, Wittkop L, Belleannée G, Collet D, Soubeyran I, Evrard S, Rousseau B, Dugot-Senant N, Mégraud F, Mazurier F, Varon C. (2016) Characterization of biomarkers of tumorigenic and chemoresistant cancer stem cells in human gastric carcinoma. *Clin Cancer Res*
- Niederreither K, Dollé P. (2008) Retinoic acid in development: towards an integrated view. *Nat Rev Genet.* **9**: 541-553
- Nielsen JS, McNagny KM. (2008) Novel functions of the CD34 family. *J Cell Sci.* **121**: 3683–3692
- Niederreither K, McCaffery P, Dräger UC, Chambon P, Dollé P. (1997). Restricted expression and retinoic acid-induced downregulation of the retinaldehyde dehydrogenase type 2 (RALDH-2) gene during mouse development. *Mech. Dev.* **62**: 67-78
- Niederreither K, Subbarayan V, Dollé P, Chambon P. (1999) Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nat Genet.* **21**: 444-448
- Niederreither K, Fraulob V, Garnier JM, Chambon P, Dollé P. (2002) Differential expression of retinoic acid-synthesizing (RALDH) enzymes during fetal development and organ differentiation in the mouse. *Mech Dev.* **110**: 165-171
- Nielsen JS, McNagny KM. (2009) CD34 is a key regulator of hematopoietic stem cell trafficking to bone marrow and mast cell progenitor trafficking in the periphery. *Microcirculation.* **16**: 487–496
- Noll M. (1993) Evolution and role of Pax genes. *Curr Opin Genet Dev* **3**: 595-605
- Nussbaum J, Minami E, Laflamme MA, Virag JA, Ware CB, Masino A, Muskheli V, Pabon L, Reinecke H, Murry CE. (2007) Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. *FASEB J.* **21**: 1345-1357

-O-

- Obermair FJ, Fiorelli R, Schroeter A, Beyeler S, Blatti C, Zoerner B, Thallmair M. (2010) A novel classification of quiescent and transit amplifying adult neural stem cells by surface and metabolic markers permits a defined simultaneous isolation. *Stem Cell Res.* **5**: 131-143
- Ohlsson R, Falck P, Hellstrom M, Lindahl P, Bostrom H, Franklin G, Ahrlund-Richter L, Pollard J, Soriano P, Betsholtz C. (1999) PDGFB regulates the development of the labyrinthine layer of the mouse fetal placenta. *Dev Biol.* **212**: 124–136
- Ohsawa I, Nishimaki K, Murakami Y, Suzuki Y, Ishikawa M, Ohta S. (2008) Age-dependent neurodegeneration accompanying memory loss in transgenic mice defective in mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 activity. *J Neurosci.* **28**: 6239-649
- Ohto H, Maeda H, Shibata Y, Chen RF, Ozaki Y, Higashihara M, Takeuchi A, Tohyama M. (1985) A novel leukocyte differentiation antigen: two monoclonal antibodies TM2 and TM3 define a 120-kd molecule present on neutrophils, monocytes, platelets and activated lymphoblasts. *Blood.* **66**: 873-881
- Ott MO, Bober E, Lyons G, Arnold H, Buckingham M. (1991) Early expression of the myogenic regulatory gene, *myf-5*, in precursor cells of skeletal muscle in the mouse embryos. *Development* **111**: 1097-1107

- Ourednik J, Ourednik V, Lynch WP, Schachner M, Snyder EY. (2002) Neural stem cells display an inherent mechanism for rescuing dysfunctional neurons. *Nat Biotechnol.* **20**: 1103-1110

-P-

- Papaconstantinou J, et al. (2015) Attenuation of p38alpha MAPK stress response signaling delays the in vivo aging of skeletal muscle myofibers and progenitor cells. *Aging* **7**: 718–733

- Pappa A, Estey T, Manzer R, Brown D, Vasiliou V. (2003) Human aldehyde dehydrogenase 3A1 (ALDH3A1): biochemical characterization and immunohistochemical localization in the cornea. *Biochem J.* **376**: 615-623

- Pappas CT, Krieg PA, Gregorio CC. (2010) Nebulin regulates actin filament lengths by a stabilization mechanism. *J. Cell Biol.* **189**: 859-870

- Parker MH, Seale P, Rudnicki MA. (2003) Looking back to the embryo: Defining transcriptional networks in adult myogenesis. *Nat Rev Genet* **4**: 497–507

- Parkinson EK. (1992) Epidermal keratinocyte stem cells: their maintenance and regulation. *Semin Cell Biol.* **3**: 435-444

- Partridge TA, Morgan JE, Coulton GR, Hoffman EP, Kunkel LM. (1989) Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to-positive by injection of normal myoblasts. *Nature.* **337**: 176–179

- Partridge TA. (2004) Stem cell therapies for neuromuscular diseases. *Acta Neurol Belg* **104**: 141–147

- Passamano L, Taglia A, Palladino A, Viggiano E, D'Ambrosio P, Scutifero M, Rosaria Cecio M, Torre V, DE Luca F, Picillo E, Paciello O, Piluso G, Nigro G, Politano L. (2012) Improvement of survival in Duchenne Muscular Dystrophy: retrospective analysis of 835 patients. *Acta Myol.* **31**: 121-125

- Payne AM, Dodd SL, Leeuwenburgh C. (2003). Life-long calorie restriction in Fischer 344 rats attenuates age-related loss in skeletal muscle-specific force and reduces extracellular space. *J. Appl. Physiol.* **95**: 2554–2562

- Payne TR, Oshima H, Sakai T, Ling Y, Gharaibeh B, Cummins J, Huard J. (2005) Regeneration of dystrophin-expressing myocytes in the mdx heart by skeletal muscle stem cells. *Gene Ther.* **12**:1264-1274

- Pearce DJ, 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

- Pearce DJ, Taussig D, Simpson C, Allen K, Rohatiner AZ, Lister TA, Bonnet D. (2005) Characterization of cells with a high aldehyde dehydrogenase activity from cord blood and acute myeloid leukemia samples. *Stem Cells.* **23**: 752-760

- Péault B, Rudnicki M, Torrente Y, Cossu G, Tremblay JP, Partridge T, Gussoni E, Kunkel LM, Huard J. (2007) Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy. *Mol Ther.* **15**: 867-877

- Pellegrini KL, Beilharz MW. (2011) The survival of myoblasts after intramuscular transplantation is improved when fewer cells are injected. *Transplantation.* **91**: 522-526

- Peppiatt CM, Howarth C, Mobbs P, Attwell D. (2006) Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature*. **443**: 700-704
- Perez-Miller S, Younus H, Vanam R, Chen CH, Mochly-Rosen D, Hurley TD. (2010) Alda-1 is an agonist and chemical chaperone for the common human aldehyde dehydrogenase 2 variant. *Nat Struct Mol Biol* **17**: 159–164
- Périé S, Trollet C, Mouly V, Vanneaux V, Mamchaoui K, Bouazza B, et al. (2014) Autologous myoblast transplantation for oculopharyngeal muscular dystrophy: a phase I/IIa clinical study. *Mol Ther* : 22(1):219-25
- Perin EC, Murphy M, Cooke JP, Moyé L, Henry TD, Bettencourt J, Gahremanpour A, Leeper N, Anderson RD, Hiatt WR, Lima JA, Venkatesh B, Sayre SL, Vojvodic RW, Taylor DA, Ebert RF, Hirsch AT (2014) Cardiovascular Cell Therapy Research Network. Rationale and design for PACE: patients with intermittent claudication injected with ALDH bright cells. *Am Heart J*. **168**: 667-673
- Perkins W. J., Han Y. S., Sieck G. C. (1997). Skeletal muscle force and actomyosin ATPase activity reduced by nitric oxide donor. *J. Appl. Physiol.* **83**: 1326–1332
- Petkovich PM. (2001) Retinoic acid metabolism. *J Am Acad Dermatol.* **45**: S136-142
- Petrof BJ. (2002) Molecular pathophysiology of myofiber injury in deficiencies of the dystrophin-glycoprotein complex. *Am J Phys Med Rehabil.* **81**
- Piatigorsky J, Horwitz J, Kuwabara T, Cutress CE. (1989) The cellular eye lens and crystallins of cubomedusan jellyfish. *J Comp Physiol A.* **164**: 577-587
- Pickl WF, Majdic O, Fischer GF, Petzelbauer P, Fae I, Waclavicek M et al. (1997) MUC18/MCAM (CD146), an activation antigen of human T lymphocyte. *J Immunol.* **158**: 2107-2115
- Pluchino S, Peruzzotti-Jametti L. (2013) Rewiring the ischaemic brain with human-induced pluripotent stem cell-derived cortical neurons. *Brain.* 136: 3525-3527
- Polchert D, Sobinsky J, Douglas G, Kidd M, Moadsiri A et al. (2008) INF-gamma activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. *Eur J Immuno* 38: 1745-1755
- Pollitt RJ, Green A, Smith R. (1985) Excessive excretion of beta-alanine and of 3-hydroxypropionic, R- and S-3-aminoisobutyric, R- and S-3-hydroxyisobutyric and S-2-(hydroxymethyl)butyric acids probably due to a defect in the metabolism of the corresponding malonic semialdehydes. *J Inherit Metab Dis.* **8**: 75–79
- Pors K, Moreb JS. (2014) Aldehyde dehydrogenases in cancer: an opportunity for biomarker and drug development? *Drug Discov Today.***19**: 1953-1963
- Pouget C, Pottin K, Jaffredo T. (2008) Sclerotomal origin of vascular smooth muscle cells and pericytes in the embryo. *Dev Biol.* **315**: 437-447
- Povsic TJ, Adams SD, Zavodni KL, Kelly F, Melton LG, Rao SV, Najjar SS, Harrington RA, Peterson ED. (2009) Aldehyde dehydrogenase activity allows reliable EPC enumeration in stored peripheral blood samples. *J Thromb Thrombolysis.* **28**: 259-265
- Povsic TJ, Zavodni KL, Kelly FL, Zhu S, Goldschmidt-Clermont PJ, Dong C, Peterson ED. (2007) Circulating progenitor cells can be reliably identified on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *J Am Coll Cardiol.* **50**: 2243-2248

- Povsic TJ, Zhou J, Adams SD, Bolognesi MP, Attarian DE, Peterson ED. (2010) Aging is not associated with bone marrow-resident progenitor cell depletion. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* **65**: 1042-1050
- Powner D, Kopp PM, Monkley SJ, Critchley DR, Berditchevski F. (2011) Tetraspanin CD9 in cell migration. *Biochem Soc Trans.* **39**: 563–567
- Prasanna SJ, Gopalakrishnan D, Shankar SR, Vasandan AB (2010) Proinflammatory cytokines, IFN γ and TNF α , influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially. *PLoS One* **5**: e9016
- Price FD, et al. (2014) Inhibition of JAK-STAT signaling stimulates adult satellite cell function. *Nat Med.* **20**: 1174–1181
- Price FD, Kuroda K, Rudnicki MA. (2007) Stem cell based therapies to treat muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta.* **1772**: 272-283
- Prochniewicz E, Thompson LV, Thomas DD. (2007) Age-related decline in actomyosin structure and function. *Exp. Gerontol.* **42**: 931–938
- Przewozniak M, Czaplicka I, Czerwinska AM, Markowska-Zagrajek A, Moraczewski J, Streminska W, et al. (2013) Adhesion proteins – an impact on skeletal myoblast differentiation. *PLoS One.* **8**

-Q-

- Qiu JJ, Zeisig BB, Li S, Liu W, Chu H, Song Y, Giordano A, Schwaller J, Gronemeyer H, Dong S, So CW. (2015) Critical role of retinoid/rexinoid signaling in mediating transformation and therapeutic response of NUP98-RARG leukemia. *Leukemia.* **29**: 1153-1162
- Qu-Petersen Z, Deasy B, Jankowski R, Ikezawa M, Cummins J, Pruchnic R, Mytinger J, Cao B, Gates C, Wernig A, Huard J. (2012) Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *J Cell Biol.* **157**: 851-864

-R-

- Rantanen J, Ranne J, Hurme T, Kalimo H. (1995) Denervated segments of injured skeletal muscle fibers are reinnervated by newly formed neuromuscular junctions. *J Neuropathol Exp Neurol* **54**: 188–194
- Rayment I, et al. (1993) Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science* **261**: 58-65
- Reinks M, Papageorgiou AP, Frangogiannis NG, Heymans S (2014) Myocardial extracellular matrix: an everchanging and diverse entity. *Circ. Res.* **114**: 972-888
- Relaix F, Zammit PS. (2012) Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage. *Development* **139**: 2845–2856
- Ren G, Zhao X, Zhang L, Zhang J, L’Huillier A et al. (2010) Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-A in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. *J Immunol* **184**: 2321-2328
- Rhodes SJ, Konieczny SF. (1989) Identification of MRF4: A new member of the muscle regulatory factor gene family. *Genes Dev* **3**: 2050–2061

- Richard PL, Gosselin C, Laliberte T, Paradis M, Goulet M, Tremblay JP, Skuk D. (2010) A first semi-manual device for clinical intramuscular repetitive cell injections. *Cell Transplant.* **19**: 67–78
- Rickard AM, Petek LM, Miller DG. (2015) Endogenous DUX4 expression in FSHD myotubes is sufficient to cause cell death and disrupts RNA splicing and cell migration pathways. *Hum. Mol. Genet.* **24**: 5901-5914
- Rizzo WB, Lin Z, Carney G. (2001) Fatty aldehyde dehydrogenase: genomic structure, expression and mutation analysis in Sjogren-Larsson syndrome. *Chem Biol Interact.* **130–132**: 297–307
- Robson MC, Phillips LG, Thomason A, Robson LE, Pierce GF. (1992) Platelet-derived growth factor BB for the treatment of chronic pressure ulcers. *Lancet.* **339**: 23-25
- Rocheteau P, Gayraud-Morel B, Siegl-Cachedenier I, Blasco MA, Tajbakhsh S. (2012). A subpopulation of adult skeletal muscle stem cells retains all template DNA strands after cell division. *Cell* **148**: 112–125
- Rodriguez-Guzman M, Montero JA, Santesteban E, Gañan Y, Macias D, Hurle JM. (2007) Tendon-muscle crosstalk controls muscle bellies morphogenesis, which is mediated by cell death and retinoic acid signaling. *Dev Biol.* **302**: 267-280
- Rodt SA, Ahlén K, Berg A, Rubin K, Reed RK. (1996) A novel physiological function for platelet-derived growth factor-BB in rat dermis. *J Physiol.* **495**: 193-200
- Roehrich ME, Spicher A, Milano G, Vassalli G. (2013) Characterization of cardiac-resident progenitor cells expressing high aldehyde dehydrogenase activity. *Biomed Res Int.* **2013**: 503047
- Rolny C, Nilsson I, Magnusson P, Armulik A, Jakobsson L, Wentzel P, Lindblom P, Norlin J, Betsholtz C, Heuchel R, Welsh M, Claesson-Welsh L. (2006) Platelet-derived growth factor receptor-beta promotes early endothelial cell differentiation. *Blood.* **108**: 1877-1886
- Romero-Suarez S, Shen J, Brotto L, Hall T, Mo C, Valdivia HH, Andresen J, Wacker M, Nosek TM, Qu CK, et al. (2010). Muscle-specific inositol phosphatase (MIP/MTMR14) is reduced with age and its loss accelerates skeletal muscle aging process by altering calcium homeostasis. *Aging* **2**: 504–513
- Rooyackers OE, Adey DB, Ades PA, Nair KS. (1996) Effect of age on in vivo rates of mitochondrial protein synthesis in human skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 15364–15369
- Rouger K, Larcher T, Dubreil L, Deschamps JY, Le Guiner C, Jouvion G, Delorme B, Lieubeau B, Carlus M, Fornasari B, et al. (2011) Systemic delivery of allogenic muscle stem cells induces long-term muscle repair and clinical efficacy in duchenne muscular dystrophy dogs. *Am J Pathol.* **179**: 2501-2518
- Rovira M, Scott SG, Liss AS, Jensen J, Thayer SP, Leach SD. (2010) Isolation and characterization of centroacinar/terminal ductal progenitor cells in adult mouse pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **107**: 75-80
- Rudnicki MA, Braun T, Hinuma S, Jaenisch R. (1992) Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development. *Cell* **71**: 383-390
- Rudnicki MA, Jaenisch R. (1995) The MyoD family of transcription factors and skeletal myogenesis. *Bioessays* **17**: 203-209

- Rudnicki MA, Schnegelsberg PN, Stead RH, Braun T, Arnold HH, Jaenisch R. (1993) MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* **75**: 1351–1359
- Russ DW, Grandy JS, Toma K, Ward CW. (2011). Ageing, but not yet senescent, rats exhibit reduced muscle quality and sarcoplasmic reticulum function. *Acta Physiol.* **201**: 391–403
- Ryan T, Liu J, Chu A, Wang L, Blais A, Skerjanc IS. (2012) Retinoic acid enhances skeletal myogenesis in human embryonic stem cells by expanding the premyogenic progenitor population. *Stem Cell Rev.* **8**: 482-493

-S-

- Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, et al. (2007) Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organise a hematopoietic microenvironment. *Cell.* **131**: 324-336
- Sacconi S, Lemmers RJ, Balog J, van der Vliet PJ, Lahaut P, van Nieuwenhuizen MP, Straasheijm KR, Debipersad RD, Vos-Versteeg M, Salviati L, Casarin A, Pegoraro E, Tawil R, Bakker E, Tapscott SJ, Desnuelle C, van der Maarel SM. (2013) The FSHD2 gene SMCHD1 is a modifier of disease severity in families affected by FSHD1. *Am. J. Hum. Genet.* **93**: 744-751
- Sacconi S, Salviati L, Desnuelle C. (2015) Facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta.* **1852**: 607-614
- Sakurai H, Okawa Y, Inami Y, et al. (2008) Paraxial mesodermal progenitors derived from mouse embryonic stem cells contribute to muscle regeneration via differentiation into muscle satellite cells. *Stem Cells* **26**: 1865-1873
- Salort-Campana E, Nguyen K, Bernard R, Jouve E, Solé G, Nadaj-Pakleza A, Niederhauser J, Charles E, Ollagnon E, et al. (2015) Low penetrance in facioscapulohumeral muscular dystrophy type 1 with large pathological D4Z4 alleles: a cross-sectional multicenter study. *Orphanet J Rare Dis.* **10**: 2
- Sambasivan R, Tajbakhsh S. (2007) Skeletal muscle stem cell birth and properties. *Semin Cell Dev Biol* **18**: 870–882
- Sambasivan R, Yao R, Kissenpfennig A, Van Wittenberghe L, Paldi A, Gayraud-Morel B, Guenou H, Malissen B, Tajbakhsh S, Galy A. (2011) Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration. *Development* **138**: 3647–3656
- 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. (2006) Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature.* **444**: 574-579
- Sampaolesi M, Torrente Y, Innocenzi A, Tonlorenzi R, D'Antona G, Pellegrino MA, et al. (2003) Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. *Science.* **301**: 487–92
- Sancricca C, Mirabella M, Gliubizzi C, et al. (2010) Vessel-associated stem cells from skeletal muscle : from biology to future uses in cell therapy. *World J Stem Cells* **2**: 39-49

- Saroufim A, Messai Y, Hasmin M, Rioux N, Lacovelli R, Verhoest G, et al. (2014) Tumoral CD105 is a novel independent prognostic marker for prognosis in clear-cell renal cell carcinoma. *Br J Cancer* **110**:1778-1784
- Sato PY, Coombs W, Lin X, et al. (2011) Interactions between ankyrin-G, Plakophilin-2, and Connexin43 at the cardiac intercalated disc. *Circulation research*. **109**: 193–201
- Savio-Galimberti E, et al. (2008) Novel features of the rabbit transverse tubular system revealed by quantitative analysis of three-dimensional reconstructions from confocal images. *Biophys. J.* **95**: 2053-2062
- Saw YT, Yang J, Ng SK, Liu S, Singh S, Singh M, Welch WR, Tsuda H, Fong WP, Thompson D, Vasiliou V, Berkowitz RS, Ng SW. (2012) Characterization of aldehyde dehydrogenase isozymes in ovarian cancer tissues and sphere cultures. *BMC Cancer*. **12**: 329
- Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev.* **91**: 1447-1531
- Schiaffino S. (2012) Tubular aggregates in skeletal muscle: just a special type of protein aggregates? *Neuromuscul Disord.* **23**: 199-207
- Schoenauer R, et al. (2005) Myomesin is a molecular spring with adaptable elasticity. *J. Mol. Biol.* **349**: 367-379
- Scholz D, Thomas S, Sass S, Podzuweit T. (2003) Angiogenesis and myogenesis as two facets of inflammatory post-ischemic tissue regeneration. *Mol Cell Biochem* **246**: 57–67
- Schroder HM, Hoffmann SC, Hecker M, Korff T, Ludwig T. (2013) The tetraspanin network modulates MT1-MMP cell surface trafficking. *Int J Biochem Cell Biol.* **45** : 1133–1144
- Schubert W, Zimmermann K, Cramer M, Starzinski-Powitz A. (1989) Lymphocyte antigen Leu-19 as a molecular marker of regeneration in human skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 307–331
- Schultz E et McCormick KM. (1994) Skeletal muscle satellite cells. *Rev.Physiol Biochem.Pharmacol.* **123**: 213-257
- Schultz E, Gibson MC, Champion T. (1978) Satellite cells are mitotically quiescent in mature mouse muscle: An EM and radioautographic study. *J Exp Zool* **206**: 451–456
- Schultz E. (1996) Satellite cell proliferative compartments in growing skeletal muscles. *Dev Biol* **175**: 84–94
- Schwander M, Leu M, Stumm M, Dorchie OM, Ruegg UT, Schittny J, et al. (2003) Beta1 integrins regulate myoblast fusion and sarcomere assembly. *Dev Cell.* **4**: 673–685
- Sciorati C, Buono R, Azzoni E, Casati S, Ciuffreda P, D'Angelo G. (2010) Co-administration of ibuprofen and nitric oxide is an effective experimental therapy for muscular dystrophy, with immediate applicability to humans. *Br J Pharmacol.* **160**: 1550-1560
- Sciote JJ, Morris TJ. (2000) Skeletal muscle function and fibre types: the relationship between occlusal function and the phenotype of jaw-closing muscles in human. *J Orthod.* **27**: 15-30
- Scriven DR, Dan P, Moore ED. (2000) Distribution of proteins implicated in excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *Biophys. J.* **79**: 2682-2691
- Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, Rudnicki MA. (2000) Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* **102**: 777–786

- Seo AY, Xu J, Servais S, Hofer T, Marzetti E, Wohlgemuth SE, Knutson MD, Chung HY, Leeuwenburgh C. (2008) Mitochondrial iron accumulation with age and functional consequences. *Aging Cell* **7**: 706–716
- Shapiro F, Zurakowski D, Bui T, Darras BT. (2014) Progression of spinal deformity in wheelchair-dependent patients with Duchenne muscular dystrophy who are not treated with steroids: coronal plane (scoliosis) and sagittal plane (kyphosis, lordosis) deformity. *Bone Joint J.* **96-B**: 100-105
- Sharp NH, Kornegay JN, Van Camp SD, Herbstreith MH, Secore SL, Kettle S, Hung WY, Constantinou CD, Dykstra MJ, Roses AD, et al. (1992) An error in dystrophin mRNA processing in golden retriever muscular dystrophy, an animal homologue of Duchenne muscular dystrophy. *Genomics.* **13**: 115-121
- Shefer G, Rauner G, Tablonka-Reuveni Z, Benayahu D. (2010) Reduced satellite cell numbers and myogenic capacity in aging can be alleviated by endurance exercise. *PLoS ONE* **5**, e13307
- Shelton M, Metz J, Liu J, Carpenedo RL, Demers SP, Stanford WL, Skerjanc IS. (2014) Derivation and Expansion of PAX7-Positive Muscle Progenitors from Human and Mouse Embryonic Stem Cells. *Stem Cell Reports.* **3**: 516–529
- Sherwood RI, Christensen JL, Conboy IM, Conboy MJ, Rando TA, Weissman IL, Wagers AJ. (2004) Isolation of adult mouse myogenic progenitors: functional heterogeneity of cells within and engrafting skeletal muscle. *Cell.* **119**: 543-554
- Shi S, Gronthos S. (2003) Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res.* **18**: 696-704
- Shi X, Garry DJ. (2006) Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes & Development* **20**: 1692-1708
- Shiaffino S, Reggiani C. (2011). Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol. Rev.* **91**: 1447-1531
- Sicinski P, Geng Y, Ryder-Cook AS, Barnard EA, Darlison MG, Barard PJ. (1989) The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science.* **30**: 1570-1580
- Simmons PJ, Masinovsky B, Longenecker BM, Berenson R, Torol-Storb B et al. (1992) Vascular cell adhesion molecule-1 expressed by bone marrow stromal cells mediates the binding of hematopoietic progenitor cells. *Blood* **80**: 388-395
- Sinanan AC, Hunt NP, Lewis MP. (2004) Human adult craniofacial muscle-derived cells: Neural-cell adhesion-molecule (NCAM; CD56)-expressing cells appear to contain multipotential stem cells. *Biotechnol Appl Biochem.* **40**: 25–34
- Singh S, Chen Y, Matsumoto A, Orlicky DJ, Dong H, Thompson DC, Vasiliou V. (2015) ALDH1B1 links alcohol consumption and diabetes. *Biochem Biophys Res Commun.* **463**: 768-773
- Skuk D, Goulet M, Roy B, Piette V, Côté CH, Chapdelaine P, et al. (2007) First test of a “high-density injection” protocol for myogenic cell transplantation throughout large volumes of muscles in a Duchenne muscular dystrophy patient: eighteen months follow-up. *Neuromuscul Disord.* **17**: 38–46
- Skuk D, Goulet M, Roy B. (2006) Dystrophin expression in muscles of Duchenne muscular dystrophy patients after high-density injections of normal myogenic cells. *J Neuropathol Exp Neurol* **65**: 371–386

- Skuk D, Goulet M, Tremblay JP. (2011) Transplanted myoblasts can migrate several millimeters to fuse with damaged myofibers in nonhuman primate skeletal muscle. *J Neuropathol Exp Neurol.* **70**: 770-778
- Skuk D, Tremblay JP. (2014) First study of intra-arterial delivery of myogenic mononuclear cells to skeletal muscles in primates. *Cell Transplant.* **23**
- Skuk D. (2004) Myoblast transplantation for inherited myopathies: a clinical approach. *Expert Opin Biol Ther.* **4**: 1871-1885
- Sládek NE. (1999) Aldehyde dehydrogenase-mediated cellular relative insensitivity to the oxazaphosphorines. *Curr Pharm Des* **5**: 607–625
- Sladek NE. (2002) Human Aldehyde Dehydrogenase: Potential Pathological, Pharmacological, and Toxicological Impact. *J Biochem Molecular Toxicology* **17**: 7-23
- Smith JE, Reese TS. (1980) Use of aldehyde fixatives to determine the rate of synaptic transmitter release. *J Exp Biol.* **89**: 19-29
- Sobreira TJ, Marlétaz F, Simões-Costa M, Schechtman D, Pereira AC, Brunet F, Sweeney S, Pani A, Aronowicz J, Lowe CJ, Davidson B, Laudet V, Bronner M, de Oliveira PS, Schubert M, Xavier-Neto J. (2011) Structural shifts of aldehyde dehydrogenase enzymes were instrumental for the early evolution of retinoid-dependent axial patterning in metazoans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **108**: 226-231
- Sondergaard CS, Hess DA, Maxwell DJ, Weinheimer C, Rosová I, Creer MH, Piwnicka-Worms D, Kovacs A, Pedersen L, Nolte JA. (2010) Human cord blood progenitors with high aldehyde dehydrogenase activity improve vascular density in a model of acute myocardial infarction. *J Transl Med.* **8**: 24
- Sophos NA, Vasiliou V. (2003) Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2002 update. *Chem Biol Interact.* **143-144**: 5-22
- Soriano P (1994) Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice. *Genes Dev.* **8**: 1888-1896
- Soriano P. (1994) Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF β -receptor mutant mice. *Genes & Dev.* **8**: 1888–1896
- Sousa-Victor P, et al. (2014) Geriatric muscle stem cells switch reversible quiescence into senescence. *Nature.* **506**: 316–321
- Spada F, Fuoco C, Pirrò S, Paoluzi S, Castagnoli L, Gargioli C, Cesareni G. (2016) Characterization by mass cytometry of different methods for the preparation of muscle mononuclear cells. *N Biotechnol.* **25**: 514-523
- Stagos D, Chen Y, Brocker C, Donald E, Jackson BC, Orlicky DJ, Thompson DC, Vasiliou V. (2010) Aldehyde dehydrogenase 1B1: molecular cloning and characterization of a novel mitochondrial acetaldehyde-metabolizing enzyme. *Drug Metab Dispos.* **38**: 1679-1687
- Stangel-Wojcikiewicz K, Majka M, Basta A, Stec M, Pabian W, Piwowar M, et al. (2010) Adult stem cells therapy for urine incontinence in women. *Ginekol Pol.* **81**: 378–381
- Staunton L, O’Connell K, Ohlendieck K. (2011) Proteomic profiling of mitochondrial enzymes during skeletal muscle aging. *J. Aging Res.* **2011**: 908035
- Steinmetz CG, Xie P, Weiner H, Hurley TD. (1997) Structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: the genetic component of ethanol aversion. *Structure* **5**: 701–711

- Sterrenburg E, Turk R, 't Hoen PA, van Deutekom JC, Boer JM, van Ommen GJ, den Dunnen JT. (2004) Large-scale gene expression analysis of human skeletal myoblast differentiation. *Neuromuscul Disord.* **14**: 507-518
- Stewart MJ, Malek K, Crabb DW. (1996) Distribution of messenger RNAs for aldehyde dehydrogenase 1, aldehyde dehydrogenase 2, and aldehyde dehydrogenase 5 in human tissues. *J Investig Med.* **4**: 442-446
- Stopp S, Bornhäuser M, Ugarte F, Wobus M, Kuhn M, Brenner S, Thieme S. (2013) Expression of the melanoma cell adhesion molecule in human mesenchymal stromal cells regulates proliferation, differentiation, and maintenance of hematopoietic stem and progenitor cells. *Haematologica.* **98**: 505-513
- Storms RW, Green PD, Safford KM, Niedzwiecki D, Cogle CR, Colvin OM, Chao NJ, Rice HE, Smith CA. (2005) Distinct hematopoietic progenitor compartments are delineated by the expression of aldehyde dehydrogenase and CD34. *Blood.* **106**: 95–102
- Storms RW, Trujillo AP, Springer JB, Shah L, Colvin OM, Ludeman SM, Smith C. (1999) Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**: 9118-9123
- Strickland KC, Krupenko NI, Dubard ME, Hu CJ, Tsybovsky Y, Krupenko SA. (2011) Enzymatic properties of ALDH1L2, a mitochondrial 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase. *Chem Biol Interact* **191**: 129–136

-T-

- Tachibana I, Hemler ME. Role of transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins CD9 and CD81 in muscle cell fusion and myotube maintenance. (1999) *J Cell Biol.* **146**: 893–904
- Tajbakhsh S. (2009) Skeletal muscle stem cells in developmental versus regenerative myogenesis. *J Intern Med* **266**: 372–389
- Tanei T, Morimoto K, Shimazu K, Kim SJ, Tanji Y, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S. (2009) Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential Paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers. *Clin Cancer Res.* **15**: 4234-4241
- Tawil R, Van Der Maarel SM. (2006) Facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Muscle Nerve.* **34**: 1-15
- Tedesco FS, Dellavalle A, Diaz-Manera J, Messina G, Cossu G. (2010) Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. *J Clin Invest.* **120**: 11-19
- Tedesco FS, Gerli MF, Perani L, Benedetti S, Ungaro F, Cassano M, Antonini S, Tagliafico E, Artusi V, Longa E, Tonlorenzi R, et al. (2012) Transplantation of genetically corrected human iPSC-derived progenitors in mice with limb-girdle muscular dystrophy. *Sci Transl Med.* **4**: 140ra89
- Ten Broek RW, Grefte S, Von den Hoff JW. (2010) Regulatory factors and cell populations involved in skeletal muscle regeneration. *J Cell Physiol.* **224**: 7-16
- Teng YD, Lavik EB, Qu X, Park KI, Ourednik J, Zurakowski D, Langer R, Snyder EY. (2002) Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**: 3024-3029

- Terman A, Brunk UT. (2004) Myocyte aging and mitochondrial turnover. *Exp. Gerontol.* **39**: 701–705
- Testore G, Cravanzola C, Bedino S. (1999) Aldehyde dehydrogenase from rat intestinal mucosa: purification and characterization of an isozyme with high affinity for gamma- aminobutyraldehyde. *Int J Biochem Cell Biol.* **31**: 777-786
- Tessmar K, Loosli F, Wittbrodt J. (2002) A screen for co-factors of Six3. *Mech Dev* **117**: 103–113
- Thomas DR. (2007) Loss of skeletal muscle mass in aging: examining the relationship of starvation, sarcopenia and cachexia. *Clin. Nutr.* **26**: 389–399
- Tidball JG (1995) Inflammatory cell response to acute muscle injury. *Med Sci Sports Exerc* **27**: 1022–1032
- Tidball JG (2005) Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **288**: 345–353
- Tidball JG (2011) Mechanisms of muscle injury, repair, and regeneration. *Compr Physiol* **1**: 2029–2062
- Tidball JG, Law DJ. (1991) Dystrophin is required for normal thin filament-membrane associations at myotendinous junctions. *Am. J. Pathol.* **138**:17-21
- Tidball JG, Wehling-Henricks M (2007) Macrophages promote muscle membrane repair and muscle fibre growth and regeneration during modified muscle loading in mice in vivo. *J Physiol* **578**: 327–336
- Tohyama Y, Takano T, Yamamura H. (2004) B cell responses to oxidative stress. *Curr. Pharm. Des.* **10**: 835-839
- Tomita H, Tanaka K, Tanaka T, Hara A. (2016) Aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer. *Oncotarget.* **7**:11018-11032
- Torrente Y, Belicchi M, Marchesi C, D'Antona G, Cogiamanian F, Pisati F, Gavina M, Giordano R, Tonlorenzi R, et al. (2007) Autologous transplantation of muscle-derived CD133+ stem cells in Duchenne muscle patients. *Cell Transplant.* **16**: 563-577
- Torrente Y, Belicchi M, Sampaolesi M et al. (2004) Human circulating AC133(+) stem cells re- store dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle. *J Clin Invest* **114**: 182–195
- Torrente Y, Tremblay JP, Pisati F, Belicchi M, Rossi B, Sironi M, Fortunato F, El Fahime M, D'Angelo MG, Caron NJ, Constantin G, Paulin D, Scarlato G, Bresolin N. (2001) Intraarterial injection of muscle-derived CD34(+)/Sca-1(+) stem cells restores dystrophin in mdx mice. *J Cell Biol.* **152**: 335-348
- Tortora, GJ, Grabowski SR, & al. (1994) Principe d'anatomie et de physiologie. Anjou, CEC collégial et universitaire
- Toumi H, Best TM (2003) The inflammatory response: friend or enemy for muscle injury? *Br J Sports Med* **37**: 284–286
- Touznik A, Lee J, Yokota T. (2014) New developments in exon skipping and splice modulation therapies for neuromuscular diseases. *Expert Opin Biol Ther* **14**: 809–819

-U-

- Unguryte A, Bernotiene E, Bagdonas E, Garberyste S, Porvaneckas N, Jorgensen C. (2015) Human articular chondrocytes with higher aldehyde dehydrogenase activity have stronger expression of COL2A1 and SOX9. *Osteoarthritis Cartilage*. **24**: 873-882

-V-

- Vaittinen S, Lukka R, Sahlgren C, Hurme T, Rantanen J, Lendahl U, Eriksson JE, Kalimo H. (2001) The expression of intermediate filament protein nestin as related to vimentin and desmin in regenerating skeletal muscle. *J Neuropathol Exp Neurol* 60: 588–59

- Valentine BA, Winand NJ, Pradhan D, Moise NS, de Lahunta A, Kornegay JN, Cooper BJ. (1992) Canine X-linked muscular dystrophy as an animal model of Duchenne muscular dystrophy: a review. *Am J Med Genet*. **42**: 352-356

- Valle DL, Phang JM, Goodman SI. (1974) Type 2 hyperprolinemia: Absence of delta1-pyrroline-5-carboxylic acid dehydrogenase activity. *Science*. **185**: 1053-1054

- van Mourik JA, Leeksa OC, Reinders JH, de Groot PG, Zandbergen-Spaargaren J. (1985) Vascular endothelial cells synthesize a plasma membrane protein indistinguishable from the platelet membraneglycoprotein IIa. *J. Biol. Chem.* 260: 11300-11306

- Vasiliou V, Nebert DW. (2005) Analysis and update of the human aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene family. *Hum Genomics* **2**: 138–143

- Vasiliou V, Pappa A, Estey T. (2004) Role of human aldehyde dehydrogenases in endobiotic and xenobiotic metabolism. *Drug Metab Rev.* **36**: 279-9

- Vasiliou V, Pappa A. (2000) Polymorphisms of human aldehyde dehydrogenases. Consequences for drug metabolism and disease. *Pharmacology*. **61**:192-198

- Vasiliou V, Thompson DC, Smith C, Fujita M, Chen Y. (2013) Aldehyde dehydrogenases: from eye crystallins to metabolic disease and cancer stem cells. *Chem Biol Interact.* **202**: 2-10

- Vauchez K, Marolleau JP, Schmid M, Khattar P, Chapel A, Catelain C, Lecourt S, Larghéro J, Fiszman M, Vilquin JT. (2009) Aldehyde dehydrogenase activity identifies a population of human skeletal muscle cells with high myogenic capacities. *Mol Ther.* **17**: 1948-1958

- Vaz FM, Fouchier SW, Ofman R, et al. (2000). Molecular and biochemical characterization of rat gamma-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase and evidence for the involvement of human aldehyde dehydrogenase 9 in carnitine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **275**: 7390–7394

- Vaz FM, Scholte HR, Ruiter J, Hussaarts-Odijk LM, Pereira RR, Schweitzer S, de Klerk JB, Waterham HR, Wanders RJ. (1999) Identification of two novel mutations in OCTN2 of three patients with systemic carnitine deficiency. *Hum Genet.* **105**: 157-161

- Vella JB, Thompson SD, Bucsek MJ, Song M, Huard J. (2011) Murine and human myogenic cells identified by elevated aldehyde dehydrogenase activity: implications for muscle regeneration and repair. *PLoS One.* **6**: e29226

- Verdijk LB, Snijders T, Drost M, Delhaas T, Kadi F, van Loon LJ. (2014) Satellite cells in human skeletal muscle; from birth to old age. *Age (Dordr).* **36**: 545-547

- Vilquin JT, Brussee V, Asselin I, Kinoshita I, Gingras M, Tremblay JP. (1998) Evidence of mdx mouse skeletal muscle fragility in vivo by eccentric running exercise. *Muscle Nerve* : 21(5):567-76.

- Vilquin JT, Catelain C, Vauchez K. (2011) Cell therapy for muscular dystrophies: advances and challenges. *Curr Opin Organ Transplant* : 16(6):640-9
- Vilquin JT, Marolleau JP, Sacconi S, Garcin I, Lacassagne MN, Robert I, Ternaux B, Bouazza B, Larghero J, Desnuelle C. (2005) Normal growth and regenerating ability of myoblasts from unaffected muscles of facioscapulohumeral muscular dystrophy patients. *Gene Ther.* **12**: 1651-1662
- Vinciguerra M, Musaro A, Rosenthal N. (2010) Regulation of muscle atrophy in aging and disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 694: 211–233

-W-

- Wagers, A. J. and I. M. Conboy. (2005) Cellular and molecular signatures of muscle regeneration: current concepts and controversies in adult myogenesis. *Cell.* **122**: 659-667
- Wall TL, Johnson ML, Horn SM, Carr LG, Smith TL, Schuckit MA. (1999) Evaluation of the self-rating of the effects of alcohol form in Asian Americans with aldehyde dehydrogenase polymorphisms. *J Stud Alcohol.* **60**: 784-789
- Wanagat J, Cao Z, Pathare P, Aiken JM. (2001) Mitochondrial DNA deletion mutations colocalize with segmental electron transport system abnormalities, muscle fiber atrophy, fiber splitting, and oxidative damage in sarcopenia. *FASEB J.* 15: 322–332
- Wang B, Li J, Xiao X. (2000) Adeno-associated virus vector carrying human minidystrophin genes effectively ameliorates muscular dystrophy in mdx mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 13714-13719
- Wang B, Miyagoe-Suzuki Y, Yada E, Ito N, Nishiyama T, Nakamura M, Ono Y, Motohashi N, Segawa M, Masuda S, Takeda S. (2011) Reprogramming efficiency and quality of induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) generated from muscle-derived fibroblasts of mdx mice at different ages. *PLoS Curr.* **3**: RRN1274
- Wang C, Kane MA, Napoli JL. (2011) Multiple retinol and retinal dehydrogenases catalyze all-trans-retinoic acid biosynthesis in astrocytes. *J Biol Chem.* **286**: 6542-6553
- Wang D, Chen K, Du WT, Han ZB, Ren H et al. (2010) CD14+ monocytes promote the immunosuppressive effect of human umbilical cord matrix stem cells. *Exp Cell Res* **316**: 2414-2423
- Wang MF, Han CL, Yin SJ. (2009) Substrate specificity of human and yeast aldehyde dehydrogenases. *Chem. Biol. Interact.* **178**: 36-39
- Weintraub H, Davis R, Tapscott S, Thayer M, Krause M, Benezra R, Blackwell TK, Turner D, Rupp R, Hollenberg S et al. (1991) The myoD gene family: Nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science* **251**: 761–766
- Westenbroek RE, Bischoff S, Fu Y, Maier SK, Catterall WA, Scheuer T. (2013) Localization of sodium channel subtypes in mouse ventricular myocytes using quantitative immunocytochemistry. *J Mol Cell Cardiol.* **64**: 69-78
- Wilschut KJ, van Tol HT, Arkesteijn GJ, Haagsman HP, Roelen BA. (2011) Alpha 6 integrin is important for myogenic stem cell differentiation. *Stem Cell Res.* **7**: 112-1123

-X-

- Xavier-Neto J, Sousa Costa ÂM, Figueira AC, Caiaffa CD, Amaral FN, Peres LM, da Silva BS, Santos LN, Moise AR, Castillo HA. (2015) Signaling through retinoic acid receptors in cardiac development: Doing the right things at the right times. *Biochim Biophys Acta.* **1849**: 94-111
- Xiao T, Shoeb M, Siddiqui MS, Zhang M, Ramana KV, Srivastava SK, Vasiliou V, Ansari NH. (2009) Molecular cloning and oxidative modification of human lens ALDH1A1: implication in impaired detoxification of lipid aldehydes. *J Toxicol Environ Health A* **72**: 577–584
- Xu X, Wilschut KJ, Kouklis G, Tian H, Hesse R, Garland C, Sbitany H, Hansen S, Seth R, Knott PD, Hoffman WY, Pomerantz JH. (2015) Human Satellite Cell Transplantation and Regeneration from Diverse Skeletal Muscles. *Stem Cell Reports.* **5**: 419-434

-Y-

- Yao L, Fan P, Arolfo M, Jiang Z, Olive MF, Zablocki J, Sun HL, Chu N, Lee J, Kim HY, et al. (2010) Inhibition of aldehyde dehydrogenase-2 suppresses cocaine seeking by generating THP, a cocaine use-dependent inhibitor of dopamine synthesis. *Nat Med* **16**: 1024–1028
- Yin H, Price F, Rudnicki M.A. (2011) Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol. Rev.* **93**: 23–67
- Yoshida A, Rzhetsky A, Hsu LC, Chang C. (1998) Human aldehyde dehydrogenase gene family. *Eur J Biochem* **251**: 549–557
- Yoshida A, Rzhetsky A, Hsu LC, Chang C. (1999) Human aldehyde dehydrogenase gene family. *Eur J Biochem.* **251**: 549-557
- Yui R, Ohno Y, Matsuura ET. (2003). Accumulation of deleted mitochondrial DNA in aging *Drosophila melanogaster*. *Genes Genet. Syst.* **78**: 245–251

-Z-

- Zemljic-Harpf AE, Godoy JC, Platoshyn O, Asfaw EK, Busija AR, Domenighetti AA, Ross RS. (2014) Vinculin directly binds zonula occludens-1 and is essential for stabilizing connexin-43-containing gap junctions in cardiac myocytes. *J Cell Sci.* **127**: 1104-1116
- Zhang C, Cheng YJ, Chen J, Wickline S, Wang LV (2012) Label-free photoacoustic microscopy of myocardial sheet architecture. *J Biomed Opt.* **17**: 060506
- Zhao D, McCaffery P, Ivins KJ, Neve RL, Hogan P, Chin WW, Dräger UC. (1996) Molecular identification of a major retinoic-acid-synthesizing enzyme, a retinaldehyde-specific dehydrogenase. *Eur J Biochem.* **240**: 15-22
- Zhao T, Zhang ZN, Rong Z, Xu Y. (2011) Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature.* **474**: 212-215
- Zhao W, Lu H, Wang X, Ransohoff RM, Zhou L (2016) CX3CR1 deficiency delays acute skeletal muscle injury repair by impairing macrophage functions. *FASEB J* **30**: 380–393
- Zhao X, Sirbu IO, Mic FA, Molotkova N, Molotkov A, Kumar S, Duester G. (2009) Retinoic acid promotes limb induction through effects on body axis extension but is unnecessary for limb patterning. *Curr Biol.* **19**: 1050-1057

- Zhao X, Weisleder N, Thornton A, Oppong Y, Campbell R, Ma J, Brotto M. (2008). Compromised store-operated Ca²⁺ entry in aged skeletal muscle. *Aging Cell* **7**: 561–568
- Zheng B, Cao B, Crisan M, et al. (2007) Prospective identification of myogenic endothelial cells in human skeletal muscle. *Nat Biotechnol.* **25**: 1025–1034
- Zhou P, Hohm S, Olusanya Y, Hess DA, Nolte J. (2009). Human progenitor cells with high aldehyde dehydrogenase activity efficiently engraft into damaged liver in a novel model. *Hepatology.* **49**: 1992-2000
- Zhu CC, Dyer MA, Uchikawa M, Kondoh H, Lagutin OV, Oliver G. (2002) Six3-mediated auto repression and eye development requires its interaction with members of the Groucho-related family of co-repressors. *Development* **129**: 2835–2849

Annexes

- **Annexe 1** : Curriculum vitae
- **Annexe 2** : Article en soumission
 - « **Characterization and cardiogenic capacities of non-human primate skeletal muscle cells expressing Aldehyde dehydrogenase activity** »
- **Annexe 3** : Article publié (Médecine/Science)
 - « **Thérapies cellulaires des cardiopathies – Evolution du paradigme** »

Jessy ETIENNE+

Expériences de Laboratoire+

Stages+ !

" *Caractérisation du lignage cellulaire exprimant Notch1 dans le colon et implication de l'activation de Notch dans le cancer colorectal.*

Département!Biologie!et!Génétique!!

Institut!Curie!!

(Avril"Juin!2012,!Encadrant!:!S.!FRE)!

" *Caractérisation des progéniteurs musculaires cellulaires exprimant les Aldéhyde déhydrogénase (ALDH) dans des modèles sains et pathologiques.*

Régénération,! Physiologie! &! Approches! thérapeutiques! :!
modèles!cellulaires!!

Centre!de!recherche!en!Myologie!!

(Janvier"Juin!2013,!Encadrant!:!JT.!VILQUIN)!

Projet de thèse+

" *Caractérisation des progéniteurs musculaires cellulaires exprimant les Aldéhyde déhydrogénase (ALDH) dans des modèles sains et pathologiques.*

Régénération,! Physiologie! &! Approches! thérapeutiques! :!
modèles!cellulaires!!

Centre!de!recherche!en!Myologie!!

!(October!2013"!December!2016,!Encadrant!:!JT.!VILQUIN)!

PUBLICATION+

Posters++

" *Identification of muscle cells expressing aldehyde dehydrogenase in Healthy and DMD patients and models, and their changes with ageing,*

5^{ème}!Congrès!International!de!Myologie!/Myology!2016,!!

Lyon,!14"18!Mars!2016.!

" *Characterisation of muscle cells expressing aldehyde dehydrogenase*

Symposium!de!jeunes!chercheurs!-!AFM!Téléthon,!!

Paris,!12!Juin!2015!

" *Changes in ALDH⁺ muscle cell populations with ageing in healthy and DMD patients and models*

13^{ème}!Congrès!International!des!maladies!neuromusculaires!!

Nice,!France,!05"10!Juillet!2014!

" *Changes in ALDH⁺ muscle cell populations with ageing in healthy and DMD patients and models*

6^{ème}! symposium! annuel! des! DIM! Biothérapies! et! DIM!

Cardiovasculaire/Obésité/rein!/Diabète!

" *Phenotypic characterisations and therapeutical potential of muscle progenitor cells expressing Aldehyde dehydrogenase*

5^{ème}!symposium!annuel!des!DIM!Biothérapies!et!DIM!Cerveau!et!
Pensée!!

Paris,!25!Novembre!2013!

+

Papiers+!!

" *Several aldehyde dehydrogenase isoenzymes participate to skeletal muscle homeostasis In Human, Macaque, and Dog!*
(premier!auteur,!en!préparation)!

" *Characterization and cardiogenic capacities of non-human primate skeletal muscle cells expressing Aldehyde Dehydrogenase activity!*
(en!preparation)



!!!!!!!

!

31! avenue! des! Frères! Lumière,!
Appart.!247!

!

(+33)!607628905!

!

[jessy.etienne@hotmail.fr!](mailto:jessy.etienne@hotmail.fr)

[j.etienne@institutmyologie.org!](mailto:j.etienne@institutmyologie.org)

!

26/11/1990!(26)!

!

Célibataire!

!

Permis!de!conduire!

!

COMPETENCES+

Cytométrie! de! flux! (FASCalibur! and!
CellQuest!Software!/!FACS Aria!II!and!

Diva),! Image! J,! Western! Blot,!

Immunocytofluorescence,!

Expérimentation! animale,!

Dissociation! enzymatique,!

Préparation!d'ARNm!et!de!protéines,!

Culture!de!cellules!musculaires,!PCR,!

Microscopie!confocale!

!

!

LANGUAGES+

Français!/Créole!Français!:!Maîtrise!

Anglais!:!Intermédiaire!

Espagnol!:!Elémentaire!!

!

!

QUALITES PERSONNELLES+

Capacités! de! travail! autonome! et! en!
équipe!

Esprit!critique!et!de!synthèse!

Excellentes! relations!

interpersonnelles!

!

!

.

FORMATION+

Expérimentation animale Niveau 4 (éthique et "bien-être")+

Paris!VI!-!Paris!Sorbonnes,!14"15!Septembre!2015!

« Entraînez-vous à la prise de parole en public »+

!Paris!VI!-!Paris!Sorbonnes,!19!Decembre!2014!!

« Conduisez efficacement vos entretiens et vos réunions »+

Paris!VI!-!Paris!Sorbonnes,!17!Novembre!2014!!

« Communication écrite et orale Paris »+

!Paris!VI!-!Paris!Sorbonnes,!12!Novembre!2015!!

« Pratiques managériales + Principes généraux »+

!Paris!VI!-!Paris!Sorbonnes,!07!Novembre!2015!!

« Doctoriales @ 2014 Paris »+

!Paris!VI!-!Paris!Sorbonnes,!07"10!Avril!2014!!

Entrepreneuriat innovant+

Université!Paris!VI!-!Paris!Sorbonnes!et!Aroganov,!28!Mars!2014!

Master de Biologie Cellulaire Physiologie et Pathologie (BCPP)+

specialisation!Biologie!du!Vieillessement!!

Université!Paris!VII"!Paris!Diderot!(2011"2013)!

Licence de Biologie Cellulaire Physiologie (BCP)+

Université!Paris!VII"!Paris!Diderot!(2009"2010)!

!

!

!

Characterization and cardiogenic capacities of non-human primate skeletal muscle cells expressing Aldehyde Dehydrogenase activity.

Cyril Catelain Ph.D.¹, Stéphanie Riveron M.Sc.¹, Karine Vauchez Ph.D.¹, Jessy Etienne M. Sc.¹, Erica Yada Ph.D.¹, Anne-Sophie Pellen M. Sc.¹, Pierre Joanne, Onnik Agbulut, Jean-Thomas Vilquin Pharm.D., Ph.D.^{1*}

¹ Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM UMRS974, CNRS FRE3617, Center for Research in Myology, F-75013, Paris, France

*Corresponding author: Jean-Thomas Vilquin, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM UMRS974, CNRS FRE3617, Center for Research in Myology, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Bâtiment Babinski, 47 Boulevard de l'Hôpital, 75651 Paris Cedex 13, France.

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

Phone: +33 1 42 16 57 14 - Fax: +33 1 42 16 57 00

Abstract (250 words):

Cell therapy approaches are developed in the indication of heart failure to circumvent the cardiac remodeling and improve local contractility. Several cellular candidates have demonstrated limited efficacy due to poor survival and integration *in vivo*. Aldehyde deshydrogenases (ALDH) constitute a family of intracellular enzymes involved in metabolism and detoxification of aldehydes through oxidation and promote cell survival. Some ALDH isoenzymes produce the retinoic acid involved in cardiogenic differentiation pathways. ALDH is considered a marker of several stem cell types, detected using the fluorescent substrate Aldefluor. Within primate skeletal muscle tissues, we previously identified an ALDH⁺/34⁻ population presenting a myogenic capacity *in vitro* and participating to muscle regeneration *in vivo* upon intramuscular administration. We first extended the phenotypic characterization of non-human primate ALDH⁺ cells, highlighting their association with CD9, CD10, CD29, CD36, CD44, CD49a, CD49c, CD49e, CD56, CD106, CD146, CD184. Based on their stemness and versatility, we designed a combination of cytokines including BMP2, BMP4, IGF1 and bFGF which committed ALDH⁺/CD34⁻ cells into cardiogenic-like cells expressing GATA4 and NKx2.5 *in vitro*. Upon transplantation of induced cells from non Human Primates into the myocardium of immunodeficient mice, we observed their presence one month later, based on the expression of donor-specific antigens within the recipient environment. Some of these cells expressed markers of cardiomyocytes and presented a cardiac-like morphology. This experimental

setting would represent a first proof of the usefulness of ALDH⁺ progenitors to promote myocardial repair in the context of heart failure.

Introduction

Cell transplantation is actively investigated as a strategy to improve cardiac structure and function in the indication of heart failure, which becomes one major cause of morbidity and mortality in the 21st century (Berry). A variety of cells have been contemplated up to clinical trials, mainly in the setting of ischemic cardiomyopathy (Menasche 2011), including skeletal myoblasts, bone marrow mononuclear cells, circulating endothelial progenitor cells, mesenchymal cells, cardiac progenitors of cardiac origin. Crude preparations or cells expanded and committed *in vitro* were used. Despite encouraging results, trials failed to illustrate the ability of transplanted cells to differentiate *in vivo* into cardiomyocytes, suggesting that the improvements in myocardial efficiency were mainly due to paracrine effects (Menasche 2011; Murry 2006; Perez-Ilzarbe 2011). Their real efficacy is presently under scrutiny at the fundamental and clinical levels (Van Berlo *et al.*, Nowbar *et al.*). The clinical use of Embryonic stem cells is still limited by their allogenicity, stability, and extent of terminal differentiation, which may be challenged by their selection and their combination with biomaterials (Menasche *et al.* 2014, 2015). All these limitations mandate the identification of new cell types with cardiogenic capacities.

Although conceptually challenging and intriguing, the presence of cell populations presenting cardiogenic capacities within the skeletal muscle tissues has been suggested by different groups, most studies being based on rodent cells [Abdel-Latif, Arsic, Clause, Shibuya, Winitsky]. In some studies, specific treatments of cells are required to coax a cardiogenic differentiation, for example, co-cultures on mouse cells, three-dimensional gel bioreactor, formation of myspheres [Arsic, Iijima, Nomura, Poulet, Tamaki]. In most studies, the expression of cardiac markers has been assessed *in vitro* only, without further functional evaluation *in vivo*. Very few studies addressed the cardiogenic differentiation of Primate skeletal muscle cells *in vivo*. One report used expanded cells and a treatment with retinoic acid [Invernici], however the number of cells produced was limited. One report is based on the selection of Human muscle CD34⁺ cells, which however did not directly differentiate into cardiac tissue [Proksch].

Aldehyde dehydrogenases (ALDH) are intracellular enzymes involved in oxidation of aldehydes into the corresponding acids. They detoxify biogenic and xenobiotic aldehydes, conferring resistance to some anti-cancer drugs (Balber; Jackson *et al.*; Sobreira *et al.*) and a survival advantage when confronted to oxidative stress *in vitro* or *in vivo* (Jean *et al.*; Vella *et al.*; El Haddad *et al.*). Several isoenzymes are involved in the production of retinoic acid from retinal, and therefore play a pivotal

role in retinoid-dependent differentiation pathways (Sobreira *et al.*; Lewandoski et Mackem; Keegan *et al.*). ALDH are markers of functional activity and are expressed by primitive progenitors identified in bone marrow (Gentry *et al.*; Lioznov *et al.*), umbilical cord blood (Gentry *et al.*; Hess *et al.*; Storms *et al.*), peripheral blood (Lioznov *et al.*; Fallon *et al.*; Povsic *et al.*), neural, liver, pancreatic, epithelial, angiogenic (Capoccia *et al.*; Corti *et al.*) and cardiac tissues (Konninckx *et al.*; Roehrich *et al.*), suggesting tissue-oriented differentiation capacities of ALDH-positive cell subsets. Based on CD34 co-expression, we identified previously two populations of cells exhibiting ALDH activities within human skeletal muscle biopsies (Vauchez *et al.*), and illustrated that ALDH⁺/CD34⁻ cells have a myogenic capacity *in vitro* and *In vivo*, while ALDH⁺/34⁺ cells have a non myogenic mesenchymal profile. The ALDH⁺/34⁻ cells of skeletal muscle could be considered as a tool for cell therapy of degenerative diseases, raising the question of a cardiac counterpart. To assess whether the differentiation of ALDH⁺ populations may be coaxed by the environmental cues or by culture conditions, as observed using embryonic or mesenchymal stem cells (Bartunek *et al.*, Behfar *et al.*), we established and compared the phenotypes of non-human primates cell populations extracted from cardiac and skeletal muscle biopsies. We capitalized on the expression of ALDH by the selected progenitors to produce the retinoic acid involved in heart and/or skeletal muscle patterning and development [Keegan]. We report here the use of a defined cocktail of cytokines consisting of bFGF, BMP-2, BMP-4 and IGF-1, that enabled the commitment of ALDH⁺/CD34⁻ populations of cells into cardiomyocyte-like lineage by enhancement of the expression of cardiac differentiation factors such as GATA-4, Nkx2.5 and Islet-1. Then, we assessed and compared their integration capacities within immunodeficient mouse myocardium. The cell populations from skeletal muscle fragments displayed the capacity to form cardiomyocyte-like cells *in vivo* after transplantation, while the populations from the cardiac muscle fragments did not.

Materials and Methods

Muscle biopsies : sources and processing

Macaque biopsies were obtained from *Macaca Fascicularis* or *Macaca Mulatta* at the time of sacrifice of these animals which were involved in unrelated protocols. Muscle biopsies were sliced, finely minced and digested for 1 hour at 37°C using 0.2% type II collagenase (Worthington) in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum. Mechanical dissociation was completed by passage of the cell dissociate through a 10 ml pipette, and an 18G needle. The suspension was filtrated through 100 then 40µm cell strainers (Becton-Dickinson). The resulting cell suspensions were centrifuged, washed, and frozen in a medium containing 10% DMSO, 20% FBS and 70% DMEM for later use.

Characterization and quantification of ALDH-expressing cells using Aldefluor reagent and cytofluorimetry

Following thawing and washing, cell suspensions were incubated with the ALDH substrate Aldefluor® (1µM) for 20 min, at 37°C (Stemcell Technologies). Controls were obtained by prior incubation of cells with 50mM of the specific ALDH inhibitor DEAB. Cells were centrifuged, labeled with antibodies directed against extracellular markers (Supplemental Table 1) and analyzed by flow fluorocytometry (FacsCalibur, BD) using the Cell Quest Software. Aldefluor® labeling was also used for cell sorting in combination with labeling of CD34 using a PBS buffer containing 2% FBS and 100µM Verapamil.

Phenotyping of cell populations using antibodies directed against extracellular markers

Extracellular markers were detected by incubations with allophycocyanin (APC)-conjugated antibodies (CD34, CD45, Becton-Dickinson), or Phycoerythrin (PE)-conjugated antibodies (CD9, CD10, CD29, CD31, CD36, CD44, CD47, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD56, CD61, CD71, CD105, CD106, CD133, CD140a, CD140b, CD143, CD146, CD172a, CD184, CD309) at 1/30 (15 min, 4 °C). Non-specific fluorescence was determined using isotype controls (BD). Cells were analyzed by flow fluorocytometry (FacsCalibur, BD) using the Cell Quest Software.

Cell sorting

Following incubation in presence of Aldefluor reagent, then incubation in presence of the anti-CD34 antibody labelled with APC (clone 563, BD), cells were sorted on the basis of both ALDH activity and expression of CD34 using a Vantage SE DiVA (Becton Dickinson).

Cell cultures

Sorted cells were centrifuged, washed and seeded in 6-wells, 12-wells or 24-wells plates depending on their initial number. The cells were induced into the cardiac lineage in a proliferation medium that typically contained 80% modified synthetic custom-made MCDB120 medium (Hyclone), 20% fetal bovine serum (Hyclone), Gentamycin (25µg/ml), and 10 ng/ml of each human recombinant cytokines: bFGF (R&D systems, Lille, France), BMP-2 (Sigma), BMP-4 (R&D systems) and IGF-1 (R&D systems). The medium was changed daily.

Flow cytometry analysis of differentiating cells

At various times after setting of the cultures (24 hours, 48 hours and 72 hours), the cell layers were washed in PBS, fixed in paraformaldehyde 4% in PBS (PFA 4%) 10 min at room temperature, permeabilized using triton (0.2%) 10 min at room temperature, rinsed in PBS and incubated using one antibody directed against a transcriptional factor involved in cardiac differentiation such as Islet-

1 (Rabbit polyclonal, Abcam), Nkx2.5 (clone H-114, Santa Cruz) and GATA-4 (clone H-112, Santa Cruz). Cells were first incubated with the primary Rabbit antibody (Islet-1, Nkx2.5 or GATA-4, 1/50, 90 min at 4°C) followed by the secondary Goat anti-Rabbit antibody linked to a fluorophore (FITC, 1/100 in PBS, 30 min at 4°C) and analyzed by FACS as above.

Preparation of cells and their transplantation into mouse myocardium

The cells treated for 48 to 72h as above were harvested using trypsin-EDTA (0.025%, Invitrogen), suspended in PBS supplemented with 0.5% bovine serum albumin (BSA, Sigma) and kept on ice until injection. All experimental procedures were performed on female age-matched mice according to the guide for the care and use of laboratory animals published by the NIH (publication No. 85-23, revised 1996). Immunodeficient animals (RAG mice and NOD-SCID mice) were anaesthetized using ketamine (75 mg/kg) and xylazine (15 mg/kg) and ventilated (MiniVent, Type845; Hugo Sachs Elektronik, Germany). Upon small left thoracotomy at the level of the 5th intercostal space, 10 000 to 150 000 treated cells were injected at four sites on the anterior-lateral wall of the left ventricle under a total volume of 40µl, using a Hamilton syringe and a 32G needle.

Histological characterization of cell integration

The animals were sacrificed 3 to 4 wks after transplantation under general anesthesia. Hearts were snap frozen in liquid-nitrogen-cooled isopentane and serial cryosections (7 µm) collected in a transverse orientation from apex to basis, in order to ensure a complete overview of cell distribution. Implantation of primate cells in host muscles was evaluated by species-specific labeling of the primate protein lamin A/C (Vector, clone 636 not staining the mouse antigen). Connexin 43 (Rabbit polyclonal, Sigma) staining delineated the membrane of cardiomyocytes. Cardiac troponin I and α -actinin (clone EA-53, Sigma) stained the cytoplasm of cardiomyocytes. Fast skeletal myosin heavy chain (Clone My32, Sigma) stained skeletal muscle fibers and not the cardiac cells. Secondary antibodies were coupled to Alexa fluorophores (350, 488, 568) (1/400 in PBS for 1h). Cells were mounted with Vectashield. Negative controls were obtained by substitution of the primary Ab with fetal bovine serum. Cells were observed using an inverted microscope equipped with fluorescence (Olympus Optical Co).

Results

Phenotypic characterization of muscle cells

The mechanical and enzymatic dissociation of cardiac and skeletal muscle tissues provided cell suspensions, of which small proportions expressed ALDH activity as observed using the Aldefluor

reagent (Figure 1A; right panel). The co-expression of CD34 or its absence delineated two sub-populations. The relative proportion of total ALDH⁺ cells varied according to the anatomical origin of the tissue, from 2.77 % in the Macaque Ventricle to 9% in the Macaque atrium, while ALDH⁺/CD34⁻ cells represented 12% to 30% of the total ALDH⁺ cells (Figure 1; left panel). Skeletal ALDH⁺CD34⁻ cells predominantly exhibited SSC^{low} and FSC^{low} characteristics, while Atrium ALDH⁺CD34⁻ cells constituted a subset with intermediate-to-high SSC and FSC characteristics. Ventricular ALDH⁺CD34⁻ cells exhibited more heterogeneous SSC and FSC properties without forming a defined population (Figure 1; left panel, population in red).

The cells were characterized using one or several markers (listed in Supplemental Table 1), alone or in association with Aldefluor (Figure 2). We noted that the association was never complete, *i.e.* only a proportion of the ALDH⁺ cells expressed a given marker. For example, a minority of ALDH⁺/CD34⁻ cells (*i.e.* between 10 to 50%) extracted from skeletal muscle were associated to the following markers (in ascending order): CD71 < CD36 < CD140a < CD106 < CD61 < CD143 < CD31 < CD49c < CD105 < CD146 < CD309 < CD49e < CD140b < CD49a while the majority (*i.e.* more than 50%) were associated with one of the following markers (in ascending order): CD44 < CD184 < CD10 < CD56 < CD9 < CD29 < CD47.

Differences were noted between cell suspensions, depending on the anatomic origin and the combination of markers under scrutiny. Among tissues, the ALDH⁺/CD34⁺ populations are the more homogenous, since they are frequently associated to the expression of CD49e (integrin alpha 5) and CD140b (PDGF beta receptor), with or without CD10 (CALLA) and CD106 (VCAM-1). The ALDH⁺/CD34⁻ populations present common general features such as the expression of CD29 and CD44 in all tissues, but they are associated with specific features in skeletal muscle tissue such as expression of CD9 (MRP-1), CD56 (NCAM), CD184 (CXCR4), CD10 (CALAA), completed with CD31 (PECAM), CD36 (PASIV), CD49a (integrin alpha1), CD49c (integrin alpha3), CD49f (integrin alpha6), CD71 (Transferrin receptor), CD106, CD140a (PDGF alpha receptor) and CD146 (MCAM). Therefore, ALDH⁺/CD34⁻ populations from cardiac and skeletal origin seem differentially defined, suggesting differential biological properties or functions. A few markers would typically allow to discriminate the ALDH⁺/CD34⁻ cells such as CD9 and CD184 (Figure 1; down panel), because most of CD9 or CD184 cells are ALDH⁺/CD34⁻ and vice-versa. Some cells also harbor non-exclusive markers, such as CD10 or CD56 (Figure 1; down panel) which label most ALDH⁺/CD34⁻ cells but also ALDH⁻ cells and would not allow selective sorting.

Among markers, the combination of integrin isoforms within the whole family (CD49) helps differentiating cells from distinct origins. While expressed on 20-30% of cells extracted from ventricles and auricles, CD49a and CD49f are mainly expressed by ALDH⁺/CD34⁻ cells and CD49e by ALDH⁺/CD34⁺ cells extracted from skeletal muscles (Figure 2).

Cardiogenic commitment of selected cell populations

The cells extracted from skeletal muscle biopsies were treated using one or several cytokines (bFGF, IGF-1, BMP-2, BMP-4) for 12 to 72h, before being analyzed for the proportion of cells expressing cardiac markers (GATA-4, Nkx2.5, Islet-1) using flow cytometry, as presented in Figure 3. These cells were ALDH⁺ CD34⁻ selected initially.

In selected cells, the addition of recombinant BMP-2 modifies the proportion of cells expressing the cardiac marker GATA-4. The addition of bFGF, BMP-2 and IGF-1 led to a 30 times increase in the proportion of cells expressing the cardiac marker Nkx2.5 (Figure 3A, in presence of bFGF alone). The addition of BMP-4 modifies the proportion of cells expressing the cardiac marker Islet-1 (Figure 3C). Higher percentages of cells expressing the cardiac markers are obtained when the cocktail is renewed every day than when it has been added only once at the onset of cell culture and the absolute number of cells expressing cardiac markers is increased with time in culture.

Preparation, implantation and integration of committed cells

Following selection by flow cytometry on ALDH⁺/CD34⁻ expression, cells were induced in culture, harvested, gathered and concentrated, then injected within the myocardial tissue of immunodeficient recipient animals. Thirty days (Figure 4) after transplantation, animals were sacrificed, their hearts were processed and the presence of cells harboring specifically non-human primates proteins was demonstrated within the mouse tissue using immunohistological procedures. We observed that cells prepared from skeletal muscles implanted as concentrated clusters, or in a more dispersed manner within the grafted areas, as attested by the specific staining of Macaque nuclei using anti-laminA/C antibody (Figure 4). A few days after injection, within delays from 2 days to 2 months, the injected cells expressed markers typical of structure (troponin, actinin) or function (connexin 43) of cardiomyocytes. The cardiac protein alpha-actinin was expressed in the cytoplasm of both mouse (recipient) cardiac cells, and Macaque (donor) cells. A majority of cells in the same area expressed the Cardiac Troponin I marker. Mouse and Macaque cells also expressed the cardiac membrane marker connexin-43 that normally warrants electrical coupling between cardiac cells (Figure 4). Some Macaque cells (stained by the specific anti-lamin A/C) exhibited striations characteristic of a sarcomere and of the establishment of a contractile apparatus. Some of these cells were undistinguishable from the resident murine cardiomyocytes that still constituted the majority of the murine heart tissue. Meanwhile, a small number of Macaque cells expressed a fast isoform of skeletal myosin heavy chain, a marker of differentiated skeletal muscle cells (Figure 4; down panel). Implanted cells were observed at different sites within mouse myocardium, reflecting the multiple

injection trajectories used for cell implantation. These results suggest the preferential commitment of the cytokines-induced skeletal muscle derived cells into cardiomyocyte-like cells *In vivo*.

Strikingly, the cells not originating from skeletal muscles, i. e. cells extracted from auricles or ventricles, or ALDH⁺/CD34⁺ cells, and the skeletal muscle cells that were not incubated with the cytokines, did not implant in such a successful manner (Supplementary Figure S2). When a few Macaque cells were observed within the mouse cardiac tissue, they did not express cardiac-specific markers, suggesting their lack of cardiogenic capacity. The several conditions tested for implantation of the cells, and their results in terms of engraftment and presence of cells harboring cardiac markers are summarized in Table 1.

Discussion

The production of *bona fide* cardiac progenitors is explored tremendously in the clinical perspective of regenerative medicine. The usefulness of several candidates is frequently limited by the easiness of procurement and characterization, the capacity of being expanded *ex vivo*, the failure of these cells to differentiate *in vivo* into mature cardiomyocytes. Being abundant, the skeletal muscle tissue has been investigated by different groups for the production of cardiogenic cells. Most studies were done in rodents using markers that do not have real counterpart in primates (*i.e.* Sca-1 antigen) or that do not label the same cell types (*i.e.* CD34). Several procedures were based on low adherence capacities (Arsic *et al.*; Winitzky *et al.*). Specific treatments were frequently required to coax a cardiogenic differentiation, for example, co-cultures on mouse cells (Iijima *et al.*), three-dimensional or cardiosphere cultures, formation of myospheres (Arsic *et al.*; Poulet *et al.* ; Tamaki *et al.*). However, the expression of cardiac markers has been assessed *in vitro*, without experimental evidence of integration *in vivo* upon intramyocardial implantation (Arsic *et al.*, Iijima *et al.*, Poulet *et al.*). *In vivo*, a treatment with retinoic acid produced a limited number of cells (Invernici *et al.*), or selected Human muscle CD34⁺ cells grown in culture did not differentiate into cardiac tissue (Proksch *et al.*). In the absence of prior cardiogenic induction, skeletal muscle progenitors participate to neoangiogenesis, and reduce fibrosis through the formation of myotubes or small muscle fibers which do not differentiate into *bona fide* cardiomyocytes nor constitute electromechanical junctions (Leobon *et al.*). Their healing activity is exerted through paracrine mechanisms (Perez-Illzarbe *et al.*). Stem cells from alternative compartments of the body have been tested, but the results of clinical trials have been disappointing or controversial (Van Berlo *et al.*; Menasché 2011; Nowbar *et al.*). Because of their paucity, mesenchymal stem cells require bone marrow aspiration and long-term expansions. Nevertheless, upon treatment with cytokines the MSC may differentiate into cardiac-like (non-beating) cells *in vitro* and *in vivo* (Bartunek *et al.*).

Striated muscles contain several ALDH+ cell populations.

ALDH is a functional marker, which depends on cellular activity and viability, thus conferring an advantage over extracellular markers. We identified cell populations expressing ALDH activity in dissociated cardiac and skeletal muscles of human and non human primates, and other animal species (Mouse, Dog, data not shown) thus confirming and extending previous results from our group and others although with slight variations, (Jean *et al.*, Konninckx *et al.*, Roehrich *et al.*, Vauchez *et al.*, Vella *et al.*). These results open the way to the exploration of the role and regulation of these cell types in normal or pathological contexts.

Differential co-expression of several extracellular markers was observed. Based on the functional, discriminative role of CD34 observed in populations extracted from human skeletal muscle, we identified populations associating defined markers with the expression of ALDH and the presence of CD34 [ALDH⁺/CD34⁺] or its absence [ALDH⁺/CD34⁻]. At variance with a previous study, we avoided incubation of dissociated muscles fragments into trypsin to be more protective regarding the cell surface. Some markers are regularly expressed on ALDH⁻ cells (such as the endothelial marker CD31), and some are consistently or preferentially expressed on ALDH⁺ cells (such as CD9, CD10, CD36, CD44, some CD49, CD140b, CD184...).

In a given muscle tissue, some differences are observed between populations on the basis of CD34 co-expression. The ALDH⁺/CD34⁺ population is generally associated to the expression of CD49e and CD140b. The ALDH⁺/CD34⁻ population harbors common markers (CD10, CD44) and some that are more exclusively observed in skeletal muscle (CD9, CD56, CD184). These data suggest that sub-populations of ALDH⁺ cells may be further enriched by positive or negative selection using flow-cytometry-based sorting, or, in the perspective of clinical developments, using immunomagnetic selection methodologies. In this perspective, the ALDH⁺/CD34⁻ cell populations associated to one or more of the following markers: CD9, CD10, CD44, CD56 and CD184, would be of special interest.

In a previous study, differences in the proportions of cell populations were observed between paravertebral and quadriceps muscle sources. Here, we also observed differences in nature and proportions of cell populations extracted from cardiac or skeletal muscles, the highest percentages of ALDH⁺ cells being observed in the auricular tissues. Taken together, these differences may reflect the commitment capacities *in vitro* or *In vivo*.

ALDH+ cells may be committed towards a cardiogenic fate *in vitro*.

To substitute to the use of cardiomyocytes feeders (Konninckx *et al.*), several growth factors, cytokines or combinations have been proposed to trigger the cardiogenic commitment of progenitors of various origins (Bartunek *et al.*, Behfar *et al.*,), or sustain its continuum, taking clues

from early cardiomyogenesis. In this study, we capitalized on the expression of ALDH by the selected progenitors to participate to the production of the retinoic acid involved in heart and/or skeletal muscle patterning and development (Keegan *et al.*). A preferential cardiogenic commitment was induced using the minimal combination of members of BMP family (BMP2, BMP4) and IGF-1, such as set up previously by different groups (Bartunek *et al.*, Behfar *et al.*) allowing the expression and nuclear translocation of cardiogenic factors. bFGF was added to favor and sustain proliferation over terminal differentiation. *In vitro*, we observed evidences of cardioinstructive commitment, through the expression of the precocious markers NKx2.5 or GATA4 by significant proportions of cells. Terminal differentiation was not observed in these short-term experiments *in vitro*, *i.e.* we did not observe the specific architecture of isolated cardiomyocytes, nor a spontaneous contractile activity such as the one obtained in embryoid bodies. We hypothesized that such an immature level of differentiation would promote higher yields of survival of the cells upon intracardiac injection.

Some populations of committed ALDH⁺ cells differentiate into cardiogenic cells *in vivo*.

Among all combinations tested, only the transplantation of ALDH⁺/CD34⁻ cells dissociated from skeletal muscle tissue and committed towards cardiogenic fate for 48h using the dedicated cocktail of cytokines allowed the implantation of cardiac-like cells that were expressing both donor-specific and cardiac-specific markers. Hundreds to thousands cells were observed at the injection site, but were not disseminated through the whole myocardium.

Indeed, these cells were injected into the heart of healthy animals, *i.e.* into an environment that was not favorable to regeneration, as a recent infarction scar could be. Interestingly, in the absence of cardiogenic induction conferred by the dedicated cocktail of cytokines, the transplantation of ALDH⁺/CD34⁻ cells extracted from skeletal muscle did not yield cardiac-like cells *in vivo*, but prompted the formation of some myotubes expressing the specific fast isoform of Myosin heavy chain. Therefore, the initial differentiation capacity of these ALDH⁺/CD34⁻ cells remains the formation of skeletal muscle structures in the absence of specific induction, as observed previously (Vauchez). In this study, the ALDH⁺ cell populations extracted from macaque skeletal muscle that show cardiogenic efficiency do not co-express CD34⁺. In a previous set of experiments, we observed that ALDH⁺/CD34⁻ cells participated to skeletal muscle regeneration without pretreatment, while ALDH⁺/CD34⁺ cells harbored adipogenic and osteogenic differentiation capacities *in vitro*. These mesenchymal-like capacities have been also observed in ALDH⁺/CD34⁺ cells extracted from cardiac tissue by Koninckx *et al.* in Humans and by Roehrich *et al.* in Mouse. Que PEUT ON EN CONCLURE? Chez la Souris le CD34 est un marqueur plus large (Reohrich) mais chez l'Homme (Koninckx) ?

The transplantation of cells dissociated from cardiac tissues (ventricles, auricles) did not yield cardiac-like tissue, despite incubation of ALDH⁺/CD34⁻ cells in the dedicated cocktail of cytokines,

although some of them could be observed in interstitial spaces, suggesting that the cells from these environments did not retain the capacity to form contractile tissue. Whether these cells participate to angiogenesis, stromal support or conduction tissue is unknown yet. The reason for this lack of efficacy could lie in the nature of the cell populations, or in the balance of expression of ALDH-coding isoenzymes.

Limitations of the models and future prospects.

Some limitations of the present model may be pointed. The state of maturation of the cardiac-like cells, their contractility, the electrophysiological properties and electrical coupling with neighboring cells are not known yet, neither *in vitro* nor *in vivo*. Beyond this proof of concept, allogenic or syngenic transplantation models should be set to avoid the molecular inter-species barriers that may hamper proper integration or maturation of the Macaque cells within murine tissue. Also, while these cells are prepared from a rich source of relatively easy access (*i.e.* a skeletal muscle biopsy) that was considered and used in previous clinical trials, the capacity of the progenitor cells to sustain long-term expansions is not known yet, neither their capacity to support the cell injection procedures that are frequently detrimental to several cell types (Skuk *et al.*). Finally, the study of the functional ability deserves the use of animal models of cardiopathies, either post-ischemic or genetic ones. Nevertheless, this is the first report of the preparation, implantation, persistency and differentiation *in vivo* of a new category of progenitors, which are of easy access and preparation using simple and reliable reagents. These cells may constitute interesting tools to assess normal and pathological development, to develop screening platforms, to develop functional studies. It is also conceivable to assess the production and efficacy of these cells in an autologous fashion, in the perspective of clinical developments, so as to propose them a place in the armamentarium of cell therapy.

Acknowledgements

This work was supported in part by the Leducq Foundation through the CaPTAA network (C. Catelain, S. Riveron), by the DIM-STEMPOLE from Région Ile-de-France (C. Catelain, E. Yada, J. Etienne), by the Association Française contre les Myopathies (AFM, C. Catelain, S. Riveron, K. Vauchez), and by grants from the Duchenne Parent Project from the Netherlands (DPP) and from the Ligue contre la Cardiomyopathie. Our group is supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the AFM, the Université Pierre et Marie Curie-Paris 6 (UPMC).

We thank Professor Philippe Menasché (HEGP, Assistance Publique Hopitaux de Paris) and Professor Thomas Voit (Centre de Recherche en Myologie) for fruitful discussions. We thank Dr. Serban

Morosan, Dr. Nathalie Mougenot, Mr. Olivier Bregerie and members of the animal experimentation center (Hopital Pitié-Salpêtrière) for their assistance and care of the mice. We thank Dr. Chantal François and Ms. Elodie Laffrat (Institut du Cerveau et de la Moelle, Paris, France), Dr. Marjorie Lagrevol and Dr. Kevin Thibault-Duprey (SANOFI, Alfortville, France), Dr. Claire-Maëlle Fovet (MIRcen-CEA, Fontenay-aux-Roses, France) and Dr. P. Pradeau (IMASSA, France) for the kind gift of Macaque biopsies. We thank Mr. Yann Lecluse (Institut Gustave Roussy, Villejuif, France) and Mrs. Catherine Blanc (Flow Cytometry Core CyPS, Pierre & Marie Curie University, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris) for invaluable help in cell sorting.

References

- Abdel-Latif A, Zuba-Surma EK, Case J, Tiwari S, Hunt G, Ranjan S, Vincent RJ, Srour EF, Bolli R, Dawn B. TGF-beta1 enhances cardiomyogenic differentiation of skeletal muscle-derived adult primitive cells. *Basic Res Cardiol*. 2008 Nov;103(6):514-24.
- Arsic N, Mamaeva D, Lamb NJ, Fernandez A. Muscle-derived stem cells isolated as non-adherent population give rise to cardiac, skeletal muscle and neural lineages. *Exp Cell Res*. 2008 Apr 1;314(6):1266-80.
- Balber AE. (2011) Concise review: aldehyde dehydrogenase bright stem and progenitor cell populations from normal tissues: characteristics, activities, and emerging uses in regenerative medicine. *Stem Cells*. ;29(4):570-5.
- Bartunek J, Behfar A, Dolatabadi D et al. Cardiopoietic stem cell therapy in heart failure: the C-CURE (Cardiopoietic stem Cell therapy in heart failURE) multicenter randomized trial with lineage-specified biologics. *J Am Coll Cardiol* 2013;61:2329-2338.
- Bartunek J, Croissant JD, Wijns W, Gofflot S, de Lavareille A, Vanderheyden M, Kaluzhny Y, Mazouz N, Willemsen P, Penicka M, Mathieu M, Homsy C, De Bruyne B, McEntee K, Lee IW, Heyndrickx GR. Pretreatment of adult bone marrow mesenchymal stem cells with cardiomyogenic growth factors and repair of the chronically infarcted myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 Feb;292(2):H1095-104.
- Behfar A, Faustino RS, Arrell DK, Dzeja PP, Perez-Terzic C, Terzic A. Guided stem cell cardiopoiesis: discovery and translation. *J Mol Cell Cardiol*. 2008 Oct;45(4):523-9.
- Behfar A, Perez-Terzic C, Faustino RS, Arrell DK, Hodgson DM, Yamada S, Puceat M, Niederländer N, Alekseev AE, Zingman LV, Terzic A. Cardiopoietic programming of embryonic stem cells for tumor free heart repair. *J Exp Med*. 2007 Feb 19;204(2):405-20.
- Berry C, Murdoch DR, McMurray JJ (2001). Economics of chronic heart failure. *Eur J Heart Fail*; 3 : 283-291.

- Brinkmann JF, Pelsers MM, van Nieuwenhoven FA, Tandon NN, van der Vusse GJ, Glatz JF. Purification, immunochemical quantification and localization in rat heart of putative fatty acid translocase (FAT/CD36). *Mol Cell Biochem.* 2006 Mar;284(1-2):127-34.
- Burridge PW, Keller G, Gold JD, Wu JC. Production of de novo cardiomyocytes: human pluripotent stem cell differentiation and direct reprogramming. *Cell Stem Cell.* 2012 Jan 6;10(1):16-28.
- Capoccia BJ, Robson DL, Levac KD, Maxwell DJ, Hohm SA, Neelamkavil MJ, Bell GI, Xenocostas A, Link DC, Piwnica-Worms D, Nolte JA, Hess DA. Revascularization of ischemic limbs after transplantation of human bone marrow cells with high aldehyde dehydrogenase activity. *Blood.* 2009 May 21;113(21):5340-51.
- Catelain C, Riveron S, Papadopoulos A, Mougenot N, Jacquet A, Vauchez K, Yada E, Pucéat M, Fisman M, Butler-Browne G, Bonne G, Vilquin JT. Myoblasts and embryonic stem cells differentially engraft in a mouse model of genetic dilated cardiomyopathy. *Mol Ther.* 2013 May;21(5):1064-75.
- Chong JJ, Yang X, Don CW, Minami E, Liu YW, Weyers JJ, Mahoney WM, Van Biber B, Palpant NJ, Gantz JA, Fugate JA, Muskheli V, Gough GM, Vogel KW, Astley CA, Hotchkiss CE, Baldessari A, Pabon L, Reinecke H, Gill EA, Nelson V, Kiem HP, Laflamme MA, Murry CE. Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. *Nature.* 2014 Apr 30. doi: 10.1038/nature13233.
- Chute JP, Muramoto GG, Whitesides J, Colvin M, Safi R, Chao NJ, McDonnell DP. Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Aug 1;103(31):11707-12.
- Clause KC, Tcho J, Powell MC, Liu LJ, Huard J, Keller BB, Tobita K. Developing cardiac and skeletal muscle share fast-skeletal myosin heavy chain and cardiac troponin-I expression. *PLoS One.* 2012;7(7):e40725.
- 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 Apr;24(4):975-85.
- Degeorge BR Jr, Rosenberg M, Eckstein V, Gao E, Herzog N, Katus HA, Koch WJ, Frey N, Most P. BMP-2 and FGF-2 synergistically facilitate adoption of a cardiac phenotype in somatic bone marrow c-kit+/Sca-1+ stem cells. *Clin Transl Sci.* 2008 Sep;1(2):116-25.
- Dey D, Pan G, Varma NR, Palaniyandi SS. Sca-1+ cells from fetal heart with high aldehyde dehydrogenase activity exhibit enhanced gene expression for self-renewal, proliferation, and survival. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:730683.
- Douville J, Beaulieu R, Balicki D. ALDH1 as a functional marker of cancer stem and progenitor cells. *Stem Cells Dev.* 2009 Jan-Feb;18(1):17-25.

Dubois NC, Craft AM, Sharma P, Elliott DA, Stanley EG, Elefanty AG, Gramolini A, Keller G. SIRPA is a specific cell-surface marker for isolating cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol.* 2011 Oct 23;29(11):1011-8.

Duester G, Mic FA, Molotkov A. Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue-specific metabolism to retinoic acid. *Chem Biol Interact.* 2003 Feb 1;143-144:201-10.

El Haddad M, Jean E, Turki A, Hugon G, Vernus B, Bonniou A, Passerieux E, Hamade A, Mercier J, Laoudj-Chenivresse D, Carnac G. Glutathione peroxidase 3, a new retinoid target gene, is crucial for human skeletal muscle precursor cell survival. *J Cell Sci.* 2012 Dec 15;125(Pt 24):6147-56.

Espagnolle N, Guilloton F, Deschaseaux F, Gadelorge M, Sensébé L, Bourin P. CD146 expression on mesenchymal stem cells is associated with their vascular smooth muscle commitment. *J Cell Mol Med.* 2014 Jan;18(1):104-14.

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 Jul;122(1):99-108.

Fanton Y, Robic B, Rummens JL, Daniëls A, Windmolders S, Willems L, Jamaer L, Dubois J, Bijmens E, Heuts N, Notelaers K, Paesen R, Ameloot M, Mees U, Bito V, Declercq J, Hensen K, Koninckx R, Hendriks M. Cardiac atrial appendage stem cells engraft and differentiate into cardiomyocytes in vivo: A new tool for cardiac repair after MI. *Int J Cardiol.* 2015 Dec 15;201:10-9.

Garaycochea JI, Crossan GP, Langevin F, Daly M, Arends MJ, Patel KJ. Genotoxic consequences of endogenous aldehydes on mouse haematopoietic stem cell function. *Nature.* 2012 Sep 27;489(7417):571-5.

Gentry T, Foster S, Winstead L, Deibert E, Fiordalisi M, 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(3): 259-274.

Hamade A, Deries M, Begemann G, Bally-Cuif L, Genêt C, Sabatier F, Bonniou A, Cousin X. Retinoic acid activates myogenesis in vivo through Fgf8 signalling. *Dev Biol.* 2006 Jan 1;289(1):127-40.

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 Sep 15;104(6):1648-55.

Iijima Y, Nagai T, Mizukami M, Matsuura K, Ogura T, Wada H, Toko H, Akazawa H, Takano H, Nakaya H, Komuro I. Beating is necessary for transdifferentiation of skeletal muscle-derived cells into cardiomyocytes. *FASEB J.* 2003 Jul;17(10):1361-3.

Invernici G, Cristini S, Madeddu P, Brock S, Spillmann F, Bernasconi P, Cappelletti C, Calatozzolo C, Fascio U, Bisleri G, Muneretto C, Alessandri G, Parati EA. Human adult skeletal muscle stem cells differentiate into cardiomyocyte phenotype *in vitro*. *Exp Cell Res*. 2008 Jan 15;314(2):366-76.

Jackson B, Brocker C, Thompson DC, Black W, Vasiliou K, Nebert DW, Vasiliou V. Update on the aldehyde dehydrogenase gene (ALDH) superfamily. *Hum Genomics*. 2011 May;5(4):283-303.

Jean E, Laoudj-Chenivesse D, Notarnicola C, Rouger K, Serratrice N, Bonnieu A, Gay S, Bacou F, Duret C, Carnac G. Aldehyde dehydrogenase activity promotes survival of human muscle precursor cells. *J Cell Mol Med*. 2011 Jan;15(1):119-33.

Jokubaitis VJ, Sinka L, Driessen R, Whitty G, Haylock DN, Bertocello I, Smith I, Péault B, Tavian M, Simmons PJ. Angiotensin-converting enzyme (CD143) marks hematopoietic stem cells in human embryonic, fetal, and adult hematopoietic tissues. *Blood*. 2008 Apr 15;111(8):4055-63.

Keegan BR, Feldman JL, Begemann G, Ingham PW, Yelon D. Retinoic acid signaling restricts the cardiac progenitor pool. *Science*. 2005 Jan 14;307(5707):247-9.

Koninckx R, Daniëls A, Windmolders S, Mees U, Macianskiene R, Mubagwa K, Steels P, Jamaer L, Dubois J, Robic B, Hendrikx M, Rummens JL, Hensen K. The cardiac atrial appendage stem cell: a new and promising candidate for myocardial repair. *Cardiovasc Res*. 2013 Mar 1;97(3):413-23.

Kumar S, Sandell LL, Trainor PA, Koentgen F, Duester G. Alcohol and aldehyde dehydrogenases: retinoid metabolic effects in mouse knockout models. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Jan;1821(1):198-205.

Leobon B, Garcin I, Menasche P, Vilquin JT, Audinat E, Charpak S. Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jun 24;100(13):7808-11.

Lewandoski M, Mackem S. Limb development: the rise and fall of retinoic acid. *Curr Biol*. 2009 Jul 28;19(14):R558-61.

Menasché P, Vanneaux V, Fabreguettes JR, Bel A, Tosca L, Garcia S, Bellamy V, Farouz Y, Pouly J, Damour O, Périer MC, Desnos M, Hagège A, Agbulut O, Bruneval P, Tachdjian G, Trouvin JH, Larghero J. Towards a clinical use of human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors: a translational experience. *Eur Heart J*. 2014 May 16. pii: ehu192.

Menasché P, Vanneaux V, Hagège A, Bel A, Cholley B, Cacciapuoti I, Parouchev A, Benhamouda N, Tachdjian G, Tosca L, Trouvin JH, Fabreguettes JR, Bellamy V, Guillemain R, Suberbielle Boissel C, Tartour E, Desnos M, Larghero J. Human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors for severe heart failure treatment: first clinical case report. *Eur Heart J*. 2015 Aug 7;36(30):2011-7.

Menasche P. (2011). Cardiac cell therapy: lessons from clinical trials. *J Mol Cell Cardiol*; 50(2):258-265.

- Metzger R, Franke FE, Bohle RM, Alhenc-Gelas F, Danilov SM. Heterogeneous distribution of angiotensin I-converting enzyme (CD143) in the human and rat vascular systems: vessel, organ and species specificity. *Microvasc Res.* 2011 Mar;81(2):206-15.
- Moreb JS, Baker HV, Chang LJ, Amaya M, Lopez MC, Ostmark B, Chou W. ALDH isozymes downregulation affects cell growth, cell motility and gene expression in lung cancer cells. *Mol Cancer.* 2008 Nov 24;7:87.
- 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 Apr 8;428(6983):664-8.
- Muzio G, Maggiora M, Paiuzzi E, Oraldi M, Canuto RA. Aldehyde dehydrogenases and cell proliferation. *Free Radic Biol Med.* 2012 Feb 15;52(4):735-46.
- Nomura T, Ueyama T, Ashihara E, Tateishi K, Asada S, Nakajima N, Isodono K, Takahashi T, Matsubara H, Oh H. Skeletal muscle-derived progenitors capable of differentiating into cardiomyocytes proliferate through myostatin-independent TGF-beta family signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Jan 25;365(4):863-9.
- Nowbar AN, Mielewicz M, Karavassilis M, Dehbi HM, Shun-Shin MJ, Jones S, Howard JP, Cole GD, Francis DP; DAMASCENE writing group. Discrepancies in autologous bone marrow stem cell trials and enhancement of ejection fraction (DAMASCENE): weighted regression and meta-analysis. *BMJ.* 2014 Apr 28;348:g2688.
- Nygren J.M., Jovinge S., Breitbach M., Sawen P., Roll W., Hescheler J., Taneera J., Fleischmann B.K., Jacobsen S.E. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat. Med.* 2004; (10) 494–501.
- Pan J, Baker KM. Retinoic acid and the heart. *Vitam Horm.* 2007;75:257-83.
- Perez-Illarbe M, Agbulut O, Pelacho B, Ciorba C, San Jose-Eneriz E, Desnos M, Hagège 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 Nov;10(11):1065-72.
- Perin EC, Murphy M, Cooke JP, Moyé L, Henry TD, Bettencourt J, Gahremanpour A, Leeper N, Anderson RD, Hiatt WR, Lima JA, Venkatesh B, Sayre SL, Vojvodic RW, Taylor DA, Ebert RF, Hirsch AT; Cardiovascular Cell Therapy Research Network. Rationale and design for PACE: patients with intermittent claudication injected with ALDH bright cells. *Am Heart J.* 2014 Nov;168(5):667-73.
- Poulet C, Wettwer E, Christ T, Ravens U. Skeletal muscle stem cells propagated as myospheres display electrophysiological properties modulated by culture conditions. *J Mol Cell Cardiol.* 2011 Feb;50(2):357-66.

- 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 Dec 4;50(23):2243-8.
- Proksch S, Bel A, Puymirat E, Pidial L, Bellamy V, Peyrard S, Larghero J, Augereau-Vacher B, Menasché P. Does the human skeletal muscle harbor the murine equivalents of cardiac precursor cells? *Mol Ther*. 2009 Apr;17(4):733-41.
- Przewoźniak M, Czaplicka I, Czerwińska AM, Markowska-Zagrajek A, Moraczewski J, Stremińska W, Jańczyk-Ilach K, Ciemerych MA, Brzoska E. Adhesion proteins--an impact on skeletal myoblast differentiation. *PLoS One*. 2013 May 6;8(5):e61760.
- Raha D, Wilson TR, Peng J, Peterson D, Yue P, Evangelista M, Wilson C, Merchant M, Settleman J. The cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase is required to maintain a drug-tolerant tumor cell subpopulation. *Cancer Res*. 2014 Jul 1;74(13):3579-90.
- Reinecke H, Minami E, Poppa V, Murry CE. Evidence for fusion between cardiac and skeletal muscle cells. *Circ Res*. 2004 Apr 2;94(6):e56-60.
- Roehrich ME, Spicher A, Milano G, Vassalli G. Characterization of cardiac-resident progenitor cells expressing high aldehyde dehydrogenase activity. *Biomed Res Int*. 2013;2013:503047. doi: 10.1155/2013/503047.
- Ryan T, Liu J, Chu A, Wang L, Blais A, Skerjanc IS. Retinoic acid enhances skeletal myogenesis in human embryonic stem cells by expanding the premyogenic progenitor population. *Stem Cell Rev*. 2012 Jun;8(2):482-93.
- Sheehy SP, Pasqualini F, Grosberg A, Park SJ, Aratyn-Schaus Y, Parker KK. Quality metrics for stem cell-derived cardiac myocytes. *Stem Cell Reports*. 2014 Mar 6;2(3):282-94.
- Shibuya M, Miura T, Fukagawa Y, Akashi S, Oda T, Kawamura S, Ikeda Y, Matsuzaki M. Tongue muscle-derived stem cells express connexin 43 and improve cardiac remodeling and survival after myocardial infarction in mice. *Circ J*. 2010 Jun;74(6):1219-26.
- Skuk D, Paradis M, Goulet M, Tremblay JP (2007). Ischemic central necrosis in pockets of transplanted myoblasts in nonhuman primates: implications for cell-transplantation strategies. *Transplantation*; 84: 1307-1315.
- Sobreira TJ, Marlétaz F, Simões-Costa M, Schechtman D, Pereira AC, Brunet F, Sweeney S, Pani A, Aronowicz J, Lowe CJ, Davidson B, Laudet V, Bronner M, de Oliveira PS, Schubert M, Xavier-Neto J. Structural shifts of aldehyde dehydrogenase enzymes were instrumental for the early evolution of retinoid-dependent axial patterning in metazoans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jan 4;108(1):226-31.
- Sondergaard et al., *J Translational Medicine*, 2010, 8:24. ALDH Hum Cord Blood improve vasc density in acute myocardial infarction.

- 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 Jul 1;106(1):95-102.
- Tamaki T, Uchiyama Y, Okada Y, Tono K, Masuda M, Nitta M, Hoshi A, Akatsuka A. Clonal differentiation of skeletal muscle-derived CD34(-)/45(-) stem cells into cardiomyocytes *In vivo*. *Stem Cells Dev*. 2010 Apr;19(4):503-12.
- Thorsteinsdóttir S, Roelen BA, Goumans MJ, Ward-van Oostwaard D, Gaspar AC, Mummery CL. Expression of the alpha 6A integrin splice variant in developing mouse embryonic stem cell aggregates and correlation with cardiac muscle differentiation. *Differentiation*. 1999 Mar;64(3):173-84.
- van Berlo JH, Kanisicak O, Maillet M, Vagnozzi RJ, Karch J, Lin SC, Middleton RC, Marbán E, Molkentin JD. c-kit(+) cells minimally contribute cardiomyocytes to the heart. *Nature*. 2014 May 7. doi: 10.1038/nature13309.
- Vauche 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. *Mol Ther*. 2009 Nov;17(11):1948-58.
- Vella JB, Thompson SD, Bucsek MJ, Song M, Huard J. Murine and human myogenic cells identified by elevated aldehyde dehydrogenase activity: implications for muscle regeneration and repair. *PLoS One*. 2011;6(12):e29226.
- Windmolders S, Willems L, Daniëls A, Linsen L, Fanton Y, Hendriks M, Koninckx R, Rummens JL, Hensen K. Clinical-scale *in vitro* expansion preserves biological characteristics of cardiac atrial appendage stem cells. *Cell Prolif*. 2015 Apr;48(2):175-86.
- Winitzky 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 Apr;3(4):e87. Epub 2005 Mar 15. PubMed PMID: 15757365.
- Wobus AM, Kaomei G, Shan J, Wellner MC, Rohwedel J, Ji Guanju, Fleischmann B, Katus HA, Hescheler J, Franz WM. Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 1997 Jun;29(6):1525-39.
- Xavier-Neto J, Sousa Costa ÂM, Figueira AC, Caiaffa CD, Amaral FN, Peres LM, da Silva BS, Santos LN, Moise AR, Castillo HA. Signaling through retinoic acid receptors in cardiac development: Doing the right things at the right times. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Feb;1849(2):94-111.
- Yang X, Pabon L, Murry CE. Engineering adolescence: maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Circ Res*. 2014 Jan 31;114(3):511-23.

Zhao X, Sirbu IO, Mic FA, Molotkova N, Molotkov A, Kumar S, Duester G. Retinoic acid promotes limb induction through effects on body axis extension but is unnecessary for limb patterning. *Curr Biol.* 2009 Jun 23;19(12):1050-7.

Figures and tables legends

Figure 1. Flow cytometry characterization of ALDH⁺/CD34⁺ and ALDH⁺/CD34⁻ populations of Macaque and Human muscle cells.

Dissociated cells from heart and quadriceps muscle biopsies of Macaques (n = 4, aged 5-9 year), and from Human Fascia Lata muscle biopsies (n = 7, aged 47-63 year) were incubated with Aldefluor substrate, then with APC-labeled anti-CD34 antibody and a second PE-labeled marker. Representative cytograms are shown. In (A), the expression of CD34 is represented as a function of ALDH⁺ cells, providing an upper right quarter containing the ALDH⁺/CD34⁺ cells (green color), and a lower right quarter containing the ALDH⁺/CD34⁻ cells (red color), in which the proportions of cells can be estimated. In (B), the assigned cell populations are projected according to their side scatter (SSC) and forward scatter (FSC). Skeletal ALDH⁺ CD34⁻ cells were the most homogenous population. In (C), the expression of CD184 (left) and CD56 (right) PE-labeled markers is represented as a function of SSC (left panel) and ALDH⁺ cells (right panel). Most CD184⁺ cells belong to the ALDH⁺/CD34⁻ population, therefore this marker is almost exclusive. In comparison, only a small proportion of the CD56⁺ cells belong to the ALDH⁺/CD34⁻ population, ascribing a non-exclusive role to this marker. Datas are percentages (mean, SD) of cells positive for the indicated marker.

Figure 2. Flow cytometry phenotypic characterization of muscle cells populations.

As in Figure 1, the cells enzymatically dissociated cells were incubated with Aldefluor substrate, then with APC-labeled anti-CD34 antibody and a second PE-labeled marker. The values associated to the combinations of these markers by the cells are translated in histograms. The proportion of a dedicated marker among the whole content of mononucleated cells is presented in yellow. The proportions of cells expressing a dedicated marker within the ALDH⁺/CD34⁺ population and within the ALDH⁺/CD34⁻ population are presented in green and in red, respectively. This representation suggests that, for example, CD9 and CD184 are especially co-expressed with ALDH⁺/CD34⁻ cells from skeletal muscles, while CD49e and CD140b are frequently associated to the ALDH⁺/CD34⁺ populations. Data are percentages (mean of 4 animals, SD) of positive cells for the indicated markers.

Figure 3. Stimulated expression of cardiac differentiation factors by cytokines.

In A, enzymatically-dissociated Macaque muscle sorted ALDH⁺/CD34⁻ cells were grown with or without daily stimulation by the cocktail (BMP-4, BMP-2, IGF-1 and bFGF) during 72 hours before analysis by flow cytometry using anti GATA-4, Nkx2.5 or Islet-1 antibodies. FSC was plotted as a function of the fluorescence associated to these markers. Populations of cells expressing the cardiac markers were observed in presence of bFGF alone, bFGF + BMP-2, bFGF + IGF-1, BMP-2 + IGF-1 + bFGF, bFGF + BMP-2 + IGF-1 + BMP-4 (Independent experiments). Datas are percentages (n = 3) of cells positive for the indicated marker. In B, a single stimulation was achieved and the cells were fixed to slides, labeled with anti GATA-4, Nkx2.5, Islet-1, TBX-5 or Mef2c antibodies. Scale bar:

In C, non-sorted Macaque muscle cells were stimulated (or not) with the factors for 48 hours, then labeled with antibodies directed against GATA-4, Nkx2.5, Islet-1, Tbx5 or MEF2C and analyzed by FACS. The percentages of cells (mean, SD) expressing a cardiac marker with and without treatment are plotted.

Figure 4. *In vivo* engraftment of selected and stimulated Macaque muscle ALDH⁺/CD34⁻ cells.

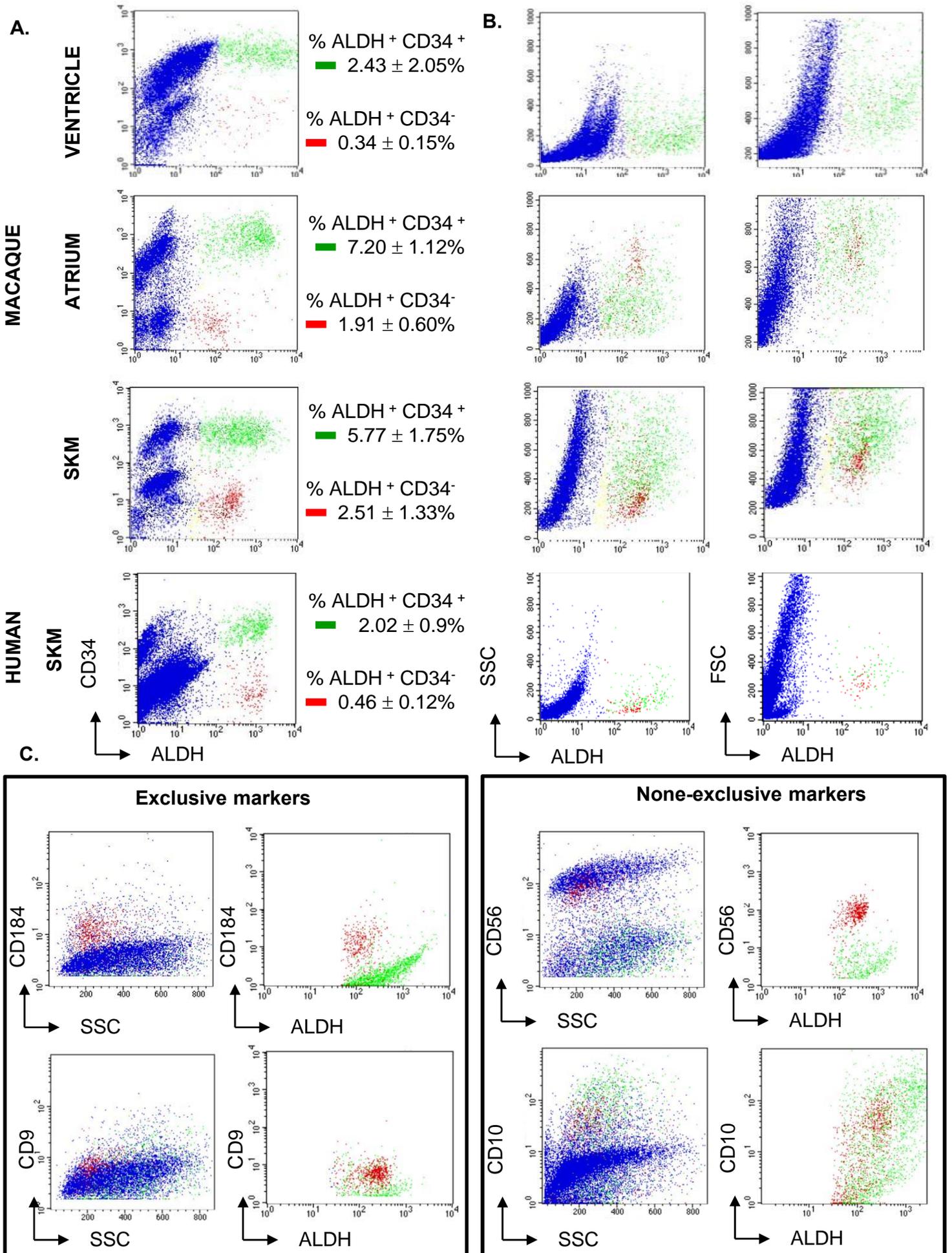
Enzymatically-dissociated Macaque ALDH⁺/CD34⁻ muscle cells were sorted on the basis of both ALDH positivity and lack of CD34 expression. The cells were grown in culture in presence of the cocktail for 48 hours or 72 hours before intramyocardial implantation into NOD-SCID immunodeficient mice. Four weeks after transplantation, the presence of Macaque-specific antigens (lamin A/C) and cardiac (top panels) or skeletal (bottom panel) muscle markers were assessed by immunohistofluorescence on heart sections. Several cells, in many fields, harbored specific Lamin A/C-positive nuclear membranes (green, white arrowheads), detected in association with specific cytoplasmic markers of cardiomyogenic differentiation such as Connexin-43 (blue, arrows) and alpha-actinin (red). Low, intermediate and high magnifications are presented. The increased magnification allows comparing the lamin A/C-positive cells with neighboring, murine cardiomyocytes, underlining their similar morphologies and expression of Cx43 and alpha actinin. In (B), the almost complete absence of the fast skeletal myosin isoform labeling suggested that the newly implanted tissues were not skeletal muscle in nature. Scale bars: 10µm to 100µm. [IL FAUT PRECISER QUELLE BARRE POUR QUELLE IMAGE.](#)

Supplementary Table 1.

List of the antibodies used in this study.

Supplementary Table 2. Engraftment of heart or skeletal muscle cells in immunodeficient mice.

Figure 1



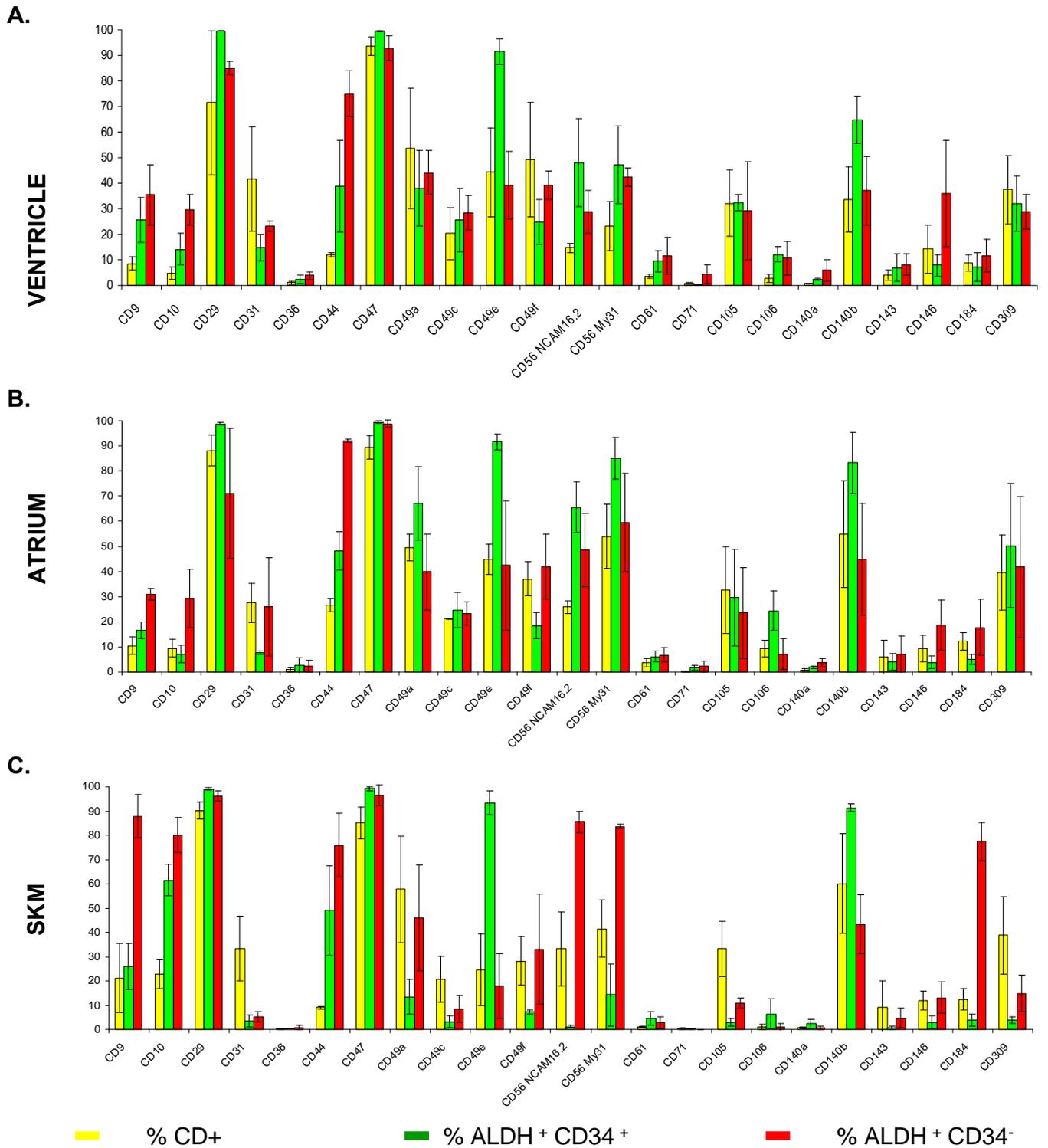
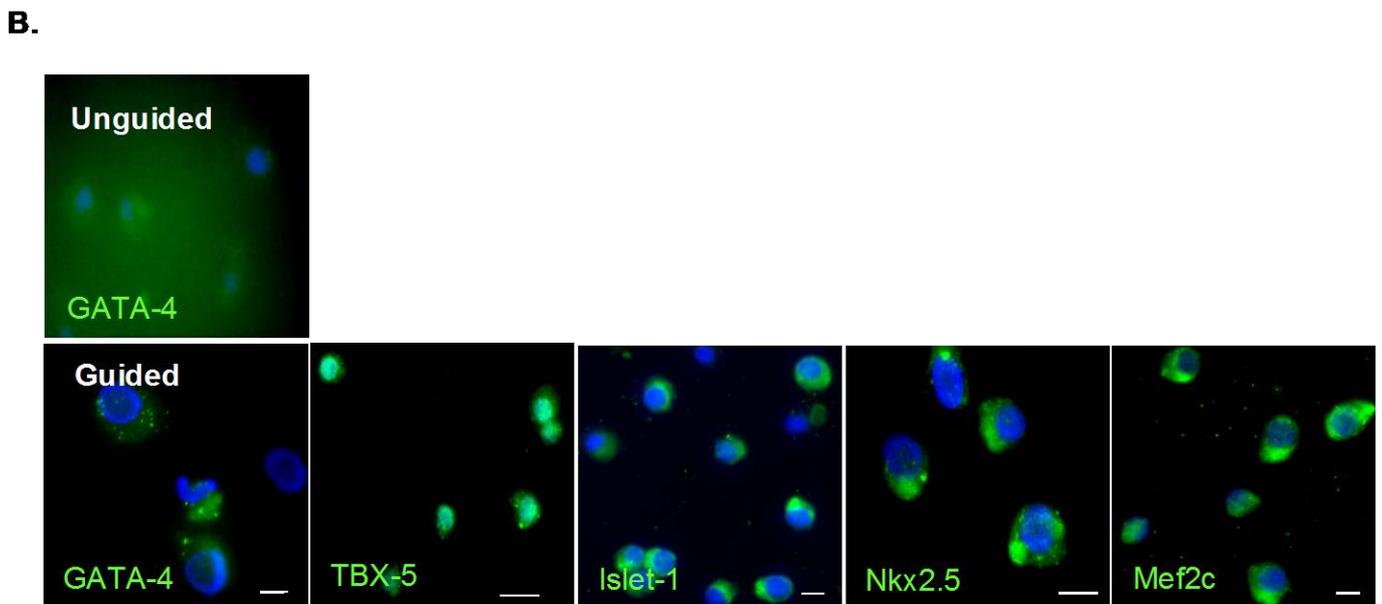
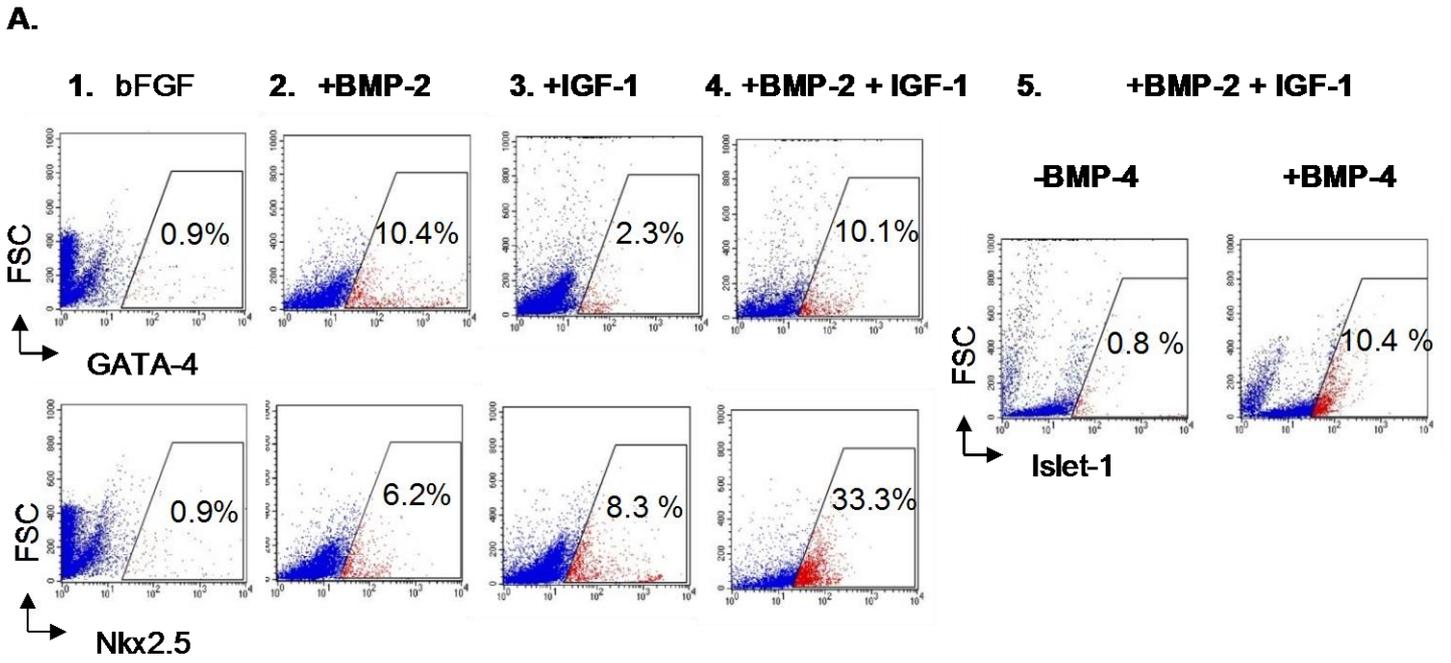


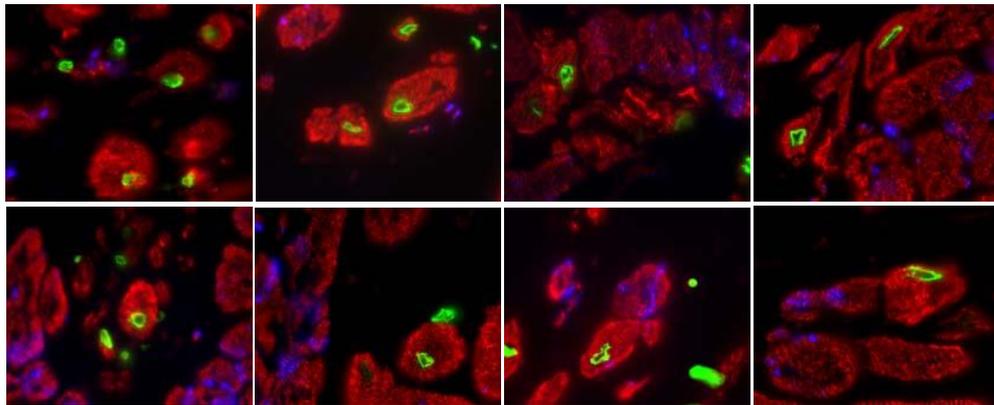
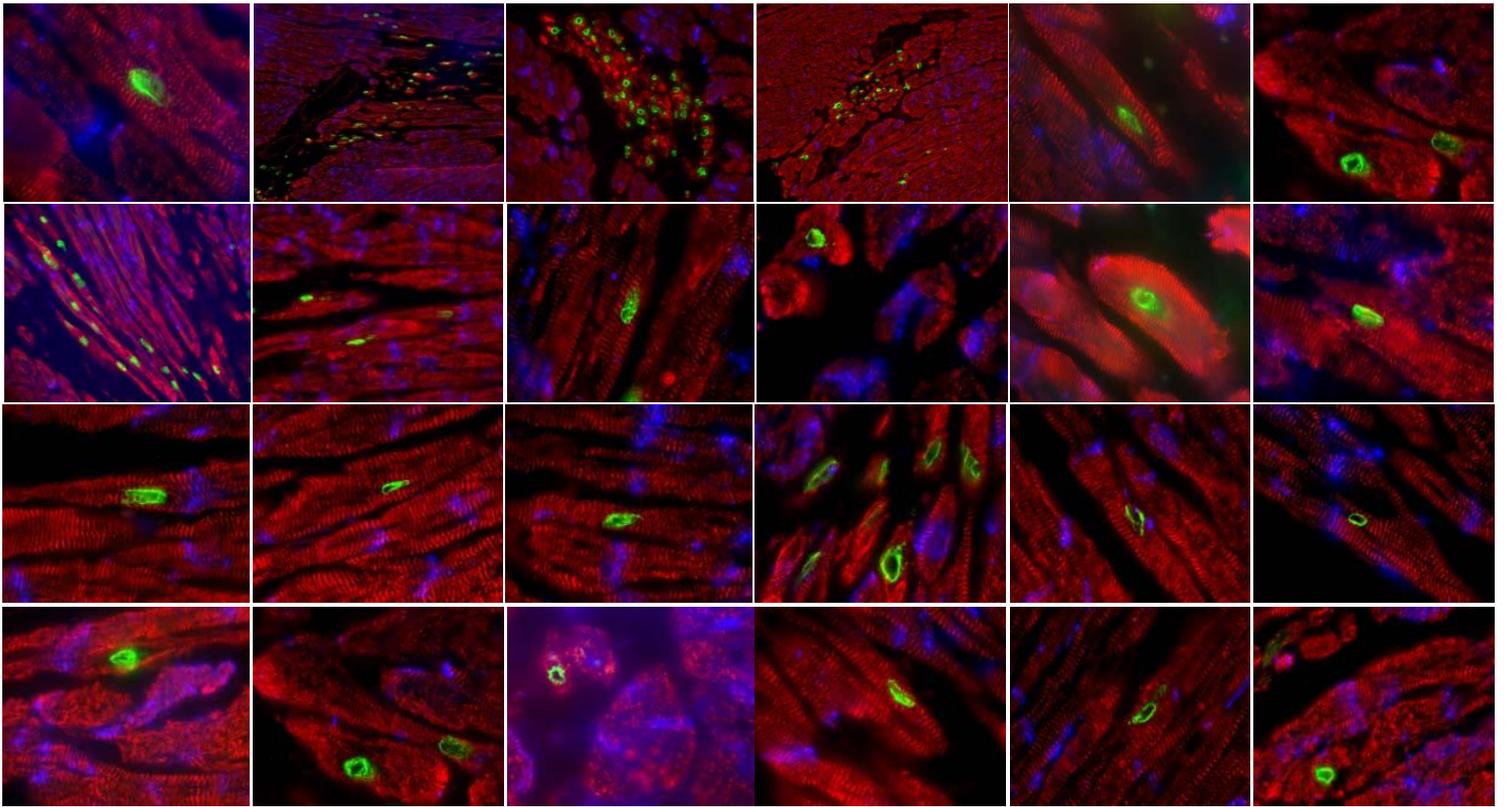
Figure 2

Figure 3

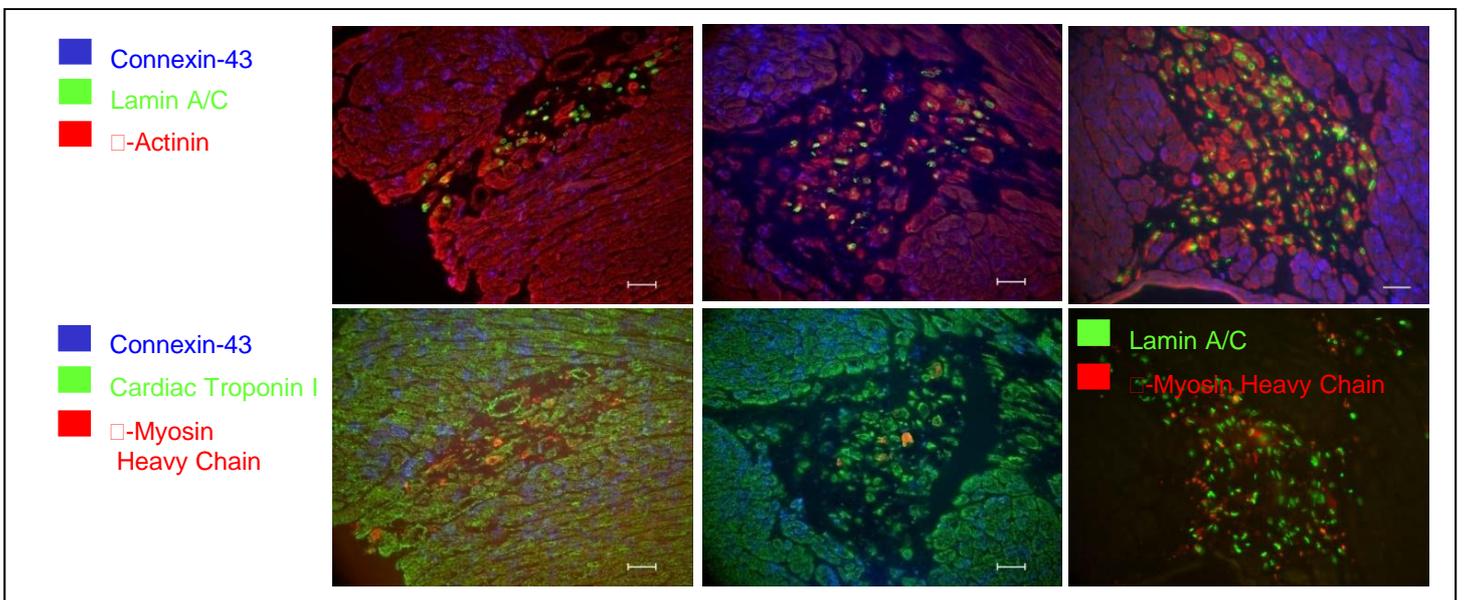


C.

Figure 4



- Connexin-43
- Lamin A/C
- α-Actinin



- Connexin-43
- Lamin A/C
- α-Actinin

- Connexin-43
- Cardiac Troponin I
- α-Myosin Heavy Chain

- Lamin A/C
- α-Myosin Heavy Chain

Table 1

CD / alternate name(s) / (function)	Clone #	Isotype	Format	Cat. #	Provider
CD9 / TSPAN29 / (cell adhesion and migration)	M-L13	Ms IgG ₁ , κ	PE	555372	BD PharMingen™
CD10 / CALLA / (neutral endopeptidase)	HI10a	Ms IgG ₁ , κ	PE	555375	BD PharMingen™
CD29 / ITGB1 / (cell adhesion)	MAR4	Ms IgG ₁ , κ	PE	555443	BD PharMingen™
CD31 / PECAM-1 / (component of endothelial cell intercellular junctions)	WM59	Ms IgG ₁ , κ	PE	555446	BD PharMingen™
CD34 / gp105-120, Sialomucin / (cell-cell adhesion factor)	581	Ms IgG ₁ , κ	APC	555824	BD PharMingen™
CD36 / FAT / (receptor for selective cholesteryl ester uptake)	CB38	Ms IgM, κ	PE	555455	BD PharMingen™
CD44 / HCELL / (cell adhesion and migration)	515	Ms IgM, κ	PE	550989	BD PharMingen™
CD45 / LCA / (tyrosine phosphatase)	HI30	Ms IgG ₁ , κ	APC	555485	BD PharMingen™
CD47 / (involved in the increase in intracellular calcium concentration)	B6H12	Ms IgG ₁ , κ	PE	556046	BD PharMingen™
CD49a / α1 integrin / (cell-surface receptor for collagen and laminin)	SR84	Ms IgG ₁ , κ	PE	559596	BD PharMingen™
CD49b / α2 integrin	DX5	Ms IgM, κ	PE	553858	BD PharMingen™
CD49c / α3 integrin	C3 II.1	Ms IgG ₁ , κ	PE	556025	BD PharMingen™
CD49d / α4 integrin	L25	Ms IgG _{2b} , κ	PE	340976	BD PharMingen™
CD49e / α5 integrin	C3 II.1	Ms IgG ₁ , κ	PE	555617	BD PharMingen™
CD49f / α6 integrin	GoH3	Ms IgG ₁ , κ	PE	555736	BD PharMingen™
CD56 / NCAM / (cell-cell adhesion)	My31	Ms IgG ₁ , κ	PE	345810	BD PharMingen™
CD61 / β3 integrin	VI-PL2	Ms IgG ₁ , κ	PE	555754	BD PharMingen™
CD71 / Transferrin receptor protein 1	M-A712	Ms IgG _{2a} , κ	PE	555537	BD PharMingen™
CD105 / Endoglin / (part of the TGF beta receptor complex)	166707	Ms IgG ₁ , κ	PE	FAB10971P	R&D Systemsä BD
CD106 / Vascular cell adhesion protein 1 / (cell adhesion)	51-10C9	Ms IgG ₁ , κ	PE	555647	BD PharMingen™
CD133	AC133	Ms IgG ₁ , κ	PE	130-080-801	Miltenyi™ BD
CD140a / PDGF Receptor a	αR1	Ms IgG _{2a} , κ	PE	556002	BD PharMingen™
CD140b // PDGF Receptor b	28D4	Ms IgG _{2a} , κ	PE	558821	BD PharMingen™
CD143 / Angiotensin-converting enzyme	BB9	Ms IgG ₁ , κ	PE	557928	BD PharMingen™
CD146 / MCAM / (marker for endothelial cell lineage)	PIH12	Ms IgG ₁ , κ	PE	550315	BD PharMingen™
CD172a / b (SIRPα/β)	SE5A5	Ms IgG ₁ , κ	APC		Biologend™ BD
CD184 / CXCR4 / (receptor specific for stromal-derived-factor-1 SDF-1)	12G5	Ms IgG _{2a} , κ	PE	555974	BD PharMingen™
CD309 / Flk-1 / (vascular endothelial growth factor receptor 2)	89106	Ms IgG ₁ , κ	PE	FAB357P	R&D Systemsä BD
Mouse IgG ₁ , κ	MOPC-21	Ms IgG ₁ , κ	PE	555749	BD PharMingen™
Mouse IgG ₁ , κ	MOPC-21	Ms IgG ₁ , κ	APC	555751	BD PharMingen™
Mouse IgG _{2a}	X39	Ms IgG _{2a} , κ	PE	349053	BD PharMingen™
Mouse IgG _{2b} , κ	27-35	Ms IgG _{2b} , κ	PE	555743	BD PharMingen™
Mouse IgM, κ	G155-228	Ms IgM, κ	PE	555584	BD PharMingen™

Table 2

Species	Origin	Cell Phenotype	Number of cells	Graft Yield	Cardiomyogenic differentiation	Number of host mice
Human	atrium	ALDH ⁺ cells	5.10 ⁴	0	negative	2 RAG
	ventricle	ALDH ⁺ cells	9.10 ⁴	less than 0,01%	positive	2 RAG
Macaque	ventricle	Total	1 g	0	negative	2 RAG
		ALDH ⁺ cells	1,5.10 ⁵	less than 0,01%	positive	2 NOD SCID
Mice	ventricle	ALDH ⁺ cells	5.10 ⁴ to 1,5.10 ⁵	less than 0,01%	positive	4 SCID, 4 RAG mice

Species	Origin	Cell Phenotype	Cardiac Induction (days)	Number of cells	Graft Yield	Cardiomyogenic differentiation	Number of recipient mice
Human	atrium	ALDH ⁺ cells	3	5,10 ⁵	0	negative	2
	ventricle	ALDH ⁺ cells	3	2,10 ⁵	less than 0,01%	negative	3
Macaque	ventricle	ALDH ⁺ cells	3	9,10 ⁴	less than 0,01%	positive	2
		ALDH ⁺ 34 ⁻ cells	5	1,10 ⁵	less than 0,01%	negative	2

Species	Origin	Cell Phenotype	Ex vivo expansion (days)	Cardiac Induction	Graft Yield	Cardiomyogenic differentiation	Number of recipient mice
Macaque	SKM	ALDH ⁺ cells (Frozen)	0	no	-	-	5 NOD-SCID
		ALDH ⁺ 34 ⁻ cells	3	no	+ (0.05%)	-	3 NSG
		ALDH ⁺ 34 ⁻ cells	2	yes	+ (8-20%)	+	3 NSG
		ALDH ⁺ 34 ⁻ cells	3	yes	+	+	2 NSG

> L'insuffisance cardiaque est un problème majeur de santé publique et différentes approches de thérapie cellulaire sont expérimentées pour améliorer la fonction de myocarde défaillants. De nombreux types cellulaires ont été utilisés (myoblastes squelettiques, cellules hématopoïétiques, endothéliales ou mésenchymateuses, cellules d'origine cardiaque...), plus souvent dans des indications d'insuffisance post-ischémique que de cardiomyopathie dilatée génétique. Il est en effet plus aisé de cibler une zone de réparation localisée que l'ensemble du tissu myocardique. De nombreux essais cliniques ont fait état de résultats fonctionnels de faibles ampleurs mais encourageants, dont l'interprétation est souvent limitée par la taille des cohortes et les variabilités biologiques liées aux patients et aux candidats cellulaires. Ces essais ont aussi mis en lumière des mécanismes d'action inattendus, qui changent les concepts et méthodologies de traitement. En effet, les bénéfices proviendraient de sécrétions de facteurs trophiques, plutôt que d'une intégration structurale des cellules au sein du myocarde. Par conséquent, les nouvelles générations d'essais visent à accroître la taille et l'homogénéité des cohortes de patients afin d'améliorer la puissance statistique. Par ailleurs, des études misent sur l'accompagnement et/ou le conditionnement des cellules à l'aide de biomatériaux et/ou de cocktails de cytokines, en vue d'améliorer leur survie et leur fonctionnement. En parallèle, de nombreuses recherches en bio-ingénierie s'intéressent au soutien des cellules, au maintien de la structure du myocarde, à la fabrication *ex vivo* de tissu cardiaque de substitution, et finalement à la possibilité de remplacer les cellules par leurs produits actifs de sécrétion. Plusieurs dispositifs devraient émerger de ces recherches, dont le choix sera guidé par l'indication médicale. <

Thérapies cellulaires des cardiopathies

Évolution du paradigme

Jean-Thomas Vilquin, Jessy Étienne



Centre de Recherche en Myologie,
Sorbonne Universités,
UPMC-Inserm UMRS 974, CNRS
FRE 3617, Institut de Myologie,
Groupe Hospitalier Pitié-
Salpêtrière, Paris, France.
jt.vilquin@institut-myologie.org

Epidémiologie, contexte médical et social

L'insuffisance cardiaque (IC) représente l'une des principales causes de morbidité et de mortalité au *xxi*^e siècle dans les pays développés. En Europe, l'IC est responsable de 5 % des admissions hospitalières en urgence, et représente environ 10 % de l'occupation des lits. 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 %. Ainsi, en France, près de 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. Les approches pharmacologiques (inhibiteurs de l'enzyme de conversion, bêta-bloquants...), la revascularisation, la réadaptation cardiovasculaire ont considérablement amélioré ce pronostic, mais restent des traitements symptomatiques, et les échappements ne sont pas rares. La transplantation cardiaque, qui constitue une solution ultime, est limitée par le nombre réduit de donneurs. Les approches de thérapie génique n'ont pas apporté tous les résultats escomptés. Les dispositifs d'aide mécanique ont des indications restreintes, et les nouvelles technologies de cœurs implantables sont encore en cours de développement.

L'une des causes principales de l'IC est l'ischémie myocardique. L'hypoxie puis la réponse inflammatoire entraînent la perte rapide et irréversible des cardiomyocytes adultes. Il n'existe pas, dans le muscle cardiaque, un stock important de cellules souches répara-

Vignette (©safaravector/FOTOLIA.COM).



trices, à l'inverse de l'abondance des cellules satellites présentes dans les muscles squelettiques. C'est donc un tissu fibreux cicatriciel, non contractile, qui va remplacer progressivement des portions de myocarde, entraînant un remodelage local puis global, une baisse de la fonction contractile, un effondrement progressif de l'efficacité hémodynamique.

Les cardiomyopathies dilatées non ischémiques (CMD) sont également à l'origine d'IC réfractaires progressives. Elles sont définies par une dilatation des cavités ventriculaires associée à une altération de la fonction contractile du myocarde. Leur étiologie n'est pas toujours expliquée, mais une origine génétique peut être établie dans un nombre croissant de cas. Les gènes identifiés à ce jour codent des protéines structurales du cytosquelette ou du sarcolemme (myosines, actines, troponine T, desmine, sarcoglycans, lamines, dystrophine...) [1]. Certaines pathologies neuromusculaires sont associées à une atteinte cardiaque évoluant vers une forme de CMD accompagnée d'insuffisance cardiaque grave, responsable en définitive du décès du patient myopathe. Il existe moins d'options thérapeutiques pour les CMD que pour les pathologies d'origine ischémique. Les CMD constituent environ 50 % des indications de transplantation cardiaque, et sont associées à des taux élevés de morts subites par arythmies ventriculaires.

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 tenter des approches de médecine régénérative, visant à repeupler ou revitaliser par des cellules des zones myocardiques lésées. Ces approches sont actuellement essentiellement basées sur la thérapie cellulaire, elles visent à remplacer les tissus fibrosés par des équivalents possédant des propriétés plus élastiques, à restreindre le remodelage, à restaurer une contractilité myocardique, à augmenter l'angiogenèse, à améliorer les conditions de survie des cellules localement présentes, à moduler les réponses inflammatoires, ou à recruter des cellules progénitrices locales ou circulantes. Ces approches thérapeutiques sont donc basées sur la restauration de fonctions nécessaires aux patients, plutôt que focalisées sur un type cellulaire en particulier. Ceci explique que de nombreux types cellulaires ont été proposés pour remplir ces offices, mais dont la pertinence clinique ultime a souvent été limitée par le manque de caractérisation phénotypique, les difficultés d'obtention, d'expansion, d'administration ciblée, d'intégration au sein du tissu cardiaque, et finalement le manque d'efficacité biologique avérée *in vivo* (Figure 1).

L'indication clinique peut dicter le choix d'un type cellulaire, ou d'un contexte immunologique. Ainsi un traitement préventif de l'IC en phase aiguë de l'ischémie myocardique fera appel à des cellules rapidement mobilisables, ne nécessitant pas de longs délais de cultures. Les traitements en phase chronique permettent l'utilisation de nombreux types cellulaires. Les approches autologues sont théoriquement préférées afin d'éviter les risques de rejet immunologique et de limiter les risques bactériovirologiques, mais les approches allogéniques ont pris progressivement une place importante dans cet arsenal. De nombreux essais cliniques sont en cours, soulignant

encore, pour l'instant, l'absence de consensus quant au choix d'un candidat idéal.

Types cellulaires envisagés et/ou utilisés

Les cardiomyocytes

Dans des modèles animaux, le transfert de cardiomyocytes fœtaux permet une reconstitution histologique et fonctionnelle de la zone nécrosée. Cependant, l'extraction directe de cardiomyocytes adultes est très difficile, leur capacité proliférative et d'intégration disparaît très peu de temps après la naissance chez les mammifères, et cette source de cellules n'est donc pas utilisable 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 peuvent varier d'une étude à l'autre. Un *turn-over* des cellules cardiaques existe en effet, mais il est extrêmement faible.

Des cellules responsables de la cardiomyogenèse ont été identifiées chez l'embryon et le jeune animal par l'expression du gène *Islet1*. Ces cellules sont impliquées dans la formation du champ secondaire cardiaque, du tissu de conduction, et du tissu vasculaire lors du développement [2]. Elles peuvent être multipliées *in vitro* sur un substrat d'origine cardiaque, pour se différencier en cardiomyocytes fonctionnels. Cependant, cette population présente une hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle, sa localisation anatomique empêche son prélèvement chez le patient selon une modalité autologue.

Les populations de cellules *c-Kit*⁺ présenteraient une fréquence de 1/10 000 et reconstitueraient les myocardes endommagés en participant à la fois à l'angiogenèse et à la cardiogenèse. Il est difficile de les produire rapidement et en grand nombre, et leurs caractéristiques phénotypiques ne sont pas conservées en culture. Elles ont fait l'objet de nombreuses controverses : leur rôle dans la cardiogenèse serait très minoritaire [3] et un essai clinique les utilisant a fait l'objet d'une enquête.

Les populations de cellules *Sca-1*⁺ représenteraient jusqu'à 20 % des cellules non contractiles du myocarde, certaines peuvent se différencier en cardiomyocytes, cependant le marqueur *Sca-1* est essentiellement murin et son équivalent humain est encore énigmatique. Dans la plupart des cas, leur différenciation cardiaque est tributaire d'un environnement cellulaire cardiaque.

Les mésangioblastes sont une catégorie de péricytes ou de cellules périvasculaires et ont été décrites dans

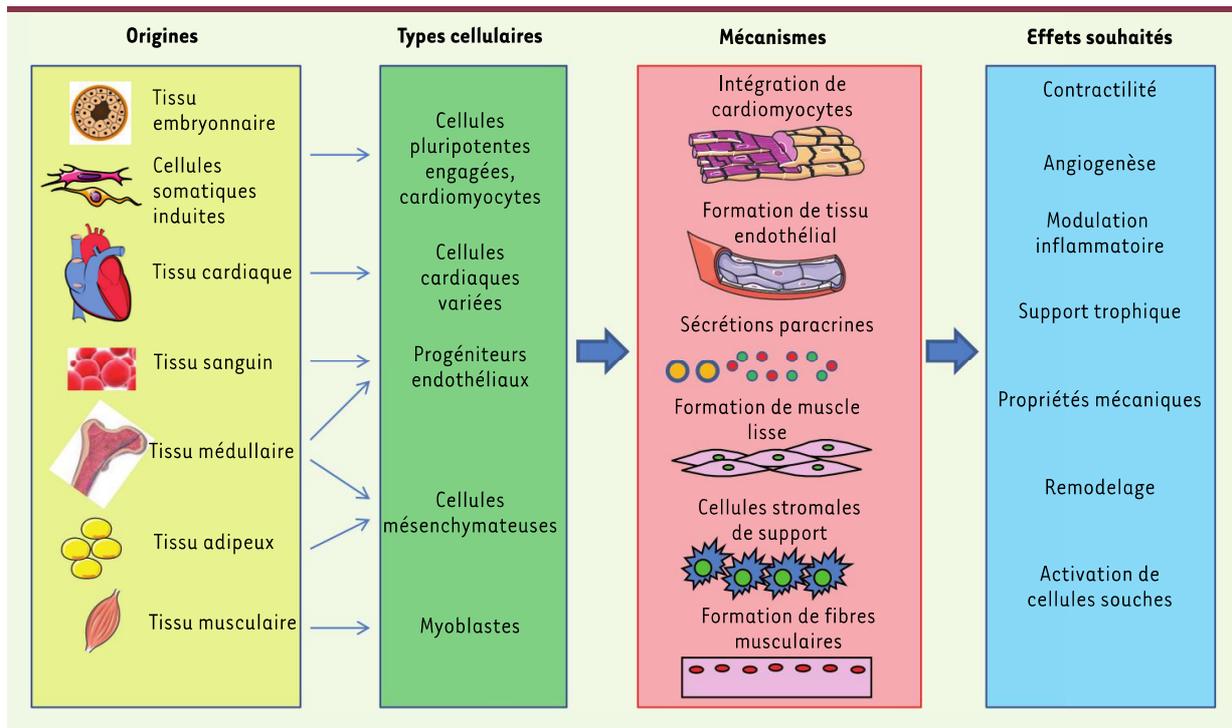


Figure 1. Types cellulaires testés en clinique, mécanismes discutés, et effets recherchés.

des compartiments cardiaques, mais ont surtout été étudiées dans le contexte de la régénération musculaire squelettique.

Il est possible de produire à partir de tissu cardiaque adulte des structures cellulaires appelées cardiosphères. Ces amas, issus de cultures réalisées dans des conditions particulières, contiennent des cellules présentant des caractéristiques proto-cardiogéniques, mais surtout mésenchymateuses si l'on se fonde sur les marqueurs qu'elles expriment préférentiellement. Les propriétés essentiellement trophiques de ces cellules ont été mises à profit au cours d'essais cliniques.

Il existe également, au sein du cœur adulte et en particulier au niveau des oreillettes, des populations de cellules exprimant des enzymes de la famille des aldéhydes déshydrogénases. Ces populations sont impliquées dans la détoxification des aldéhydes, favorisant la survie cellulaire en conditions hostiles, mais aussi dans le métabolisme de l'acide rétinolique, un acteur majeur des différenciations myogéniques et cardiogéniques [4, 5, 6]. Ces populations cellulaires, cependant, expriment surtout des phénotypes mésenchymateux, mais améliorent la fonction cardiaque dans des modèles animaux.

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, au chevet du patient, ont motivé leur utilisation dans de nombreux protocoles cliniques. Cependant, plusieurs études ont établi la restriction de différenciation de ces cellules vers la voie hématopoïétique,

et les modestes bénéfices fonctionnels observés sont attribués à des mécanismes paracrines. Des cellules hématopoïétiques peuvent être mobilisées par le G-CSF pour une récupération dans le sang circulant. Le sang de cordon, qui peut être préparé à l'issue d'accouchements, est également considéré actuellement comme une source potentielle intéressante pour ses nombreuses composantes, les cellules hématopoïétiques, endothéliales, et mésenchymateuses.

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM)

Ces cellules ont été décrites à partir du compartiment médullaire, mais peuvent être obtenues à partir d'autres tissus. En particulier, une fraction stromale du tissu adipeux, abondant et facile d'accès, contient également des cellules proches des CSM qui présentent des capacités angiogéniques plus marquées. Les CSM ont des capacités de différenciation établies, qui ont suscité des études très avancées de leur potentiel régénératif (formation d'os ou de cartilage), et des capacités plus controversées ont été revendiquées (participation à l'angiogenèse, à la myogénèse, à la cardiogénèse). Elles sont également étudiées et utilisées pour leurs propriétés immunomodulatrices, dont les mécanismes commencent à être élucidés. Enfin, lorsqu'elles ne se différencient pas de manière

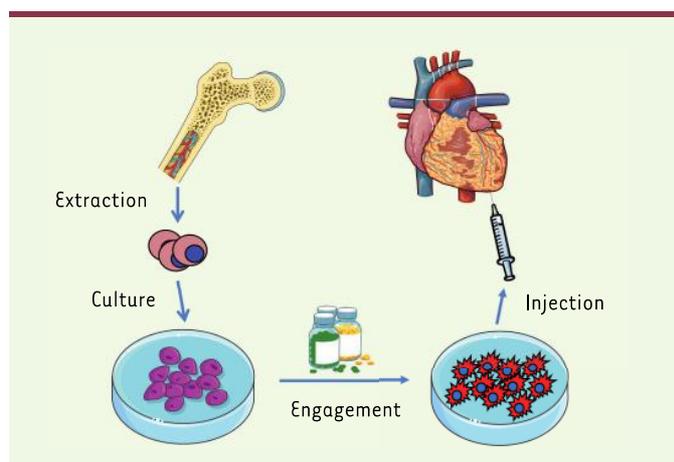


Figure 2. Conditionnement moléculaire des cellules avant utilisation.

terminale, elles participent au soutien stromal, en sécrétant des facteurs trophiques de différentes natures (cytokines, protéines, ARNs), solubles ou contenus dans des microvésicules [7]. Cependant, leur utilisation directe pour la réparation cardiaque dans des modèles animaux s'est parfois heurtée à la formation de tissus osseux ectopiques, et au risque de micro-embolisation lorsqu'elles sont injectées par la voie coronaire.

Une nouvelle modalité d'utilisation de ces cellules a donc été développée, basée sur l'engagement cardiogénique avant injection. La différenciation des cellules cardiaques passe par différentes étapes, au cours de la cardiogenèse, et ces étapes ont été décortiquées et modélisées *in vitro*. Des progéniteurs mésodermiques embryonnaires forment un mésoderme cardiaque, puis des progéniteurs cardiaques, puis des cardiomyocytes immatures, enfin des cardiomyocytes terminaux, mettant en œuvre plus de 25 gènes. Parmi ceux-ci, GATA4, NKx2.5 et Tbx5 ont des schémas d'expression caractéristiques, et leur induction a été testée à l'aide de nombreuses molécules. Ces recherches ont identifié des cocktails (activateurs et inhibiteurs de la voie wnt, protéines BMP, FGF, IGF1) qui, utilisés de manière séquentielle, permettent de produire des progéniteurs cardiaques immatures, à partir de CSM (Figure 2).

Cette approche d'un conditionnement des CSM *in vitro* est à l'origine de nouveaux essais cliniques [8] mais l'échec récemment rapporté de l'essai randomisé (CHART-1) qui a évalué ces CSM « cardiopoiétiques » pose la question de leur réelle efficacité.

Les cellules endothéliales

L'utilisation de précurseurs endothéliaux a été proposée dans le but d'augmenter l'angiogenèse locale ou de soutenir d'autres types cellulaires greffés en parallèle. Les progéniteurs endothéliaux peuvent être préparés à partir de moelle osseuse, de sang périphérique, et des méthodologies ont été développées pour les multiplier en culture. Elles sont très étudiées, en thérapie cellulaire, principalement pour le traitement de pathologies vasculaires telles que l'ischémie de membre inférieur liée au diabète.

Les myoblastes

L'utilisation des myoblastes a initialement reposé sur leurs capacités à former, *in situ*, du tissu musculaire squelettique fonctionnel. Ces cellules sont obtenues en grandes quantités à partir de biopsies musculaires, par expansion des cellules satellites qui sont les cellules souches résidentes des muscles squelettiques. Leur utilisation dans diverses indications d'IC s'est traduite par des bénéfices fonctionnels mitigés et transitoires, médiés par des mécanismes paracrines mais non structuraux.

Les cellules souches embryonnaires (ES)

Ces cellules pluripotentes peuvent, *a priori*, se différencier dans la plupart des types cellulaires d'un organisme. Leur différenciation en cardiomyocytes est de mieux en mieux maîtrisée. Les rendements de différenciation et la maturation pourront être encore améliorés en combinant des substrats synthétiques, un conditionnement par des contraintes mécaniques, ou la stimulation électrique. Les cellules ES engagées présentent des caractéristiques biochimiques et électrophysiologiques proches de celles de cardiomyocytes adultes. Dans des modèles d'IC post-ischémique, incluant les primates non humains, des cellules implantées en zone cicatricielle se différencient en cardiomyocytes et participent à la régénération histologique et fonctionnelle de l'organe [9]. Cependant, l'efficacité de ce type cellulaire peut être liée à l'indication, donc à l'environnement tissulaire où ces cellules sont implantées. L'intégration peut être très mauvaise, dans des modèles de CMD génétique, où le tissu cardiaque reste compact [10]. Sur le plan clinique, l'utilisation des cellules ES peut être limitée par plusieurs aspects : 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 ; le caractère immunogène à présent bien reconnu de ces cellules [11] qui sont forcément utilisées dans un contexte allogénique ; dans certains cas, des considérations éthiques liées à l'obtention et à la préparation de lignées humaines ; leur capacité de maturation terminale *in vivo*.

L'utilisation de ces cellules dans un contexte clinique est donc conditionnée par une série d'étapes et de contraintes à respecter pour garantir la sécurité des patients. Une banque de cellules doit être constituée, standardisée, et les caractéristiques des cellules doivent en être validées. À partir de celles-ci, une spécification cardiaque doit être mise en œuvre, et également validée. Puis, une purification poussée des cellules cardiogéniques doit être réalisée, dans le but d'éliminer les cellules non engagées et susceptibles de

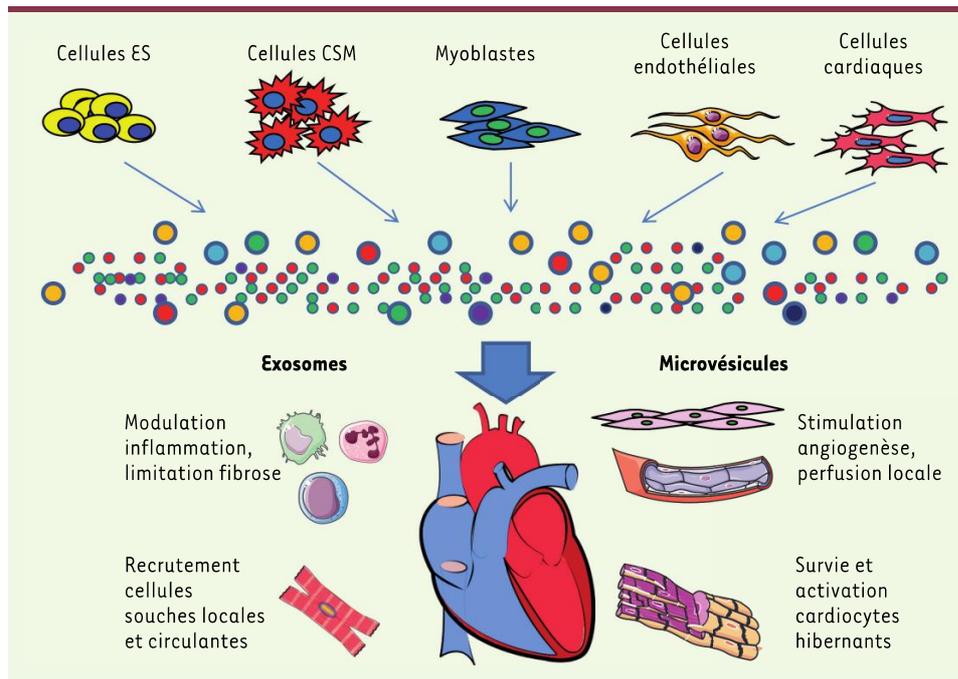


Figure 3. Productions cellulaires paracrines et effets sur l'homéostasie cardiaque.

diminue l'apoptose, l'inflammation, la fibrose et le remodelage, mais la formation de nombreux vrais cardiomyocytes n'a été obtenue qu'à partir de cellules ES engagées. La plupart des types cellulaires envisagés joue donc essentiellement un rôle trophique et de soutien [16].

Les exosomes sont des particules de 30 à 100 nm, les microvésicules mesurent de 100 à 1 000

différenciations non souhaitées. Enfin, il ne faut pas sous-évaluer la variabilité biologique et des réactifs [12- 15]. La validation de ces étapes est réalisée en concertation avec les agences réglementaires. Ces obstacles ont été récemment surmontés, ce qui a permis le lancement d'un nouveau type d'essai clinique, appelé ESCORT, évoqué ci-après.

Les cellules souches induites pluripotentes (cellules iPS) suscitent un grand intérêt car elles peuvent être obtenues par l'introduction d'une série de gènes à l'intérieur de cellules somatiques adultes, c'est-à-dire dans un contexte potentiellement autologue. Ainsi reprogrammées, elles présentent un grand nombre des caractéristiques des cellules ES, notamment la capacité de différenciation cardiomyogénique. Le développement de ces cellules en est encore à ses débuts mais les résultats sont prometteurs chez le primate non-humain. Des progrès sont réalisés concernant la nature des reprogrammations (pour éviter des événements d'intégration de séquences proto-oncogènes) et leur différenciation terminale, mais leur stabilité doit être contrôlée avant une utilisation clinique.

Mécanismes d'action des candidats cellulaires

Les concepts liés aux mécanismes d'action des cellules proposées ont évolué, avec les mesures de leur efficacité, de leur survie et de leur capacité d'intégration... Initialement, ces cellules étaient supposées apporter un bénéfice structural, contractile, et dans certains cas la différenciation directe en cardiomyocytes intégrés au tissu cardiaque était espérée. De nombreuses études ont mis en évidence des améliorations modestes de l'efficacité contractile, mais il est apparu que ces bénéfices étaient vraisemblablement liés à des effets de sécrétions paracrines. La production de cytokines, de facteurs de croissance, d'exosomes et de microparticules stimule l'angiogénèse locale,

nm. Tous deux contiennent des protéines, des lipides, du matériel génétique, différents miARN, et sont libérés par de nombreux types cellulaires incluant les cellules ES, les iPS, les CSM, les myoblastes, notamment après activation. Captés par les cellules, ils leur apportent des informations, et font ainsi partie d'un réseau de communications intercellulaires. Des études ont montré que ces vésicules amélioreraient à elles seules la fonction cardiaque, l'angiogénèse locale, la survie des cellules ; ces effets sont médiés en partie par des miARN [17, 18]. Les vésicules produites par des cellules engagées dans la cardiogénèse (cardiosphères, cellules iPS et ES induites) sont plus efficaces que celles produites par des cellules engagées dans d'autres voies (fibroblastes) (Figure 3).

La compréhension des mécanismes d'action n'est pas sans importance pour la mise en œuvre de nouvelles stratégies, et peut entraîner un changement du paradigme de traitement [16]. En effet, si les cellules ne s'intègrent pas, il peut être possible d'utiliser indifféremment des cellules autologues et allogéniques. Et si les cellules n'agissent que par leurs sécrétions, peut-être peut-on se passer des cellules pour n'utiliser que les sécrétions ?

Essais cliniques

De nombreux essais cliniques ont été réalisés depuis une quinzaine d'années, essentiellement dans les indications de l'IC post-ischémique, utilisant différents



types cellulaires, et sous la promotion d'acteurs académiques ou privés. Les essais ouverts de phase I ont généralement fourni des résultats très enthousiasmants, des essais de phase II leur ont succédé et se sont conclus par des résultats mitigés. Plusieurs types cellulaires, dans différentes indications, font actuellement l'objet d'essais de phase III. Plusieurs milliers de patients ont été inclus, donnant lieu à de très nombreuses études.

Ainsi, pour ne citer que les essais à grands effectifs, l'efficacité des CSM (d'origine médullaire ou adipeuse) a été éprouvée au cours des essais APOLLO, C-Cure, CHART I, MESAD, POSEIDON, PRECISE, PROMETHEUS, REGENT, RENEW, SEED-MS, STROMACELL, TRIDENT... Les cellules d'origine médullaire ont été testées au cours des essais ASTAMI, BAMI (en cours), BONAMI, BOOST, FOCUS, FINCELL, HEBE, REPAIR-AMI, TAC-HFT... Les cellules d'origine cardiaque (cardiosphères, cellules c-kit+) ont été testées dans les essais ALCADIA, DYNAMIC, CADUCEUS, SCIPIO, TICAP. Les myoblastes ont fait principalement l'objet de l'essai MAGIC [19].

Des méta-analyses, dédiées à des indications, à des types cellulaires ou à des voies d'administrations particuliers, ont été menées, regroupant parfois plus de 40 études et plus de 2 500 patients [20-23]. Ces analyses, globalement, notent une absence d'augmentation de la surmortalité des patients, mais aussi (et pas toujours) une légère amélioration de la fraction d'éjection du ventricule gauche (de 2.5 à 5.5 % selon les études) et une limitation du remodelage, une amélioration variable de la qualité de vie des patients. Elles donnent aussi des résultats contradictoires, suggérant des bénéfices seulement dans certaines indications (différenciant par exemple l'indication d'ischémie chronique de la situation d'infarctus aigu). Généralement, ces analyses mettent en évidence de grandes hétérogénéités entre les essais, les cohortes, les méthodologies d'inclusion et de mesures, et elles soulignent la nécessité de réaliser des cohortes plus larges, plus homogènes, et, idéalement, randomisées. De manière plus inquiétante, l'étude DAMASCENE [24] établit une corrélation positive entre les biais relevés par une lecture attentive, et l'efficacité revendiquée, et plaide pour une rigueur accrue.

L'applicabilité, la pertinence thérapeutique de ces approches sont beaucoup moins explorées dans les indications d'IC non-ischémique pour des raisons conceptuelles, médicales et techniques. La nature progressive de ces atteintes, l'extension de la fibrose et du remodelage, rendent le ciblage d'une zone spécifique plus difficile que lorsqu'il s'agit d'une cicatrice d'ischémie clairement délimitée. Alors qu'il est relativement aisé de créer des modèles expérimentaux d'IC post-ischémique par des ligatures coronaires chirurgicales, peu de modèles pertinents ont été développés qui miment la physiopathologie des CMD non ischémiques. Enfin, les mécanismes thérapeutiques à l'œuvre dans les indications ischémiques ne sont pas forcément les mêmes que dans les CMD non-ischémiques. Une synthèse récente [25] répertorie une quinzaine d'études cliniques de différentes envergures. La plupart rapportent une amélioration de la fraction d'éjection ventriculaire gauche (de 3 à 11 %), une amélioration des scores cliniques et de la qualité de vie des patients, une absence d'effet sur la surmortalité, mais une incidence plus élevée de troubles rythmiques. Ici encore, de

fortes hétérogénéités sont notées concernant les critères d'inclusion, les procédures, les mesures. Plusieurs essais sont en cours : ALLSTAR, IMPACT-DCM, ixCELDCM, MiHeart, NOGA-DCM, POSEIDON-DCM, REGENERATE-DCM, Revascor...

De manière générale, l'hétérogénéité des études est liée notamment à la variabilité présentée par des patients ayant des caractéristiques et des parcours de vie différents : citons les co-morbidités associées, le degré de sédentarité, le genre, l'âge, la présence d'un tabagisme, la nature des lésions myocardiques, les traitements pharmacologiques associés... L'hétérogénéité peut aussi être liée aux cellules puisque le nombre de cellules disponibles, leur physiologie et leur activité, la nature de la délivrance, le nombre de doses... peuvent varier. Il sera nécessaire dans l'avenir de constituer des cohortes de patients plus importantes, et plus homogènes tant du point de vue de l'indication et des qualités des types cellulaires, que du point de vue de l'état physiologique des patients.

Quel modèle immunologique, quel modèle économique ?

Le développement de traitements ne peut échapper à une étude des modèles économiques qui pourraient être mis en œuvre pour en assurer une dissémination [26]. En plus des acteurs académiques, de certaines grandes institutions ou de grands hôpitaux, de nombreuses compagnies privées sont ou se sont impliquées dans ces recherches de thérapie cellulaire de l'IC ; citons par exemple : Aastrom, Aldagen, Amorcyte, Angioblast, Arterioocyte, Baxter, Biocardia, Bioheart, Caprico, Celyad, Cytori, Genzyme, Harvest-Tech, Miltenyi, Osiris, Stempeutics, TCA, Teva Pharmaceuticals, Theravita...

Le point le plus délicat est représenté par la production de cellules de qualité clinique. Le coût de production est lié au nombre d'étapes et à la quantité de matériels et réactifs nécessaires à la réalisation et à la validation d'un lot. Le risque, et sa maîtrise, sont liés au nombre de lots produits par unité de temps. On peut donc opposer deux stratégies basées sur l'utilisation de cellules allogéniques, ou de cellules autologues.

Les cellules allogéniques sont produites à partir d'un ou plusieurs donneurs sains, définis par certains critères (âge, état de santé, activité et disponibilité des cellules...). Les cellules sont produites à grande échelle et constituent un lot unique faisant l'objet des contrôles de qualité. Puis elles sont conservées en petits aliquotes, et utilisées au moment des besoins. Une production peut suffire à plusieurs centaines de patients, et la production à grande échelle est économique sur le

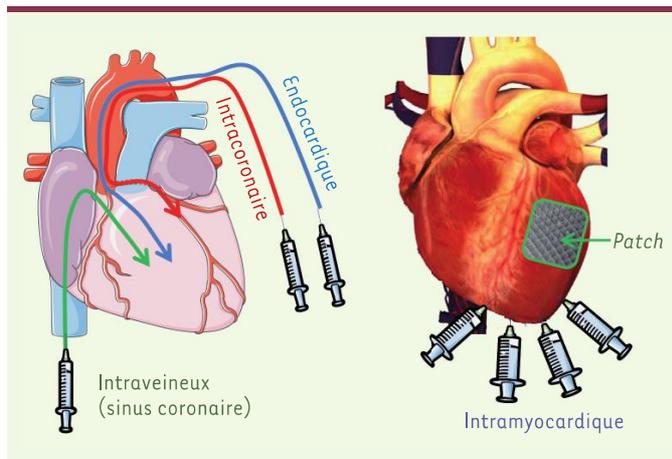


Figure 4. Modalités de délivrance des cellules.

plan des réactifs et des installations. Le différentiel de coût devient très intéressant, par rapport au coût de production de cellules autologues, lorsque le nombre de patients à traiter dépasse les 200 000 [26]. Cependant, les cellules allogéniques sont, par définition, immunogènes pour le receveur, qui devra recevoir une immunosuppression coûteuse et risquée pour en éviter le rejet. Si la persistance des cellules n'est pas recherchée à long terme, mais seulement pour un temps correspondant à la synthèse de facteurs à effet paracrine, l'immunosuppression pourra être plus limitée, et par conséquent mieux tolérée. Le développement d'une sensibilisation immunitaire du receveur, lors de la première injection, empêche les possibilités de ré-administration ultérieure des mêmes cellules allogéniques (un lot provenant d'un donneur différent pourrait théoriquement être utilisé).

Les cellules autologues sont produites à partir du donneur lui-même. Selon le type cellulaire considéré, la préparation peut prendre plus ou moins de temps, et de longues cultures cellulaires ne peuvent être entreprises si le traitement doit être réalisé très rapidement. Chaque production est donc considérée comme un lot indépendant, qui doit être qualifié individuellement, et dont la qualité intrinsèque dépend de chaque donneur. Les risques sont augmentés, ainsi que les difficultés logistiques et les coûts. Dans un certain nombre de cas, les productions peuvent échouer pour des raisons inhérentes aux patients ou à la qualité de leurs cellules. L'avantage de l'approche autologue est qu'elle évite les risques de rejet, et donc à la fois les coûts et les risques liés à l'immunosuppression, tout en permettant les ré-administrations des mêmes cellules en cas de nécessité. L'approche autologue est donc intéressante dans le cas où les cellules sont administrées plusieurs fois, justifiant la production en grandes quantités et générant des économies d'échelle.

Des études précliniques et cliniques récentes suggèrent une efficacité clinique comparable des CSM autologues et allogéniques [27, 28]. S'il s'avère qu'un effet transitoire est suffisant, les cellules allogéniques pourraient prendre le dessus sur les applications autologues pour des questions de coût et de simplicité de mise en œuvre. Nous verrons un

peu plus loin qu'il est même possible, dans l'avenir, que la présence-même des cellules ne soit pas une condition absolue... ce qui changerait tout à fait le paradigme de préparation de ces produits biologiques.

Délivrance des cellules, biomatériaux, et suivi des cellules

Outre les questions biologiques, la thérapie cellulaire se heurte à des questions de délivrance des cellules. La technique de transfert de cellules la plus utilisée jusqu'à présent repose sur des injections en des sites multiples directement dans une zone ciblée plus ou moins étendue (Figure 4).

L'injection peut être faite manuellement de manière sous-épicardique, ou à l'aide de cathéters empruntant la voie intra-coronaire ou endocardique (plus exceptionnellement, la voie rétrograde du sinus coronaire). Cette modalité d'administration n'est pas tout à fait satisfaisante pour plusieurs raisons : elle implique d'abord une trypsination des cellules qui les prive de leur ancrage naturel à une matrice ; elle projette les cellules sous pression, et sans protection dans un environnement qui n'est pas nécessairement favorable à leur intégration ; elle est peu précise et difficilement reproductible ; elle conduit à une dissémination de foyers intra-myocardiques potentiellement arythmogènes. Alternativement, les cellules peuvent être injectées dans la circulation cardiaque via un cathéter intra-coronaire, bloqué temporairement par un ballonnet gonflable. Cette technique ne permet aux cellules injectées qu'un temps de passage bref dans la circulation et leur réelle rétention est mal connue.

L'utilisation de biomatériaux s'impose progressivement en adjonction de cellules nues [14, 15]. Les biomatériaux « habillent » les cellules ; ils peuvent les protéger contre les effets de flux à l'injection ; ils augmentent la survie et la rétention précoce en fonction de leurs paramètres physico-chimiques ; ils peuvent mimer un environnement 3D à type de niche, et certains peuvent être fonctionnalisés par des facteurs de croissance ; ils peuvent renforcer la structure même des parois ou du myocarde en fonction de leurs propriétés physiques. Les différents types de biomatériaux sont les polymères naturels, les polymères synthétiques, les tissus décellularisés, voire les feuillets cellulaires (simples ou multiples) où les cellules se soutiennent mutuellement et se complètent fonctionnellement (Jackman, 2015). Les biomatériaux présentent différentes caractéristiques sur lesquelles il est possible de jouer selon la nécessité biologique, ou l'utilisation envisagée : structure (porosité ; géométrie du réseau ; fonctionnalisation ;



dégradation) ; élasticité ; capacité d'induction angiogénique ou cardiogénique ; état physique (liquide, visqueux, semi-solide...).

Plusieurs équipes expérimentent l'application sur les zones pathologiques cibles des feuilles de cellules, ou de matrices cellularisées biodégradables à base d'alginate, de Matrigel, de fibrine, de polysaccharides, de gélatine, de collagène, dans différentes espèces animales (Souris, Rat, Cochon d'Inde, Mouton, Macaque) [29]. Certaines matrices favorisent la survie cellulaire et promeuvent l'angiogénèse locale, et dans des modèles post-ischémiques, ces greffons améliorent la fonction cardiaque [30, 31]. Des progrès restent à accomplir concernant l'intégration réelle de ces biomatériaux, leur vascularisation, leur colonisation par des cellules de l'hôte, et réciproquement la migration des cellules qu'elles contiennent vers le tissu cardiaque hôte. Ces résultats fondent l'utilisation de matrices biodégradables. Certains biomatériaux peuvent aussi être utilisés *ex vivo* pour participer à la production de tissu cardiaque, qui pourra être ensuite implanté directement sur la zone à traiter [32]. Lors de leur conception, il ne faut cependant pas négliger le côté pratique de leur utilisation, pour le médecin qui sera amené à les mettre en place. Des techniques d'imagerie cellulaire ont été développées, ou mises à profit, pour suivre le destin de ces cellules que l'on voudrait promises à un engagement cardiaque [33]. Prises dans un état de flux permanent, il faut pouvoir en suivre l'état, le phénotype, l'activité, la migration, la différenciation ou la fonction *in vitro* et *in vivo*. Ces méthodes sont souvent complémentaires, directes ou indirectes, soit pour leurs hautes résolutions mises en œuvre dans les caractérisations *in vitro* (microscopie confocale, à deux photons, à super-résolution, analyse de seconde harmonique, spectroscopie Raman, imagerie photo-acoustique...), soit pour leurs capacités d'investigations de tissus épais mises en œuvre pour le suivi dans l'animal vivant (imagerie bioluminescente, imagerie par résonance magnétique ou tomographie par émission de positons, microscopie multimodale, tomographie à cohérence optique...) [33].

Vers des changements de paradigme ?

Trois constatations majeures, issues de l'expérimentation et des observations, commencent à s'imposer, et pourraient amener à changer progressivement de paradigme et de méthodologies : (1) dans de nombreuses études, l'effet bénéfique de l'injection des cellules persiste en dépit du faible nombre de cellules survivantes, en dépit de leur disparition ou de leur absence d'intégration ; cependant, les cellules qui présentent un réel phénotype cardiaque, une réelle capacité d'intégration, sont plus performantes ; (2) l'utilisation de biomatériaux, chez l'animal, peut améliorer la survie, la rétention et l'efficacité des cellules, et même certains biomatériaux sans cellules peuvent se révéler efficaces ; (3) enfin, les cellules libèrent des exosomes et des microvésicules qui contiennent de très nombreux composés de différentes natures capables d'interagir ensemble ou de se compléter, et qui sont probablement à l'origine de tout ou partie des bénéfices observés.

Une nouvelle catégorie d'essai a été initiée récemment. Dans l'essai ESCORT de phase I, des cellules ES engagées dans la différenciation car-

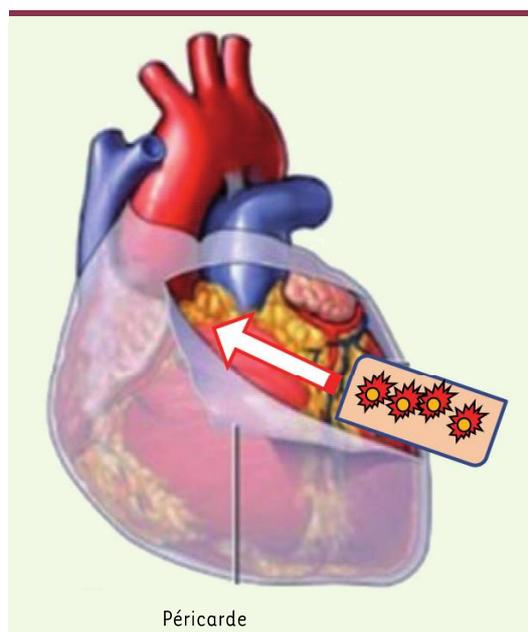


Figure 5. Mise en place sous-péricardique d'un biomatériau.

diogénique et sélectionnées sur cet engagement ont été incluses dans un gel de fibrine. Au cours d'une opération de pontage coronaire, cette pièce de biomatériau a été fixée en regard de la zone d'infarctus, puis recouverte et immobilisée par un lambeau du péricarde entrouvert du patient. Cette méthode permet de maintenir la pièce en place, et il permet également de la nicher au sein de tissus vascularisés (Figure 5). Les cellules étant allogéniques, les patients reçoivent une immunosuppression transitoire stoppée au bout d'un mois. Les premiers patients ont été inclus dans cet essai, destiné avant tout à évaluer la tolérance et la sécurité des procédures et matériels, et il se déroule à ce jour sans incident [12, 13]. Cet essai est donc particulièrement innovant, car il repose sur l'utilisation de cellules pluripotentes spécifiques et sélectionnées, en combinaison avec un biomatériau, et il mise autant, sinon davantage, sur la production de facteurs à activité paracrine par les cellules que sur leur intégration structurale au myocarde.

S'il s'avère que les exosomes et microvésicules produits par des cellules engagées sont capables d'améliorer la fonction cardiaque, il pourra être légitime de vouloir substituer l'administration de cellules par l'injection de microvésicules purifiées. Celles-ci pourraient améliorer, temporairement, l'efficacité cardiaque, et l'on pourrait évoquer une stratégie thérapeutique « *cell-based, cell-free* » [14, 15]. Cependant, les bénéfices en seraient probablement transitoires, et nécessiteraient des injections répétées. L'utilisation de biomatériaux pourrait

permettre une rétention prolongée de ces microvésicules au site de greffe. Une alternative consisterait à continuer d'utiliser des cellules, qui seraient choisies et sélectionnées pour leur capacité de production continue des vésicules les plus efficaces, et qui seraient implantées au titre de petites centrales de production.

Conclusions

Ces approches de médecine régénérative cardiaque ont été développées, chez l'homme, depuis une quinzaine d'années, à partir de concepts simples. De nombreux candidats de thérapie cellulaire ont été testés, avec des résultats mitigés, et il n'existe pas encore de consensus quant au type cellulaire préférentiel. Une compréhension plus fine des mécanismes d'action, le suivi des cellules, le développement de biomatériaux, permettent de progresser rapidement tous azimuts et de développer des concepts puis des approches innovantes. Un corollaire important de ces travaux dédiés à la santé humaine, est qu'ils permettent aussi une évolution rapide de la compréhension de la physiologie, de la biologie des cellules souches musculaires et cardiaques, et de la régénération musculaire, et qu'ils entraînent le développement de nouveaux outils. La prudence reste nécessaire, face aux incertitudes et aux variabilités de la biologie, aux risques d'erreurs et de mauvaises interprétations, aux excès d'enthousiasme. Les perspectives sont riches et nombreuses, la régénération ou au moins la préservation myocardiques restent des objectifs raisonnables. ♦

SUMMARY

Cell therapies for cardiopathies: the shift of paradigms

Heart failure is a major concern for public health systems, and several approaches of cellular therapy are being investigated with the goal of improving the function of these failing hearts. Many cell types have been used (skeletal myoblasts, hematopoietic, endothelial or mesenchymal progenitors, cardiac cells...), most often in the indication of post-ischemic heart failure rather than in the indication of genetic dilated cardiomyopathy. It is easier, indeed, to target a restricted area than the whole myocardium. Several clinical trials have reported slight but encouraging functional benefits, but their interpretations were frequently limited by the small sizes of cohorts, and by the biological variabilities inherent to the patients status and to the biology of the cells. These trials also shed light on unexpected mechanisms of action of the cells, which are changing the concepts and methodologies of the studies. The functional benefits observed would be due, indeed, to the secretion of trophic factors by the cells, instead of their true structural and mechanical integration within the myocardial tissue. Accordingly, the new generations of clinical trials aim at improving the size and homogeneity of the patient cohorts to increase the statistical power. On the other hand, several studies are associating or conditioning cells with biomaterials or cocktails of cytokines to improve their survival and their biological efficacy. In parallel, bio-engineering investigates several ways to support cells in vitro and in vivo, to sustain the architectural structure of the failing myocardium, to produce ex vivo some true substitutive cardiac tissue, or to purely replace the cells

by their active secreted products. Several therapeutic devices should emerge from these researches, and the choice of their respective use will be ultimately guided by the medical indication. ♦

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

REMERCIEMENTS

Les auteurs souhaitent remercier particulièrement le Professeur Philippe Menasché pour ses conseils, recommandations, et relectures attentives de ce manuscrit, ainsi que Madame Tuy Nga Brignol pour son aide et ses conseils iconographiques.

RÉFÉRENCES

1. Charron P, Arad M, Arbustini E, et al. Genetic counselling and testing in cardiomyopathies: a position statement of the European Society of Cardiology working group on myocardial and pericardial diseases. *Eur Heart J* 2010 ; 31 : 2715-26.
2. Moretti A, Caron L, Nakano A, et al. Multipotent embryonic isl1+ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification. *Cell* 2006 ; 127 : 1151-65.
3. Van Berlo JH, Molkenin JD. Most of the dust has settled: cKit+ progenitor cells are an irrelevant source of cardiac myocytes in vivo. *Circ Res* 2016 ; 118 : 17-9.
4. Balber AE. Concise review: aldehyde dehydrogenase bright stem and progenitor cell populations from normal tissues: characteristics, activities, and emerging uses in regenerative medicine. *Stem Cells* 2011 ; 29 : 570-5.
5. Koninckx R, Daniels A, Windmolders S, et al. The cardiac atrial appendage stem cell: a new and promising candidate for myocardial repair. *Cardiovasc Res* 2013 ; 97 : 413-23.
6. Roehrich ME, Spicher A, Milano G, et al. Characterization of cardiac-resident progenitor cells expressing high aldehyde dehydrogenase activity. *Biomed Res Int* 2013 ; 2013 : 503047.
7. Karantalis V, Hare JM. Use of mesenchymal stem cells for therapy of cardiac disease. *Circ Res* 2015 ; 116 : 1413-30.
8. Bartunek J, Behfar A, Dolatabadi D, et al. Cardiopoietic stem cell therapy in heart failure: the C-CURE (Cardiopoietic stem Cell therapy in heart failure) multicenter randomized trial with lineage-specified biologics. *J Am Coll Cardiol* 2013 ; 61 : 2329-38.
9. Chong JJ, Yang X, Don CW, et al. Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. *Nature* 2014 ; 510 : 273-7.
10. Catelain C, Riveron S, Papadopoulos A, et al. Myoblasts and embryonic stem cells differentially engraft in a mouse model of genetic dilated cardiomyopathy. *Mol Ther* 2013 ; 21 : 1064-75.
11. Nussbaum J, Minami E, Laflamme MA, et al. Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. *FASEB J* 2007 ; 21 : 1345-57.
12. Menasché P, Vanneaux V, Fabreguettes JR, et al. Towards a clinical use of human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors: a translational experience. *Eur Heart J* 2015 ; 36 : 743-50.
13. Menasché P, Vanneaux V, Hagege A, et al. Human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors for severe heart failure treatment: first clinical case report. *Eur Heart J* 2015 ; 36 : 2011-7.
14. Menasché P. The future of stem cells: should we keep the stem and skip the cells? *J Thorac Cardiovasc Surg* 2016 ; 152 : 345-9.
15. Menasché P, Vanneaux V. Stem cells for the treatment of heart failure. *Curr Res Transl Med* 2016 ; 64 : 97-106.
16. Silvestre JS, Menasché P. The evolution of the stem cell theory for heart failure. *EBioMedicine* 2015 ; 2 : 1871-9.
17. Bobis-Wozowicz S, Kmiotek K, Sekula M, et al. Human induced pluripotent stem cell-derived microvesicles transmit RNAs and proteins to recipient mature heart cells modulating cell fate and behavior. *Stem Cells* 2015 ; 33 : 2748-61.

RÉFÉRENCES

18. Ibrahim AG, Cheng K, Marbán E. Exosomes as critical agents of cardiac regeneration triggered by cell therapy. *Stem Cell Reports* 2014 ; 2 : 606-19.
19. Menasché P, Alfieri O, Janssens S, et al. The myoblast autologous grafting in ischemic cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation* 2008 ; 117 : 1189-1200.
20. Fisher SA, Doree C, Mathur A, et al. Meta-analysis of cell therapy trials for patients with heart failure. *Circ Res* 2015 ; 116 : 1361-77.
21. Harvey E, Fisher SA, Doree C, et al. Current evidence of the efficacy of cell-based therapies in heart failure. *Circ J* 2015 ; 79 : 229-36.
22. Kandala J, Upadhyay GA, Pokushalov E, et al. Meta-analysis of stem cell therapy in chronic ischemic cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 2013 ; 112 : 217-25.
23. Sanganalmath SK, Bolli R. Cell therapy for heart failure: a comprehensive overview of experimental and clinical studies, current challenges, and future directions. *Circ Res* 2013 ; 113 : 810-34.
24. Nowbar AN, Mielewicz M, Karavassilis M, et al. DAMASCENE writing group. Discrepancies in autologous bone marrow stem cell trials and enhancement of ejection fraction (DAMASCENE): weighted regression and meta-analysis. *Br Med J* 2014 ; 348 : g2688.
25. Gho JM, Kummeling GJ, Koudstaal S, et al. Cell therapy, a novel remedy for dilated cardiomyopathy? A systematic review. *J Card Fail* 2013 ; 19 : 494-502.
26. Smith DM. Assessing commercial opportunities for autologous and allogeneic cell-based products. *Regen Med* 2012 ; 7 : 721-32.
27. Hare JM, Fishman JE, Gerstenblith G, et al. Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transcatheter injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial. *JAMA* 2012 ; 308 : 2369-79.
28. Jansen Of Lorkeers SJ, Eding JE, Vesterinen HM, et al. Similar effect of autologous and allogeneic cell therapy for ischemic heart disease: systematic review and meta-analysis of large animal studies. *Circ Res* 2015 ; 116 : 80-6.
29. Jackman CP, Shadrin IY, Carlson AL, et al. Human cardiac tissue engineering: from pluripotent stem cells to heart repair. *Curr Opin Chem Eng* 2015 ; 7 : 57-64.
30. Bellamy V, Vanneaux V, Bel A, et al. Long-term functional benefits of human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors embedded into a fibrin scaffold. *J Heart Lung Transplant* 2015 ; 34 : 1198-207.
31. Segers VF, Lee RT. Biomaterials to enhance stem cell function in the heart. *Circ Res* 2011 ; 109 : 910-22.
32. Hirt MN, Hansen A, Eschenhagen T. Cardiac tissue engineering: state of the art. *Circ Res* 2014 ; 114 : 354-67.
33. Kupfer ME, Ogle BM. Advanced imaging approaches for regenerative medicine: emerging technologies for monitoring stem cell fate in vitro and in vivo. *Biotechnol J* 2015 ; 10 : 1515-28.

TIRÉS À PART

J.T. Vilquin



NEGATIVE RESULTS SCIENTIFIC JOURNAL



La thérapie cellulaire est une stratégie envisagée pour traiter des pathologies cardiaques (insuffisance cardiaque) ou squelettiques (myopathies), basée sur la médecine régénérative. Les progéniteurs cellulaires classiquement utilisés tels que les myoblastes (issus des cellules satellites) ou les cellules mésenchymateuses n'ont démontré qu'une efficacité limitée sur le plan clinique. Dans ce contexte, notre laboratoire a identifié une nouvelle catégorie de progéniteurs, sur la base de leur activité enzymatique aldéhyde déshydrogénase (ALDH) mise en évidence par un substrat fluorescent, l'Aldéfluor, et en association avec le marqueur transmembranaire CD34. Les ALDH sont en effet impliquées dans le métabolisme et la détoxification des aldéhydes, et constituent un nouveau marqueur des cellules souches. Ce travail de thèse a permis de caractériser de manière extensive les progéniteurs myogéniques (ALDH+/CD34-) et non myogéniques (ALDH+/CD34+), dans différents contextes physiopathologiques. Leur présence dans différents muscles de primates humains ou non humains, leur persistance au cours du vieillissement naturel ou lors d'atteinte par la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) chez l'Homme et dans des modèles animaux, suggèrent une utilisation possible des cellules ALDH+/CD34- pour des développements thérapeutiques ultérieurs. L'étude phénotypique révèle que des marqueurs transmembranaires sont associés à des sous-populations de cellules ALDH myogéniques (CD9, CD49c, CD49f, CD56, CD146, CD184) ou non myogéniques (CD34, CD49e, CD140b), dont la comparaison permettra de proposer de meilleurs candidats de thérapie cellulaire. En parallèle, les caractérisations histologiques et cytologiques ont identifié des sous-populations exprimant les isoenzymes ALDH1A1, ALDH1A2, ALDH1A3, ALDH2, ALDH3A1, ALDH3A2, ALDH3B1, ALDH3B2, ALDH4A1, ALDH7A1, ALDH8A1. Les analyses d'expression génique réalisées ex vivo et en culture suggèrent que les isoenzymes ALDH1A1, ALDH1A3, ALDH1B1, ALDH2, ALDH3A2, ALDH3B1, ALDH7A1, ALDH8A1, à minima, sont impliquées dans l'homéostasie musculaire in vivo et in vitro.

Mots clés : [ALDH, DMD, Progéniteurs myogéniques, Thérapie cellulaire]

Characterization of muscle progenitors expressing Aldehyde dehydrogenase (ALDH) in healthy and dystrophic models, and their change with ageing

Cell therapy is a regenerative medicine strategy considered for the treatment of cardiac or skeletal muscle diseases such as heart failure and muscular dystrophies. The cellular progenitors used to date such as myoblasts or mesenchymal stem cells provided mitigated success in clinical trials, thus mandating the identification and characterization of new categories of progenitors. In this context, our laboratory has identified new populations of progenitors, based on their Aldehyde Deshydrogenase activity (ALDH) detectable using the fluorescent substrate ALdefluor, associated with the expression of the membrane-bound CD34 marker. Indeed, ALDH are involved in metabolism and detoxification of aldehydes, they play important roles in cell survival and differentiation and are considered a new marker of stem cells. The present project allowed characterizing extensively the myogenic (ALDH+/CD34-) and non myogenic (ALDH+/CD34+) progenitors, in several physiopathological contexts and animal models. The presence of ALDH+/CD34- cells in distinct muscle groups in Human and non-human Primates, their persistence through natural ageing and despite the ongoing degenerative process observed in Duchenne muscular dystrophy in Human patients and animal models suggest their future use for therapeutic applications. The phenotypic characterization indicated that membrane markers are associated to myogenic (CD9, CD49c, CD49f, CD56, CD146, CD184) or non-myogenic (CD34, CD49e, CD140b) sub-populations of ALDH cells. The comparison or their efficacies in vitro and in vivo will allow proposing new candidates for cell therapy. In parallel, histological and cytological analysis identified cell populations expressing isoenzymes (ALDH1A1, ALDH1A2, ALDH1A3, ALDH2, ALDH3A1, ALDH3A2, ALDH3B1, ALDH3B2, ALDH4A1, ALDH7A1, ALDH8A1). The analysis of gene expressions suggested that, at least, ALDH1A1, ALDH1A3, ALDH1B1, ALDH2, ALDH3A2, ALDH7A1, ALDH8A1 and ALDH9A1 isoenzymes are involved in muscle homeostasis in situ or in vitro. This study therefore unveils the importance of the ALDH family in skeletal muscle physiology.

Keywords : [ALDH, Cell therapy, DMD, Muscle progenitors]

