Université de POITIERS

Faculté de Médecine et de Pharmacie

2019

Thèse n°

THESE POUR LE DIPLÔME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

(Arrêté du 17 juillet 1987)

présentée et soutenue publiquement le 6 Novembre 2019 à POITIERS par Madame THOMAS Pauline née le 25/10/1994

Thérapie cellulaire dans la Dystrophie Musculaire de Duchenne : Étude du rôle des sécrétions vésiculaires des cellules hMuStem

Composition du jury :

Président : Monsieur le Professeur Jean-Christophe OLIVIER, Galénique

Membres :

Madame le Docteur Laure FAVOT-LAFORGE, Biologie cellulaire et moléculaire Monsieur le Docteur Julien BRILLAULT, Pharmacocinétique Madame le Docteur Laëtitia GUÉVEL, Biochimie Monsieur le Docteur Karl ROUGER, Biologie cellulaire et moléculaire

Directeur de Thèse : Madame le Professeur Guylène PAGE, Biothérapie

Liste des enseignants de Pharmacie



UNIVERSITE DE POITIERS



Faculté de Médecine et de Rharmacie

۶ > > ۶ > > ≻ \triangleright ۶ > > Maîtres de Conférences Associés - officine > ≻ > ۶ ⊳ Enseignants d' \triangleright > > > > ⊳ > ≻

- >
- > >
- >

Remerciements

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Jean-Christophe OLIVIER pour me faire l'honneur de présider mon jury de thèse.

Je tiens également à remercier les Docteurs Julien BRILLAULT, Laure FAVOT-LAFORGE, Karl ROUGER et Laëtitia GUÉVEL pour avoir accepté de juger mon travail de thèse en tant que membres du jury.

Je remercie tout particulièrement Madame le Professeur Guylène PAGE, pour m'avoir soutenue et aidée régulièrement au cours de mon parcours pharmaceutique. C'est en partie grâce à vous, à vos conseils que je me suis orientée et épanouie dans ce domaine. Et un grand merci d'avoir accepté de m'encadrer en étant ma maître de thèse. J'ai apprécié votre soutien et vos encouragements tout au long de ma rédaction.

Je remercie Marie-Anne COLLE, directrice de l'UMR 703 PAnTher, pour m'avoir accueillie au sein de son unité de recherche.

Je remercie Karl ROUGER, responsable de la thématique « Muscles et Biothérapies », pour m'avoir accueillie au sein de son équipe ainsi que Laëtitia GUÉVEL pour m'avoir encadrée, conseillée et soutenue tout au long de ces 6 mois de stage.

Je remercie Romain FLEURISSON pour la formation et les conseils en microscopie mais aussi pour l'aide et le temps qu'il a pu me consacrer. Je remercie tout autant Isabelle LEROUX, pour son aide en culture cellulaire, ses conseils et le temps qu'elle a su m'accorder. Merci aussi à Samuel FREHEL pour son temps et son aide en culture cellulaire.

Je remercie de même Laurence DE BEAUREPAIRE pour son temps et son aide dans la caractérisation de nos productions.

Un merci également aux trois thésards Alice RANNOU, Marine CHARRIER, et Julien PICHON pour leur aide sur certaines techniques. Et pour finir, je remercie Sabrina JAGOT, Élina VARAILLON, Ophélie TRAVERT, Karim BEY et tous les membres de l'UMR 703 que je n'ai pas cités, pour leur accueil, leur convivialité et leur disponibilité (notamment lorsqu'il s'agit d'aller boire des bières au bord de l'Erdre !)

Merci à mes girlz ! Cloé, Camille, Valentine et Calypso, merci d'avoir toujours été un crew hors norme. Du Pitch perfect, du meuuh chez alphonse, des rainbow cake et des millions d'heures passées en pause à la BU (pensée pour René et Stéphane). Merci d'avoir toujours rajouté des paillettes, des chats et des tatouages dans ma vie ! Sans vous ces années pharma auraient été beaucoup plus ternes, et ce n'est pas fini, que ce soit à Poitiers, La Rochelle, Toulouse, Paris ou Nantes !

Merci à mes Emeline's préférées, ma blonde et ma brune, soutiens sans faille depuis le tout début de l'aventure, n'importe où et n'importe quand, et ce n'est pas prêt de s'arrêter !

Merci à mes parents, qui n'ont pas eu d'autre choix que de supporter et porter tous mes projets, et qui, je pense, l'on fait avec beaucoup de certainement ! Merci pour votre confiance et votre enthousiasme toujours présents même si vous ne compreniez pas tout le temps de quoi il s'agissait. Mais l'important maintenant vous l'avez compris, c'est d'en avoir l'air ! Merci à ma grande sœur préférée, qui a aussi été un grand soutien tout le long de ces années plus ou moins faciles. Merci pour ces heures de téléphone mais aussi de magasins qui s'avèrent toujours être une bonne thérapie !

Et enfin, merci à ma supportrice de première ligne, Maëva. Tu as su apprivoiser la boule d'angoisse que je suis, et m'aider à réaliser tous mes projets. Merci de toujours te réjouir et merci pour tous tes encouragements. Malgré les obstacles tu arrives toujours à croire en moi. Maintenant, tu m'accompagnes sur le nouveau projet Nantes, avec encore pleins d'autres aventures à venir j'en suis sure !

Table des matières

Figures et tableaux					
Liste des abréviations					
Introduction					
Généralités11					
1 Dystrophie Musculaire de Duchenne					
1.1 Physiopathologie et présentation clinique14					
1.2 Prise en charge actuelle					
1.3 État de la recherche clinique					
1.3.1Étude clinique de la pathologie					
1.3.2 Étude clinique visant à corriger les conséquences de la pathologie24					
1.3.2.1 Stimulation de l'expression d'utrophine					
1.3.2.2 Inhibition de la myostatine24					
1.3.2.3 Diminution de la fibrose25					
1.3.2.4 Réduction de l'inflammation26					
1.3.2.5 Diminution du stress oxydatif					
1.3.2.6 Réduction de l'atteinte de la fonction cardiaque					
1.3.2.7 Amélioration de la fonction et de la force musculaire					
1.3.3 Étude clinique ciblant les anomalies du gène DMD					
1.3.3.1 Translecture du codon stop					
1.3.3.2 Thérapie génique					
2 Thérapie cellulaire					
2.1 Définition					
2.2 Principaux types cellulaires utilisés					
2.3 Candidats cellulaires pour une thérapie cellulaire de la dystrophie musculaire de					
Duchenne					
2.4 Vésicules extracellulaires					

		2.4.1	Définition	50
		2.4.2	Différents types de vésicules extracellulaires	50
		2.4.3	Composition des vésicules extracellulaires	53
		2.4.4	Isolation des vésicules extracellulaires	55
		2.4.5	Devenir des vésicules extracellulaires	56
		2.4.6	Fonction des vésicules extracellulaires	57
		2.4.7	Les vésicules extracellulaires comme futurs médicaments	58
]	Partie	expérime	entale	62
	1	Laborat	oire d'accueil	63
	2	Thérapi	e cellulaire hMuStem et vésicules extracellulaires	63
	3	Objecti	f du projet de recherche	65
	4	Matérie	ls et méthodes	66
	4.	.1 Cu	lture des cellules MuStem humaines	66
	4.	.2 Cu	lture des myoblastes humains	66
	4.	.3 Pro	oduction et purification des vésicules extracellulaires	67
	4.	.4 Ma	arquage des vésicules extracellulaires purifiées	68
	4.	.5 Qu	antification des vésicules extracellulaires	68
		4.5.1	Analyse de la taille et de la concentration des particules	68
		4.5.2	Extraction protéique et dosage	69
		4.5.3	Technologie Myriade [®] : interférométrie	69
	4.	.6 Im	agerie des vésicules extracellulaires	70
		4.6.1	Microscopie confocale	70
		4.6.2	Microscopie super résolution	70
	4.	.7 Éti	de d'internalisation des vésicules extracellulaires marquées	71
	4.	.8 Ac	tivité biologique des vésicules extracellulaires dans un contexte in vitro	72
		4.8.1	Étude de l'impact sur le pouvoir prolifératif	72
		4.8.1	.1 Cellules MuStem humaines	72

	4.8.1.2	Myoblastes humains	.73
	4.8.1.3	HUVEC	. 73
4	1.8.2	Étude de l'impact sur la capacité de différenciation	.75
	4.8.2.1	Cellules MuStem humaines	.75
	4.8.2.2	Myoblastes humains	.76
	4.8.2.3	Analyse de l'imagerie et calcul de l'index de fusion	.77
4.9	Anal	yses statistiques	.77
5 F	Résultats	et discussion	.77
5.1	Qua	ntification des VEs sécrétées par les cellules hMuStem	. 78
5.2	Imag	gerie directe par microscopie confocale spectrale et reconstruction optio	que
sto	chastique	e (d-STORM)	. 80
5.3	Inter	nalisation des vésicules extracellulaires par différents types cellulaires	. 83
5.4	Les	VE ^{hMuStem} et leur rôle d'induction de prolifération	. 86
5.5	Pote	ntiel d'induction myogénique des VE ^{hMuStem}	.91
Conclus	ion et per	rspectives	.93
Bibliogr	aphie		. 95

Figures et tableaux

Figure 1 : Représentation schématique de la dystrophine sous la membrane cellulaire musculaire
Figure 2 : Voies impliquées dans les lésions musculaires causées par un étirement musculaire
Figure 3 : Signe de Gowers
Figure 4 : Voies de signalisation de l'hypertrophie et de l'atrophie
Figure 5 : Représentation schématique de la translecture de codons STOP
Figure 6 : Représentation schématique de la stratégie du saut d'exon
Figure 7 : L'édition génomique à l'aide de l'outils CRISPR-Cas9
Figure 8 : Comparaison de la thérapie cellulaire autologue et allogénique
Figure 9 : Différents types de cellules souches
Figure 10 : Représentation des différents types de vésicules extracellulaires en fonction de leur
biogenèse
Figure 11 : Représentation schématique de la composition des vésicules extracellulaires 54
Figure 12 : Représentation de l'interaction des vésicules extracellulaires et de leur cellule cible
Figure 13 : Résumé du développement de vésicules extracellulaires en tant que futurs
médicaments
Figure 14 : Caractérisation des VEs sécrétées par les cellules hMuStem
Figure 15 : Protocole de preplating à partir de cellules dérivées du muscle
Figure 16 : Représentation schématique de l'étude de prolifération des VE ^{hMuStem} sur les
HUVEC
Figure 17 : Distribution des VEs en fonction de leur taille (nm)
Figure 18 : Caractérisation des VEs conservées à 4°C avec la technologie Myriade [®] 80
Figure 19 : Microscopie confocale spectrale des VE ^{hMuStem} et macro-vésicules
Figure 20 : Microscopie super résolution des VE ^{hMuStem}
Figure 21 : Capture d'écran des « live imaging » des études d'internalisation des VEs sur deux
types cellulaires
Figure 22 : Internalisation des VEs sur deux types cellulaires fixés
Figure 23 : Impact des VE ^{hMuStem} sur le pouvoir prolifératif des cellules hMuStem
Figure 24 : Impact des VE ^{hMuStem} sur le pouvoir prolifératif des myoblastes humains
Figure 25 : Impact des VE ^{hMuStem} sur le pouvoir prolifératif des HUVECs

Figure 26 : Influence des VE^{hMuStem} sur le potentiel myogénique des cellules hMuStem.......92

Tableau 1 : Conditions étudiées dans l'étude de l'impact des VEs sur la prolifération cellulaire
des cellules hMuStem72
Tableau 2 : Conditions étudiées dans l'étude de l'impact des VEs sur la prolifération cellulaire
des myoblastes humains
Tableau 3 : Conditions testées lors de l'étude de prolifération des VE ^{hMuStem} sur les HUVEC74
Tableau 4 : Conditions étudiées dans l'étude de l'impact des VEs sur la différenciation des
myoblastes humains
Tableau 5 : Tableau récapitulatif des différentes productions des VE ^{hMuStem}

Liste des abréviations

- 20MP: 2'-O-Méthyl-Phosphorothioate
- AAV : Adeno-Associated Virus
- Ac Iaire : Anticorps primaire
- Ac IIaire : Anticorps secondaire
- Acm : Anticorps monoclonal
- ADN : Acide DésoxyriboNucléique
- AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
- ANSM : Agence Nationale de Sécurité des Médicaments et produits de santé
- ARNg : Acide RiboNucléique guide
- ARNm : Acide RiboNucléique messager
- ASMR : Amélioration du Service Médical Rendu
- ATMP : Advanced Therapy Medicinal Product
- bFGF : basic Fibroblast Growth Factor
- BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication
- BSA : Bovine Serum Albumin
- CAPD : Complexe des Protéines Associées à la Dystrophine
- CD : Cluster of Differentiation
- CDC : Cellule Cardiaque Dérivée
- CDCs : Cardiosphere-Derived Cells
- CE : Commission Européenne
- CHMP : Comité des médicaments à usage humain
- CK : Créatinine Kinase
- CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
- **CPD** : Cumulative Population Doubling
- DAPI: 4',6-diamidino-2-phénylindole
- DMEM : Dulbecco modified eagle's Minimal Essential Medium
- CRISPR-Cas9 : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, soit en français
- « courtes répétitions en palindrome regroupées et régulièrement espacées »
- CSE : Cellule Souche Embryonnaire
- CSH : Cellule Souche Hématopoïétique
- CSMs : Cellules Souches Mésenchymateuses
- CTGF : Connective Tissue Growth Factor

DHA : Acide docosahexaenoïque DMB : Dystrophie Musculaire de Becker DMD : Dystrophie Musculaire de Duchenne ECG : ElectroCardioGramme EGFR : Epithelial Growth Factor Receptor EMA : European Medicine Agency FDA : Food and Drug Administration GMP : Good Manufacturing Practices (BPF) GRMD : Golden Retriever Muscular Dystrophy HAS : Haute Autorité de Santé HDAC : Histone DésACétylases HLA : Human Leukocyte Antigen HUVEC : Human Umbilical Vein Endothelial Cells IEC : Inhibiteur de l'Enzyme de Conversion IF : Index de Fusion IFN : Interféron IGF-1 : Insulin-like Growth Factor-1 IL : Interleukine iPSC : induced Pluripotent Stem Cell IRM : Imagerie à Résonance Magnétique LT : Lymphocyte T MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase MB-Cy3 : Membright[®]-Cyanine 3 MB-Cy5 : Membright[®]-Cyanine 5 MBP-1 : c-Myc Promoter Binding Protein-1 MDSC : Myeloïd-Derived Suppressor Cells MEC : Matrice ExtraCellulaire MMP9 : Métalloprotéae 9 **MP** : Microparticules MRF : Myogenic Regulation Factor MSA : Milieu Souche Artisanal MTI : Médicament de Thérapie Innovante MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide NF- κ B : Nuclear Factor κ -B

nNOS : neuronal Nitric Oxyde Synthase

- NO : Oxyde Nitrique
- NOS : Oxyde Nitrique Synhtase
- NP : NanoPore
- NSAA : NorthStar Ambulatory Assesment
- OA : Oligonucléotides Artificiels
- PALM/STORM : Photo-Activated Localization Microscopy / Stochastic Optical
- Reconstruction Microscopy
- PAM : Protospacer Adjacent Motif
- PBS : Phosphate Buffered Saline
- PCR : PolyChain Reaction
- PD : Population Doubling
- PDt : Population Doubling time
- PFA : ParaFormAldehyde
- PGE : Prostaglandine
- PLA2 : Phospholipase A2
- PMO : Phosphorodiamidate Morpholina Oligomer
- PSF : Peni-Strepto-Amphotericin
- RIPA : RadioImmunoPrecipitation Assay buffer
- RMS : Root Mean Square
- **RPM** : Rotation Par Minute
- SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
- QI : Quotient Intellectuel
- ROS : Reactiv Oxygen Species
- SCID : Severe Combined ImmunoDeficiency
- SFM : Société Française de Myologie
- SMR : Service Médical Rendu
- TGFβ-1 : Transforming Growth Factor β-1
- TIRF : Total Internal Reflection Fluorescence microscopy
- **TRP** : Transient Receptor Potential
- **TRPS** : Tunable Resistive Pulse Sensing
- VEs : Vésicules Extracellulaires
- WMS : World Muscle Society

Introduction

Les dystrophies musculaires ont été décrites pour la première fois en 1860 par Charles Bell, qui a pu observer le déclin progressif des fonctions musculaires chez des patients. Ce groupe de myopathies englobe des pathologies génétiques provoquant une faiblesse de tout le système musculaire. Elles sont la conséquence d'un défaut qualitatif ou quantitatif d'une protéine : la dystrophine, ce qui entraîne la mort des tissus musculaires à plus ou moins long terme. Parmi les neufs dystrophies musculaires humaines recensées à ce jour, la Dystrophie musculaire de Duchenne est la plus sévère et courante. Elle doit son nom au neurologue français Guillaume Duchenne, qui observa ces atteintes musculaires chez 13 garçons à la fin du XIX^{ème} siècle.

Jusqu'à ce jour, de nombreuses recherches ont été réalisées afin de traiter cette pathologie. Néanmoins, il n'existe toujours pas de traitement curatif de la maladie. La prise en charge consiste alors à retarder l'avancée de la maladie, et soulager le patient.

Depuis les années 1970, de nouvelles thérapeutiques ont émergé au sein du milieu scientifique. Ces thérapeutiques, appelées thérapies innovantes sont issues de produits biologiques. Ces thérapeutiques sont constituées de la thérapie cellulaire, de la thérapie génique, de l'ingénierie tissulaire ainsi que de la thérapie combinée. La thérapie cellulaire repose sur le principe de greffer des cellules vivantes afin de restaurer la fonction d'un tissu ou d'un organe. De nombreuses études sont en cours afin de proposer une thérapie cellulaire en traitement dans la dystrophie musculaire de Duchenne.

Récemment, dans le cadre de la thérapie cellulaire, les chercheurs se sont intéressés de plus en plus aux vésicules extracellulaires sécrétées par les cellules greffées. Ces vésicules sont sécrétées par tous les types cellulaires et possèdent un rôle très important dans la communication intercellulaire. De nombreuses études se penchent sur le rôle des vésicules sécrétées par les cellules après leurs greffes puisque dans certains traitements de thérapie cellulaire, les cellules greffées meurent mais l'effet thérapeutique perdure.

C'est dans cette optique que nous nous sommes intéressés aux sécrétions vésiculaires d'un produit de thérapie cellulaire à l'étude actuellement dans la dystrophie musculaire de Duchenne : les cellules hMuStem. Ce produit de thérapie cellulaire est étudié au sein du laboratoire UMR 703 INRA/Oniris de Nantes.

Dans une première partie qui sera dédiée aux généralités, nous aborderons la pathologie de la dystrophie musculaire de Duchenne, à travers sa physiopathologie, la prise en charge des patients, mais également les recherches cliniques en cours. Nous étudierons dans un second temps le principe de la thérapie cellulaire ainsi que le concept de thérapie à base de vésicules

extracellulaires. Dans la troisième et dernière partie, nous discuterons des travaux réalisés en laboratoire concernant l'étude des vésicules extracellulaires de cellules hMuStem dans un contexte de muscle dystrophique. Les résultats préliminaires seront présentés ainsi que les perspectives du projet de recherche global.

Généralités

1 Dystrophie Musculaire de Duchenne

La Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) a été décrite durant les années 1860^1 . Aujourd'hui, c'est la plus fréquente et sévère des dystrophies. Cette pathologie est liée à une mutation du gène de la dystrophine localisé sur le chromosome X (locus p21) et possède une incidence de 1-9 pour 100000 naissances. La DMD affecte principalement les garçons, du fait de la localisation de la mutation sur le chromosome X, avec une incidence à la naissance de 1/3300 garçons².

Le gène de la dystrophine est le gène le plus long connu chez l'Homme, avec une occupation de 0,1% du génome humain total. Il possède une longueur d'environ 2500 kilobases, et est transcrit en un ARN messager (ARNm) de 14 kilobases contenant 79 exons^{3–5}.

Le gène DMD et la protéine dystrophine ont été identifiés dans les années 1986 et 1987^{6–8}. Il existe cinq isoformes de dystrophine résultant de différents épissages alternatifs, et les formes les plus longues sont les plus abondantes et situées au niveau des muscles striés squelettiques et cardiaque⁹. La forme la plus courante est la plus longue, appelée Dp247. Elle est localisée sous la membrane cellulaire au sein des fibres squelettiques où elle assure un rôle de maintien de la structure du cytosquelette. Les filaments d'actine et le sarcolemme sont reliés par la dystrophine ainsi que par un complexe de protéines associées à la dystrophine, appelé CAPD (Complexe des Protéines Associées à la Dystrophine)¹⁰ (Figure 1). Le CAPD traverse la membrane et est relié à la matrice extracellulaire. Il est composé de différents types de protéines intracellulaires (syntrophines, NO synthase neuronale), transmembranaires (β-dystroglycanes, sarcoglycanes et sarcospanes) et extracellulaires (alpha-dystroglycane et laminine 2)^{9,11}.

D'un point de vue de sa structure, la dystrophine peut être divisée en quatre parties^{9,12–14} :

- Une partie N-terminale liée à l'actine
- Une partie centrale constituée de 25 répétitions de segments proches de la spectrine en triple hélice avec quatre régions charnières
- Une partie riche en cystéine composée d'un domaine WW, de deux domaines *EE-hand-like* de fixation au calcium ainsi que d'un domaine ZZ permettant la liaison au CAPD via le β-dystroglycane
- Une partie C-terminale se liant aux syntrophines





La dystrophine est reliée à l'actine, au sarcolemme et au CAPD. Extrait de « Avancées dans les dystrophies de Duchenne et Becker », AFM-Téléthon, Juin 2019.

La dystrophine intervient dans plusieurs processus physiologiques. Son premier rôle consiste en un maintien de la stabilité de la membrane cellulaire durant les cycles de contraction/relaxation des fibres musculaires. Elle possède également un rôle dans le maintien de différentes fonctions métaboliques telles que l'homéostasie calcique, la production d'ATP par les mitochondries, mais également dans certaines cascades de signalisation impliquées dans la régulation des canaux calciques par exemple⁹.

Une mutation intragénique peut entraîner un changement du cadre de lecture, avec la formation d'un codon STOP de manière prématurée. Ces mutations peuvent entraîner la formation d'une dystrophine non fonctionnelle ou tronquée, comme dans la Dystrophie Musculaire de Becker (DMB). Elles peuvent également engendrer une absence de dystrophine, ce qui est le cas dans le Dystrophie Musculaire de Duchenne.

En janvier 2019, un nouveau registre Français financé par l'AFM-Téléthon a été créé afin de recenser les données génétiques et cliniques des patients atteints de DMD et de DMB¹⁵. Il est constitué de données rétrospectives et de données prospectives avec, dans un premier lieu les données des patients de l'Hôpital Necker à Paris, ainsi que du C.H.U. de Montpellier. Il y sera ajouté également les données de l'ancien registre appelé UMD-DMD^{15,16}.

1.1 <u>Physiopathologie et présentation clinique</u>

L'absence de dystrophine dans la Dystrophie Musculaire de Duchenne a plusieurs conséquences. En effet, cette absence entraîne une fragilité et une porosité de la membrane cellulaire^{17,18}. Il y a une dysrégulation de l'homéostasie calcique avec une augmentation de la concentration en calcium cytosolique. Cela entraîne une plus forte quantité d'espèces réactives de l'oxygène, mais aussi une surexpression de protéases calcium-dépendantes ainsi que la production d'espèces réactives oxygénées (ROS)¹⁹. Les fibres musculaires sont alors plus sensibles à la nécrose et il a été montré la corrélation entre l'amplitude du stress mécanique et les dommages infligés à la membrane^{20,21}.

L'absence de dystrophine induit également une augmentation de l'activité des canaux mécanosensibles et canaux TRP (Transient Receptor Potential). Il y aura alors une entrée massive de calcium dans la fibre musculaire ce qui aura pour conséquence d'induire une hyper-contraction des fibres musculaires aboutissant à une rupture de celles-ci²².

Le CAPD qui est couplé à la dystrophine a un rôle majeur dans les voies de signalisation, notamment à travers les voies des MAP-Kinases (MAPK). Son absence a donc des conséquences sur la phosphorylation des protéines MAP²³. Cette absence induit aussi une perte

de l'isoforme neuronale de la NO synthase (nNOS) au niveau de la membrane. La diminution de cette isoforme, qui est la plus abondante, va conduire à une altération de la réponse à l'activation du récepteur α -adrénergique et donc une diminution de la vasoconstriction²⁴. Cette diminution favorise une ischémie lors d'un effort musculaire. De plus, le manque de dystrophine provoque une rupture dans la liaison de la laminine aux dystroglycanes. Cela a pour conséquences une inhibition de la protéine Akt1 ou Protéine Kinase B, ce qui induit une perte de la survie de la cellule musculaire. La production d'espèces réactives oxygénées est augmentée en absence de dystrophine, ce qui aboutit à l'activation du facteur de transcription NF- κ B et donc active les voies de signalisation de l'inflammation, de la fibrose ainsi que de l'atrophie^{25,26}.

Ces exemples de conséquences de l'absence de dystrophine font partie d'un cercle vicieux, puisque le manque de cette protéine aboutit à une perméabilisation de la membrane. La concentration en calcium cytosolique est augmentée et un pompage actif est mis en place pour y pallier. Ce dispositif actif arrive ensuite à saturation, le calcium cytosolique augmente ce qui active la phospholipase A2 (PLA2), et aboutit à une production d'espèces réactives oxygénées, augmentant d'autant plus la perméabilité membranaire. Le calcium cytosolique est également capté par la mitochondrie qui finira par être saturée et induira une apoptose ou une nécrose^{25,27} (Figure 2).



*Figure 2 : Voies impliquées dans les lésions musculaires causées par un étirement musculaire*²⁵

 $[Ca^{2+}]_{IC}$: concentration de calcium intra-cellulaire; TRP: Transient Receptor Potential, modifié d'après Allen et al., 2005.

Ce cercle vicieux induit une apoptose des cellules musculaires. Le tissu est infiltré par différents types cellulaires immunitaires du fait de l'inflammation locale, dont des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques sécrétant de la perforine^{28,29}.

Le tissu musculaire est également infiltré par des macrophages M1 et M2 (pro- et antiinflammatoire respectivement). Les macrophages M1 interviennent durant la phase aigüe du cycle de « dégénérescence/régénération », en stimulant la lyse des fibres musculaires avec une sécrétion d'oxyde nitrique (NO). Les macrophages M2 interviennent, eux, pendant les phases ultérieures (régénérative et progressive) en sécrétant de l'arginase, qui provoque la régénération des fibres³⁰.

Les macrophages vont sécréter de la métalloprotéase 9, une enzyme protéolytique, qui va aggraver le phénotype dystrophique. En effet, cela perturbe l'homéostasie tissulaire avec une dégradation du β -dystroglycane provoquant une rupture entre la Matrice ExtraCellulaire (MEC) et la membrane³¹. Il a été montré qu'une inhibition de MMP-9 chez le modèle de souris dystrophique (souris *mdx*^{32–34}) provoque une augmentation de la régénération musculaire et une diminution de l'inflammation et nécrose³⁵.

Les polynucléaires neutrophiles entrent aussi dans ce cycle de « dégénérescence/régénération ». Ils sécrètent du MBP-1, un facteur de transcription ayant pour résultante une augmentation de la fibrose tissulaire. De la même manière il a été montré qu'une inhibition de ce facteur, ou encore des polynucléaires neutrophiles sur des souris *mdx* a pour effet d'induire une réduction de la lyse et de la fibrose des muscles striées squelettiques et cardiaque³⁶.

Chez les patients atteints de DMD, un épuisement du stock de cellules satellites est observé³⁷. Ces cellules sont des précurseurs myogéniques endogènes quiescentes et sont activées dans des phénomènes de régénération musculaire. De plus, ces cellules satellites subissent un raccourcissement des télomères 14 fois plus important qu'une cellule provenant d'une personne saine³⁸. Il y a également une perturbation de la division asymétrique puisque la diminution de la dystrophine induit une diminution de l'expression de Mark 2, une sérine-thréonine kinase, à travers la diminution de leur liaison. Cela provoque une diminution de la division asymétrique et donc une baisse des précurseurs musculaires disponibles pour la régénération³⁹.

Par ailleurs, l'infiltrat lymphocytaire et macrophagique sécrète une quantité importante de TGFB-1 qui conduit à une inhibition de la différenciation myogénique^{40,41}.

Tout ceci amène au fur et à mesure une fibrose des tissus. Les myoblastes sont reprogrammés en un phénotype pro-fibrotique et le tissu musculaire est progressivement remplacé par du tissu collagénique et adipeux^{42,43}. Cela provoque alors la perte progressive de la fonction musculaire.

La DMD est une maladie génétique liée au chromosome X et récessive. Elle touche majoritairement les garçons. Le plus souvent, la mère porte l'anomalie sur l'un de ses chromosomes X, ce qui constitue un risque de 50% de transmission. Dans un tiers des cas, la mutation responsable de la DMD est spontanée chez l'enfant⁴⁴. Lorsque la maladie est connue dans la famille, il est recommandé de profiter de conseil génétique en consultation spécialisée dans un centre de référence.

Il est possible d'avoir recours au diagnostic préimplantatoire lors d'une fécondation *in vitro* afin de sélectionner les embryons avant l'implantation dans l'utérus, et ce, dans un centre agréé (Paris, Strasbourg, Montpellier). Il est également possible de réaliser un diagnostic prénatal afin de déterminer si l'enfant à naître est porteur d'une anomalie génétique du gène DMD. Cet examen est réalisé au début du second trimestre de grossesse à partir d'ADN extrait du liquide amniotique ou du tissu qui entoure le fœtus⁴⁴.

La maladie se manifeste rarement avant l'âge de 4 à 5 ans. À partir de cet âge, il est observé une atrophie et une faiblesse des muscles proximaux. L'enfant va commencer à tomber et avoir du mal à se relever. Il aura également des difficultés à se lever à partir de la station assise et il présentera les signes de Gowers, où il doit prendre appui sur ses cuisses avec ses bras pour se relever⁴⁵ (Figure 3). Il présentera une pseudo-hypertrophie des muscles des jambes ainsi que des crampes et des douleurs plus ou moins intenses à l'exercice physique⁴⁶.

Vers l'âge de 10 ans, l'atteinte du système musculaire est telle que l'enfant commence à perdre la faculté de marche, et aura donc recours à un fauteuil roulant. Ce fauteuil servira également à soulager les déformations osseuses que l'enfant présente⁴⁷.

Aux alentours de cet âge-là, l'enfant commencera à avoir une atteinte des muscles cardiaque et lisses. En effet, plus la maladie progresse, plus il risque de présenter une tachycardie sinusale suivie d'une arythmie ventriculaire^{45,48}. L'atteinte cardiaque apparaît chez 90% des patients DMD, et est responsable d'environ 20% des décès⁴⁹. L'altération des muscles lisses va également engendrer une dilatation gastrique. Le diaphragme sera lui aussi touché, ce qui provoquera une hypoventilation et un risque très élevé de développer des infections broncho-alvéolaires.



Figure 3 : Signe de Gowers⁵⁰

L'enfant doit s'appuyer sur ses mains au sol avant de s'appuyer sur ses genoux pour se relever. Extrait du dossier informatif ASRIM des maladies neuromusculaires, T. Kuntzer et M. Dunand, Edition 2005.

Le système nerveux central est lui aussi atteint puisqu'il y a été montré que les patients atteints de DMD présentaient un QI moyen autour de 80 et qu'un tiers d'entre eux sont considérés comme retardés mentaux⁵¹. Selon le Dr. JM Cuisset, Neuropédiatre au centre de référence des maladies neuromusculaires de Lille, les patients DMD possèdent un atteinte cognitive, aussi faible puisse-t-elle être¹⁵. En effet, chez 32% des enfants il est retrouvé une hyperactivité. Chez 25% d'entre eux il est retrouvé un déficit intellectuel. 17% associent un déficit intellectuel et un trouble de l'attention. Et 3 à 8% des enfants présentent des troubles du spectre autistique. De manière générale, les enfants font très fréquemment face à des troubles de la mémoire, des fonctions exécutives et attentionnelles. Pour 20 à 30% d'entre eux, ces troubles permettent d'établir un diagnostic vers l'âge de 6 ans¹⁵.

C'est aux alentours de l'âge de 20 à 30 ans que le patient présentera de très sévères déficits fonctionnels musculaire striés squelettiques, lisses mais surtout cardiaque ce qui entrainera son décès⁵¹.

Les signes cognitifs, en plus des signes moteurs peuvent orienter le diagnostic vers la DMD. Pour le valider, il sera effectué un dosage de la Créatinine Kinase (CK) dans le sérum. Si cette enzyme musculaire est élevée, cela signifie qu'il y a une rupture des fibres musculaires. Avec ce dosage, il est également réalisé un test PCR d'amplification de l'ADN de lymphocytes du patient afin d'apprécier la mutation génique^{52,53}. Le nombre des exons présents doit être exactement évalué afin d'apprécier l'étendu de la délétion en dystrophine. Environ 65% des patients atteints de DMD présentent des exons manquants sur les 79 normalement présents. Six à 11% des patients présentent au contraire, une duplication d'exons. S'il n'est pas retrouvé de suppression ou de duplication, un séquençage de toute la région codante est réalisé afin d'observer s'il y a des mutations ponctuelles comme des mutations non-sens ou des insertions/délétions⁵⁴.

Environ 7% des patients possèdent une mutation indétectable par analyse ADN, il est alors nécessaire de faire une biopsie du muscle. Ces patients-là présentent le plus souvent des mutations introniques entraînant l'inclusion de séquences introniques en pseudo-exon. Pour cette évaluation, il est réalisé une analyse des ARN messagers (ARNm) dérivés du muscle⁵⁴.

Il est également possible que chez certains patients, il soit observé une discordance entre le phénotype prédit par l'analyse ADN et le phénotype observé. Chez ces patients, il est possible de réaliser une biopsie musculaire afin de faire une analyse protéique⁵⁴.

1.2 Prise en charge actuelle

Aujourd'hui, la prise en charge de la DMD est essentiellement symptomatique⁵⁵. Le patient suit des séances de kinésithérapie de manière très régulière et est aussi pris en charge orthopédiquement, avec notamment le port d'orthèses pour les membres inférieurs⁵⁶. Du fait de l'atteinte osseuse, le patient subira une arthrodèse vertébrale lorsque la scoliose sera trop importante, environ 2 ans après la perte de la marche⁵⁵.

La dégénérescence du muscle cardiaque est une cause majeure de morbidité et de mortalité dans la DMD. La prise en charge est donc adaptée avec un Électrocardiogramme (ECG) et un échocardiogramme ou une IRM cardiaque recommandés tous les ans à compter de l'établissement du diagnostic⁵⁷. De manière préventive vers l'âge de 10 ans, le patient sera placé sous inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) et β-bloquants⁵⁷.

Une étude récente a montré que l'injection de cellules cardiaques dérivées (CDC) dans l'artère coronaire pouvait entrainer une diminution de la fibrose cardiaque et une amélioration de la fonction à 6 et 12 mois et ce, sur 25 patients⁵⁸. La possibilité de traitement par thérapie innovante comme l'injection de cellules est à l'étude dans ces problématiques, afin de restaurer des fonctions indispensables.

La prise en charge de la défaillance de l'appareil respiratoire est quant à elle, adaptée aux symptômes du patient. Le patient pourra bénéficier d'un système de ventilation non invasive et d'appareils d'aide à la toux, afin de limiter les infections respiratoires. Si besoin, une trachéotomie sera réalisée dans le but de mettre en place une ventilation invasive⁵⁹.

Les muscles lisses présents au niveau gastro-intestinal sont aussi touchés, il est donc possible de devoir réaliser une gastrostomie en cas de trouble de la déglutition⁶⁰. Le patient a de gros risques d'être sujet à de la constipation, du reflux gastrique et d'avoir une vidange gastrique retardée ce qui impact grandement la qualité de vie. La prise de corticostéroïdes étant très fréquente dans le traitement de fond⁶¹ de la DMD, le risque d'obésité est donc très présent. Les patients sont donc suivis très régulièrement par un gastroentérologue ainsi qu'un diététicien⁶⁰.

La perte de masse osseuse est aggravée par la prise de corticostéroïdes, il est alors recommandé de placer les patients sous complément de vitamine D avec un dosage annuel afin d'essayer de maintenir une concentration à 30 ng/mL⁶¹. Un complément vitaminique quotidien peut être engagé pour les patients ayant des difficultés à maintenir un régime approprié. Un monitorage est installé avec un contrôle de la colonne vertébrale tous les 2 ans. La densité osseuse est surveillée à l'aide d'un examen d'absorptiométrie des rayons X à double énergie qui est entrepris tous les ans^{60,61}.

Toutes ces prises en charge non médicamenteuses ne traite pas la maladie, il n'y a pas de modification de la dégradation musculaire, mais cela permet d'allonger l'espérance de vie de 18-27 ans à 30 ans⁵⁴. En parallèle, il peut être initié un traitement pharmacologique, tels que des corticostéroïdes.

Le premier patient atteint de DMD et traité avec des corticostéroïdes date de 1974. Aujourd'hui, la mise en place de ce traitement est systématique et intervient assez tôt dans le développement de la maladie. En effet, les glucocorticoïdes ont un effet anabolisant dans le muscle et donc une action positive sur la prolifération et la différenciation des myoblastes. Ils vont également inhiber la protéolyse musculaire, réduire la concentration en calcium cytosolique et augmenter l'expression d'utrophine^{62–64}. Cette dernière est une protéine possédant 80% d'homologie avec la dystrophine, ubiquitaire, et légèrement surexprimée dans la dystrophie musculaire de Duchenne afin de compenser le déficit en dystrophine⁶⁵.

Deux types de corticostéroïdes sont prescrits aujourd'hui dans la DMD ; la Prednisone avec une posologie de 0,3mg à 1,5 mg/kg/jour⁶⁶ et le Déflazacort à 0,9mg/kg/jour⁶⁷. Grâce à ces

corticostéroïdes, et à l'aide respiratoire, 53% des patients survivent jusqu'à 25 ans⁶⁸. En France, la prednisone est la plus prescrite des deux tandis que dans les pays anglo-saxons, la Food and Drug Administration (FDA) n'a donné une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) qu'au Déflazacort pour les patients atteints de DMD de 5 ans et plus¹⁵. Ces corticoïdes causent des effets indésirables chez les jeunes enfants et, pris sur la durée ils peuvent provoquer certains effets secondaires tels que des troubles du comportement, une prise de poids, une fragilité osseuse entraînant des fractures spontanées ainsi qu'une hypokaliémie⁵⁴. Deux études publiées récemment ont étudié l'effet d'une prise quotidienne de ces corticoïdes. La première publiée en Juin 2018 a été réalisée sur 596 patients atteints de DMD. Il a été montré que le risque de survenue d'une cataracte est élevé (22,4%) lors d'une prise de corticoïdes, et que ce risque est deux fois plus élevé lorsque le patient est sous Déflazacort^{69,70}. Cet effet indésirable intervient cependant en moyenne après 4 à 6 ans de traitement. La deuxième étude a été publiée en mars 2019 et portait sur 564 patients avec un suivi sur une moyenne de 4 ans. Ces chercheurs ont montré que le risque de survenue d'une fracture est doublé chez les patients prenant du Déflazacort au quotidien. La courbe de croissance des enfants sous Déflazacort est inférieure aux autres. Néanmoins, les enfants traités avec de la prednisone subissent un gain de poids important⁷¹.

Récemment, il a été montré que la posologie jouait un rôle important vis-à-vis de l'apparition de ces effets secondaires. L'administration hebdomadaire et quotidienne aurait le même bénéfice mais la première possèderait moins d'effets indésirables⁷². Des cliniciens ont alors commencé à prescrire une dose hebdomadaire de Prednisone à l'âge de 3 ans, à une posologie de 5 à 10 mg/kg et ce, répartie sur deux jours (samedi et dimanche).

1.3 État de la recherche clinique

La recherche concernant la pathologie de la dystrophie musculaire de Duchenne est en constante évolution depuis sa découverte. De nombreux évènements médico-scientifiques ont lieu régulièrement afin de réunir la communauté scientifique pour présenter les avancées mais aussi discuter des différentes problématiques rencontrées. En France, il y a notamment un congrès annuel de la Société Française de Myologie (SFM). Au niveau international, plusieurs rencontres ont lieu régulièrement. Nous pouvons citer le congrès Myology international qui a eu lieu en Mars 2019 à Bordeaux et qui a été organisé par l'association AFM-Téléthon, une association promouvant la recherche médicale. Il existe également un congrès annuel de la

World Muscle Society (WMS) qui a pour but de mettre en place de nouvelles thérapeutiques dans les maladies neuromusculaires⁷³.

1.3.1 Étude clinique de la pathologie

De nombreuses études ont été réalisées et sont en cours afin de décrire les différentes manifestations de la DMD et son évolution au cours du temps en l'absence de traitement. En effet, il est indispensable de connaître au mieux la pathologie et ses conséquences pour développer un traitement.

En France, il existe une étude sur la DMD, au niveau pédiatrique, de suivi de la pathologie pendant 4 ans sur 80 patients⁷⁴. Au niveau international, une étude similaire a été mise au point à plus grande envergure. Elle se déroule sur un minimum de 8 ans et sur 551 patients¹⁵. Cela permettra d'étayer les connaissances de cette pathologie et notamment d'établir un lien entre les déficiences observées, un lien entre la participation sociale et la qualité de vie mais également de découvrir de nouveaux biomarqueurs de la maladie.

En 2018, une étude a été publiée sur l'histoire naturelle de la DMD. Cette étude a été conduite pendant 10 ans, chez 204 garçons atteints de DMD âgés de 4 à 9 ans⁷⁵. Ces enfants ont été suivis régulièrement : une visite tous les 3 mois la 1^{ère} année, une visite tous les 6 mois la 2^{ème} année puis une visite par an pour les années suivantes. À chaque visite, les patients ont dû remplir un questionnaire évaluant la qualité de vie : support de l'échelle de mesure PedsQLTM. Cette échelle renseigne plusieurs informations comme le fonctionnement physique, émotionnel, social mais également scolaire.

Les résultats ont été publiés sous forme de statistiques. Il a alors été observé que 33% des garçons présentaient un retard de langage. 24% présentent un retard dans leur développement cognitif, 16,5% souffrent de problèmes de comportements significatifs et 14,5% possèdent des troubles du langage. Ils ont également montré que 5% des garçons souffraient de troubles de l'attention, que 5% présentent une hyperactivité et que 3% souffrent de troubles du spectre autistique. Ils ont démontré qu'il n'y avait pas de lien entre la prise de corticoïdes et l'apparition de ces troubles. Il a également été montré que ces troubles étaient plus fréquents chez les patients ayant une anomalie du gène DMD en amont de l'exon 51⁷⁵.

1.3.2 Étude clinique visant à corriger les conséquences de la pathologie

Plusieurs études sont actuellement en cours et ont pour but de corriger les conséquences de la pathologie sur le tissu musculaire. En effet, les stratégies de recherche ne sont pas axées uniquement sur le traitement de la DMD « à la source » au niveau du gène DMD. De nombreuses équipes sont en train d'étudier de nouveaux traitements pouvant limiter ou retarder la dégénérescence musculaire.

1.3.2.1 Stimulation de l'expression d'utrophine

L'utrophine est une protéine paralogue à la dystrophine et transcrite de façon ubiquitaire. Il existe deux isoformes d'utrophine : la forme A est présente dans les muscles striés squelettiques et la forme B est exprimée dans l'endothélium vasculaire. Contrairement à la dystrophine qui est exprimée tout le long du sarcolemme, l'utrophine est exprimée uniquement au niveau de la jonction myotendineuse et neuromusculaire. Dans un modèle de souris dystrophique, un facteur de croissance agissant sur la production d'utrophine a été administré : l'héréguline. Il a alors été montré que l'administration de cette molécule augmente de 2 à 3 fois la production d'utrophine, et que cela a pour effet d'améliorer le phénotype des souris atteintes de DMD⁷⁶. Des chercheurs ont donc entamé les recherches sur l'Homme avec la molécule SMT C1100 qui agit sur le promoteur de l'utrophine A. La molécule a été testée dans le cadre d'un essai clinique de phase I, et il a été montré une bonne tolérance du produit ainsi qu'une surexpression d'utrophine⁷⁷. Des recherches de phase II ont alors été engagées et conduites par le laboratoire Summit Therapeutics. Néanmoins, le laboratoire a annoncé en 2018 l'arrêt du développement de cette molécule ainsi que l'arrêt de l'essai « PhaseOut DMD ». En effet, ils ont estimé qu'après 48 semaines d'essai, les résultats n'étaient pas suffisants^{78,79}.

1.3.2.2 Inhibition de la myostatine

La myostatine est un facteur de croissance inhibant de manière naturelle la croissance musculaire. Elle fait partie de la famille des TGF-ß1 et est présente chez la personne saine et la personne atteinte de DMD. Chez la souris, l'inhibition de ce facteur de croissance améliore le

phénotype dystrophique⁸⁰. Les sociétés Bristol-Myers-Squibb et Hoffmann-La Roche ont développé une molécule RG6202 afin de diminuer ce facteur chez l'Homme. Les résultats de l'essai clinique de phase I/II de cette molécule ont été rendus publiquement lors d'un congrès scientifique. Cet essai s'est déroulé en double aveugle contre placebo, et la tolérance et l'innocuité de plusieurs doses ont été évaluées. Le traitement a été injecté en sous-cutané pendant 24 semaines à 43 garçons atteints de DMD, de 5 à 10 ans et pouvant marcher. Il n'a pas été observé d'effets secondaires (sauf quelques petites réactions au site d'injection, modérées à moyennes), le traitement a bien été toléré. Une chute d'environ 77% de myostatine a été mise en évidence avec une petite augmentation de la masse musculaire chez les garçons traités, ainsi qu'une augmentation de la capacité contractile du muscle⁸¹. Ce traitement va donc être évalué par la suite en essai clinique de phase II/III afin de visualiser son efficacité sur une plus grande cohorte de patients.

1.3.2.3 Diminution de la fibrose

Une des stratégies possibles quant à la prise en charge de la DMD est d'essayer de réduire au maximum la fibrose qui se met en place avec le temps. Cette fibrose sera en partie responsable de la perte de la fonction musculaire, c'est donc une piste thérapeutique intéressante.

<u>Tamoxifène</u>

Le Tamoxifène est un anti-œstrogène utilisé dans certains traitements du cancer. Son administration dans un modèle de souris DMD a montré une amélioration de la force musculaire et une réduction de la fibrose cardiaque de 50%, et ce au bout de 15 mois de traitement⁸². L'étude des mécanismes responsables est en cours, c'est pourquoi il n'y a pas encore d'AMM pour le Tamoxifène dans l'indication de la DMD. Il y a également plusieurs essais cliniques en cours afin d'évaluer cette molécule dans la DMD. En Israël, 19 patients atteints de DMD sont testés dans un essai clinique de phase I¹⁵. Au niveau international, un essai clinique de phase II multicentrique (TAMDMD) est en cours, et se termine en juin 2020⁸³. Il est réalisé en double aveugle contre placebo avec l'administration de 20mg de Tamoxifène une fois par jour pendant 48 semaines. Deux groupes de personnes ont été inclus dans cet essai : un premier composé de 84 patients atteints de DMD et ambulant, âgés de 6,5 à 12 ans et sous corticothérapie. Le deuxième groupe est composé de 16 à 20 patients ayant perdu la faculté de marcher, âgés de 10 à 16 et non traités par corticothérapie. Cet essai multicentrique se déroule en Allemagne, en

Espagne, aux Pays-Bas, au Royaume-Uni ainsi qu'en Suisse. La participation de la France a été refusée par l'Agence Nationale de Sécurité des Médicaments et produits de santé (ANSM) en raison de discordances sur des questions réglementaires et méthodologiques¹⁵.

Pamrevlumab

Le Pamrevlumab ou FG-3019 est un anticorps monoclonal (Acm) humain inhibant l'activité du facteur de croissance du tissu conjonctif (CTGF) et développé par la société FibroGen. Cet Acm inhibe la formation de fibrose. Il a été montré une amélioration de la fonction musculaire chez le modèle de souris atteintes de DMD, et est actuellement en essai clinique de phase II⁸⁴. Cet Acm a été autorisé par la FDA en Avril 2019 aux États-Unis en tant que médicament orphelin⁸⁵.

1.3.2.4 Réduction de l'inflammation

Réduire l'inflammation chez les patients atteints de DMD est une stratégie connue depuis les années 1970. En effet, il est reconnu que l'inflammation accélère l'avancement de la maladie, notamment à travers l'infiltration des macrophages mais également des lymphocytes T cytotoxiques. En plus du traitement de fond par des corticostéroïdes, d'autres molécules sont étudiées à des fins anti-inflammatoires.

Cyclosporine A

La cyclosporine A est un immunosuppresseur qui est le plus souvent utilisé lors de transplantation d'organes avec ou sans prednisone. Cet immunomodulateur n'a pas d'AMM dans la DMD mais une étude chez le modèle de chien atteint de dystrophie musculaire de Duchenne (Golden Retriever Muscular Dystrophy : GRMD) a pu montrer une amélioration du score clinique, une relaxation musculaire post-tétanique ainsi qu'une amélioration du taux de CK sérique⁸⁶. Ce type de traitement n'augmente pas la force musculaire mais est tout de même à l'étude chez l'Homme⁸⁷.

Edasalonexent

L'Edasalonexent ou CAT-1004 est une molécule composée de deux substances : l'acide salicylique et l'acide docosahexaenoïque (DHA). Elle est classée comme faisant partie des antiinflammatoires non-stéroïdiens et a été développée par la société Catabasis Pharmaceuticals. Son mécanisme d'action va être d'inhiber l'activité du NF- κ B⁸⁸. Le NF- κ B est une protéine clé d'une voie de signalisation qui va empêcher la régénération du muscle malade ce qui va accroître sa dégradation (Figure 4). Actuellement en phase I/II d'un essai clinique se déroulant aux États-Unis, cette molécule a montré une bonne tolérance chez les patients, avec également une diminution du taux de NF- κ B et des marqueurs cellulaires de l'inflammation dans le sang⁸⁸.





Figure 4 : Voies de signalisation de l'hypertrophie et de l'atrophie⁸⁹

La voie de signalisation à gauche correspond à celle du signal d'hypertrophie via l'IGF-1. Les molécules activatrices sont représentées en vert, les molécules inhibitrices sont représentées en rouge. La voie de signalisation à droite représente celle du signal d'atrophie. Modifié d'après Glass et al., 2005

Vamorolone

Le Vamorolone ou VBP15 est également classé comme anti-inflammatoire non stéroïdien. C'est une molécule composée de 11 glucocorticoïdes qui ne se lie pas aux récepteurs des glucocorticoïdes ce qui limite les effets indésirables. Cette molécule est développée par la société ReveraGen BioPharma et a montré une capacité d'inhibition du NF- κ B *in vitro*. Une étude a été réalisée sur un modèle de souris atteints de DMD, en administration quotidienne à des posologies de 5, 15 ou 30mg/kg⁹⁰. Une diminution de l'inflammation tissulaire a été

observée ainsi qu'une stabilisation de la membrane. Ce composé stimule également la réparation des fibres musculaires lésées et donc augmente la force. Il est important de notifier que ce composé provoque moins d'effets secondaires que des glucocorticoïdes classiques, c'est pourquoi il est actuellement en essai de phase II⁹⁰. De plus, cette molécule a reçu la désignation de médicament orphelin aux États-Unis et en Europe.

1.3.2.5 Diminution du stress oxydatif

Le stress oxydatif est une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive de molécules toxiques provenant de la respiration cellulaire. Ces radicaux libres en excès vont entraîner une lésion des cellules et de l'ADN. C'est pourquoi l'utilisation d'antioxydants peut protéger l'organisme des effets toxiques, et la plupart sont fournis aujourd'hui par l'alimentation. L'administration de N-acétylcystéine, antioxydant, dans l'eau de boisson des souris atteintes de DMD a montré une réduction de la concentration en espèces oxygénées réactives dans les muscles⁹¹.

<u>Idébénone</u>

L'Idébénone est une benzoquinine développée par Santhera Pharmaceuticals. Elle améliore la fonction mitochondriale en protégeant les membranes cellulaires mais surtout mitochondriales des lésions oxydatives. Elle diminue le stress oxydatif et réduit l'inflammation et la fibrose cardiaque. Un essai clinique est en cours (DELOS) sur 64 garçons âgés de 10 à 18 ans ne prenant pas de corticoïdes. Le traitement a bien été toléré au bout d'un an et l'atteinte respiratoire a été moins marquée chez les patients traités que ceux ayant reçu le placebo⁹². L'essai clinique est étendu en phase III avec une extension : essai SIDEROS¹⁵. Il sera conduit en double aveugle et évaluera l'efficacité du traitement à travers la préservation de la fonction respiratoire avec des glucocorticoïdes.

1.3.2.6 Réduction de l'atteinte de la fonction cardiaque

Chez les patients atteints de DMD, il est préconisé de débuter un traitement en prévention pour limiter et repousser la perte de la fonction cardiaque. Classiquement, avant l'âge de 10 ans, le

patient est placé sous IEC et ß-bloquant. D'autres traitements pour compléter cette association sont aujourd'hui à l'étude.

<u>Nébivolol</u>

Le Nébivolol est un médicament de la famille des β -bloquants, et son association avec des IEC est actuellement à l'étude pour une indication de DMD⁹³.

Eplerenone et spironolactone

L'Eplerenone et la spironolactone sont des diurétiques anti-aldostérone couramment utilisés dans le traitement de l'hypertension artérielle ou encore dans l'insuffisance cardiaque. Un essai clinique de phase III a été réalisé aux États-Unis et actuellement en cours d'analyse⁹⁴. L'objectif est de traiter les patients atteints de DMD avec cette association afin de préserver leur fonction cardiaque.

Riméporide

Le Riméporide est un inhibiteur sélectif du transporteur sodium/proton NHE-1. Il régule le taux de sodium et calcium dans les cellules et est utilisé aujourd'hui dans le traitement de l'insuffisance cardiaque chronique¹⁵. Ce traitement peut donc être intéressant dans la DMD puisqu'il y a une accumulation de calcium dans les cellules musculaires. Un essai clinique de phase Ib chez des garçons atteints de DMD vient se terminer. Les datas brutes ont été publiées, et les premiers résultats montrent une bonne tolérance ainsi qu'une possible amélioration des fonctions musculaires et cardiaques à travers la réduction de certains biomarqueurs⁹⁵.

Levosimendan

Le Levosimendan est une nouvelle molécule inotrope augmentant la force de contraction cardiaque sans augmenter la consommation en oxygène. Dans une étude parue en 2019, il fait état d'un patient de 26 ans atteint de DMD en insuffisance cardiaque sévère. Il ne répondait plus aux traitements conventionnels mais a répondu de façon très importante à ce nouveau traitement innovant⁹⁶.

1.3.2.7 Amélioration de la fonction et de la force musculaire

Une stratégie possible pour corriger les conséquences de l'absence de dystrophine peut être axée sur le plan musculaire. En effet, il est également possible d'agir au niveau du muscle pour compenser l'absence de dystrophine.

L-citrulline et Metformine

La L-Citrulline est un acide aminé précurseur de l'arginine et la Metformine est un antidiabétique oral de la famille des biguanides normoglycémiants. L'association de ces deux molécules stimule la production de NO. L'absence de dystrophine dans la DMD aboutit à une délocalisation de la NOS puisqu'elles sont étroitement liées dans un tissu sain. L'association L-Citrulline et Metformine permettra alors de compenser le manque de dystrophine⁹⁷. Cette stratégie est actuellement en essai clinique de phase III en Suisse sur 47 patients âgés de 7 à 10 ans⁹⁸.

Givinostat

Le Givinostat est un inhibiteur des histones désacétylases (HDAC) qui a des activités antiinflammatoire, anti-angiogénique et antinéoplasique. C'est un produit développé par la société Italfarmaco, qui agit sur le muscle en augmentant la production de follistatine. Cette protéine favorise l'augmentation de la masse musculaire mais protège aussi le muscle de la dégénérescence. En 2012, ce médicament a été désigné comme médicament orphelin dans la DMD en Europe⁹⁹. Le Givinostat est aujourd'hui en essai clinique de phase III sur des patients ayant encore la capacité de marcher. Il se déroule entre l'Europe et les États-Unis sur 213 patients âgés de 6 à 17 ans⁹⁹.

<u>IGF-1</u>

L'IGF-1 ou Somatomédine C est un facteur de croissance ayant une structure proche de l'insuline (nom anglais : Insulin-like Growth Factor-1). L'IGF-1 va inhiber les médiateurs de l'atrophie musculaire comme MuRF1 et MAFbx⁸⁹ (Figure 4). Cela permet une stimulation de la prolifération de la différenciation des cellules progénitrices musculaires. Les résultats précliniques chez la souris ont été encourageants¹⁰⁰, c'est pourquoi cette protéine recombinante est en essai clinique de phase II chez des patients atteints de dystrophies myotoniques⁸¹.

1.3.3 Étude clinique ciblant les anomalies du gène DMD

Grâce aux nouvelles thérapeutiques ayant émergé durant ces trois dernières décennies, il est maintenant possible d'envisager de corriger directement les anomalies du gène DMD afin de limiter les conséquences de la pathologie ou encore même de traiter les patients. Plusieurs stratégies sont alors étudiées aujourd'hui comme de la translecture de codon STOP, de la thérapie génique ou même du remaniement de l'ADN avec les techniques de CRISPR-Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, soit en français « courtes répétitions en palindrome regroupées et régulièrement espacées » ; Cas9 pour protéine associée au CRISPR).

1.3.3.1 Translecture du codon stop

Certaines anomalies du gène DMD sont constituées de mutation « non-sens ». C'est à dire que chez 10 à 15% des patients, la mutation responsable de la pathologie est un remplacement d'un nucléotide qui devient alors un codon stop : UAA, UGA ou UAG^{101,102}. Une des stratégies pensées par des chercheurs a été de développer une molécule capable d'induire une translecture du codon stop lors de la synthèse protéique. À travers une liaison au ribosome, la molécule permettra de « sauter » le codon stop de l'ARNm ce qui permettra de conserver le cadre de lecture et de continuer la synthèse de la dystrophine (Figure 5). C'est dans cette optique que PTC Therapeutics a développé une molécule appelée Ataluren, Translarna ou PTC 124. Cette molécule va se lier à la sous unité 60S du ribosome et permettra de passer outre les codons stop prématurés du gène¹⁰³. En 2014, une AMM conditionnelle a été délivrée par l'EMA et ce pour des garçons atteints de DMD à partir de l'âge de 5 ans, ambulants et porteurs d'une anomalie du gène DMD de type codon stop. En août 2018 cette autorisation de prescription s'est étendue et s'applique désormais aux mêmes patients mais dès l'âge de 2 ans¹⁰⁴. Cette autorisation conditionnelle s'arrêtera en Septembre 2021 puisque l'ANSM demande des résultats démontrant une efficacité d'ici à cette date. En 2017, la commission de transparence de la Haute Autorité de Santé (HAS) a donné un avis favorable pour l'inscription de cette spécialité sur la liste des spécialités remboursables même si l'amélioration du service médical rendu (ASMR) est à V (considéré comme n'apportant pas d'amélioration du service médical rendu)¹⁰⁵. Aujourd'hui, l'Ataluren n'est remboursé que dans un cadre hospitalier et en consultation spécialisée mais cela évoluera dans les années à venir.

TRANSLECTURE DE CODONS STOP



Figure 5 : Représentation schématique de la translecture de codons STOP¹⁰⁶

Extrait de « Perspectives thérapeutiques pour les maladies génétiques », Collège national des enseignants et praticiens de génétique médicale, M. Krahn, N. Lévy, 2012.

En 2018, une étude menée sur 4 garçons atteints de la DMD et non marchant a été publiée. Les chercheurs ont montré que l'Ataluren a pu atténuer la progression de la maladie au niveau de l'appareil respiratoire et moteur¹⁰⁷. À la suite, une seconde étude a été publiée portant sur l'évaluation de l'efficacité de ce traitement. L'étude s'est portée sur 3 garçons ambulants, et il a été montré que le traitement présente une efficacité dans le prolongement de la marche, avec soit une stabilisation, ou bien une amélioration de la distance de marche en un temps donnée (test de marche de 6 minutes, appelé 6MWT)¹⁰⁸. Plusieurs études sont encore en cours et permettront d'aiguiller la décision des autorités de santé.
1.3.3.2 Thérapie génique

Depuis les années 90, la thérapie génique a suscité un réel engouement dans la recherche des maladies génétiques. Elle consiste en une introduction de matériel génétique dans les cellules pour traiter une pathologie. Ce matériel génétique peut être de l'ADN ou de l'ARN et l'objectif est de modifier l'expression génique du patient¹⁰⁹. L'introduction de ces acides nucléiques peut être faite de différentes façons : ADN nu, par un vecteur synthétique ou bien par un vecteur viral. Les vecteurs viraux sont des particules virales véhiculant un génome artificiellement modifié et sont non réplicatifs pour des raisons de sécurité. Ils peuvent être de type adénovirus, virus associés aux adénovirus (AAV) ou bien rétrovirus (lentivirus et oncorétrovirus)¹⁰⁹. Aujourd'hui les vecteurs viraux les plus utilisés sont les AAV car ils sont non pathogènes pour l'homme donc le risque immunologique est maîtrisé. Ils sont aussi non réplicatifs et très peu intégratifs (10% seulement intègre le génome de l'hôte, ce qui limite le risque oncogène). Les différents sérotypes d'AAV ciblent différents types cellulaires ce qui facilite l'adressage, néanmoins ils sont limités en taille à 5 kilobases¹¹⁰. Ce dernier point pose un problème notamment dans la DMD puisque la dystrophine est codée par le gène DMD qui est très long : 2300 kilobases¹¹¹.

Le transfert du gène codant pour la dystrophine est donc impossible. Cependant, de nombreuses stratégies de thérapie génique ont émergé afin de contourner cette problématique.

Surexpression du gène GALGLT2

Le gène GALGLT2 code pour une enzyme, une O-mannosyltransferase, qui est exprimée au niveau de la jonction neuromusculaire. Elle est impliquée dans la glycosylation terminale de certaines protéines comme les dystroglycanes. Il a été montré que sa surexpression chez les souris ou le grand singe pouvait stimuler la production d'utrophine mais aussi changer la localisation sur toute la myofibre ce qui améliore les symptômes de la pathologie^{112,113}. Une thérapie génique a donc été développée afin d'apporter une surexpression de ce gène à l'aide d'un AAV. Les résultats montrent une stimulation de la production d'utrophine pouvant alors remplacer la dystrophine manquante. Cet essai clinique de phase I/II est actuellement réalisé sur 6 garçons de plus de 4 ans aux États-Unis¹¹⁴. Les résultats préliminaires partagés sont ceux de deux d'entre eux. Pour ces deux patients, le traitement a bien été toléré mais la démonstration d'une efficacité clinique est limitée pour l'instant¹⁵.

Saut d'exon

Le saut d'exon a pour but de contourner les anomalies du gène DMD provoquant un décalage du cadre de lecture qui entraîne la production d'une dystrophine non fonctionnelle. En « sautant » cet exon, il sera alors possible de produire une dystrophine tronquée mais fonctionnelle. Théoriquement, la technique de simple et de double saut d'exon permet de cibler 83% des patients atteints de DMD¹¹⁵.

La thérapeutique se compose d'ARN artificiels et plus précisément d'oligonucléotides artificiels (OA). Ces OA portent non seulement un petit ARN du splicéosome mais aussi de l'ARN complémentaire à l'ARN muté. Ils vont se lier au pré-ARNm au moment de la maturation et vont exclure les exons qui entraînent le décalage du cadre de lecture en permettant la liaison de protéines du splicéosome pour exciser l'exon comme un intron. Il en résultera alors la production d'une dystrophine plus courte mais bien fonctionnelle (Figure 6).

Il existe deux types d'OA, le 2'-O-méthyl-phosphorothioate (2OMP) d'environ 20 nucléotides obtenu en modifiant la synthèse classique d'oligonucléotides, et le phosphorodiamidate morpholina oligomer (PMO) appelé morpholinos obtenu de la même manière.

Dans le cadre de la DMD, Sarepta Therapeutics a développé l'Eteplirsen, Exondys 51[®] ou AVI-4658 qui est un PMO. Ce traitement permet le saut de l'exon 51 et ne concerne alors 10% des patients¹¹⁶.



*Figure 6 : Représentation schématique de la stratégie du saut d'exon*¹¹⁷ *Inserm, F. Koulikoff, 2012*

Une AMM a été délivrée pour ce traitement dans la DMD aux États-Unis en 2016, mais l'agence européenne du médicament (EMA) a refusé de délivrer une AMM en Europe. En effet, ils estiment que les résultats fonctionnels notamment concernant la marche sont insuffisants au long terme car ces essais ont été faits sur peu de temps et peu de patients¹¹⁸. Ils estiment également que la méthode d'évaluation de la maladie n'était pas validée et que le rapport bénéfice/risque est insuffisant. Cette différence dans la méthode d'évaluation s'explique par le fait que les États-Unis et notamment la FDA prend en compte la production de dystrophine alors que l'EMA ne prend en compte que l'effet fonctionnel¹¹⁸. Le comité des médicaments à usage humain (CHMP) demande des données supplémentaires pour poser un avis¹⁵.

Trois essais cliniques sont en cours sur 74 patients atteints de DMD. Il a été montré que le déclin de la fonction respiratoire et motrice est moins important chez les patients traités pendant au moins 2 ans à l'Eteplirsen¹¹⁹.

D'autres molécules sont également à l'étude tel que le WCE-210201 qui est un OA « stéréopur » développé pour le saut de l'exon 51¹²⁰. En ce qui concerne le saut d'autres exons, nous pouvons citer les SRP-4045¹²¹ (Casimersen) et DS-5141b¹²² pour le saut de l'exon 45, ou encore le SRP-4053¹²³ (Golodirsen) et le NS-065/NCNP-01¹²⁴ pour le saut de l'exon 53. D'autres OA sont également en développement pré-clinique pour les exons 44, 50 et 52.

Apport d'une mini/micro-dystrophine

Le gène de la dystrophine est trop grand pour être transporté au sein des cellules à l'aide d'un vecteur AAV. C'est pourquoi cette stratégie est de transporter un « mini-gène » codant pour une mini- ou une micro-dystrophine. Les vecteurs privilégiés sont donc les AAV puisqu'ils sont non pathogènes pour l'Homme et très peu intégratifs. Certaines études se sont intéressées au transport de micro-dystrophine *via* des lentivirus sur des modèles de petits animaux. Néanmoins, aucune étude n'a été réalisée sur des modèles de gros animaux. De plus, l'intégration aléatoire de ces vecteurs pose des problèmes de sureté puisqu'il est possible que ce rétrovirus active des oncogènes lors de son intégration aléatoire¹⁰¹.

C'est dans cette optique que des chercheurs ont développé le rAAV rh74.MCK.Micro-Dystrophine¹⁵. Ce vecteur est un AAV transportant un ADN simple brin codant pour une microdystrophine. Deux essais cliniques sont en cours pour ce vecteur, l'un en phase I/II et le deuxième en phase II, tous deux aux États-Unis. Pour ces deux essais clinique l'injection se fait en intraveineux, mais le suivi dure 3 ans pour le premier, et 2, puis 4 ans pour le second. Des résultats intermédiaires ont été publiés et les chercheurs ont pu montrer dans un premier temps que ce traitement possède une bonne tolérance. Il a également été montré qu'une forte expression de micro-dystrophine était retrouvée dans des biopsies des 4 premiers participants (expression dans 95,8% des fibres musculaires). Ils ont également relevé une amélioration fonctionnelle de 33% en moyenne entre la 1^{ère} et la dernière visite de suivi qui était de 1 ou 3 mois selon les patients. Cette amélioration fonctionnelle a pu être mesurée à l'aide de l'échelle NorthStar Ambulatory Assesment (NSAA), ce qui a permis de montrer une baisse de 31% du temps pour monter 4 marches, une baisse de 13% du temps pour se relever du sol ainsi qu'une baisse de 14% du temps pour marcher 100 mètres¹⁵.

D'autres vecteurs sont également à l'étude, notamment le PF-06939926 avec un gène de mini dystrophine qui est développé par la société Pfizer. Un essai clinique de phase I est en cours aux États-Unis sur 12 patients pendant 5 ans¹²⁵.

Il existe également un essai développé sur l'apport d'une micro-dystrophine par la société Solid Biosciences. L'essai clinique en cours est dans la phase I/II aux États-Unis sur 16 patients pendant un an. Les résultats préliminaires montrent l'analyse de biopsies musculaires de 3 patients. Sur ces 3 patients, un seul a 10% de ses fibres musculaires positives au marquage de la dystrophine¹²⁶.

CRISPR-Cas9

CRISPR-Cas9 est un outil servant à modifier le génome. C'est un système simple, rapide et efficace permettant de couper l'ADN à un endroit précis dans n'importe quelle cellule. C'est une technique très récente et couramment qualifiée de « ciseaux moléculaires ».

Ce complexe est constitué d'une enzyme, cas9, possédant une activité d'endonucléase qui va couper l'ADN et d'un ARN guide (ARNg) qui va permettre de cibler l'ADN à un endroit précis¹²⁷. Cet outil permet d'enlever une partie d'un gène, d'en réparer une partie, mais peut également servir à modifier un gène (Figure 7).

Dans le cadre de la DMD, CRISPR-Cas9 peut servir à restaurer le cadre de lecture de la dystrophine. En effet, l'ARNg va cibler une séquence d'ADN double brin à la fin d'un exon précédant la mutation ou bien au début de l'exon qui suit cette mutation¹²⁸.



Figure 7 : L'édition génomique à l'aide de l'outils CRISPR-Cas9¹²⁹

L'ADN génomique est reconnu par un ARN guide. L'endonucléase Cas9 d'origine bactérienne coupe l'ADN 3 nucléotides avant la séquence PAM (Protospacer Adjacent Motif). La cellule eucaryote répare l'ADN par une recombinaison non homologue (ligation des extrémités cassées) ou par une recombinaison homologue (insertion d'une séquence d'ADN). Modifié d'après « Molecular surgery with CRISPR-Cas9 », Pr. D. Hornby.

Cet outil a montré des résultats très prometteurs chez le modèle de souris DMD en injection intraveineuse. Il a été montré une réduction de la fibrose dans tous les muscles striés squelettiques, une augmentation significative de la dystrophine ainsi qu'une amélioration fonctionnelle des muscles striés squelettiques et cardiaques¹³⁰.

L'étude s'est alors poursuivie chez un plus gros modèle animal, le chien « deltaE50-MD » qui présente une mutation entrainant une perte de l'exon 50 de la dystrophine. L'objectif a été d'éliminer l'exon suivant (51) afin de restaurer le cadre de lecture. L'étude s'est portée sur 4 chiens âgés d'un mois¹³¹. Le traitement a été inoculé à l'aide d'un AAV et injecté en intramusculaire pour deux chiens avec un suivi de six semaines, et en intraveineux pour les deux autres chiens avec un suivi de 8 semaines. Ces résultats pré-cliniques ont récemment été communiqués et ils montrent que les chiens présentent une augmentation de la production de dystrophine dans les muscles striés squelettiques et dans le cœur pour ceux traités en intraveineux¹³¹. Des travaux supplémentaires sont alors engagés pour évaluer l'efficacité et la sécurité de ce traitement sur un plus grand nombre de chiens.

Cette technique pourrait éventuellement s'étendre à l'excision de toute la région de l'exon 45 à l'exon 55, ce qui permettrait de toucher un plus grand nombre de patients¹³². Néanmoins, ces nouvelles approches suscitent des inquiétudes telles que l'altération de la lignée cellulaire, les effets « off-target » ou même encore des réactions immunitaires de par l'origine bactérienne de la Cas9. Néanmoins, pour l'instant cette stratégie n'est à l'étude qu'en pré-clinique. Une fois le traitement validé sur de gros animaux, les études pourront débuter chez l'Homme.

Toutes ces nouvelles thérapeutiques innovantes combinées aux thérapeutiques pharmacologiques apportent un réel espoir quant à la mise au point du traitement curatif de la dystrophie musculaire de Duchenne. Au sein de ces thérapies innovantes, il existe également une stratégie qui est à l'étude : la thérapie cellulaire. En effet, certains chercheurs se penchent alors sur le fait d'amener des cellules souches ou différenciées au patient pour régénérer les tissus musculaires. Ceci permettrait de compenser la perte musculaire à travers le développement de muscles sains.

2 Thérapie cellulaire

La thérapie génique, la thérapie cellulaire somatique, l'ingénierie tissulaire ainsi que les thérapies combinées répondent au statut de Médicament de Thérapies Innovantes (MTI ou ATMP Advanced Therapy Medicinal Products). Le développement de ces nouvelles thérapeutiques a été rendu possible grâce à l'essor des biotechnologies. Ces MTI sont règlementés depuis 2007 par la directive européenne n°1394/2007 CE¹³³. En 2016, la part de chacune des stratégies de thérapie cellulaire, thérapie génique, d'ingénierie tissulaire au sein de la recherche, étaient respectivement de 53,6%, 22,4%, 22,8% ainsi que 1,2% pour la thérapie combinée¹³⁴.

2.1 <u>Définition</u>

La thérapie cellulaire consiste à greffer des cellules vivantes afin de restaurer la fonction d'un tissu ou d'un organe. Ce médicament de thérapie cellulaire est distingué du Produit de Thérapie Cellulaire (PTC) selon différents critères : les cellules auront subi des manipulations substantielles ou ne seront pas destinées à avoir la même utilité entre le donneur et le receveur. Aujourd'hui, les principales indications visées par la thérapie cellulaire sont la médecine régénérative ainsi que l'oncologie. Il s'agit ainsi de traiter des tissus ou organes qui présentent une dégénérescence dans le cas de la médecine régénérative. Et, en comparaison à une transplantation d'organe, l'administration est plus simple et la récupération et la morbidité sont meilleures par le biais de thérapie cellulaire¹³⁵.

Il existe deux stratégies dans la thérapie cellulaire aujourd'hui : la thérapie cellulaire autologue et la thérapie cellulaire allogénique (Figure 8). Dans la thérapie cellulaire basée sur des cellules autologues, le donneur des cellules sera aussi le receveur. Au contraire, dans une thérapie cellulaire basée sur des cellules allogéniques, le donneur et le receveur seront deux personnes distinctes. Ces deux stratégies présentent toutes les deux leurs propres avantages et inconvénients qui les rendent uniques et pertinentes ou non suivant les indications. Malgré l'émergence de l'intérêt des cellules allogéniques, la thérapie cellulaire basée sur les cellules autologues reste majoritaire sur le marché. Une explication plausible reste le contexte historique. En effet, la thérapie cellulaire autologue suit logiquement la greffe autologue utilisée maintenant depuis plusieurs décennies et ceci est illustré par le fait qu'en 2012, 75% de la recherche en thérapie cellulaire était basée sur des cellules autologues¹³⁶.

Dans un contexte de thérapie cellulaire autologue, le patient est donneur et receveur. Il n'y a donc aucun risque de rejet immunitaire. Néanmoins, cette stratégie présente des inconvénients certains tels que de la variabilité entre les lots cellulaires, des temps d'amplification cellulaire qui peuvent être longs avec une possible difficulté à générer un nombre suffisant de cellules à transplanter. À ces problématiques s'ajoute également le coût de production plus élevé. En effet, cette stratégie engendre un fort coût dû au prélèvement, à la caractérisation, la modification ainsi que l'amplification des cellules. La thérapie cellulaire autologue n'est, de plus, pas industrialisable ce qui limite l'investissement des industries¹³⁷.

Au contraire, dans une stratégie de thérapie cellulaire allogénique, l'industrialisation est réalisable avec la mise en place de bio-banques ce qui permet une disponibilité immédiate du produit. Les cellules sont prélevées chez un donneur sain, sélectionnées, amplifiées puis stockées. Cependant, il existe un risque important de rejet immunitaire du greffon cellulaire. Les patients sont donc placés sous traitement immunosuppresseur, ce qui entraîne des effets indésirables assez lourds^{137,138}.



*Figure 8 : Comparaison de la thérapie cellulaire autologue et allogénique*¹³⁸. *Modifié d'après Karantalis et al., 2015*

Aujourd'hui, il existe très peu de traitements de thérapie cellulaire sur le marché. Dans les stratégies de thérapie cellulaire autologue, il est retrouvé le produit Carticel[®] commercialisé par la société Genzyme, afin de réparer les dommages articulaires après des traumas répétés ou chez les patients non répondant aux traitements classiques de l'arthrose¹³⁹. En Europe, l'Holoclar[®] est également un produit de thérapie cellulaire autologue ayant une AMM dans la régénération de cornée après brûlure. Ces cellules sont différenciées *ex vivo* en cellules épithéliales de la cornée et sont ensuite réimplantées¹⁴⁰. Dans le contexte de thérapie cellulaire allogénique, en Europe, nous retrouvons l'Alofisel[®] développé par la société TiGenix, à base de cellules souches mésenchymateuses indiqué dans la prise en charge des fistules anales complexes associées à la maladie de Crohn chez les patients non répondeurs aux thérapies médicales et chirurgicales classiques¹⁴¹.

À titre d'information, sur le site clinicaltrial.gov en août 2019, il est retrouvé 5626 études cliniques de phase I et II dans le domaine de la thérapie cellulaire¹⁴². Le faible nombre de médicaments innovants en thérapie cellulaire sur le marché comparé au nombre très important d'études en cours sur ces stratégies reflète très clairement la complexité de tels médicaments. Différentes problématiques s'imposent alors telles que la confection du médicament de thérapie cellulaire, ou bien la compréhension du mécanisme d'action. Ces informations sont indispensables pour la validation du produit, et de la même manière il faut y associer une définition claire du protocole d'administration ainsi qu'avoir une vision économique à long terme pour l'industrialisation.

2.2 <u>Principaux types cellulaires utilisés</u>

Parmi les sources de cellules greffées, les cellules souches sont particulièrement utilisées au regard de leurs propriétés intrinsèques d'auto-renouvellement, ainsi que de différenciation en plusieurs types cellulaires. Cinq grands types de cellules souches peuvent ainsi être décrits (Figure 9) :

- Cellules souches totipotentes : capables de se différencier dans tous les types cellulaires (embryonnaire et extra-embryonnaire) et peuvent donner à elles seules un organisme entier lors d'une réimplantation chez une mère porteuse.
- Cellules souches pluripotentes : cellules souches de la masse interne de l'embryon, dites cellules souches embryonnaires. Elles peuvent générer des cellules des trois feuillets embryonnaires : endoderme, mésoderme et ectoderme. Leur obtention est rendue

possible grâce aux embryons surnuméraires issus de fécondation *in vitro* et non retenus pour un projet parental ; mais soulève néanmoins des questions d'ordre éthique¹⁴³.

- Cellules souches multipotentes : cellules souches pouvant donner plusieurs types cellulaires. Elles sont dites déterminées ou progénitrices et sont présentes dans la plupart des tissus afin d'assurer une homéostasie.
- Cellules souches oligopotentes : cellules souches pouvant donner quelques types cellulaires pour un tissu donné.
- Cellules souches unipotentes : cellules souches pouvant donner un seul type cellulaire, avec une capacité d'auto-renouvellement.





À ces cinq types cellulaires s'ajoutent les cellules souches pluripotentes induites (iPSC) décrites et mises au point par l'équipe du Professeur Yamanaka¹⁴⁴. Ce sont des cellules pluripotentes provenant de cellules différenciées. Cette technique est basée sur la transfection d'ADN au sein de la cellule différenciée qui code pour des facteurs de transcription qui forceront l'expression de gènes spécifiques des cellules souches pluripotentes¹⁴⁵. Cette technique permet alors

d'obtenir des cellules souches possédant les propriétés de cellules souches embryonnaires (CSE), ce qui limite la problématique éthique de la ponction des cellules sur les embryons humains.

Un autre type de cellules souches est également à l'étude en tant que produit de thérapie cellulaire : les cellules précurseurs. Ces cellules sont engagées dans une voie de différenciation. Elles ont perdu leur capacité d'auto-renouvellement et ne pourront donner qu'un seul type cellulaire¹⁴⁶.

Tous ces types cellulaires peuvent servir à l'élaboration d'un produit de thérapie cellulaire de par leur capacité de différenciation et d'auto-renouvellement. De plus, les cellules souches possèdent une capacité de prolifération plus importante que des cellules différenciées ce qui est important pour l'expansion des cellules en vue d'une injection.

La thérapie cellulaire aujourd'hui, utilise en majeure partie des cellules souches mésenchymateuses (CSMs). Ce sont des cellules multipotentes originaires du feuillet mésodermique que l'on peut retrouver dans de nombreux endroits tels que la moelle osseuse, le tissu adipeux, mais également dans les muscles¹⁴⁷.

Ces cellules souches multipotentes sont présentes dans différents tissus de l'organisme et peuvent être plus ou moins facilement isolées à partir de ces tissus par ponction. À noter qu'il existe deux types de tissus en fonction de la présence de ces cellules souches. Il s'agit des tissus renouvelés en permanence par des cellules souches « actives » (exemple du tissu sanguin ou intestinal) et ceux contenant des cellules souches de « réserve », qui se différencient en cellules spécialisées sous l'influence de certains signaux. Ces cellules constituent une sorte de « réservoir » de cellules réparatrices prêtes à se différencier et qui pourraient présenter un intérêt dans le développement de stratégies innovantes, non plus basées sur l'implantation de cellules souches exogènes mais sur l'utilisation de ces cellules souches présentes naturellement au sein des tissus comme cellules réparatrices potentielles (stratégie de réparation endogène).

Ces cellules souches mésenchymateuses ont donc le pouvoir de se différencier en un autre type cellulaire que celui prédit par son lieu d'origine. Une CSM provenant de la moelle osseuse peut alors se différencier en une cellule du tissu adipeux, et ce, sous l'influence de certains facteurs de croissance. De plus, ces cellules possèdent également une aptitude paracrine, lui permettant de secréter un large panel de molécules influençant le milieu, tant sur l'immunogénicité que sur l'angiogenèse¹⁴³.

Au-delà de leurs capacités de différenciation qui ont conduit à leur utilisation afin d'obtenir différents types cellulaires, ces CSMs possèdent également des propriétés immunomodulatrices¹⁴⁸. À l'état basal, les CSMs expriment très peu les molécules *Human Leukocyte Antigen* (HLA) de classe I, et n'expriment pas les molécules HLA de classe II. Elles n'expriment pas non plus les antigènes de surface de costimulation CD80, CD86 et CD40.

Cela signifie donc que les CSMs peuvent être des cellules de choix vis à vis de la greffe allogénique puisqu'elles diminuent le risque de réaction immunogène.

De plus, elles induisent une inhibition de la prolifération des Lymphocytes T (LT) qui dépendrait de contacts cellulaires engendrant la production de cytokines inflammatoires comme L'IFN-gamma ou l'IL-1Beta¹⁴⁹. Ce phénomène ajouté à différents facteurs solubles synthétisés par chacune des populations cellulaires semble être la cause de cette inhibition. Les CSMs sont également capables de moduler la réponse immunitaire en induisant une population de cellules T régulatrices¹⁵⁰. Cette immunomodulation est dépendante de la présence de sécrétions de multiples molécules telles que les prostaglandines (notamment PGE2) ou d'enzymes telle que l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO) qui inhibe la prolifération des lymphocytes T par dégradation du tryptophane en métabolites toxiques¹⁵¹.

Ce potentiel immunomodulateur des cellules souches mésenchymateuses permet de diminuer le risque immunogène d'une greffe, ce qui pourrait ainsi permettre de s'affranchir du caractère de comptabilité donneur-receveur dans une thérapie cellulaire allogénique.

Les CSMs sont connues pour être retrouvées dans la moelle osseuse, mais il existe un autre tissu riche en cellules souches multipotentes : le tissu adipeux. En effet, le tissu adipeux possède une densité en cellules souches estimée à 40 fois plus importante que celle du tissu de la moelle osseuse^{152,153}. Cela en fait un tissu très riche de cellules souches multipotentes, appelées Adipose Stem Cells (ACS)^{143,154}. Cette découverte de l'équipe de Zuk est datée de 2001¹⁵⁵. De plus, ces cellules possèdent les mêmes capacités immunomodulatrices et se différencient en différents types cellulaires au même titre que les CSMs provenant de la moelle osseuse (BM-MSC pour Bone Marrow-Mesenchymal Stem Cell)¹⁵⁶. La densité cellulaire importante de ce tissu, ajoutée à la facilité de prélèvement (liposuccion) en font une source de choix pour le développement d'une thérapie cellulaire.

2.3 <u>Candidats cellulaires pour une thérapie cellulaire de la dystrophie musculaire de</u> <u>Duchenne</u>

Cellules satellites

Dans un premier temps, les chercheurs se sont naturellement tournés vers les cellules souches myogéniques : les cellules satellites. Ce sont des cellules souches capables de proliférer et de se différencier afin de fusionner entre elles pour aboutir à la formation de fibres musculaires matures¹⁵⁷. Les cellules satellites se situent entre la membrane et la lame basale de la fibre musculaire, et sont des cellules mononuclées, d'apparence fusiforme avec un rapport nucléocytoplasmique élevé¹⁵⁸. Elles présentent différents marqueurs tels que CD56, la M-cadhérine ou la desmine¹⁵⁹. Elles expriment également des marqueurs myogéniques comme les facteurs de transcription de la famille Pax qui régulent le développement et la différenciation pendant l'embryogenèse et notamment Pax7 qui intervient dans le maintien des cellules satellites dans le tissu musculaire. Les cellules satellites sont aussi identifiables car elles expriment des facteurs de régulation myogénique (MRF) comme myf5 et MyoD^{160,161}. Ce type cellulaire peut se différencier et provoquer une croissance musculaire par ajout de nouveaux noyaux ce qui augmentera la taille de la fibre musculaire¹⁶². De plus, ces cellules vont attirer les monocytes au site de régénération, et, par contact direct et par sécrétion de facteurs solubles, les macrophages vont participer à la régénération musculaire et protéger les cellules satellites de l'apoptose¹⁶³.

Les cellules satellites seraient alors un candidat optimal pour une thérapie cellulaire de la myopathie de Duchenne, par leur capacité de régénération musculaire. Néanmoins, le faible nombre de cellules satellites disponibles limite la faisabilité d'un développement thérapeutique.

Myoblastes

Les myoblastes sont les descendants de la cellule satellite. Ce sont des cellules précurseurs du muscle strié squelettique, qui prolifèrent en fonction des facteurs externes. Elles expriment de la même manière des facteurs de transcription comme Pax7, myf5 ou MyoD. Ces précurseurs myogéniques ont montré une preuve de concept en thérapie cellulaire chez des souris atteintes de dystrophie. En effet, après administration, il a été observé une restauration de l'expression de la dystrophine^{164,165}. Par la suite, plusieurs essais cliniques ont été réalisés concernant une greffe de myoblastes humains, mais l'efficacité du traitement s'est avérée être limitée. En cause, une mortalité très importante des cellules greffées, autour de 90%, et ce, dans les 24 heures suivant l'injection^{166–169}. Plus récemment, il a été montré qu'une amplification *in vitro* des

myoblastes humains réduisait leur potentiel myogénique et réduisait également leur migration^{170,171}.

Il y a actuellement un essai clinique en cours au Canada, en phase I/II de transplantation de myoblastes humains chez 10 enfants atteints de DMD de plus de 16 ans¹⁵.

Cellules myéloïdes suppressives

Un groupe cellulaire envisagé pour une thérapie cellulaire de la DMD est également celui des cellules myéloïdes suppressives (MDSC). Ces cellules font partie d'un groupe de cellules immunitaires composées notamment de monocytes, macrophages ou de cellules dendritiques. Cette population est assez hétérogène et possède un fort potentiel inhibiteur du système immunitaire. Les MDSC humaines sont caractérisables car elles expriment les marqueurs CD105 et CD133¹⁷². Elles peuvent être isolées par un protocole de pré-plating basé sur leur temps d'adhérence¹⁷³. Leur expansion *in vitro* a pu être validée et une démonstration de régénération musculaire a pu être réalisée en pré-clinique sur un modèle de souris SCID mdx^{174} .

Mésoangioblastes et péricytes

Les mésoangioblastes et péricytes sont également à l'étude en thérapie cellulaire de la DMD. Ce sont des progéniteurs mésodermiques exprimant certains marqueurs tels que l' α -SMA, ALP, Flk, CD56⁻¹⁷⁵. Ils possèdent la capacité de se différencier *in vitro* en myocytes, en cellules musculaires lisses, en cardiomyocytes mais également en ostéocytes et adipocytes. Ces cellules ont montré une preuve de concept en pré-clinique dans un modèle de souris SCID *mdx*¹⁷⁶. Une thérapie cellulaire a été alors testée en essai clinique de phase I/IIa sur 5 patients avec des injections intra-artérielles de mésoangioblastes/péricytes HLA-compatibles. Ces injections ont été réalisées à des doses croissantes à intervalle de deux mois. Malheureusement les résultats n'ont montré qu'une faible quantité d'ADN retrouvé des cellules greffées ainsi qu'une absence d'expression de dystrophine. Du point de vue du phénotype, aucune amélioration fonctionnelle n'a été montrée¹⁷⁷.

Cellules myo-endothéliales

Les cellules myo-endothéliales peuvent également être envisagées comme produit de thérapie cellulaire dans la DMD. Ce sont des cellules présentes dans l'espace interstitiel du muscle squelettique. Elles diffèrent des cellules satellites par l'expression de transcrits comme ABCG2/BRCP1 et peuvent se différencier en cellules myogéniques, en adipocytes et en cellules endothéliales¹⁷⁸. Dans un modèle de souris présentant des lésions musculaires, l'injection de

ces cellules en intramusculaire a pu entraîner une augmentation de la masse et de la fonction musculaire¹⁷⁹.

Cellules AC133⁺

Les cellules AC133⁺ sont des cellules souches multipotentes exprimant le marqueur CD133 et isolées à partir du sang périphérique ou du muscle humain. En tant que produit de thérapie cellulaire, ces cellules ont été injectées à des souris *mdx*. La preuve de concept a été validée puisque ces souris ont montré une régénération du muscle, une production de dystrophine ainsi qu'une augmentation de la force musculaire. Ces cellules ont pu être retrouvées au niveau des niches de cellules satellites¹⁸⁰. Un essai clinique de phase I a pu être réalisé chez des patients atteints de DMD avec une injection locale de ce produit de thérapie cellulaire. Néanmoins, une mort cellulaire excessive à 24 heures des cellules injectées a été observée, ainsi qu'une absence totale de bénéfice fonctionnel¹⁸¹.

Cellules PICs

Les cellules PICs pour cellules interstitielles PW1⁺/Pax7⁻ sont des progéniteurs musculaires localisés dans l'interstitium, et ont été identifiées assez récemment¹⁸². L'expression du marqueur PW1 est une caractéristique qui les différencie des autres cellules souches musculaires. Il a été montré qu'une injection intramusculaire sur un modèle pré-clinique de souris peut contribuer à une régénération musculaire¹⁸².

Cellules dérivées de la cardiosphère

Les cellules dérivées de la cardiosphère (CDCs) sont des progéniteurs cardiaques. Ces cellules ont été envisagées pour traiter des patients dystrophiques ayant une atteinte cardiaque. Un essai clinique de phase II « HOPE-2 » a été réalisé sur 25 garçons âgés de plus de 12 ans possédant une cardiomyopathie avec une fibrose avancée¹⁸³. Le médicament de thérapie cellulaire CAP-1002 a été bien toléré en ce qui concerne l'injection. Douze mois après le traitement, les analyses d'imagerie (IRM) du cœur a pu montrer une amélioration morphologique et fonctionnelle mais également une amélioration fonctionnelle au niveau des membres supérieurs¹⁸³. Ce médicament de thérapie cellulaire est maintenant en essai clinique de phase I/II¹⁵.

Cellules souches hématopoïétiques

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont des cellules originaires des lignées cellulaires sanguines¹⁸⁴. Elles peuvent être isolées à partir d'une ponction de moelle osseuse et par leurs marqueurs spécifiques CD34 et CD45¹⁸⁵. Ces cellules se différencient en cellules appartenant aux lignées lymphoïdes et myéloïdes. Néanmoins, il a été montré qu'elles avaient la capacité de se différencier en d'autres types cellulaires tels que des types appartenant au muscle strié squelettique, au myocarde, au système nerveux ou encore au foie¹⁸⁶. Au niveau du muscle strié squelettique, il a même été montré que ces cellules pouvaient migrer vers un site lésé et, à travers une différenciation en cellules musculaires, pouvaient augmenter la régénération¹⁸⁷. Néanmoins, lors d'une administration chez la souris *mdx* et chez le chien GRMD, il n'a été observé aucune amélioration du phénotype^{188,189}.

Cellules souches mésenchymateuses

Les CSMs étant le type cellulaire le plus fréquemment étudié dans le développement de thérapie cellulaire, il est également envisagé dans le traitement de la DMD. Ces CSMs ne possèdent pas de marqueurs spécifiques mais il est admis qu'elles présentent les caractéristiques phénotypiques suivantes : capacité d'adhérence au plastique, prolifération et capacité d'autorenouvellement, expression de marqueurs membranaires caractéristiques CD105, CD73, CD90, CD44, CD29¹⁹⁰. Néanmoins, elles n'expriment pas les antigènes de surface des cellules souches hématopoïétiques (CD34, CD45, CD14). Leur potentiel immunomodulateur est un très fort atout dans la mise en place d'une thérapie cellulaire. C'est un candidat de taille dans le développement d'une thérapie cellulaire dans la DMD, néanmoins les résultats jusqu'ici sont toujours mitigés, d'autant plus que différents résultats peuvent être observés en fonction de l'origine des cellules souches mésenchymateuses. En effet, si l'on prend des CSM originaires du tissu adipeux, des chercheurs ont pu montrer qu'après une injection en intramusculaire chez des souris mdx, il était retrouvé une expression de dystrophine dans 50% des fibres musculaires à 10 jours, et que les cellules greffées étaient toujours présentes au bout de 80 jours postinjection¹⁹¹. Il a également été montré qu'en injection systémique chez le chien GRMD, les CSMs du tissu adipeux ont un tropisme musculaire, avec une expression de la dystrophine faible pendant plusieurs mois¹⁹². Néanmoins, une absence de bénéfice clinique a pu être démontrée. D'un autre côté, les résultats sont mitigés en ce qui concerne les CSMs provenant de la moelle osseuse. Ces cellules ne se différencient en cellules musculaires in vitro que lorsqu'elles sont mises en contact avec des myoblastes ou bien transduites avec des facteurs de transcription tels que Pax3 ou $MyoD^{193}$.

Cellules souches pluripotentes induites

Les cellules souches pluripotentes induites (iPSC) sont également au centre du sujet de la recherche développant des thérapies cellulaires puisqu'elles possèdent une capacité à se différencier en plusieurs types cellulaires¹⁴⁵. Elles possèdent la même pluripotence que les cellules souches embryonnaires, et apportent donc une alternative notamment vis à vis du problème éthique de ponctions cellulaires sur des embryons. Néanmoins, dans un contexte de DMD, il est nécessaire d'induire au préalable leur différenciation en lignée myogénique. Ces cellules peuvent également engendrer la formation de tumeurs, ce qui est un risque important et donc limite aujourd'hui les recherches dans ce domaine.

Le développement d'une thérapie cellulaire implique aujourd'hui plusieurs problématiques. En premier lieu, le choix du type cellulaire est un élément essentiel et dépendant de chaque pathologie visée. À savoir également si la thérapie sera autologue ou allogénique, ce qui n'engendre pas les mêmes schémas thérapeutiques, et surtout une question d'immuno-compatibilité à maîtriser. À ceci, s'ajoute également tout un protocole à mettre en place afin de valider les doses de cellules à injecter mais aussi d'établir la voie d'administration. De plus, à présent il est de moins en moins parlé de cellules injectées seules mais plutôt de produit de thérapie cellulaire qui englobe les cellules, leur milieu et tout le conditionnement pré-injection comme une différenciation en lignée myogénique par exemple. Ce sont tous ces facteurs qui pourront engendrer une efficacité thérapeutique.

Depuis quelques années, de nombreuses questions ont émergé concernant la thérapie cellulaire. En effet, des études ont pu montrer que les cellules greffées mourraient après la transplantation mais qu'un effet thérapeutique était tout de même observé¹⁹⁴. Des solutions sont à l'étude pour remédier à cette mort cellulaire précoce, notamment à travers l'encapsulation des cellules ou bien *via* l'intégration des cellules dans une matrice sous forme de gel. Le pré-conditionnement des cellules est également très important. Elles peuvent être prétraitées de manière chimique ou même physique avec du chaud ou du froid.

Néanmoins, la mort cellulaire avec une persistance de l'effet thérapeutique soulève une question de taille concernant le mécanisme d'action réel de ces thérapeutiques. Les bénéfices observés seraient-ils liés uniquement au peu de cellules greffées qui se sont implantées ou bien dû aux sécrétions paracrines des cellules avant leur mort ? Pour répondre à cette problématique, des chercheurs ont testé l'injection du milieu conditionné des cellules et ont pu montrer un

bénéfice thérapeutique similaire à l'injection des cellules^{195,196}. Cela signifie que les messages envoyés par les cellules sont capables de modifier l'environnement. Ces messages sont des facteurs paracrines qui peuvent être des facteurs solubles tels que des protéines, mais aussi des vésicules extracellulaires (VEs) qui possèdent un rôle de « taxi » transportant différents messages comme des micro-ARN, des protéines ou même des lipides^{197–199}. Ces messages seront réceptionnés par les cellules de l'environnement et induiront un changement pouvant engendrer un bénéfice thérapeutique.

2.4 <u>Vésicules extracellulaires</u>

2.4.1 Définition

Les vésicules extracellulaires sont des vésicules de taille nanométrique transportant des informations qui servent à la communication intercellulaire. Elles sont sécrétées par tous les types cellulaires qu'ils soient procaryotes ou eucaryotes. Les VEs sont retrouvées dans tous les liquides biologiques : sang, urine, lait maternel, lymphe, salive, larmes, sécrétions nasales, liquide amniotique, liquide céphalo-rachidien, bile, liquide d'ascite et liquide séminal^{200,201}. En fonction de leur provenance, les VEs peuvent transporter des messages pouvant avoir un effet bénéfique ou bien un effet néfaste comme dans certaines pathologies tel que le cancer.

2.4.2 Différents types de vésicules extracellulaires

Dans l'appellation « vésicules extracellulaires », il est distingué plusieurs types de vésicules, mais elles sont toutes formées par une bicouche lipidique renfermant un milieu aqueux. Les différents types diffèrent par leur taille mais surtout par leur biogenèse : les corps apoptotiques, les microvésicules et les exosomes²⁰² (Figure 10).



Figure 10 : Représentation des différents types de vésicules extracellulaires en fonction de leur biogenèse²⁰³

Modifié d'après Devhare et al., 2017

Les corps apoptotiques

Ils possèdent une taille pouvant varier de 100 à 5000 nm. Ils sont le résultat de l'apoptose cellulaire qui est une mort cellulaire programmée. Cette mort cellulaire se déroule en plusieurs étapes avec dans un premier temps une condensation de la chromatine nucléaire. Par la suite, la membrane plasmique va bourgeonner et enfin la cellule se désintègrera en grosses vésicules appelées corps apoptotiques. L'apoptose a lieu suite à des voies de signalisation spécifiques, et les cellules en apoptose sont marquées par la présence de phosphatidylsérine sur la face externe de la membrane. De plus, la thrombospondine et les protéines du complément C3b sont oxydées ce qui permet une reconnaissance par les macrophages afin d'induire la phagocytose des corps apoptotiques²⁰⁴.

Les microvésicules

Les microvésicules ou microparticules (MP) sont des vésicules ayant une taille comprise entre 100 et 1000 nm. Dans un premier temps, il y a un bourgeonnement de la membrane plasmique, puis une fission et une libération de la vésicule dans le milieu extracellulaire²⁰⁵. De par la

formation de ces MP, leur contenu cytosolique est assez proche du cytosol de la cellule sécrétrice. Il est retrouvé deux marqueurs principaux dans les MP, notamment la phosphatidylsérine qui est nécessaire pour la formation des MP. Elle est transloquée à la membrane externe ce qui provoque un déséquilibre dans les lipides et induit une courbure de la membrane formant ainsi le bourgeonnement. Le second marqueur principal est la protéine ARF6 (ADP-ribosylation Factor 6). En effet, cette protéine active la phospholipase D qui va recruter des kinases ERK. Cela activera par la suite les kinases de la chaîne légère des myosines qui induiront une contraction du cytosquelette et enfin une libération des MP²⁰⁴.

Exosomes

Les exosomes forment la fraction la plus petite des vésicules extracellulaires. Ils possèdent une taille variant de 30 à 150 nm. Ils sont formés à partir du compartiment endosomal. En effet, une portion de la membrane cellulaire est internalisée et forme ensuite un endosome. Des vésicules se forment ensuite à l'intérieur de l'endosome et ce *via* une invagination de partie de la membrane endosomale. L'endosome contenant plusieurs vésicules est ensuite appelé corps multivésiculaires. La réorganisation de protéines comme les tétraspanines est un élément essentiel pour la formation des vésicules intra-luminales. De même, les protéines de la famille Rab sont des régulateurs de la formation d'exosomes²⁰⁴. Le corps vésiculaire pourra ensuite fusionner avec la membrane cellulaire et libérer les vésicules dans le milieu extracellulaire²⁰⁵. Il existent différents marqueurs pour caractériser mais également isoler la fraction exosomale des VEs, telles que les tétraspanines CD9, CD63 ou CD81, ou encore les protéines Alix et TGS101²⁰⁴.

Certains chercheurs font le choix de conserver l'appellation générique des vésicules extracellulaires et de ne pas parler sélectivement des exosomes ou des microparticules. C'est le choix qu'a fait la Société Internationale des Vésicules Extracellulaires, puisqu'ils classent les vésicules extracellulaires selon des critères différents tels que la taille, la morphologie, les marqueurs protéiques transmembranaires ou cytosolique mais également selon l'absence de résidus intracellulaires ou provenant de protéines extracellulaires²⁰⁶. La fonction qu'auront les vésicules rentrent également dans leurs critères de sélection²⁰⁷.

2.4.3 Composition des vésicules extracellulaires

L'identification du contenu vésiculaire est une étape clé dans la caractérisation d'un type de VEs. Les vésicules peuvent contenir des acides nucléiques tels que des ARN messagers (ARNm), des microARN ou des ARN non codants mais également des protéines et des lipides (Figure 11).

Les acides nucléiques contenus dans les VEs peuvent donc être des ARNm, des microARN mais aussi des ARN ribosomaux, des ARN de transfert, des ARN interférents, de l'ADN mitochondrial ou des ARN longs non codants. Récemment il a même été découvert de l'ADN double brin à l'intérieur de VEs^{208–211}. Ces acides nucléiques seront transférés dans des cellules cibles et pourront induire des effets spécifiques comme une régulation de gènes ou même une reprogrammation épigénétique de la cellule cible²¹². L'incorporation des microARN dans la cellule cible serait sous le contrôle de la ribonucléoprotéine nucléaire A2B1²¹³.

Les VEs transportant des acides nucléiques permettent notamment leur protection puisque lorsque ces acides nucléiques sont libérés « nus » dans le milieu extracellulaire, ils sont dégradés rapidement par des RNases. Ces acides nucléiques contenus dans les VEs forment une sorte de signature de la cellule sécrétrice, et ceux-ci peuvent être identifiés à l'aide d'analyse transcriptomique telle que de la RNAseq.

Au sein des VEs, il est également retrouvé des protéines spécifiques et conservées entre différentes espèces de VEs. Il a été montré que le contenu protéique est non aléatoire et qu'il peut être retrouvé des protéines communes à une majeure partie des VEs. Les protéines les plus communément retrouvées sont des protéines de structures telles que des tétraspanines, des intégrines, des protéines du choc thermique comme Hsp60, 70 ou 90. Il est également retrouvé des protéines ribosomales et des molécules du CMH²¹⁴. Certaines protéines comme les tétraspanines et les protéines endosomales sont plus souvent retrouvées dans la fraction exosomale. En revanche, les protéines ribosomales et protéines du protéasome sont, elles, retrouvées plus fréquemment dans les microvésicules^{215,216}. Ces protéines peuvent être mises en évidence par différentes techniques connues comme le western-blot ou la microscopie immuno-électronique. Plus récemment, le développement de techniques d'étude de protéomique a permis la recherche plus rapide et large des protéines contenues dans les vésicules.



*Figure 11 : Représentation schématique de la composition des vésicules extracellulaires*²¹⁷ *Extrait de Colombo et al., 2014.*

Les lipides font également partie intégrante de la composition des VEs et sont aussi répartis de manière non aléatoire et spécifique en fonction de chaque type sécrétoire. Les lipides communément retrouvés dans les VEs sont la sphingomyéline, la phosphatidylcholine, la phosphatidyléthanolamine, la phosphatidylsérine, le ganglioside GM3, le phosphatidylinositol, les prostaglandines D2, F2, J2 et R2, des céramides, du cholestérol, l'acide lysobiphosphatidique et certains acides gras saturés²¹⁶. Les lipides participent pour beaucoup au maintien de la stabilité et de la rigidité des VEs. De la même manière que pour le protéome des VEs, le taux de chaque lipides diffère en fonction de la fraction vésiculaire. Par exemple, il sera retrouvé de la phosphatidylsérine préférentiellement dans les microvésicules car le bourgeonnement de ces vésicules nécessite la translocation de la phosphatidylsérine sur la face externe. Certains lipides peuvent également être dits « bio-actifs », comme la sphingomyéline qui aurait un potentiel pro-angiogénique ou encore certaines prostaglandines associées à la

membrane de la vésicule qui pourront activer des voies de signalisation spécifiques^{218,219}. Le lipidome des VEs peut être étudié à travers des études spécifiques de lipidomique.

2.4.4 Isolation des vésicules extracellulaires

Différentes techniques sont aujourd'hui réalisables pour isoler les fractions vésiculaires de liquide biologique ou de milieu de culture. La plus communément utilisée dans la recherche est basée sur des techniques d'ultracentrifugations successives. Elle permet une sélection de la fraction par la masse des vésicules. Un protocole reconnu et très utilisé aujourd'hui dans de nombreuses études a été mis en place par l'équipe de Clotilde Théry et consiste en une centrifugation de 10 minutes à 300g permettant d'éliminer les cellules, une centrifugation de 20 minutes à 2000g permettant d'éliminer les débris cellulaires, une centrifugation de 40 minutes à 10000g permettant d'éliminer les plus grosses vésicules²²⁰. Cette dernière ultracentrifugation peut être répétée une seconde fois afin d'obtenir une fraction vésiculaire plus pure. Néanmoins, il a été reconnu que la séparation des fractions vésiculaires par ce biais induisait également la formation d'agrégats des particules qui deviennent alors très difficiles à resuspendre²²¹.

D'autres techniques également très utilisées sont basées sur le principe de la chromatographie. Il est possible de séparer différentes fractions selon leur taille en chromatographie d'exclusion stérique ou bien selon leurs marqueurs cellulaires en chromatographie d'affinité. Pour cette dernière, il est récupéré une fraction plus pure que lors d'ultracentrifugation par exemple. Une autre technique possible est la séparation des vésicules en centrifugation à gradient de sucrose qui permet une sélection des particules selon leur poids moléculaire et leur forme²⁰⁷. Néanmoins, l'isolation d'une fraction vésiculaire pour une application clinique n'est validée d'un point de vue réglementaire que lorsqu'elle est réalisée par diafiltration suivie d'une filtration tangentielle. La diafiltration permettra de remplacer le milieu dans lequel sont les vésicules par un milieu spécifique et validé, puis la filtration tangentielle permettra de récupérer une fraction vésiculaire selon la taille des particules¹⁹⁴.

2.4.5 Devenir des vésicules extracellulaires

Il est admis aujourd'hui que les VEs possèdent un rôle très important dans la signalisation paracrine par reconnaissance des cellules cibles. L'interaction peut se faire avec des cellules cibles proches en terme de localisation ou bien plus éloignées si les vésicules se retrouvent dans la circulation sanguine. Lorsque la vésicule extracellulaire rencontre sa cellule cible, différents mécanismes d'interaction peuvent avoir lieux : interaction directe, endocytose ou bien fusion des membranes (Figure 12).

L'interaction directe est, comme son nom le laisse supposer, une reconnaissance directe de marqueurs cellulaires présents sur la vésicule par la cellule cible. Cette reconnaissance peut engendrer directement l'activation de cascades de signalisation. Par exemple, il a été montré que la présence de marqueurs vésiculaires comme l'ICAM1 ou des intégrines sur la membrane vésiculaire amenait ce type d'interaction directe²²².

L'endocytose est un procédé plus complexe, avec toujours cette notion de reconnaissance des marqueurs vésiculaires. La reconnaissance va induire l'internalisation de la vésicule par endocytose ou phagocytose. La vésicule sera ensuite, soit transportée vers une autre cellule par transcytose, ou bien dégradée *via* des lysosomes, ce qui rendra le contenu vésiculaire accessible pour la cellule cible. La phagocytose est plus souvent observée par les cellules immunitaires telles que les cellules dendritiques, les macrophages ou les cellules T²²³.

Le dernier mécanisme d'interaction vésicules-cellule cible est la fusion des membranes. Par reconnaissance, les membranes vésiculaires et cellulaires vont fusionner et il y aura alors une libération du contenu vésiculaire dans le cytosol. Pour ce mécanisme, il est important que le milieu vésiculaire et cellulaire soit compatible²⁰⁴. De plus, le pH de la vésicule sera un paramètre important puisqu'un pH neutre rend les membranes plus rigides et donc limite la possibilité de fusion alors qu'un pH légèrement acide permet un assouplissement de celle-ci.



*Figure 12 : Représentation de l'interaction des vésicules extracellulaires et de leur cellule cible*²⁰⁴

Modifié d'après Kervadec, 2017

Afin de visualiser l'internalisation des VEs dans les cellules cibles, il est possible de les marquer avec un colorant comme le PKH26 ou le DiD qui vont marquer les bicouches lipidiques ou encore le CFSE (carboxyfluorescéine diacétate succinimidyl ester) qui marque le cytosol²²⁴. Un suivi des VEs peut être réalisé, permettant une observation de la livraison du contenu vésiculaire dans la cellule cible.

2.4.6 Fonction des vésicules extracellulaires

Les VEs ont donc un rôle prépondérant dans la communication intercellulaire. Pour exemple, des fibroblastes ont été mis en incubation avec des VEs de cellules cardiaques, et il a été démontré que ces fibroblastes exprimaient moins les marqueurs de fibroblastes que des marqueurs angiogéniques²²⁵. Ces VEs ont donc pu modifier le phénotype d'un autre type cellulaire par transfert horizontal d'informations.

Les VEs peuvent avoir un rôle dans des conditions physiologiques mais également pathologiques. Par exemple, il a été montré que des lymphocytes T activés pouvaient, par le biais de VEs de cellules dendritiques (CD) contenant des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II, être régulés négativement pour l'interaction LT-CD²²⁶. Il a également été montré que des microvésicules de cellules progénitrices endothéliales pouvaient activer l'angiogenèse par transfert d'ARNm dans d'autres cellules²²⁷.

D'un autre côté, leur fonction dans des situations pathologiques a également été montrée, par exemple lors de la mise en contact de VEs dérivant de cellules tumorales avec des cellules souches mésenchymateuses. En effet, ces CSMs présentes dans le stroma du tissu tumoral ont ensuite évoluées en myofibroblastes associés au cancer²²⁸.

De nombreuses études ont su montrer le rôle des VEs dans des conditions physiologiques ou pathologiques. Néanmoins, très peu d'études ont pu identifier quelles molécules contenues dans les VEs étaient responsables des effets observés.

La fonction des VEs est avant tout dépendante du contenu vésiculaire mais surtout du type cellulaire sécréteur. En effet, les VEs seront totalement différentes lorsque l'on change le type cellulaire qui va envoyer à travers ses VEs des messages bien spécifiques. À titre d'exemple, dans les exosomes de CSMs, il a pu être identifié pas moins de 4400 protéines et plus de 150 microARN^{229,230}. Cela signifie aussi que la recherche du contenu vésiculaire par des techniques de transcriptomique, protéomique ou lipidomique doit être ciblée car la densité des données obtenues peut être trop lourde vis-à-vis de l'information recherchée.

2.4.7 Les vésicules extracellulaires comme futurs médicaments

En fonction du rôle physiologique ou pathologique des VEs, différentes stratégies pourront être proposées. Notamment dans les cancers, où de nombreux chercheurs travaillent à inhiber la formation des VEs pouvant agir comme un promoteur du cancer ou encore dans des maladies neurodégénératives. Un volet de la recherche se concentre également aujourd'hui sur l'identification rapide de VEs qui pourraient servir comme un outil de diagnostic de certaines pathologies.

Pour les VEs possédant un rôle de « taxi », il est envisagé de s'en servir comme transporteurs pour certaines applications. En effet, les cellules sécrétrices peuvent être modifiées par transfection d'ADN plasmidique ou d'ARN afin de transporter des VEs vers des cellules cibles^{231–233}. Une incubation avec un médicament peut également engendrer l'empaquetage de celui-ci dans les VEs²²⁴. Dans un contexte d'ingénierie des VEs, des chercheurs ont également pu développer des VEs qui expriment une protéine qui cible spécifiquement des cellules

cancéreuses du sein exprimant l'EGFR (récepteur du facteur de croissance épidermique) afin de délivrer certains microARN²³⁴.

Dans le contexte de la thérapie cellulaire, des études récentes démontrent que les VEs sécrétées par les cellules transplantées seraient responsables de l'effet global de la thérapie cellulaire²³⁵. En effet, il a été montré que les VEs peuvent stimuler l'angiogenèse ainsi qu'augmenter la fonction contractile cardiaque, ce qui est alors très intéressant pour le traitement de l'infarctus^{236,237}.

Il est important de noter que la nature des cellules sécrétrices est très important puisqu'il a été montré que des VEs de fibroblastes n'apportaient aucun bénéfice dans un cœur infarcis²³⁸. De ce fait, la plupart des VEs utilisées aujourd'hui sont celles sécrétées par le type cellulaire envisagé en thérapie cellulaire.

Les vésicules extracellulaires présentent un avantage certain comparé aux cellules greffées en thérapie cellulaire classique : leur potentiel immunogène est très faible voire nul²³⁹. De plus, les VEs permettent une protection des informations et un maintien de leur stabilité dans un liquide biologique, où ces informations auraient été dégradées rapidement²⁴⁰. Elles permettent également le transport et l'internalisation de grosses protéines.

Aujourd'hui, les thérapies à bases de vésicules extracellulaires sont envisagées dans une optique de soutien aux thérapies cellulaires développées mais également en thérapie seule appelée « thérapie a-cellulaire ». L'utilisation de VEs seules en médecine régénérative par exemple permettrait dans un premier temps de s'affranchir des difficultés rencontrés en thérapie cellulaire telles que l'immunogénicité due à la greffe allogénique²³⁹. L'industrialisation à grande échelle est également plus facilement envisageable avec une standardisation de la production et de la purification des VEs. De plus, il a été montré que les VEs peuvent être conservées à -80°C dans des banques sans cryopréservant sans altérer le contenu des vésicules et donc la qualité du produit thérapeutique²²⁹. Pour l'instant, la réglementation concernant les VEs les qualifie non pas de médicament de thérapie innovante mais de médicament biologique. Cela peut être amené à évoluer puisque les vésicules contiennent des acides nucléiques, ce qui pourrait justifier une requalification des VEs parmi les MTI de thérapie génique.

De nombreuses études ont fait état de l'impact significatif positif des VEs de CSMs dans des problématiques comme l'ischémie d'un membre, l'ischémie cérébrale, l'insuffisance rénale, la cicatrisation cutanée, la régénération osseuse, l'insuffisance hépatique aigue ou même le diabète de type I^{199,212,241–244}. Néanmoins, ces études sont pour l'instant majoritairement concentrées sur les VEs des CSMs²⁴⁵, et uniquement sur des rongeurs. Par ailleurs, il est

important de souligner que le type cellulaire seul ne suffit pas à qualifier les vésicules sécrétées. Puisqu'il a été montré que des CSMs provenant de tissu adipeux pouvaient contenir une enzyme, la néprilysine, qui a le pouvoir de dégrader le peptide β-amyloïde s'accumulant dans la maladie d'Alzheimer²⁴⁶. Cette même enzyme n'a pas été retrouvée dans les CSMs provenant de la moelle osseuse. Ceci confirme donc que le type cellulaire et son origine entrent en compte vis-à-vis de la composition des messages transportés par les VEs.

Lors de culture *in vitro* de cellules dans un but de récolter les vésicules extracellulaires, le milieu joue un rôle très important. Celui-ci, à travers différentes cytokines, transmettra des messages aux cellules qui sécréteront des VEs en conséquence, et qui peuvent être différentes de celles sécrétées dans un contexte *in vivo*²⁴⁷. De la même manière, les conditions de culture jouent un rôle très important dans la nature des VEs sécrétées, puisqu'il a été montré que la température, un stress génotoxique, un stress oxydatif ou hypoxique pouvaient induire un changement du contenu vésiculaire et donc un changement de fonction des VEs²⁴⁸. En effet, un stress oxydatif aurait pour effet d'augmenter la tolérance au stress oxydatif par les VEs, alors qu'un stress hypoxique aurait plutôt pour effet de modifier les VEs afin qu'elles puissent promouvoir l'angiogenèse, la prolifération et un remodelage de la matrice extracellulaire²⁴⁸.

Le développement de nouvelles thérapeutiques basées sur les VEs est un challenge de taille avec différentes problématiques qui se posent. Le choix du type cellulaire sécréteur est très important, mais également toutes les conditions connexes telles que la densité d'ensemencement, le milieu utilisé ou même les conditions de culture²⁴⁹. Il est important d'étudier également quelle serait la fraction vésiculaire la plus efficace entre les microvésicules, les exosomes, ou bien les deux réunies²²⁰. De la même manière que pour une thérapie cellulaire, la dose à injecter doit être validée. Mais dans la situation des VEs, encore peu d'études sont parues sur le sujet, avec pour l'instant, un manque de standardisation. En effet, il existe de nombreux critères sur lesquels il est possible de s'appuyer pour quantifier les VEs : nombre de vésicules (quantifiées par des techniques TRPS ou de Zetasizer), concentration protéique ou plus simplement équivalence de sécrétion pour une cellule²⁵⁰. Le mode d'administration est aussi une question à se poser puisqu'elle pourra être locale dans certaines pathologies comme l'infarctus, mais si les VEs viennent à être administrées dans un contexte de dystrophie musculaire de Duchenne, il faudra songer à une administration systémique.

Comme lors du développement d'une thérapeutique classique la biodistribution sera alors étudiée, sachant que le temps d'élimination des VEs dans le sang est estimé entre 1 et 6 heures²⁵¹. Enfin, la découverte des VEs dans un contexte thérapeutique étant récente, la standardisation concernant le contrôle qualité du produit n'est pas encore au point. Comme pour une thérapie cellulaire, il est demandé une caractérisation physique et moléculaire du contenu vésiculaire ainsi que des vésicules elles-mêmes, afin de permettre une libération de lots uniformes²⁴⁹. Et dans une optique de production à plus grande échelle, il est également demandé d'établir au plus tôt des protocoles de recherches et de production répondant aux normes de Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) (Figure 13).



*Figure 13 : Résumé du développement de vésicules extracellulaires en tant que futurs médicaments*²²⁴

Étape 1 : Déterminer la cellule cible ; étape 2 : Identifier le type de VE pour la cellule cible ; étape 3 : Modifier la surface des VEs pour améliorer la reconnaissance et l'internalisation ; étape 4 : Développement et optimisation de la méthode d'obtention des VEs ; étape 5 : Fabrication des VEs en contexte industriel en qualité « Bonnes pratiques de Fabrication » ; étape 6 : Modification post-fabrication des VEs. Extrait de Kao et al., 2019

Partie expérimentale

1 Laboratoire d'accueil

L'UMR 703 « Physiopathologie Animale et bioThérapie du muscle et du système nerveux » (PAnTher) est un laboratoire INRA/Oniris situé à Nantes et dirigé par le Professeur Marie-Anne Colle. L'UMR est structurée autour de deux thématiques dédiées à une approche de thérapie cellulaire d'affections musculaires (dystrophies, infarctus du myocarde) et une stratégie de thérapie génique des maladies neurodégénératives d'origine génétique (maladie de Pompe et amyotrophie spinale). Elles sont respectivement dirigées par le Dr. Karl Rouger et le Pr. Marie-Anne Colle. L'UMR se compose de 4 chercheurs et enseignants-chercheurs, 2 post-doctorants, 3 doctorants, 3 ingénieurs ainsi que de 6 techniciens de recherche. L'UMR dispose d'une plateforme technologique APEX proposant une expertise et des formations en anatomopathologie et microscopie de haute technologie (microscopie confocale spectrale, TIRF, PALM/STORM et microscopie biphotonique).

2 Thérapie cellulaire hMuStem et vésicules extracellulaires

L'UMR 703 INRA/Oniris développe depuis 2005 un programme de recherche d'identification d'un candidat cellulaire pour une thérapie cellulaire de la DMD. Le laboratoire a pu isoler une population de cellules souches dérivées du muscle, les cellules MuStem. Dans un premier temps, cette population a été identifiée dans un modèle aviaire, puis chez le chien²⁵². Plus récemment, elle a pu également être isolée chez l'Humain, et constitue aujourd'hui la population hMuStem²⁵³.

Cette population de cellules souches adultes est isolée *via* une technique de preplating et est caractérisée par une capacité de prolifération importante *in vitro* ainsi qu'une oligopotence puisque ces cellules peuvent se différencier en myocytes, en ostéocytes mais aussi en adipocytes. L'administration systémique des cellules MuStem canines (cMuStem) dans le modèle cliniquement pertinent : la DMD développée par le chien GRMD, a permis d'établir une preuve de concept de leur intérêt thérapeutique. Cette étude a montré une stabilisation de l'état général du chien dystrophique ainsi qu'un profond remodelage du tissu musculaire^{252,254–256}.

La fraction de cellules équivalentes aux cellules cMuStem a donc pu être isolée chez l'Homme et caractérisée²⁵³. Ces cellules hMuStem présentent des caractéristiques phénotypiques et comportementales similaires aux cellules cMuStem. Les données expérimentales d'ores et déjà

collectées laissent entrevoir une faisabilité réelle de confection d'un MTI en médecine régénératrice répondant aux normes BPF. Un comportement immunomodulateur des cellules a été décrit et la faisabilité d'une thérapie cellulaire allogénique chez l'Homme est actuellement à l'étude.

Malgré les propriétés immunomodulatrices évidentes des cellules hMuStem, le concept de thérapie cellulaire allogénique possède toujours un point limitant qui concerne le risque de réaction immunitaire²⁵⁷. Dans le but de limiter cette réaction, il est aujourd'hui nécessaire de placer le patient sous immunosuppresseurs, un traitement pouvant engendrer de nombreux effets indésirables. Récemment, de nombreux travaux ont pu démontrer que le potentiel de régénération suite aux injections de cellules serait également étroitement lié à leur sécrétome^{258,259}. Ces études ont mis en évidence l'efficacité de l'utilisation des VEs, comme alternative ou complément à la thérapie cellulaire²⁶⁰. Les VEs, constituant du sécrétome, ont un rôle bénéfique et permettraient une régénération des tissus sans présenter les inconvénients immunogènes des cellules^{261–263}.

Au sein de l'UMR 703, les travaux sur les vésicules extracellulaires sécrétées par les cellules hMuStem ont débuté en 2016. Un protocole de production, purification et caractérisation des VEs a pu être mis en place selon la littérature dans un premier travail effectué durant la thèse d'Alice Rannou présenté ici dans la figure $14^{220,264}$. La présence de marqueurs caractéristiques des microvésicules et des exosomes comme la fibronectine, CD9, CD63 et CD81 et l'absence de marqueurs indiquant une contamination cellulaire de nos VEs avec des marqueurs tels que la calnexine et la β -actine ont été mis en évidence par western-blot (Figure 14A). Une analyse en cryo-TEM a permis de visualiser en 3D les vésicules et de déterminer une taille moyenne des vésicules de 80 nm (n=30) en figure 14B.



Figure 14 : Caractérisation des VEs sécrétées par les cellules hMuStem

A : Western blot des marqueurs Fibronectine, CD9, CD63, CD81, Calnexine et β-actine.(MW : poids moléculaire ; EV : extracellular vesicles (vésicules extracellulaires) ; CC : Culot cellulaire ; SEV- : Surnageant appauvri en VEs. **B** : Microscopie en Cryo-TEM des VEs. Échelle : 100 nm

3 Objectif du projet de recherche

Les études sur les VEs ont permis de mettre en évidence leur rôle de messagers dans la communication cellulaire^{265–267}. Dans une démarche de thérapie cellulaire, le rôle paracrine des cellules greffées participe à la régénération et les effets fonctionnels persistent dans un tissu hôte où les cellules peuvent mourir prématurément. Ces travaux laissent envisager un rôle prometteur des VEs qui pourraient potentialiser l'effet de nos cellules lors d'injections systémiques ou locales dans un contexte de médecine régénératrice pour des pathologies d'affections musculaires telle que la DMD. L'objectif de ce projet a été dans un premier temps d'approfondir la caractérisation des VEs sécrétées par les cellules hMuStem (VE^{hMuStem}) à travers la microscopie confocale à fluorescence et super résolution à l'aide d'un nouveau colorant marquant les bicouches lipidiques et couplé à un fluorophore : le MemBright^{®268}. Dans un second temps, ce projet a concerné l'étude de l'activité biologique de ces VE^{hMuStem} dans un

contexte *in vitro*. Ainsi, j'ai pu aborder l'impact des VE^{hMuStem} sur la prolifération cellulaire ainsi que sur la différentiation de cellules myogéniques.

4 Matériels et méthodes

4.1 Culture des cellules MuStem humaines

Les cellules hMuStem sont isolées à partir d'un protocole de preplating de cellules issues de déchets opératoires musculaires humains de jeunes patients du C.H.U. de Nantes (Figure 15). Pour toutes les études menées au cours de ce stage, les cellules hMuStem sont issues d'un même patient (un seul lot) au passage 3 (P3) stockées à -150°C. Elles sont décongelées au bain-marie, rincées avec du PBS (CS1PBS01_01, Eurobio) avec 2% de sérum humain (SH) (EFS) et ensuite récupérées par centrifugation pendant 10 minutes à 400 g (Heraus Megafuge 40, Thermo Scientific). Les culots sont repris dans du PBS + 2% de SH pour réaliser par la suite un comptage sur lame de Malassez (dilué au ½ dans du bleu de Trypan (T8154, Sigma) afin d'apprécier la mortalité cellulaire).



Figure 15 : Protocole de preplating à partir de cellules dérivées du muscle

4.2 <u>Culture des myoblastes humains</u>

Les myoblastes humains sont isolés dans les premières étapes de preplating du protocole en figure 15. Pour les études de prolifération, les cellules sont issues d'un seul patient et stockées à -150°C. Pour l'étude de différenciation, les cellules ont été triées sur la base de l'expression

du CD56 pour une plus grande homogénéité puis stockées à -150°C. De la même manière, les cellules sont décongelées puis comptées avant d'être ensemencées.

4.3 <u>Production et purification des vésicules extracellulaires</u>

Les cellules hMuStem sont ensemencées dans 4 flasques F175 cm² préalablement coatées avec du CellStartTM (Gibco, Fisher) (2h à 37°C) à une densité de 2500 cellules/cm² dans du milieu artisanal souche (MSA) protégé par un brevet²⁶⁹. Après 3 jours de culture, le milieu est remplacé par 22 mL du milieu MSA VEs-Free (milieu ultracentrifugé à 100000 g à 4°C pendant 17 heures) par flasque et les cellules sont mises en culture sous hypoxie (1% d'O₂, 5% de CO₂, 37°C) pendant 24 heures. Le surnageant de culture est ensuite récolté et les cellules sont décollées à l'aide de TrypLETM Select CTSTM (Gibco, Life technologies) dilué au 1/3 dans du PBS. Les cellules sont centrifugées à 400 g pendant 10 minutes pour réaliser des culots secs à 1 x 10⁶ cellules stockés à -80°C.

Le surnageant est centrifugé selon le protocole de Kowal *et al.*²²⁰ qui consiste en deux centrifugations à 400 et 2000 g pendant 10 et 20 minutes pour éliminer les cellules mortes et corps apoptotiques. Le surnageant récolté est ensuite centrifugé à 16000 g pendant 40 minutes à 4°C dans le but de retirer les macro-vésicules qui sont alors resuspendues dans 500µL de PBS filtré à 0,1 µm et stockées à 4°C.

Le surnageant ainsi appauvri en macro-vésicules est ultracentrifugé (Optima XE-100 Ultracentrifuge, Beckman Coulter) à 4°C à 110000 g pendant 70 minutes. Le surnageant résultant de cette ultracentrifugation est récupéré, noté SEV- et stocké à 4°C. Le culot est resuspendu dans 9 mL de PBS filtré à 0,1 μ m et ultracentrifugé une seconde fois à 4°C à 110000 g pendant 70 minutes. Le culot final est ensuite repris dans 100 μ L de PBS filtré à 0,1 μ m par flasque récoltée.

Cette suspension est ensuite stockée à 4°C et à -80°C. Une partie de la suspension (l'équivalent d'une flasque de culture) est utilisée afin de réaliser les marquages au Membright[®] (Lipilight by MemBright, Idylle).

4.4 <u>Marquage des vésicules extracellulaires purifiées</u>

Après le lavage au PBS réalisé par ultracentrifugation, les VEs sont marquées avec du Membright[®] couplé à de la Cyanine 3 ou de la Cyanine 5. La solution mère de Membright[®] (100 μ M) est diluée au 1/5^{ème} dans du PBS filtré à 0,1 μ m et le volume correspondant à une concentration finale de 200 nM est ajouté au culot resuspendu. Ce mélange est ensuite incubé pendant 30 minutes à température ambiante, à l'obscurité et sous rotation (350 RPM). Après incubation, la suspension est ultracentrifugée à 110 000 g à 4°C pendant 60 minutes ainsi qu'un contrôle de Membright[®] dans PBS filtré à 0,1 μ m afin de vérifier que le colorant ne précipite pas. Une fois l'ultracentrifugation finie, le culot est remis en suspension dans 200 μ L de PBS filtré à 0,1 μ m par flasque initiale récoltée.

4.5 Quantification des vésicules extracellulaires

4.5.1 Analyse de la taille et de la concentration des particules

Afin de déterminer la concentration (nombre de particules par unité de volume) des VEs et d'obtenir une distribution précise de la taille de ces particules, nous avons utilisé la technologie TRPS (Tunable Resistive Pulse Sensing) sur un appareil qNano (Izon Science). Dix μ L de la préparation sont dilués au ¼ dans du PBS Tween 20 (0,03%) afin de limiter les agrégats et une filtration à 0,45 µm est réalisée à l'aide de microtubes contenant un filtre (Clearspin Filtered Microtubes, ClearLine, Dutscher). Toutes les solutions utilisées durant la manipulation sont filtrées à 0,1 µL (Millipore) et les nanopores (Izon Sciences) utilisés sont des NP100 et NP150 de tailles différentes laissant passer respectivement des particules de 50 à 330 nm et 70 à 420 nm.

Le passage de notre échantillon est précédé d'une calibration à l'aide d'un « calibrateur 200 nm » de nanoparticules à différentes pressions afin de déterminer une référence de taille de particule. Les échantillons (30 μ L final) peuvent ensuite être déposés dans le qNano et être analysés à deux pressions différentes afin d'optimiser la précision des mesures. L'acquisition ne doit pas dépasser 10 minutes, et 500 particules au minimum doivent être analysées pour que la mesure soit validée. Le flux de particules doit également suivre l'augmentation de la pression imposée, le bruit de fond doit être faible (root mean square [RMS] noise < 10 pA) et le courant doit rester stable entre les différentes mesures. Un courant est généré grâce au passage d'ions à
travers le nanopore entre des électrodes Ag/AgCl. Le passage des particules à travers le nanopore induit une résistance qui sera quantifiée. Cela permet d'obtenir une concentration précise en particules/mL et des graphiques de distribution de tailles, ce qui permet ainsi d'en déduire le diamètre moyen des particules.

4.5.2 Extraction protéique et dosage

Une petite quantité de la suspension de VEs (10 μ L) est diluée au ½ dans un tampon de lyse RIPA (NP40 1%, Tris-HCl 20 mM, NaCl 137 mM, glycérol 10%, EDTA 2 mM, inhibiteur de protéase). De la même manière, 200 μ L de tampon de lyse RIPA sont ajoutés à un culot sec de 1 million de cellules hMuStem ayant produit les vésicules. La lyse protéique se fait dans la glace pendant 30 minutes avec une homogénéisation à la pipette toutes les 10 minutes. Les protéines totales extraites des cellules et des VEs sont dosées par de l'acide bicinchronique selon la technique de dosage de Lowry²⁷⁰. L'absorbance est ensuite mesurée à 562 nm grâce au lecteur de plaques LT-4000 Microplate Reader (Labtech, East Sussex United Kingdom).

4.5.3 Technologie Myriade[®] : interférométrie

Une nouvelle technologie basée sur les principes de l'interférométrie permet de visualiser des nanoparticules de 35 à 300 nm. La suspension contenant les VEs est déposée dans une microcuvette de 5 à 15 μ L éclairée par une lumière blanche. Un système optique couplé à une caméra enregistre les mouvements des particules ce qui a permis d'obtenir un film où il est possible de distinguer les nanoparticules. Ces nanoparticules sont au bord du plan focal et passent du noir au blanc de part et d'autre de l'axe sous l'effet de leur propre mouvement. La caméra peut « pister » une nanoparticule et ainsi, une concentration et une mesure de la taille des nanoparticules sont alors calculées grâce à un algorithme^{271–273}.

4.6 <u>Imagerie des vésicules extracellulaires</u>

4.6.1 Microscopie confocale

Les VEs marquées au Membright-Cyanine 3 (MB-Cy3) et Membright-Cyanine 5 (MB-Cy5) sont visualisées *via* un microscope confocal LSM 780 Zeiss appartenant à la plateforme APEX de l'UMR 703 INRA/Oniris à Nantes. L'observation est réalisée sur des Labtek[®] 8 puits préalablement coatés avec de la Poly-L-Lysine 0,01% (Sigma-Aldrich). 10µL de la suspension de VEs sont déposés dans chaque puits et les vésicules marquées au MB-Cy3 et au MB-Cy5 sont alors respectivement observées avec une excitation d'un laser à 561 nm et 633 nm.

4.6.2 Microscopie super résolution

Les VEs marquées au MB-Cy5 sont visualisées *via* un microscope N-STORM (Nikon). L'observation est réalisée sur des lamelles de 18 mm d'épaisseur, nettoyées à l'éthanol puis trempées dans un bain d'HCl 1M pendant 17 heures afin d'éliminer d'éventuelles particules/poussières fluorescentes. Les lamelles nettoyées sont ensuite coatées avec de la Poly-L-Lysine 0,01% (Sigma-Aldrich) pendant 5 minutes. Le surplus du coating est ensuite aspiré et les lamelles sont laissées à l'air libre pour sécher.

Le tampon de montage (Abbelight[®]) utilisé est réalisé juste avant l'imagerie selon les recommandations (Abbelight, Allemagne). De ce mélange, 100 μ L sont prélevés et déposés dans le puits d'une lame incurvée en verre. Dix μ L de la suspension de VEs sont déposés au centre de la lamelle coatée et laissés au repos pendant 15 minutes. Le surplus est ensuite aspiré, la lamelle est déposée délicatement sur la lame incurvée avec la face comportant les VEs adhérées au contact de la goutte de tampon en faisant attention à ne pas faire de bulles. L'excédent de liquide est enlevé à l'aide de papier absorbant, puis le montage est scellé avec du Picodent Twinsil[®]22 selon les recommandations (Picodent, Wipperfürth, Allemagne). La durée de vie du tampon étant d'environ 4 heures, l'échantillon est observé à la suite du montage.

4.7 Étude d'internalisation des vésicules extracellulaires marquées

Afin d'évaluer le potentiel de pénétration des VEs dans des cellules, une étude d'internalisation a été réalisée sur deux types cellulaires : les cellules hMuStem et des myoblastes humains.

Les cellules hMuStem et les myoblastes humains ont été ensemencés dans un Labtek[®] 8 puits préalablement coaté avec du CellStartTM à des densités respectives de 2 500 et 10 000 cellules/cm². Les cellules hMuStem sont ensemencées dans un milieu MSA et les myoblastes humains dans un milieu HAM-F12 (F-12 Nut Mix + GlutaMAXTM-l, Gibco, Life technologies) + 10% de sérum Humain (EFS) + 1% de PSF (Peni-Strepto-Amphotericin, Eurobio) + 0,125% de bFGF (Human FGF-2, premium grade, Miltenyi Biotec).

Après trois jours de culture, une solution de LysoTrackerTM Green DND-26 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) est préparée extemporanément et ajoutée à une concentration finale de 50 nM pendant 30 minutes à 37°C et 5% de CO₂. Après incorporation du LysoTrackerTM par les cellules, 10µL de suspension de VEs marquées au MB-Cy3 sont ajoutés dans chaque puits et une acquisition est lancée toutes les 4 minutes en mode Z-stack pendant 3 heures pour les cellules hMuStem et 9 heures pour les myoblastes humains. L'acquisition est composée de deux Tracks avec un laser à 488 nm pour le LysoTrackerTM et 561 nm pour les VEs.

Suite à ce « Live Imaging », les cellules sont fixées avec du PFA 4% à 37°C pendant 30 minutes puis perméabilisées avec du Triton 0,2% (T9264, Sigma) pendant 20 minutes à 4°C. Un marquage de l'actine est réalisé avec de la Phalloïdine couplée à Alexa-488 (A12379, Life Technologies, Fischer Scientifique) diluée au 1/100^{ème} dans du PBS pendant 15 minutes, à 37°C, à l'obscurité. Pour finir, un contremarquage au DAPI (Invitrogen, Molecular Probes ; dilué au 1/1000^{ème} dans de l'eau déminéralisée) est réalisé pendant 15 minutes, à température ambiante, à l'obscurité. Les cellules sont ensuite recouvertes de PBS et visualisées au microscope confocal afin d'apprécier la pénétration des VEs.

4.8 <u>Activité biologique des vésicules extracellulaires dans un contexte *in vitro*4.8.1 Étude de l'impact sur le pouvoir prolifératif </u>

Une étude de prolifération a été réalisée sur plusieurs types cellulaires afin d'évaluer le potentiel fonctionnel des VEs. Cette évaluation a été faite sur des cellules hMuStem, des myoblastes humains ainsi que sur une lignée cellulaire endothéliale immortalisée HUVEC-EaHY926.

4.8.1.1 Cellules MuStem humaines

Les cellules hMuStem ont été ensemencées dans un milieu MSA sur des plaques P6 de culture préalablement coatées avec du CellStartTM à une densité de 2500 cellules/cm². L'étude s'est étendue sur trois passages (21 jours) et le milieu a été renouvelé toutes les 48 heures. Trois conditions ont été étudiées en triplicat (Tableau 1) :

Tableau 1 : Conditions étudiées dans l'étude de l'impact des VEs sur la proliférationcellulaire des cellules hMuStem

Conditions	Milieu	Quantité de VEs ajoutée
Contrôle	MSA	-
« 1-1 »	MSA	VEs produites par une cellule hMuStem pour une cellule ensemencée
« 5-1 »	MSA	VEs produites par 5 cellules hMuStem pour une cellule ensemencée

À confluence, les cellules sont décollées avec du TrypLETM pendant 5 minutes à 37°C, 5% de CO₂. Elles sont ensuite comptées sur lame de Malassez, puis réensemencées en suivant les conditions ci-dessus. À chacun de ces passages, le PD (Population Doubling) ou doublement de population des cellules est évalué par la formule :

PD = [log(Nb de cellules recoltées; 10) - log(Nb de cellules ensemencées; 10)] ÷ log(2; 10)Le PD est ensuite divisé par le nombre de jours de culture entre l'ensemencement et le comptage, ce qui renseigne sur le temps de doublement des cellules en jour (PDt). Le CPD (cumulative population doubling) est également calculé en ajoutant les différents PD de chaque passage.

4.8.1.2 Myoblastes humains

Les myoblastes humains ont été ensemencés sur des plaques P6 de culture préalablement coatées avec du CellStartTM à une densité de 10000 cellules/cm². L'étude s'est étendue sur trois passages (11 jours) et le milieu a été renouvelé toutes les 48 heures. Quatre conditions ont été étudiées en triplicat (Tableau 2) :

Tableau 2 : Conditions étudiées dans l'étude de l'impact des VEs sur la proliférationcellulaire des myoblastes humains

Conditions	Milieu	Quantité de VEs ajoutée	
Contrôle négatif	HAM-F12 + 5% Sérum Humain (SH) + 1% PSF + 0,125% ßFGF	-	
Contrôle positif	HAM-F12 + 10% SH + 2% Sérum de Poulet (SP) + 5% Sérum de Vœu Fœtal (SVF) + 1% PSF + 0,125% ßFGF	-	
« 1-2 »	Milieu contrôle négatif	1 particule pour 2 myoblastes ensemencés	
« 3-2 »	Milieu contrôle négatif	3 particules pour 2 myoblastes ensemencés	

À confluence, les cellules sont décollées avec du TrypLETM pendant 5 minutes à 37°C, 5% de CO₂ puis comptées sur lame de Malassez, et réensemencées en suivant les conditions ci-dessus. À chacun de ces passages, le PD, le PDt et le CPD sont évalués de la même manière que pour les cellules hMuStem.

4.8.1.3 HUVEC

Les HUVECs ont été ensemencées dans 3 plaques P96 de culture préalablement coatées avec du CellStartTM à une densité de 5000 cellules/puits. Les cellules sont cultivées dans un milieu DMEM 4,5 g/L de glucose (Gibco, Fisher) + 10% de SVF + 1% de PSF. Les 3 plaques se

distinguent par leur jour de lecture : la plaque n°1 sera lue au « Jour 0 », la plaque n°2 au « Jour 1 » et la plaque n°3 sera lue au « Jour 2 » (Figure 16).



Figure 16 : Représentation schématique de l'étude de prolifération des VE^{hMuStem} sur les HUVEC

Les différentes plaques sont ensemencées et lues selon le schéma en figure 16. Différentes conditions avec des EV^{hMuStem} ont été étudiées en sixplicat (Tableau 3) :

Tableau 3 : Conditions testées lors de l'étude de prolifération des VE^{hMuStem} sur les HUVEC

Conditions	Milieu	Quantité de VEs ajoutée	Répliquât biologique
	Milieu DMEM 4,5 g/L Glc		2
Contrôle	+ 5 % de SVF + 1% de PSF	-	
« 1-1 »	Milieu contrôle	1 particule pour 1 cellule ensemencée	1
« 1-2 »	Milieu contrôle	1 particule pour 2	1
		cellules ensemencées	
« 1-4 »	Milieu contrôle	1 particule pour 4	1
		cellules ensemencées	
« 1-10 »	Milieu contrôle	1 particule pour 10	2
		cellules ensemencées	
« 1-100 »	Miliou contrôlo	1 particule pour 100	1
		cellules ensemencées	
« 1-1000 »	Milieu contrôle	1 particule pour 1000	1
		cellules ensemencées	

Le MTT (Sigma) est ajouté pour une concentration finale de 0,5 mg/mL dans tous les puits (excepté le premier puits qui fera office de « blanc »). La plaque est ensuite placée dans l'incubateur à 37°C 5% de CO₂ pendant 1 heure. Après l'incubation d'une heure, le milieu est aspiré et 200 μ L de DMSO (Cryomacs[®] DMSO, Miltenyi Biotec) sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est ensuite placée sous agitation à 150 RPM pendant 15 minutes dans le noir. L'absorbance est ensuite mesurée à 562 nm grâce au lecteur de plaques LT-4000 Microplate Reader (Labtech, East Sussex United Kingdom). Pour chaque jour, le blanc sera soustrait aux absorbances mesurées et l'interprétation des résultats se fera selon un rapport : (Abs mesurée au jour x)/(Abs mesurée au jour 0) (où x = 0 ; 1 ou 2). Cette étude a été réalisée en deux fois : une première étude avec les concentrations « 1-2 », « 1-4 » et « 1-10 ». Les autres conditions ont été étudiées lors d'un second test.

4.8.2 Étude de l'impact sur la capacité de différenciation

Une étude de différenciation a été réalisée sur plusieurs types cellulaires afin d'évaluer l'activité biologique des VEs sur le potentiel myogénique. Cette évaluation a été faite sur les cellules hMuStem et les myoblastes humains.

4.8.2.1 Cellules MuStem humaines

Les cellules sont ensemencées dans une plaque de culture 24 puits préalablement coatée avec du CellStartTM dans un milieu MSA à une densité de 2500 cellules/cm². Les trois conditions étudiées sont les mêmes que pour l'étude de l'impact des VEs sur la prolifération des cellules hMuStem (Tableau 1).

Le milieu est renouvelé toutes les 48 heures jusqu'à confluence. Une fois la confluence atteinte, le « milieu MSA » est modifié : le sérum humain est abaissé à 1% et les cytokines supprimées. Ce nouveau milieu avec ou non des vésicules est changé de la même manière toutes les 48 heures jusqu'à l'observation de myotubes.

Les cellules sont ensuite fixées avec du PFA 4% pendant 30 minutes à 37°C. Trois lavages de 5 minutes avec du PBS sont réalisés. Les cellules sont perméabilisées avec du Triton 5%

pendant 20 minutes à 4°C, puis rincées 3 x 3 minutes avec du PBS. Le marquage de la myosine sarcomérique à l'aide d'un anticorps I^{aire} (MF20, Mouse Monoclonal anti-Human, H.BANK, dilué au 1/500^{ème} dans du PBS, incubation d'une heure à 37°C) est précédé d'une saturation avec du sérum de chèvre 20% (Dutscher) pendant 20 minutes à 37°C. Les cellules sont alors rincées 3 x 3 minutes avant d'être mises en contact avec un anticorps II^{aire} couplé à Alexa-488 (A11029, Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG, Probes) dilué au 1/300^{ème} dans du PBS pendant 30 minutes à 37°C dans l'obscurité. Une fois cette incubation terminée, les cellules sont rincées 3 x 3 minutes avec du PBS. Un contremarquage au DAPI (dilué au 1/1000^{ème} dans de l'eau déminéralisée) est pratiqué pendant 10 minutes à température ambiante dans l'obscurité. Pour finir, les cellules sont rincées deux fois 5 minutes avant d'être recouvertes de PBS et stockées à 4°C dans l'obscurité en attendant une visualisation microscopique.

4.8.2.2 Myoblastes humains

Les cellules sont ensemencées dans une plaque de culture 24 puits préalablement coatée avec du CellStartTM dans un milieu HAM-F12 + 1% PSF + 0,125% bFGF à une densité de 10000 cellules/cm². Quatre conditions sont étudiées (Tableau 4) :

 Tableau 4 : Conditions étudiées dans l'étude de l'impact des VEs sur la différenciation des myoblastes humains

Conditions	Milieu	Quantité de VEs ajoutée	
Contrôle négatif	HAM-F12 +		
	5% SH + 1% PSF +	-	
	0,125% bFGF		
« 1-2 »	Miliou contrôle négatif	1 particule pour 2 myoblastes	
	Willed controle negatil	ensemencés	
« 1-4 »	Miliou contrôle négatif	1 particule pour 4 myoblastes	
	Willed controle negatil	ensemencés	
« 1-10 »	Miliou contrôle négatif	1 particule pour 10 myoblastes	
	Mineu controle negatii	ensemencés	

Le milieu est renouvelé toutes les 48 heures jusqu'à confluence. Une fois la confluence atteinte, le milieu est modifié : le sérum humain est abaissé à 1% et le bFGF supprimé. Ce nouveau milieu avec ou sans VEs est changé de la même manière toutes les 48 heures jusqu'à l'observation de myotubes. Les cellules sont ensuite fixées et immunomarquées de la même manière que l'ont été les cellules hMuStem et une observation microscopique est alors réalisée.

4.8.2.3 Analyse de l'imagerie et calcul de l'index de fusion

Les cellules ayant été immunomarquées sont visualisées *via* un microscope N-STORM confocal (Nikon). Chaque condition en triplicat est observée en deux points distincts aléatoires, et au moins 651 noyaux sont considérés par puits. Une fois les acquisitions réalisées, chaque image est analysée à l'aide d'une macro sur le logiciel ImageJ[®] permettant de dénombrer les noyaux mais également de fixer un seuil de détection pour l'immunomarquage. Cela nous permet alors de dénombrer les noyaux présents dans le puits ainsi que les noyaux au sein de myotubes (≥ 2 noyaux/myotube), pour ensuite calculer l'index de fusion (IF), qui est le rapport des noyaux dans les myotubes sur le nombre total de noyaux.

4.9 Analyses statistiques

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm écart-type de n échantillons. Les graphiques et les tests statistiques sont réalisés avec le logiciel GraphPad Prism[®] v6. Les PDs, CPDs, et viabilités cellulaire sont analysés statistiquement en appliquant un test ANOVA-2-way suivi d'un test post-hoc Tukey de comparaison multiple. Les IF sont analysés statistiquement en appliquant un test One-way ANOVA suivi d'un test post-hoc de Tukey de comparaison multiple.

5 Résultats et discussion

Au cours de mon stage, trois productions de VE^{hMuStem} ont été réalisées. Pour chacune d'elles, le milieu souche artisanal (MSA) est utilisé les premiers jours de culture jusqu'à obtention de 80% de confluence des cellules, puis est remplacé par un milieu « MSA VEs-free » pendant 48 heures dont 24 heures en condition hypoxique (1% d'O₂). La culture sous hypoxie permet de stimuler la sécrétion de vésicules sans en impacter la qualité^{239,274–277}. Des travaux sur des cultures de cardiomyocytes en conditions hypoxiques ont montré un relargage de plus petites vésicules (exosomes) avec une expression plus abondante de TNF-alpha²⁷⁸. Le surnageant de culture est ensuite prélevé et les vésicules sont extraites selon le protocole décrit dans la partie

matériels et méthodes. À chaque production, nous avons marqué 1/4 de la quantité de vésicules avec du MemBright[®] afin de développer la partie imagerie. Le reste de la production a permis de poursuivre la caractérisation et la mise en place des tests fonctionnels.

5.1 Quantification des VEs sécrétées par les cellules hMuStem

Chaque production a pu être quantifiée avec l'appareil qNano qui utilise la technologie TRPS (Tunable Resistive Pulse Sensing). En parallèle, une seule production a pu être caractérisée à l'aide de la technologie Myriade[®] qui nous a été présentée lors d'un essai dans le cadre d'un séminaire du réseau Grand-Ouest des VEs. Les résultats obtenus sont résumés sur le tableau 5 et la figure 17.

Production	Concentration (particules/mL)	Quantité (particules)	Diamètre moyen (nm)	Concentration protéique (mg/mL)	Technologie
ExoMu19-1	7,19.10 ⁹	7,19.10 ⁵	107	2	qNano
ExoMu19-2	3.10 ¹⁰	4,5.10 ⁶	97	1,15	qNano
ExoMu19-3 Stocké à 4°c	3.10 ¹⁰	9.10 ⁶	104	1,64	qNano
ExoMu 19-3 Stocké à 4°C	5,35.10 ⁹	-	179,8	-	Myriade
ExoMu 19-3 Stocké à -80°C	6,11.10 ⁹	-	182,9	-	Myriade

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des différentes productions des VE^{hMuStem}

Il est observé des distributions homogènes dans les trois productions, avec des diamètres moyens proches (107, 97 et 104 nm). Les trois productions possèdent un pic en nombre de particules pour les vésicules ayant un diamètre d'environ 75 à 90 nm. La concentration protéique ainsi que les quantités de particules récoltées varient légèrement (multiplication par 10 entre la première et la dernière production). Les trois productions réalisées et quantifiées au qNano nous montrent alors que le protocole de production et de purification est reproductible.

Les trois productions sont représentées graphiquement (nombre de particules en fonction de leur taille en nm) en figure 17.



Figure 17 : Distribution des VEs en fonction de leur taille (nm) Analyse au qNano (Izon Science) des trois productions

La technologie Myriade[®], qui est un outil à l'essai dans la communauté scientifique des VEs, nous a permis d'apprécier la concentration, la forme et la taille de nos VEs à travers un film d'environ 10 secondes. L'avantage de cette technologie est la rapidité et la facilité d'utilisation. Sur un échantillon de 10 μ L conservé à 4°C, et plus précisément sur trois comptages de 126 particules, il est observé un diamètre moyen de 180,7 ± 2,38 nm ainsi qu'une concentration de 5,47.10⁹ ± 0,13 particules/mL. Nous pouvons constater que la distribution observée avec la technologie Myriade[®] (Figure 18) est moins homogène que ce qui a pu être observé au qNano (Tableau 5 et Figure 17). Cette technologie, pourrait être utilisée dans les laboratoires afin de faire un rapide contrôle de la quantité de VEs produite mais ne semble pas adaptée à une caractérisation fine des VEs. Néanmoins, ce système est aujourd'hui toujours à l'étude afin d'améliorer les mesures. Un temps plus long d'aquisition permet par exemple de gagner en précision de mesure.

Afin de tester la congélation de nos VEs pour évaluer la possibilité de stockage^{229,279}, nous avons réalisé une mesure d'un échantillon ayant subi une congélation à -80°C sans cryopréservant. Sur 140 vésicules analysées, le diamètre est en moyenne de 182,9 nm, et la

concentration est estimée à 6,12.10⁹ vésicules/mL. La distribution nous montre un pic de nombre de vésicules ayant un diamètre hydrodynamique à environ 140 nm. Ce profil est similaire à la distribution de la condition stockée à 4°C.



Figure 18 : Caractérisation des VEs conservées à 4°C avec la technologie Myriade[®]
A : Dernière image traitée. Cercle blanc et orange : suivi des particules par le logiciel.
B : Répartition des vésicules détectées en fonction de leur taille (nm)

Jusqu'ici, les VEs produites à des fins de thérapie acellulaire ne sont utilisées qu'en état « frais » : VEs conservées à 4°C et utilisées au maximum un mois après la production²⁸⁰. Cependant, certains chercheurs préconisent aujourd'hui une conservation et un « banking » des VEs à -80°C afin de faciliter l'approche thérapeutique²⁸¹. Ce premier résultat nous permet d'envisager une caractérisation plus fine allant jusqu'au test de fonctionnalité des VEs cryopréservées.

5.2 <u>Imagerie directe par microscopie confocale spectrale et reconstruction optique</u> <u>stochastique (d-STORM)</u>

Dans l'optique de définir la fonctionnalité des VEs dans des études *in vitro* ou *in vivo*, il est nécessaire de pouvoir marquer les vésicules afin de les visualiser²⁸². Nous souhaitons notamment mettre au point un marquage des VEs et des techniques de microscopie à haute résolution afin de pouvoir par la suite évaluer la morphologie des VEs, les interactions VEs-cellules ou même la biodistribution des VEs dans un tissu.

Un nouveau colorant MemBright[®] a été développé et mis sur le marché en 2019. Le MemBright[®] regroupe une famille de six sondes à membrane plasmique, activées par fluorescence à base de Cyanine (3 ; 3,5 ; 5 ; 5,5 ; 7 ; 7,5)²⁶⁸. Ce colorant permet une coloration homogène et sélective des bicouches lipidiques, et est compatible avec l'imagerie de cellules vivantes²⁶⁸. L'utilisation de ce nouveau colorant MemBright[®] nous a permis d'obtenir des images des VE^{hMuStem} en microscopie confocale spectrale (Figure 19).



Figure 19 : Microscopie confocale spectrale des VE^{hMuStem} *et macro-vésicules A : VEs marquées au MB-Cy3. B : Macro-vésicules marquées au MB-Cy3. C : VEs marquées au MB-Cy5. D : Contrôle d'ultracentrifugation PBS + MB-Cy3. Barre d'échelle : 5 μm.*

Le marquage des VEs au MB-Cy3 (Figure 19A) permet d'observer des vésicules de grande taille (en moyenne 2 μ m de diamètre) mais également des points plus fins, ainsi que des agrégats de vésicules. À l'aide d'une macro du logiciel ImageJ[®], il a été observé un diamètre moyen de 540 ± 237 nm sur 60 particules identifiées.

Les macro-vésicules (fraction récupérée après une centrifugation à 16000 g) qui ont elles aussi été marquées avec du MB-Cy3, sont représentées en figure 19B. Dans cette fraction, des macro-vésicules de 5 µm de diamètre en moyenne sont observées.

Les VEs ont également été marquées avec ce même colorant couplé à un fluorophore différent : MB-Cy5 (Figure 19C). On observe sur cette acquisition des vésicules plus petites ainsi que des agrégats de vésicules. Néanmoins, lorsque cette image est analysée, il est observé un diamètre moyen de 570 ± 281 nm sur 21 particules identifiées. Ce diamètre est assez proche de ce qui a pu être observé au niveau des VEs marquées au MB-Cy3.

Un contrôle de PBS + MB-Cy5 nous a permis de confirmer le fait que le MemBright[®] ne précipite pas, et que le signal observé est bien spécifique des vésicules extracellulaires (Figure 19D).

Une technologie dSTORM, permet d'affiner la sensibilité et d'obtenir des images plus fines des VEs marquées avec du MB-Cy5²⁸³. A l'aide d'une reconstruction, on obtient la Figure 20A qui représente des vésicules en grand nombre possédant une taille entre 20 et 150-200 nm. Quelques grosses vésicules sont également visibles, d'une taille d'environ 500nm. Du PBS filtré à 0,1 μ m nous sert alors de contrôle (Figure 20B). Sur 217 particules identifiées, une macro a pu déterminé un diamètre moyen de 40 ± 22 nm. La différence importante de mesure entre les deux techniques d'acquisition peut notamment s'expliquer par la limite de résolution très grande en confocale (200 nm) comparé à celle de super résolution (20 nm).



Figure 20 : Microscopie super résolution des VE^{hMuStem} *A : Reconstruction dSTORM - VEs marquées au Mb-Cy5. B : Reconstruction dSTORM - PBS filtré 0,1µm. Barre d'échelle : 2µm.*

La combinaison d'un marqueur spécifique des membranes, adapté aux VEs, sans aucune précipitation, et d'une technologie d'imagerie très innovante à haute résolution, le dSTORM sont très prometteurs et à ce jour non décrits dans la littérature. Des perspectives sont envisageables avec un suivi des VEs dans un contexte *in vitro* dans le but d'observer les communications entre les VEs et les cellules.

Par ailleurs, le suivi *in vivo* des VEs est crucial dans le développement et l'optimisation des stratégies thérapeutiques utilisant les vésicules. Les études précliniques et cliniques nécessitent des innovations technologiques dans un but d'étude de biodistribution permettant de déterminer le rôle physiologique des VEs après injection. Dans un contexte de thérapie acellulaire ou de thérapie cellulaire couplée aux injections de VEs, des investigations précises liées à l'imagerie sont à renseigner²⁸⁴.

5.3 Internalisation des vésicules extracellulaires par différents types cellulaires

Afin de caractériser les influences réciproques entre les VEs et différents types cellulaires, une étude d'internalisation a pu être réalisée *via* un suivi à l'aide de la microscopie confocale spectrale. Cette étude a été menée sur deux types cellulaires cibles : les cellules hMuStem et les myoblastes humains, puisque cela récapitule leur utilisation thérapeutique future (co-injection de VEs et de cellules hMuStem dans un contexte de régénération musculaire). La figure 21A permet de visualiser des VEs en train de pénétrer dans les cellules hMuStem.

De la même manière, nous pouvons voir sur la figure 21B des VEs en train de pénétrer dans les myoblastes. Ces résultats nous renseignent sur le fait que les VE^{hMuStem} possèdent donc un rôle paracrine *via* l'internalisation par des myoblastes, mais également un rôle autocrine *via* l'internalisation par les cellules mères hMuStem.



Figure 21 : Capture d'écran des « live imaging » des études d'internalisation des VEs sur deux types cellulaires

A : Capture d'écran au temps 1 heure et 36 minutes de l'internalisation des VEs marquées au Mb-Cy3 (rouge) dans les cellules hMuStem marquées avec un lysotrackerTM (vert). **B** : Capture d'écran au temps 2 heures et 39 minutes de l'internalisation des VEs marquées au Mb-Cy3 (rouge) dans les myoblastes humains marquées avec un lysotrackerTM (vert). Barre d'échelle : 20μm

Afin de compléter cette étude, les cellules ont été fixées et marquées dans le but d'apprécier la présence ou non de VE^{hMuStem} à l'intérieur des cellules. Nous pouvons voir sur la figure 22A, les cellules hMuStem fixées au bout de 7 heures d'incubation avec les VE^{hMuStem}. Au niveau des cercles blancs, les VEs sont bien visibles à l'intérieur des cellules hMuStem. De la même manière, sur la figure 22B, il est possible de voir les myoblastes humains fixés au bout de 16 heures d'incubation avec les VE^{hMuStem}. À l'intérieur des cercles blancs, nous remarquons de la même façon les VEs qui ont pénétré à l'intérieur des cellules. Cette technique non invasive d'imagerie moléculaire des VEs confirme les interactions VEs-hMuStem ou myoblastes par internalisation. En effet, les VEs sont visualisées à l'aide de la vue *Ortho-3D* dans le cytoplasme des cellules et non à leur surface. Des résultats similaires ont été observés avec une internalisation de VEs d'autres types cellulaires^{204,285–289}. L'impact biologique est alors à confirmer et des tests de fonctionnalité des VEs sont à mettre en place avant de proposer des expériences *in vivo* d'utilisation de VEs en thérapie.



Figure 22 : Internalisation des VEs sur deux types cellulaires fixés A : Vue « Ortho-3D » d'une coupe en Z de cellules hMuStem fixées et marquées après 7 heures d'incubation avec des VE^{hMuStem} marquées au MB-Cy3 (rouge). B : Vue « Ortho-3D » d'une coupe en Z de myoblastes humains fixés et marqués après 16 heures d'incubation avec des VE^{hMuStem} marquées au MBCy3 (rouge). L'actine est marquée en vert avec de la Phalloïdine couplé à Alexa-488, et les noyaux en bleu avec du DAPI. Barre d'échelle : 10µm.

Nous pouvons donc observer les vésicules en microscopie confocale et en microscopie superrésolution avec le nouveau marqueur des membranes. Un protocole efficace a également été mis en place afin d'évaluer la pénétration des VEs dans différents types cellulaires en direct, mais également après fixation. Cependant, que ce soit dans l'observation directe des VEs, ou bien dans le contexte de capture par différents types cellulaires, il est observé de nombreux agrégats. La présence de ces agrégats peut alors modifier la pénétration des VEs dans les cellules, puisqu'une particule de taille nanométrique pourra être internalisée de manière plus simple et plus rapide qu'un agrégat vésiculaire. À l'heure actuelle, nous ne savons pas si les agrégats sont générés lors de la coloration par l'insertion du marqueur (sous forme « d'agrafe membranaire ») qui pourrait changer le potentiel de répulsion entre les particules, ou bien produits lors de la purification par ultracentrifugation. En effet, cette technique, largement utilisée aujourd'hui dans la communauté scientifique des VEs est cependant décrite comme favorisant la formation d'agrégats²²¹. Aujourd'hui, les techniques de purification des VEs sont très variables et de nombreux kits de purification à l'aide d'anticorps sont mis sur le marché. Comme décrit précédemment, la technique la plus utilisée est l'ultracentrifugation. Néanmoins, si l'on veut envisager d'évoluer en essai clinique, il sera préférable d'envisager une combinaison de filtration tangentielle et de filtration/concentration²⁹⁰.

Il est important de souligner également que lors de l'observation au microscope à superrésolution et de la reconstruction, nous n'avons pas observé d'agrégats. Cela peut également signifier que la limite de résolution (environ 200 nm) de la microscopie confocale utilisée lors des études de pénétration modifie ce que l'on perçoit. Une étude des cellules fixées après internalisation des VEs à l'aide la microscopie à super-résolution sera intéressante à réaliser.

5.4 Les VE^{hMuStem} et leur rôle d'induction de prolifération

En médecine régénératrice, il a été démontré un effet thérapeutique des VEs qui pouvaient améliorer la régénération de certains tissus en passant par une stimulation de la prolifération de cibles cellulaires^{204,263,288}. Cependant, la nature de la cellule productrice est primordiale. L'exploration fonctionnelle des VEs produites par le candidat cellulaire thérapeutique hMuStem est à ce jour très important dans les stratégies de thérapie de la DMD.

Différentes études ont été réalisées sur des cellules hMuStem, des myoblastes humains et des cellules endothéliales afin d'évaluer si les VE^{hMuStem} stimulent ou inhibent la prolifération cellulaire.

L'étude sur les cellules hMuStem s'est déroulée sur trois semaines totales, et un comptage a été effectué à chacun des passages (3 passages). Les résultats sont présentés en temps de doublement, mais également en CPD qui représente le cumulatif des doublements de population (PD pour Population Doubling) (Figure 23).



Figure 23 : Impact des VE^{hMuStem} sur le pouvoir prolifératif des cellules hMuStem

A : Temps de doublement (PDt) en jour en fonction des passages des cellules. **B** : Doublement de population cumulé (CPD) en fonction des passages. Les résultats sont présentés en $n=3\pm$ SEM. Une analyse statistique a été faite avec un Anova-2-way suivi d'un test post-hoc de Tukey. *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001 ; ***p<0,001.

En ce qui concerne le temps de doublement de chaque condition, nous n'observons pas de différence significative entre le contrôle et les deux conditions étudiées (Figure 23A). Néanmoins, en ce qui concerne le CPD, entre la condition « 1-1 » et le contrôle au niveau du passage P6, il y a une différence de 0,57 doublement (CTRL : 18,29 doublements \pm 0,21 vs. « 1-1 » : 18,87 doublements \pm 0,07). Au passage P7 la différence augmente très légèrement à 0,59 doublement (CTRL : 21,41 doublements \pm 0,11 vs. « 1-1 » : 22 doublements \pm 0,21). Les différences au passage 6 et 7 entre la condition « 1-1 » et le contrôle sont significativement différentes (p<0,01) (Figure 23B). Cela signifie alors qu'à une concentration 1-1, les VE^{hMuStem} stimulent très légèrement la croissance de ce lot de cellules hMuStem. Cependant, cet effet reste très faible et le protocole mis en place présente quelques inconvénients.

Les cellules hMuStem sont des cellules qui nécessitent un milieu de culture particulier riche en cytokines et sérums. La réalisation des contrôles doit être mise au point en augmentant ou en diminuant ces ajouts afin de pouvoir visualiser des différences significatives. Ces contrôles, appliqués aux cellules hMuStem entraînent un changement dans la prolifération et/ou la différenciation des cellules ce qui en limite la réalisation. De plus, le milieu de grade clinique BPF adapté aux cellules hMuStem est actuellement en rupture de process. Il a donc été remplacé par du MSA moins optimal pour nos études préliminaires de fonctionnalité. L'effet des VEs étant significatif mais faible, de futurs tests en présence de 3 autres lots de VEs et de cellules

hMuStem sont prévus dans les conditions de culture utilisant le milieu M2STEM utilisé pour la production des cellules de grade clinique²⁵³.

Une étude similaire a été réalisée sur un lot de myoblastes humains sur 11 jours avec un passage tous les 3 à 4 jours. Les résultats sont présentés de la même manière que pour les cellules hMuStem (PDt et CPD) (Figure 24).



Figure 24 : Impact des $VE^{hMuStem}$ sur le pouvoir prolifératif des myoblastes humains A : Temps de doublement (PDt) en jour en fonction des passages des cellules. **B** : Doublement de population cumulé (CPD) en fonction des passages. Les résultats sont présentés en $n=3\pm SEM$. Une analyse statistique a été faite avec un Anova-2-way suivi d'un test post-hoc de Tukey. *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001 ; ****p<0,001.

En observant les résultats du PDt, nous pouvons remarquer de grands écarts types ainsi qu'une chute de croissance très importante pour la condition du contrôle négatif : entre le P6 et le P7, les cellules passent d'environ de 2,20 jours \pm 0,16 à 7,32 jours \pm 2,50 pour un dédoublement. Entre les deux différentes conditions et le contrôle négatif, il existe une différence significative du PDt (Figure 24A)(p<0,001). Nous observons également une différence avec le contrôle positif (p<0,0001), ce qui confirme la faisabilité de notre test. En ce qui concerne le CPD de cette étude il est observé une différence significative entre la condition du contrôle positif et toutes les autres conditions (À P7, CTRL + : 12,24 doublements \pm 0,04 *vs*. CTRL - : 8,11 doublements \pm 0,18 ; p<0,0001). C'est à dire que le contrôle positif, sous stimulation, a proliféré de manière plus importante (Figure 24B). Cependant nous n'observons pas de différence significative entre les deux conditions tests de VE^{hMuStem} et le contrôle négatif. Cela signifie que l'on ne peut pas conclure à un effet d'induction des VEs sur la prolifération de ce lot de myoblastes humains.

Une seconde étude a alors été entreprise afin de confirmer ces résultats, avec un autre lot de myoblastes humains. Ce deuxième lot possède la même provenance, mais les cellules ont été triées par un marqueur des myoblastes en prolifération, l'anticorps CD56^{+ 291}. Malheureusement, cette étude n'a pu aboutir du fait d'un temps trop lent de doublement des cellules. En effet, les myoblastes possédaient un temps de doublement supérieur à une semaine, et, du fait de la rareté des productions des VEs, nous avons décidé de stopper cette étude dans le but de privilégier d'autres manipulations. Par manque de temps, nous n'avons pas pu renouveler les études de prolifération et de différenciation sur un autre lot CD56⁺.

Il est important de noter que dans la littérature, une équipe a réussi à démontrer l'efficacité d'induction de prolifération ou de différenciation des VEs de différents types cellulaires sur des myoblastes²⁶³. Cependant, leurs études sont réalisées sur des lignées cellulaires murines C2C12 et non des cultures primaires humaines.

Les cellules hMuStem sont aujourd'hui décrites comme ayant un potentiel thérapeutique en médecine régénératrice et une hypothèse de travail est que cela passerait *via* une augmentation de l'angiogenèse (travail en cours). De nombreuses VEs actuellement en cours d'étude ont cette capacité de promouvoir la prolifération cellulaire et l'angiogenèse et différents tests de validation *in vitr*o ont été publiés²⁸⁸. Afin d'évaluer le potentiel des VE^{hMuStem} sur l'angiogenèse, favorisant alors une régénération, une étude de prolifération a également été menée sur une lignée cellulaire immortalisée endothéliale : les HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells). Ces tests se déroulent sur 4 jours, avec une lecture *via* un test MTT au jour 0, 1 et 2. Les résultats se présentent sous forme d'un rapport de l'absorbance au jour de lecture divisée par l'absorbance au jour 0. La réalisation de ce test sur deux jours nous donne une cinétique de prolifération selon les différentes conditions (Figure 25).



Figure 25 : Impact des VE^{hMuStem} sur le pouvoir prolifératif des HUVECs

Évolution du nombre de cellules relatif au jour 0 en fonction du temps (en jour). Deux tests ont été réalisés avec différentes conditions, $n=12\pm$ SEM pour « 1-10 » et $n=6\pm$ SEM pour les autres conditions. Le CTRL 1 correspond au contrôle du premier test, et le CTRL 2 correspond au contrôle du 2nd test. Une analyse statistique a été faite avec un Anova-2-way suivi d'un test post-hoc de Tukey. *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001 ; ****p<0,0001.

Le premier test a été réalisé avec les concentrations « 1-2 », « 1-4 » et « 1-10 », et nous avons observé une tendance de stimulation de prolifération pour les deux concentrations les plus faibles (Figure 25). Nous avons alors décidé de faire une gamme de VEs avec comme concentration la plus forte : une particule pour une cellule. Le deuxième test a alors été réalisé avec 4 concentrations diminuant chacune d'un facteur 10, 100 et 1000 vis à vis de la concentration « 1-1 ». Pour ce deuxième test, il est observé un contrôle avec une viabilité cellulaire très haute vis à vis des conditions avec VEs. Au vu de la différence entre le contrôle du premier test (CTRL 1) et du contrôle du deuxième test (CTRL 2), nous avons décidé de les séparer.

En ce qui concerne les conditions traitées avec VEs du test n°2, les résultats laissent entrevoir un effet de diminution de prolifération vis à vis du contrôle 2. Les résultats sont néanmoins à nuancer du fait d'un duplicat biologique non validé, de différences observées non significatives mais également d'une disparité dans les absorbances mesurées (grands écart-types). À ce jour, nous ne savons pas si nous sommes dans des concentrations trop faibles de VEs pour avoir des résultats homogènes, et il ne nous a pas été possible d'étudier des concentrations plus fortes du fait de la rareté des VEs. Cependant, il est également possible que les VEs n'aient pas d'effet d'induction ou d'inhibition de prolifération sur les HUVEC ou encore que le test ne soit pas optimal pour le démontrer.

Dans la littérature, il existe des tests similaires montrant l'impact positif des VEs de cellules souches sur la prolifération cellulaire des HUVECs, mais il est important de préciser que nous nous sommes placés dans des concentrations en VEs environ 20 fois inférieures²⁸⁸. Il serait pertinent de réitérer ces tests à des concentrations 10 voire 100 fois supérieures. Afin d'évaluer le potentiel angiogénique des VEs, il serait également possible de mettre en place d'autres tests tels que ceux de cicatrisation et de formation de tube^{204,288}.

5.5 Potentiel d'induction myogénique des VE^{hMuStem}

Le potentiel d'induction myogénique des VEs a été étudié à travers les deux types cellulaires cibles : les cellules hMuStem et les myoblastes humains.

L'étude sur les cellules hMuStem a duré 11 jours. Les cellules ont été ensemencées et ont proliféré pendant 7 jours avant d'être induites en différenciation (réduction du sérum à 1%) pendant 4 jours. Un immunomarquage avec la myosine sarcomérique a permis de visualiser les myotubes et une contre-coloration des noyaux au DAPI a permis d'évaluer le nombre de noyaux présents dans les myotubes. De cette manière, la différenciation est représentée sous la forme d'un Index de Fusion (IF) : nombre de noyaux dans les myotubes (≥ 2 noyaux par myotube) / nombre de noyaux total. Les concentrations en VE^{hMuStem} ajoutées dans le milieu sont équivalentes à celles utilisées lors de l'étude de prolifération.

Des exemples d'acquisition d'images des différentes conditions contrôle, « 1-1 » et « 5-1 » sont respectivement représentées en figure 26A, B et C. Dans la condition contrôle, les cellules ont un IF de 28% \pm 0,38. Les cellules traitées « 1-1 » ont un IF de 24,5% \pm 1,88 et celle traitées « 5-1 », un IF de 25,5 \pm 1,92. Il est donc observé une légère tendance à la baisse, non significative, dans nos conditions traitées. Cela pourrait corréler avec la tendance d'induction de la prolifération observée précédemment puisque les cellules souches répondent à une balance prolifération/différenciation. De plus, les VEh^{MuStem} sont sécrétées dans des conditions où les cellules mères sont en prolifération. Il serait alors logique que les vésicules sécrétées favorisent la prolifération et non la différenciation ce qui induirait un maintien en état prolifératif des cellules souches cibles.

Néanmoins, les résultats observés ne permettent aucune conclusion, et de prochaines études utilisant d'autres lots cellulaires ou le milieu spécifique grade clinique des cellules hMuStem (M2STEM) pourront être réalisées afin de confirmer cette tendance.

Une étude similaire a été réalisée sur un lot de myoblastes triés CD56⁺. Malheureusement, après une semaine de prolifération, une semaine de différenciation ainsi qu'un immunomarquage, nous avons remarqué que les cellules triées CD56⁺ ne s'étaient que très peu différenciées et que les résultats ne sont donc pas interprétables. Comme décrit lors du test de prolifération, les cellules ne se sont pas assez dédoublées et différenciées pour avoir des résultats clairs. Des études similaires avec d'autres lots sont prévues lors de prochaines productions de VE^{hMuStem}.



Figure 26 : Influence des VE^{hMuStem} sur le potentiel myogénique des cellules hMuStem A, B et C : Contrôle, condition "1-1", condition "5-1" observés en microscopie après immunomarquage (Myosine sarcomérique en vert) et contre-coloration des noyaux (DAPI en bleu). Barre d'échelle : 200µm. D : Index de fusion (%) en fonction des conditions. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM (n=2). Une analyse statistique a été faite avec un Anova-One-way suivi d'un test post-hoc de Tukey. *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001 ; ****p<0,0001.

Conclusion et perspectives

Récemment, de nombreuses études se sont penchées sur le rôle paracrine que possèdent les VEs sécrétées par les cellules greffées *in situ*. Par exemple, il a été démontré que les VEs provenant de cellules souches mésenchymateuses pouvaient réduire la taille d'un infarctus du myocarde, ou même promouvoir un recouvrement fonctionnel post-accident vasculaire cérébral^{292,293}. Il est également important d'ajouter que l'effet des VEs sur un compartiment cellulaire reste dépendant du type cellulaire les ayant sécrétés^{237,238}.

À l'aide du protocole mis en place précédemment, il nous a été permis de produire, purifier et caractériser les VEs sécrétées par les cellules hMuStem candidates à la thérapie cellulaire dans le cadre de la dystrophie musculaire de Duchenne²⁵³.

La démonstration de l'internalisation des VE^{hMuStem} dans deux types cellulaires a été réalisée grâce à l'imagerie à l'aide du colorant MemBright[®], ainsi qu'une observation très fine de ces VEs *via* la microscopie à super-résolution.

Du côté de l'effet fonctionnel des VEs, nous avons pu évaluer leur effet d'induction ou d'inhibition de prolifération et différenciation sur plusieurs types cellulaires. Nous avons été confrontés à des difficultés de réalisation des tests qui pourraient s'expliquer par l'utilisation d'un milieu artisanal pour les cellules hMuStem moins optimal que le milieu BPF, actuellement en rupture de stock. Malgré ces conditions de culture non optimisées, nous avons réussi à montrer un léger effet de stimulation de la prolifération sur le lot de cellules hMuStem « mères » des VEs à une concentration d'équivalence de production d'une cellule mère pour une cellule ensemencée. De la même manière, nous avons observé une tendance non significative à la diminution de différenciation en myotubes avec cette même concentration.

Les perspectives de ce projet naissant sont nombreuses. Tout d'abord, il sera nécessaire de compléter et de refaire ces tests *in vitro* sur différents lots de cellules, en réalisant par exemple des triplicats biologiques qui n'ont pu être réalisés ici. Dans le cadre des cellules hMuStem, ces tests seront également reproduits avec le milieu spécifique M2STEM, certifié grade GMP²⁵³.

Une autre étude pertinente serait d'évaluer le rôle des VE^{hMuStem} dans l'immunité. Les VEs produites par les cellules souches mésenchymateuses sont considérées comme des messagers du système immunitaire inné et présentent un rôle anti-inflammatoire en induisant la sécrétion de cytokines^{294–297}. Concernant les cellules hMuStem, le laboratoire a démontré un rôle immunomodulateur en interagissant avec l'immunité adaptative et innée par inhibition de la prolifération lymphocytaire *via* un ensemble de facteurs secrétés^{253,298}. Le sécrétome des cellules hMuStem possède de fortes propriétés immunomodulatrices²⁹⁸ et nous chercherons à

démontrer si les VEs purifiées conservent ces propriétés intéressantes. Une thérapie utilisant des VEs aurait une réelle pertinence clinique en réglant une partie des problèmes techniques, immunologiques et sécuritaires associés aux greffes de cellules. Si le rôle fonctionnel des VE^{hMuStem} se confirme, une première stratégie serait de diminuer considérablement le nombre de cellules hMuStem injectées et de potentialiser leur effet en ajoutant les VEs produites par ces cellules.

Une fois la démonstration de l'effet *in vitro* des VEs faite, il sera alors possible de tester ces $VE^{hMuStem}$ sur un modèle de rat dystrophique (rat DMD^{mdx}). La stratégie étant de proposer une injection conjointe de vésicules et de cellules hMuStem, il sera alors possible de réaliser une étude de comparaison entre l'injection de cellules seules, l'injection de cellules avec leurs VEs et une injection de VEs seules.

De plus, il sera intéressant de démontrer également si une communication est visualisable *in vivo* par nos techniques mises en place de « tracking » à l'aide du colorant MemBright[®] et de l'imagerie.

Par ailleurs, les cellules souches adultes hMuStem peuvent être utilisées plus largement dans des pathologies d'affections musculaires. Elles sont notamment à l'étude en médecine régénératrice dans un contexte post-infarctus^{277,299}. Les VE^{hMuStem} pourraient donc alors être considérées comme le sont aujourd'hui les VEs de CSMs, en injection seule dans un contexte de thérapie acellulaire. L'injection de VE^{hMuStem} sera comparée à l'injection de cellules hMuStem dans un modèle de rat infarcis.

Tout ceci participera alors à démontrer l'effet des VEs en médecine régénérative dans un contexte de muscle lésé, comme l'on peut trouver dans la dystrophie musculaire de Duchenne mais également dans l'infarctus du myocarde.

Bibliographie

- 1. Chelly, J. et al. La myopathie de Duchenne: du gène DMD à la dystrophine. médecine/sciences 4, (1988).
- Orphanet: Dystrophie musculaire de Duchenne. Available at: https://www.orpha.net/consor4.01/www/cgibin/Disease_Search.php?lng=FR&data_id=13913&Disease_Disease_Search_diseaseGr oup=dystrophie-musculaireduchenne&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Maladie(s)/groupes de maladies=Dystrophie-musculaire-de-Duch. (Accessed: 18th July 2019)
- Prior, T. W. & Bridgeman, S. J. Experience and Strategy for the Molecular Testing of Duchenne Muscular Dystrophy. *J. Mol. Diagnostics* 7, 317–326 (2005).
- 4. Roberts, R. G., Coffey, A. J., Bobrow, M. & Bentley, D. R. Exon Structure of the Human Dystrophin Gene. *Genomics* **16**, 536–538 (1993).
- 5. Dent, K. M. *et al.* Improved molecular diagnosis of dystrophinopathies in an unselected clinical cohort. *Am. J. Med. Genet. Part A* **134A**, 295–298 (2005).
- 6. Monaco, A. P. *et al.* Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature* **323**, 646–50 (1986).
- Hoffman, E. P., Brown, R. H. & Kunkel, L. M. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51, 919–28 (1987).
- 8. Hoffman, E. P., Knudson, C. M., Campbell, K. P. & Kunkel, L. M. Subcellular fractionation of dystrophin to the triads of skeletal muscle. *Nature* **330**, 754–8 (1987).
- Péréon, Y., Mercier, S. & Magot, A. Physiopathologie de la dystrophie musculaire de Duchenne. *Arch. Pédiatrie* 22, 12S18-12S23 (2015).
- Gao, Q. Q. & McNally, E. M. The Dystrophin Complex: Structure, Function, and Implications for Therapy. in *Comprehensive Physiology* 5, 1223–1239 (John Wiley & Sons, Inc., 2015).
- Lapidos, K. A., Kakkar, R. & McNally, E. M. The Dystrophin Glycoprotein Complex. *Circ. Res.* 94, 1023–1031 (2004).
- 12. Koenig, M., Monaco, A. P. & Kunkel, L. M. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* **53**, 219–228 (1988).
- Ahn, A. H. & Kunkel, L. M. The structural and functional diversity of dystrophin. *Nat. Genet.* 3, 283–91 (1993).
- 14. Le Rumeur, E., Winder, S. J. & Hubert, J.-F. Dystrophin: More than just the sum of its

parts. Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics 1804, 1713–1722 (2010).

- 15. AFM Téléthon. Avancées dans les dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker.
- UMD-DMD France. Banque de données des mutations du gène DMD. (2009). Available at: http://www.umd.be/DMD/W DMD/accueil FR.html. (Accessed: 7th August 2019)
- Petrof, B. J., Shrager, J. B., Stedman, H. H., Kelly, A. M. & Sweeney, H. L. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 3710–3714 (1993).
- Allen, D. G. & Whitehead, N. P. Duchenne muscular dystrophy What causes the increased membrane permeability in skeletal muscle? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 290–294 (2011).
- Lawler, J. M. Exacerbation of pathology by oxidative stress in respiratory and locomotor muscles with Duchenne muscular dystrophy. J. Physiol. 589, 2161–70 (2011).
- Mallouk, N., Jacquemond, V. & Allard, B. Elevated subsarcolemmal Ca2+ in mdx mouse skeletal muscle fibers detected with Ca2+-activated K+ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 4950–5 (2000).
- 21. Batchelor, C. L. & Winder, S. J. Sparks, signals and shock absorbers: how dystrophin loss causes muscular dystrophy. *Trends Cell Biol.* **16**, 198–205 (2006).
- Claflin, D. R. & Brooks, S. V. Direct observation of failing fibers in muscles of dystrophic mice provides mechanistic insight into muscular dystrophy. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 294, C651-8 (2008).
- Nakamura, A., Yoshida, K., Ueda, H., Takeda, S. & Ikeda, S. Up-regulation of mitogen activated protein kinases in mdx skeletal muscle following chronic treadmill exercise. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1740, 326–331 (2005).
- 24. Sander, M. *et al.* Functional muscle ischemia in neuronal nitric oxide synthase-deficient skeletal muscle of children with Duchenne muscular dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 13818–13823 (2000).
- Allen, D. G., Whitehead, N. P. & Yeung, E. W. Mechanisms of stretch-induced muscle damage in normal and dystrophic muscle: role of ionic changes. *J Physiol* 567, 723–735 (2005).
- Kozakowska, M., Pietraszek-Gremplewicz, K., Jozkowicz, A. & Dulak, J. The role of oxidative stress in skeletal muscle injury and regeneration: focus on antioxidant enzymes. J. Muscle Res. Cell Motil. 36, 377–93 (2015).
- GISSEL, H. The Role of Ca2+ in Muscle Cell Damage. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1066, 166– 180 (2005).

- Spencer, M. J., Walsh, C. M., Dorshkind, K. A., Rodriguez, E. M. & Tidball, J. G. Myonuclear apoptosis in dystrophic mdx muscle occurs by perforin-mediated cytotoxicity. *J. Clin. Invest.* 99, 2745–51 (1997).
- Cai, B., Spencer, M. J., Nakamura, G., Tseng-Ong, L. & Tidball, J. G. Eosinophilia of dystrophin-deficient muscle is promoted by perforin-mediated cytotoxicity by T cell effectors. *Am. J. Pathol.* 156, 1789–96 (2000).
- Villalta, S. A., Nguyen, H. X., Deng, B., Gotoh, T. & Tidball, J. G. Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 18, 482–96 (2009).
- 31. Michaluk, P. *et al.* Beta-dystroglycan as a target for MMP-9, in response to enhanced neuronal activity. *J. Biol. Chem.* **282**, 16036–41 (2007).
- 32. Bulfield, G., Siller, W. G., Wight, P. A. & Moore, K. J. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**, 1189–1192 (1984).
- DiMario, J. X., Uzman, A. & Strohman, R. C. Fiber regeneration is not persistent in dystrophic (MDX) mouse skeletal muscle. *Dev. Biol.* 148, 314–21 (1991).
- 34. Im, W. Differential expression of dystrophin isoforms in strains of mdx mice with different mutations. *Hum. Mol. Genet.* **5**, 1149–1153 (1996).
- Li, H., Mittal, A., Makonchuk, D. Y., Bhatnagar, S. & Kumar, A. Matrix metalloproteinase-9 inhibition ameliorates pathogenesis and improves skeletal muscle regeneration in muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 18, 2584–2598 (2009).
- Wehling-Henricks, M. *et al.* Major basic protein-1 promotes fibrosis of dystrophic muscle and attenuates the cellular immune response in muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 17, 2280–2292 (2008).
- Luz, M. A. M., Marques, M. J. & Santo Neto, H. Impaired regeneration of dystrophindeficient muscle fibers is caused by exhaustion of myogenic cells. *Brazilian J. Med. Biol. Res. = Rev. Bras. Pesqui. medicas e Biol.* 35, 691–5 (2002).
- Sacco, A. *et al.* Short Telomeres and Stem Cell Exhaustion Model Duchenne Muscular Dystrophy in mdx/mTR Mice. *Cell* 143, 1059–1071 (2010).
- 39. Dumont, N. A. *et al.* Dystrophin expression in muscle stem cells regulates their polarity and asymmetric division. *Nat. Med.* **21**, 1455–1463 (2015).
- Massague, J., Cheifetz, S., Endo, T. & Nadal-Ginard, B. Type beta transforming growth factor is an inhibitor of myogenic differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 8206–8210 (1986).
- 41. Li, Y. et al. Transforming growth factor-beta1 induces the differentiation of myogenic

cells into fibrotic cells in injured skeletal muscle: a key event in muscle fibrogenesis. *Am. J. Pathol.* **164**, 1007–19 (2004).

- Alexakis, C., Partridge, T. & Bou-Gharios, G. Implication of the satellite cell in dystrophic muscle fibrosis: a self-perpetuating mechanism of collagen overproduction. *Am. J. Physiol. Physiol.* 293, C661–C669 (2007).
- 43. Wynn, T. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. J. Pathol. 214, 199–210 (2008).
- INSERM. Myopathie de Duchenne | Inserm La science pour la santé. Available at: https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/myopathie-deduchenne. (Accessed: 8th August 2019)
- 45. Iwańczak, F., Stawarski, A., Potyrała, M., Siedlecka-Dawidko, J. & Agrawal, G. S. Early symptoms of Duchenne muscular dystrophy--description of cases of an 18-month-old and an 8-year-old patient. *Med. Sci. Monit.* **6**, 592–5
- 46. Angelini, C. *et al.* Prognostic factors in mild dystrophinopathies. *J. Neurol. Sci.* 142, 70–78 (1996).
- 47. Tyler, K. L. Origins and early descriptions of "Duchenne muscular dystrophy". *Muscle Nerve* 28, 402–22 (2003).
- Towbin, J. A. The role of cytoskeletal proteins in cardiomyopathies. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 131–9 (1998).
- 49. Finsterer, J. & Stöllberger, C. The Heart in Human Dystrophinopathies. *Cardiology* 99, 1–19 (2003).
- 50. Kuntzer, T. & Dunand, M. ASRIM Maladies neuromusculaires. (2005).
- 51. Boyce, F. M., Beggs, A. H., Feener, C. & Kunkel, L. M. Dystrophin is transcribed in brain from a distant upstream promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 1276–1280 (1991).
- 52. Anaya-Segura, M. *et al.* Non-Invasive Biomarkers for Duchenne Muscular Dystrophy and Carrier Detection. *Molecules* **20**, 11154–11172 (2015).
- Falzarano, M. S., Scotton, C., Passarelli, C. & Ferlini, A. Duchenne Muscular Dystrophy: From Diagnosis to Therapy. *Molecules* 20, 18168–84 (2015).
- 54. Waldrop, M. A. & Flanigan, K. M. Update in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Curr. Opin. Neurol.* 1 (2019). doi:10.1097/WCO.00000000000739
- 55. Urtiberea, D. J. A. Le diagnostic dans la dystrophie musculaire de Duchenne. (2009).
- 56. Desguerre, I. & Laugel, V. Diagnostic et histoire naturelle de la dystrophie musculaire de Duchenne. *Arch. Pédiatrie* **22**, 12S24-12S30 (2015).
- 57. Buddhe, S. et al. Cardiac Management of the Patient With Duchenne Muscular

Dystrophy. Pediatrics 142, S72–S81 (2018).

- Ibrahim, A. G.-E., Cheng, K. & Marbán, E. Exosomes as Critical Agents of Cardiac Regeneration Triggered by Cell Therapy. *Stem Cell Reports* 2, 606–619 (2014).
- 59. Bushby, K. *et al.* Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: implementation of multidisciplinary care. *Lancet Neurol.* **9**, 177–189 (2010).
- 60. Brumbaugh, D. *et al.* Nutritional and Gastrointestinal Management of the Patient With Duchenne Muscular Dystrophy. *Pediatrics* **142**, S53–S61 (2018).
- Ward, L. M., Hadjiyannakis, S., McMillan, H. J., Noritz, G. & Weber, D. R. Bone Health and Osteoporosis Management of the Patient With Duchenne Muscular Dystrophy. *Pediatrics* 142, S34–S42 (2018).
- 62. Mendell, J. R. *et al.* Randomized, Double-Blind Six-Month Trial of Prednisone in Duchenne's Muscular Dystrophy. *N. Engl. J. Med.* **320**, 1592–1597 (1989).
- 63. Griggs, R. C. et al. Prednisone in Duchenne Dystrophy. Arch. Neurol. 48, 383 (1991).
- 64. Brooke, M. H. Clinical Investigation of Duchenne Muscular Dystrophy. *Arch. Neurol.*44, 812 (1987).
- 65. Tinsley, J. M. *et al.* Primary structure of dystrophin-related protein. *Nature* **360**, 591–593 (1992).
- Manzur, A. Y., Kuntzer, T., Pike, M. & Swan, A. V. Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy. in *Cochrane Database of Systematic Reviews* (ed. Manzur, A. Y.) CD003725 (John Wiley & Sons, Ltd, 2008). doi:10.1002/14651858.CD003725.pub3
- 67. Bonifati, M. D. *et al.* A multicenter, double-blind, randomized trial of deflazacort versus prednisone in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* **23**, 1344–1347 (2000).
- Markham, L. W., Kinnett, K., Wong, B. L., Woodrow Benson, D. & Cripe, L. H. Corticosteroid treatment retards development of ventricular dysfunction in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* 18, 365–370 (2008).
- Rice, M. L., Wong, B., Horn, P. S. & Yang, M. B. Cataract development associated with long-term glucocorticoid therapy in Duchenne muscular dystrophy patients. *J. Am. Assoc. Pediatr. Ophthalmol. Strabismus* 22, 192–196 (2018).
- Brignol, T. N., Fort, P. E., Ventura, D. F., Tadayoni, R. & Rendon, A. Cataract development associated with long-term glucocorticoid therapy in Duchenne muscular dystrophy patients. J. Am. Assoc. Pediatr. Ophthalmol. Strabismus 22, 483–484 (2018).
- 71. Joseph, S. *et al.* Fractures and Linear Growth in a Nationwide Cohort of Boys With Duchenne Muscular Dystrophy With and Without Glucocorticoid Treatment. *JAMA*

Neurol. 76, 701 (2019).

- 72. Escolar, D. M. *et al.* Randomized, blinded trial of weekend vs daily prednisone in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* **77**, 444–452 (2011).
- WMS World Muscle Society. Available at: https://www.worldmusclesociety.org/.
 (Accessed: 8th August 2019)
- 74. DMD: étude d'histoire naturelle | AFM-Téléthon. Available at: https://www.afm-telethon.fr/dystrophie-musculaire-duchenne-etude-histoire-naturelle-46260. (Accessed: 8th August 2019)
- 75. Thangarajh, M. *et al.* Neurodevelopmental Needs in Young Boys with Duchenne Muscular Dystrophy (DMD): Observations from the Cooperative International Neuromuscular Research Group (CINRG) DMD Natural History Study (DNHS). *PLoS Curr.* 10, (2018).
- 76. B Krag, T. O. et al. Heregulin ameliorates the dystrophic phenotype in mdx mice. (2004).
- Tinsley, J., Robinson, N. & Davies, K. E. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of SMT C1100, a 2-arylbenzoxazole utrophin modulator, following single- and multipledose administration to healthy male adult volunteers. *J. Clin. Pharmacol.* 55, 698–707 (2015).
- 78. Avery, M. Summit Therapeutics plc. (2018).
- PoC Study to Assess Activity and Safety of SMT C1100 (Ezutromid) in Boys With DMD
 Full Text View ClinicalTrials.gov. Available at: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02858362. (Accessed: 9th August 2019)
- 80. Bogdanovich, S. *et al.* Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature* **420**, 418–421 (2002).
- 81. Wagner, K. R. et al. A phase I/IItrial of MYO-029 in adult subjects with muscular dystrophy. Ann. Neurol. 63, 561–571 (2008).
- Borchies, O. M. *et al.* The Anticancer Drug Tamoxifen Counteracts the Pathology in a Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy. *Am. J. Pathol.* 182, 485–504 (2013).
- 83. Tamoxifen in Duchenne Muscular Dystrophy Full Text View ClinicalTrials.gov. Available https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03354039?term=TAMDMD&rank=1. (Accessed: 8th August 2019)
- Trial of Pamrevlumab (FG-3019), in Non-Ambulatory Subjects With Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02606136?term=NCT02606136&rank=1.

(Accessed: 8th August 2019)

- 85. FibroGen Receives Orphan Drug Designation from the U.S. FDA For Pamrevlumab for the Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy Nasdaq:FGEN. Available at: https://www.globenewswire.com/news-release/2019/04/15/1803865/0/en/FibroGen-Receives-Orphan-Drug-Designation-from-the-U-S-FDA-For-Pamrevlumab-for-the-Treatment-of-Duchenne-Muscular-Dystrophy.html?culture=en-us. (Accessed: 8th August 2019)
- Barthélémy, I. *et al.* Effects of an Immunosuppressive Treatment in the GRMD Dog Model of Duchenne Muscular Dystrophy. *PLoS One* 7, e48478 (2012).
- Kirschner, J. *et al.* Treatment of Duchenne muscular dystrophy with ciclosporin A: a randomised, double-blind, placebo-controlled multicentre trial. *Lancet Neurol.* 9, 1053–1059 (2010).
- Finanger, E. *et al.* Phase 1 Study of Edasalonexent (CAT-1004), an Oral NF-κB Inhibitor, in Pediatric Patients with Duchenne Muscular Dystrophy. *J. Neuromuscul. Dis.* 6, 43–54 (2019).
- Glass, D. J. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 1974–1984 (2005).
- Conklin, L. S. *et al.* Phase IIa trial in Duchenne muscular dystrophy shows vamorolone is a first-in-class dissociative steroidal anti-inflammatory drug. *Pharmacol. Res.* 136, 140–150 (2018).
- 91. Whitehead, N. P., Pham, C., Gervasio, O. L. & Allen, D. G. Acetylcysteine ameliorates skeletal muscle pathophysiology in mdx mice. *J. Physiol.* **586**, 2003–2014 (2008).
- 92. Buyse, G. M. *et al.* Efficacy of idebenone on respiratory function in patients with Duchenne muscular dystrophy not using glucocorticoids (DELOS): a double-blind randomised placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet (London, England)* 385, 1748–1757 (2015).
- 93. Nebivolol for the Prevention of Left Ventricular Systolic Dysfunction in Patients With Duchenne Muscular Dystrophy - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01648634?term=nébidys&rank=1. (Accessed: 8th August 2019)
- 94. Therapeutic Potential for Aldosterone Inhibition in Duchenne Muscular Dystrophy Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02354352?term=eplerenone+DMD&rank=2. (Accessed: 8th August 2019)

- 95. Rimeporide in Patients With Duchenne Muscular Dystrophy Study Results ClinicalTrials.gov. Available at: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT02710591?term=rimeporide+DMD&ran k=1. (Accessed: 8th August 2019)
- 96. Beiras-Fernandez, A. *et al.* Levosimendan as rescue therapy in low output syndrome after cardiac surgery: effects and predictors of outcome. *J. Int. Med. Res.* 030006051983508 (2019). doi:10.1177/0300060519835087
- 97. Hanff, E. *et al.* Effects of single and combined metformin and l-citrulline supplementation on l-arginine-related pathways in Becker muscular dystrophy patients: possible biochemical and clinical implications. *Amino Acids* 50, 1391–1406 (2018).
- Hafner, P. *et al.* Treatment with 1-citrulline and metformin in Duchenne muscular dystrophy: study protocol for a single-centre, randomised, placebo-controlled trial. *Trials* 17, 389 (2016).
- 99. Myopathie de Duchenne: essai du givinostat | AFM-Téléthon. Available at: https://www.afm-telethon.fr/myopathie-duchenne-essai-givinostat-111946. (Accessed: 8th August 2019)
- Rizzuto, E., Catizone, A., Musarò, A. & Del Prete, Z. Dystrophic tendon functionality is recovered by muscle-specific expression of insulin-like growth factor in mdx mice. *J. Biomech.* 46, 604–607 (2013).
- 101. Pichavant, C. *et al.* Current Status of Pharmaceutical and Genetic Therapeutic Approaches to Treat DMD. *Mol. Ther.* **19**, 830–840 (2011).
- Aartsma-Rus, A., den Dunnen, J. T. & van Ommen, G.-J. B. New insights in genederived therapy: the example of Duchenne muscular dystrophy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1214, 199–212 (2010).
- Welch, E. M. *et al.* PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* 447, 87–91 (2007).
- 104. EMA Translarna, Ataluren. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/translarna. (Accessed: 8th August 2019)
- 105. HAS. HAS ATALUREN.
- 106. Krahn, M. & Lévy, N. Perspective thérapeutiques pour les maladies génétiques. (2012).
 Available at: http://campus.cerimes.fr/genetiquemedicale/enseignement/genetique15/site/html/1.html. (Accessed: 6th September 2019)
- 107. Ebrahimi-Fakhari, D. et al. Off-Label Use of Ataluren in Four Non-ambulatory Patients

With Duchenne Muscular Dystrophy: Effects on Cardiac and Pulmonary Function and Muscle Strength. *Front. Pediatr.* **6**, 316 (2018).

- Ruggiero, L. *et al.* One-year follow up of three Italian patients with Duchenne muscular dystrophy treated with ataluren: is earlier better? *Ther. Adv. Neurol. Disord.* 11, 1756286418809588 (2018).
- 109. Thérapie génique | Inserm La science pour la santé. Available at: https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/therapie-genique. (Accessed: 8th August 2019)
- Daya, S. & Berns, K. I. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin. Microbiol. Rev.* 21, 583–93 (2008).
- 111. Tennyson, C. N., Klamut, H. J. & Worton, R. G. The human dystrophin gene requires 16 hours to be transcribed and is cotranscriptionally spliced. *Nat. Genet.* 9, 184–190 (1995).
- Martin, P. T. *et al.* Overexpression of Galgt2 in skeletal muscle prevents injury resulting from eccentric contractions in both mdx and wild-type mice. *Am. J. Physiol. Physiol.* 296, C476–C488 (2009).
- Xu, R., Jia, Y., Zygmunt, D. A. & Martin, P. T. rAAVrh74.MCK.GALGT2 Protects against Loss of Hemodynamic Function in the Aging mdx Mouse Heart. *Mol. Ther.* 27, 636–649 (2019).
- 114. clinicaltrials.gov. Gene Transfer Clinical Trial to Deliver rAAVrh74.MCK.GALGT2 for Duchenne Muscular Dystrophy. (2019). Available at: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03333590?term=GALGT2+DMD&rank=1. (Accessed: 8th August 2019)
- 115. Aartsma-Rus, A. & van Ommen, G.-J. B. Progress in therapeutic antisense applications for neuromuscular disorders. *Eur. J. Hum. Genet.* **18**, 146–153 (2010).
- Aoki, Y., Yokota, T. & Wood, M. J. A. Development of Multiexon Skipping Antisense Oligonucleotide Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *Biomed Res. Int.* 2013, 1– 8 (2013).
- 117. Koulikoff, F. Schéma de la technique du saut d'exon. (2012). Available at: https://edutheque.inserm.fr/ressources/schema-de-la-technique-du-saut-d-exon. (Accessed: 6th September 2019)
- 118. Aartsma-Rus, A. & Goemans, N. A Sequel to the Eteplirsen Saga: Eteplirsen Is Approved in the United States but Was Not Approved in Europe. *Nucleic Acid Ther.* 29, 13–15 (2019).

- Khan, N. *et al.* Eteplirsen Treatment Attenuates Respiratory Decline in Ambulatory and Non-Ambulatory Patients with Duchenne Muscular Dystrophy. *J. Neuromuscul. Dis.* 6, 213–225 (2019).
- 120. Wave Life Sciences Announces Suvodirsen Phase 1 Safety and Tolerability Data and Phase 2/3 Clinical Trial Design Nasdaq:WVE. Available at: https://www.globenewswire.com/news-release/2019/04/16/1804578/0/en/Wave-Life-Sciences-Announces-Suvodirsen-Phase-1-Safety-and-Tolerability-Data-and-Phase-2-3-Clinical-Trial-Design.html. (Accessed: 8th August 2019)
- 121. Sarepta Announces Positive Expression Results from the Casimersen (SRP-4045) Arm of ESSENCE Study - Parent Project Muscular Dystrophy. Available at: https://www.parentprojectmd.org/sarepta-therapeutics-announces-positive-expressionresults-from-the-casimersen-srp-4045-arm-of-the-essence-study/. (Accessed: 8th August 2019)
- Study of DS-5141b in Patients With Duchenne Muscular Dystrophy Full Text View -ClinicalTrials.gov. Available at: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02667483?term=DS-5141b&rank=1. (Accessed: 8th August 2019)
- 123. Sarepta Therapeutics Announces Positive Results in Its Study Evaluating Gene Expression, Dystrophin Production, and Dystrophin Localization in Patients with Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) Amenable to Skipping Exon 53 Treated with Golodirsen (SRP-4053) | Sarepta Therapeutics. Available at: https://investorrelations.sarepta.com/news-releases/news-release-details/sarepta-therapeutics-announces-positive-results-its-study. (Accessed: 8th August 2019)
- 124. Extension Study of NS-065/NCNP-01 in Boys With Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) Full Text View ClinicalTrials.gov. Available at: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03167255?term=NS-065%2FNCNP-01&rank=1. (Accessed: 8th August 2019)
- 125. A Study to Evaluate the Safety and Tolerability of PF-06939926 Gene Therapy in Duchenne Muscular Dystrophy - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03362502?term=PF-06939926&rank=1. (Accessed: 8th August 2019)
- 126. Solid Biosciences Announces Preliminary SGT-001 Data and Intention to Dose Escalate in IGNITE DMD Clinical Trial for Duchenne Muscular Dystrophy | Solid Biosciences Inc. Available at: https://investors.solidbio.com/news-releases/news-release-
details/solid-biosciences-announces-preliminary-sgt-001-data-and. (Accessed: 8th August 2019)

- Jiang, F. & Doudna, J. A. CRISPR–Cas9 Structures and Mechanisms. Annu. Rev. Biophys. 46, 505–529 (2017).
- Min, Y.-L., Bassel-Duby, R. & Olson, E. N. CRISPR Correction of Duchenne Muscular Dystrophy. *Annu. Rev. Med.* 70, 239–255 (2019).
- Pr. Hornby, D. Molecular Surgery with CRISPR-Cas9 | The Manchester Literary and Philosophical Society. (2019). Available at: https://www.manlitphil.ac.uk/events/molecular-surgery-crispr-cas9. (Accessed: 6th September 2019)
- 130. Hakim, C. H. *et al.* AAV CRISPR editing rescues cardiac and muscle function for 18 months in dystrophic mice. *JCI Insight* **3**, (2018).
- Amoasii, L. *et al.* Gene editing restores dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Science (80-.).* 362, 86–91 (2018).
- 132. Young, C. S., Mokhonova, E., Quinonez, M., Pyle, A. D. & Spencer, M. J. Creation of a Novel Humanized Dystrophic Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy and Application of a CRISPR/Cas9 Gene Editing Therapy. *J. Neuromuscul. Dis.* 4, 139–145 (2017).
- 133. Thérapie cellulaire | Inserm La science pour la santé. Available at: https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/therapie-cellulaire. (Accessed: 29th August 2019)
- 134. Hanna, E., Rémuzat, C., Auquier, P. & Toumi, M. Advanced therapy medicinal products: current and future perspectives. *J. Mark. Access Heal. Policy* **4**, 31036 (2016).
- 135. Koch, T. G., Berg, L. C. & Betts, D. H. Current and future regenerative medicine principles, concepts, and therapeutic use of stem cell therapy and tissue engineering in equine medicine. *Can. Vet. J. = La Rev. Vet. Can.* **50**, 155–65 (2009).
- Smith, D. M. Assessing commercial opportunities for autologous and allogeneic cellbased products. *Regen. Med.* 7, 721–732 (2012).
- Mason, C. & Dunnill, P. Assessing the value of autologous and allogeneic cells for regenerative medicine. *Regen. Med.* 4, 835–853 (2009).
- Karantalis, V., Schulman, I. H., Balkan, W. & Hare, J. M. Allogeneic cell therapy: a new paradigm in therapeutics. *Circ. Res.* 116, 12–5 (2015).
- 139. Carticel (Autologous Cultured Chondrocytes for Implantation): Side Effects, Interactions, Warning, Dosage & amp; Uses. Available at:

https://www.rxlist.com/carticel-drug.htm. (Accessed: 29th August 2019)

- Europe approves Holoclar®, the first stem cell-based medicinal product | Eurostemcell.
 Available at: https://www.eurostemcell.org/fr/node/122. (Accessed: 29th August 2019)
- 141. CHMP. Alofisel : Résumé EPAR à l'intention du public EMA. (2018).
- 142. Search of: cell therapy | Recruiting, Active, not recruiting Studies | Phase 2, 3 List Results - ClinicalTrials.gov. Available at: https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=cell+therapy&recrs=a&recrs=d&age_v=&gn dr=&type=&rslt=&phase=1&phase=2&Search=Apply. (Accessed: 28th August 2019)
- 143. Magalon, J. *et al.* Thérapie cellulaire et cellules souches en 2018. *Rev. Francoph. des Lab.* 2018, 34–43 (2018).
- 144. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **126**, 663–676 (2006).
- Takahashi, K. *et al.* Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* 131, 861–872 (2007).
- Jankowski, R. J., Deasy, B. M. & Huard, J. Muscle-derived stem cells. *Gene Ther.* 9, 642–647 (2002).
- Clouet, J., Hamel, O., Colombier, P., Guicheux, J. & Lescaudron, L. La médecine régénératrice du disque intervertébral : panacée ou illusion ? *Rev. du Rhum. Monogr.* 80, 260–265 (2013).
- 148. Bartholomew, A. *et al.* Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp. Hematol.* **30**, 42–8 (2002).
- 149. Larghero, J. *et al.* Cellules souches mésenchymateuses et immunomodulation : vers de nouvelles stratégies immunosuppressives pour le traitement des maladies autoimmunes ? *La Rev. Médecine Interne* **30**, 287–299 (2009).
- 150. Djouad, F. *et al.* Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* **102**, 3837–3844 (2003).
- Meisel, R. *et al.* Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 103, 4619– 4621 (2004).
- 152. Parker, A. M. & Katz, A. J. Adipose-derived stem cells for the regeneration of damaged tissues. *Expert Opin. Biol. Ther.* **6**, 567–578 (2006).
- Strem, B. M. *et al.* Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J. Med.* 54, 132–41 (2005).
- 154. Merceron, C. et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells and biomaterials for

cartilage tissue engineering. Joint. Bone. Spine 75, 672-4 (2008).

- Zuk, P. A. *et al.* Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. *Tissue Eng.* 7, 211–228 (2001).
- 156. Frese, L., Dijkman, P. E. & Hoerstrup, S. P. Adipose Tissue-Derived Stem Cells in Regenerative Medicine. *Transfus. Med. Hemotherapy* 43, 268–274 (2016).
- Moss, F. P. & Leblond, C. P. Nature of dividing nuclei in skeletal muscle of growing rats. J. Cell Biol. 44, 459–62 (1970).
- Yin, H., Price, F. & Rudnicki, M. A. Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol. Rev.* 93, 23–67 (2013).
- 159. Negroni, E. *et al.* Invited review: Stem cells and muscle diseases: advances in cell therapy strategies. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **41**, 270–287 (2015).
- Hawke, T. J. & Garry, D. J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. J. Appl. Physiol. 91, 534–551 (2001).
- Negroni, E., Butler-Browne, G. S. & Mouly, V. Myogenic stem cells: regeneration and cell therapy in human skeletal muscle. *Pathol. Biol.* 54, 100–108 (2006).
- 162. Robbins, S. L. (Stanley L., Kumar, V. & Cotran, R. S. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. Chap 1: Cellular Responses to Stress and Toxic Insults: Adaptation, Injury, and Death. Cellular Responses to Stress and Toxic Insults : Adaptation, Injury and Death. (Saunders/Elsevier, 2010).
- Chazaud, B., Chrétien, F. & Gherardi, R. K. Les macrophages régulent les différentes phases de la régénération musculaire. *médecine/sciences* 23, 794–795 (2007).
- Law, P. K., Goodwin, T. G. & Wang, M. G. Normal myoblast injections provide genetic treatment for murine dystrophy. *Muscle Nerve* 11, 525–533 (1988).
- 165. Partridge, T. A., Morgan, J. E., Coulton, G. R., Hoffman, E. P. & Kunkel, L. M. Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts. *Nature* 337, 176–179 (1989).
- 166. Gussoni, E. *et al.* Normal dystrophin transcripts detected in Duchenne muscular dystrophy patients after myoblast transplantation. *Nature* **356**, 435–8 (1992).
- 167. Mendell, J. R. et al. Myoblast transfer in the treatment of Duchenne's muscular dystrophy. N. Engl. J. Med. 333, 832-8 (1995).
- Miller, R. G. *et al.* Myoblast implantation in Duchenne muscular dystrophy: the San Francisco study. *Muscle Nerve* 20, 469–78 (1997).
- 169. Beauchamp, J. R., Morgan, J. E., Pagel, C. N. & Partridge, T. A. Dynamics of myoblast transplantation reveal a discrete minority of precursors with stem cell-like properties as

the myogenic source. J. Cell Biol. 144, 1113–22 (1999).

- 170. Meregalli, M., Farini, A., Colleoni, F., Cassinelli, L. & Torrente, Y. The role of stem cells in muscular dystrophies. *Curr. Gene Ther.* **12**, 192–205 (2012).
- Riederer, I. *et al.* Slowing Down Differentiation of Engrafted Human Myoblasts Into Immunodeficient Mice Correlates With Increased Proliferation and Migration. *Mol. Ther.* 20, 146–154 (2012).
- Alessandri, G. *et al.* Isolation and culture of human muscle-derived stem cells able to differentiate into myogenic and neurogenic cell lineages. *Lancet (London, England)* 364, 1872–83 (2004).
- Gharaibeh, B. *et al.* Isolation of a slowly adhering cell fraction containing stem cells from murine skeletal muscle by the preplate technique. *Nat. Protoc.* 3, 1501–9 (2008).
- 174. Chirieleison, S. M., Feduska, J. M., Schugar, R. C., Askew, Y. & Deasy, B. M. Human Muscle-Derived Cell Populations Isolated by Differential Adhesion Rates: Phenotype and Contribution to Skeletal Muscle Regeneration in Mdx/SCID Mice. *Tissue Eng. Part A* 18, 232–241 (2012).
- 175. Crisan, M. *et al.* A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* **3**, 301–13 (2008).
- Dellavalle, A. *et al.* Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat. Cell Biol.* 9, 255–67 (2007).
- 177. Cossu, G. *et al.* Intra-arterial transplantation of HLA -matched donor mesoangioblasts in Duchenne muscular dystrophy. *EMBO Mol. Med.* **7**, 1513–1528 (2015).
- 178. Tamaki, T. *et al.* Identification of myogenic-endothelial progenitor cells in the interstitial spaces of skeletal muscle. *J. Cell Biol.* **157**, 571–7 (2002).
- Tamaki, T. *et al.* Synchronized reconstitution of muscle fibers, peripheral nerves and blood vessels by murine skeletal muscle-derived CD34(-)/45 (-) cells. *Histochem. Cell Biol.* 128, 349–60 (2007).
- Torrente, Y. *et al.* Human circulating AC133+ stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle. *J. Clin. Invest.* 114, 182–195 (2004).
- Torrente, Y. *et al.* Autologous Transplantation of Muscle-Derived CD133+ Stem Cells in Duchenne Muscle Patients. *Cell Transplant.* 16, 563–577 (2007).
- 182. Mitchell, K. J. *et al.* Identification and characterization of a non-satellite cell muscle resident progenitor during postnatal development. *Nat. Cell Biol.* **12**, 257–66 (2010).
- 183. Taylor, M. et al. Cardiac and skeletal muscle effects in the randomized HOPE-Duchenne

trial. Neurology 92, e866-e878 (2019).

- 184. Abramson, S., Miller, R. G. & Phillips, R. A. The identification in adult bone marrow of pluripotent and restricted stem cells of the myeloid and lymphoid systems. *J. Exp. Med.* 145, 1567–1579 (1977).
- Domen, J., Wagers, A. & Weissman, I. L. Bone marrow (hematopoeitic) stem cells. *Regen. Med.* (2006).
- Fukada, S. *et al.* Muscle regeneration by reconstitution with bone marrow or fetal liver cells from green fluorescent protein-gene transgenic mice. *J. Cell Sci.* 115, 1285–93 (2002).
- Ferrari, G. *et al.* Muscle Regeneration by Bone Marrow-Derived Myogenic Progenitors. *Science (80-.).* 279, 1528–1530 (1998).
- Dell'Agnola, C. *et al.* Hematopoietic stem cell transplantation does not restore dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy dogs. *Blood* 104, 4311–4318 (2004).
- Kuhr, C. S., Lupu, M. & Storb, R. Hematopoietic Cell Transplantation Directly into Dystrophic Muscle Fails to Reconstitute Satellite Cells and Myofibers. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 13, 886–888 (2007).
- 190. Kirschstein, R. & Skirboll, L. R. Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions. (2001).
- Rodriguez, A.-M. *et al.* Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J. Exp. Med.* 201, 1397–1405 (2005).
- 192. Vieira, N. M. *et al.* Human Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells Injected Systemically into GRMD Dogs without Immunosuppression are Able to Reach the Host Muscle and Express Human Dystrophin. *Cell Transplant.* 21, 1407–1417 (2012).
- 193. Gang, E. J. *et al.* Engraftment of mesenchymal stem cells into dystrophin-deficient mice is not accompanied by functional recovery. *Exp. Cell Res.* **315**, 2624–2636 (2009).
- 194. Menasché, P. Vésicules extra cellulaires : nouveaux agents thérapeu-tiques pour la réparation cardiaque ?
- 195. Timmers, L. *et al.* Reduction of myocardial infarct size by human mesenchymal stem cell conditioned medium. *Stem Cell Res.* **1**, 129–137 (2008).
- 196. Mirotsou, M., Jayawardena, T. M., Schmeckpeper, J., Gnecchi, M. & Dzau, V. J. Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart. J. Mol. Cell. Cardiol. 50, 280–289 (2011).

- 197. Valadi, H. *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* **9**, 654–659 (2007).
- 198. Vrijsen, K. R. *et al.* Cardiomyocyte progenitor cell-derived exosomes stimulate migration of endothelial cells. *J. Cell. Mol. Med.* **14**, no-no (2010).
- Sahoo, S. *et al.* Exosomes From Human CD34 ⁺ Stem Cells Mediate Their Proangiogenic Paracrine Activity. *Circ. Res.* 109, 724–728 (2011).
- Akers, J. C., Gonda, D., Kim, R., Carter, B. S. & Chen, C. C. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J. Neurooncol.* 113, 1–11 (2013).
- 201. Colombo, M., Raposo, G. & Théry, C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30, 255–289 (2014).
- Lawson, C., Vicencio, J. M., Yellon, D. M. & Davidson, S. M. Microvesicles and exosomes: new players in metabolic and cardiovascular disease. *J. Endocrinol.* 228, R57–R71 (2016).
- 203. Devhare, P. B. & Ray, R. B. Extracellular vesicles: Novel mediator for cell to cell communications in liver pathogenesis. *Mol. Aspects Med.* **60**, 115–122 (2018).
- 204. Kervadec, A. Évaluation des vésicules extracellulaires dérivées de cellules cardiaques humaines comme une alternative à la greffe des cellules : applications dans un modèle d'insuffisance cardiaque chronique. *http://www.theses.fr* (2017).
- 205. van der Pol, E., Böing, A. N., Harrison, P., Sturk, A. & Nieuwland, R. Classification, Functions, and Clinical Relevance of Extracellular Vesicles. *Pharmacol. Rev.* 64, 676– 705 (2012).
- 206. Lötvall, J. *et al.* Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J. Extracell. Vesicles* 3, 26913 (2014).
- 207. Théry, C. et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. J. Extracell. Vesicles 7, 1535750 (2018).
- Wahlgren, J. *et al.* Plasma exosomes can deliver exogenous short interfering RNA to monocytes and lymphocytes. *Nucleic Acids Res.* 40, e130–e130 (2012).
- 209. Ogawa, Y., Taketomi, Y., Murakami, M., Tsujimoto, M. & Yanoshita, R. Small RNA Transcriptomes of Two Types of Exosomes in Human Whole Saliva Determined by Next

Generation Sequencing. Biol. Pharm. Bull. 36, 66–75 (2013).

- Yoon, Y. J., Kim, O. Y. & Gho, Y. S. Extracellular vesicles as emerging intercellular communicasomes. *BMB Rep.* 47, 531–9 (2014).
- Kalluri, R. & LeBleu, V. S. Discovery of Double-Stranded Genomic DNA in Circulating Exosomes. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 81, 275–280 (2016).
- Cantaluppi, V. *et al.* Microvesicles derived from endothelial progenitor cells protect the kidney from ischemia–reperfusion injury by microRNA-dependent reprogramming of resident renal cells. *Kidney Int.* 82, 412–427 (2012).
- 213. Villarroya-Beltri, C. *et al.* Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat. Commun.* **4**, 2980 (2013).
- 214. Choi, D.-S., Kim, D.-K., Kim, Y.-K. & Gho, Y. S. Proteomics, transcriptomics and lipidomics of exosomes and ectosomes. *Proteomics* **13**, 1554–1571 (2013).
- Théry, C., Ostrowski, M. & Segura, E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 581–593 (2009).
- Durcin, M. *et al.* Characterisation of adipocyte-derived extracellular vesicle subtypes identifies distinct protein and lipid signatures for large and small extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles* 6, 1305677 (2017).
- 217. Colombo, M., Raposo, G. & Théry, C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30, 255–289 (2014).
- 218. Kim, C. W. *et al.* Extracellular membrane vesicles from tumor cells promote angiogenesis via sphingomyelin. *Cancer Res.* **62**, 6312–7 (2002).
- 219. Subra, C. *et al.* Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. *J. Lipid Res.* **51**, 2105–2120 (2010).
- 220. Kowal, J. *et al.* Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E968-77 (2016).
- 221. Linares, R., Tan, S., Gounou, C., Arraud, N. & Brisson, A. R. High-speed centrifugation induces aggregation of extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles* **4**, 29509 (2015).
- 222. Urbanelli, L. et al. Signaling Pathways in Exosomes Biogenesis, Secretion and Fate. Genes (Basel). 4, 152 (2013).
- 223. Feng, D. et al. Cellular Internalization of Exosomes Occurs Through Phagocytosis. Traffic 11, 675–687 (2010).
- 224. Kao, C.-Y. & Papoutsakis, E. T. Extracellular vesicles: exosomes, microparticles, their

parts, and their targets to enable their biomanufacturing and clinical applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* **60**, 89–98 (2019).

- 225. Tseliou, E. *et al.* Fibroblasts Rendered Antifibrotic, Antiapoptotic, and Angiogenic by Priming With Cardiosphere-Derived Extracellular Membrane Vesicles. *J. Am. Coll. Cardiol.* 66, 599–611 (2015).
- 226. Tkach, M. *et al.* Qualitative differences in T-cell activation by dendritic cell-derived extracellular vesicle subtypes. *EMBO J.* **36**, 3012–3028 (2017).
- Deregibus, M. C. *et al.* Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood* 110, 2440–8 (2007).
- 228. Webber, J., Steadman, R., Mason, M. D., Tabi, Z. & Clayton, A. Cancer Exosomes Trigger Fibroblast to Myofibroblast Differentiation. *Cancer Res.* **70**, 9621–9630 (2010).
- 229. Vlassov, A. V., Magdaleno, S., Setterquist, R. & Conrad, R. Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1820, 940–948 (2012).
- Lai, R. C., Yeo, R. W. Y. & Lim, S. K. Mesenchymal stem cell exosomes. Semin. Cell Dev. Biol. 40, 82–88 (2015).
- Ohno, S. *et al.* Focus on Extracellular Vesicles: Development of Extracellular Vesicle-Based Therapeutic Systems. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 172 (2016).
- 232. Akao, Y. et al. Microvesicle-mediated RNA Molecule Delivery System Using Monocytes/Macrophages. Mol. Ther. 19, 395–399 (2011).
- 233. Zhang, Y. *et al.* Microvesicle-mediated delivery of transforming growth factor β 1 siRNA for the suppression of tumor growth in mice. *Biomaterials* **35**, 4390–4400 (2014).
- Ohno, S. *et al.* Systemically Injected Exosomes Targeted to EGFR Deliver Antitumor MicroRNA to Breast Cancer Cells. *Mol. Ther.* 21, 185–191 (2013).
- Budoni, M. *et al.* The Immunosuppressive Effect of Mesenchymal Stromal Cells on B Lymphocytes is Mediated by Membrane Vesicles. *Cell Transplant.* 22, 369–379 (2013).
- 236. Kervadec, A. *et al.* Cardiovascular progenitor-derived extracellular vesicles recapitulate the beneficial effects of their parent cells in the treatment of chronic heart failure. *J. Hear. Lung Transplant.* 35, 795–807 (2016).
- 237. Sharma, S. *et al.* A Deep Proteome Analysis Identifies the Complete Secretome as the Functional Unit of Human Cardiac Progenitor Cells. *Circ. Res.* **120**, 816–834 (2017).
- 238. Barile, L. et al. Extracellular vesicles from human cardiac progenitor cells inhibit cardiomyocyte apoptosis and improve cardiac function after myocardial infarction.

Cardiovasc. Res. 103, 530–541 (2014).

- 239. Cervio, E., Barile, L., Moccetti, T. & Vassalli, G. Exosomes for Intramyocardial Intercellular Communication. *Stem Cells Int.* **2015**, (2015).
- 240. Mathiyalagan, P. *et al.* Angiogenic Mechanisms of Human CD34 ⁺ Stem Cell Exosomes in the Repair of Ischemic Hindlimb. *Circ. Res.* **120**, 1466–1476 (2017).
- 241. Doeppner, T. R., Bähr, M., Hermann, D. M. & Giebel, B. Concise Review: Extracellular Vesicles Overcoming Limitations of Cell Therapies in Ischemic Stroke. *Stem Cells Transl. Med.* 6, 2044–2052 (2017).
- Haga, H., Yan, I. K., Takahashi, K., Matsuda, A. & Patel, T. Extracellular Vesicles from Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Improve Survival from Lethal Hepatic Failure in Mice. *Stem Cells Transl. Med.* 6, 1262–1272 (2017).
- Shigemoto-Kuroda, T. *et al.* MSC-derived Extracellular Vesicles Attenuate Immune Responses in Two Autoimmune Murine Models: Type 1 Diabetes and Uveoretinitis. *Stem Cell Reports* 8, 1214–1225 (2017).
- 244. Chen, B., Li, Q., Zhao, B. & Wang, Y. Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles as a Novel Potential Therapeutic Tool for Tissue Repair. *Stem Cells Transl. Med.* 6, 1753– 1758 (2017).
- 245. Barile, L., Milano, G. & Vassalli, G. Beneficial effects of exosomes secreted by cardiacderived progenitor cells and other cell types in myocardial ischemia. *Stem cell Investig.* 4, 93 (2017).
- 246. Katsuda, T. *et al.* Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells secrete functional neprilysin-bound exosomes. *Sci. Rep.* **3**, 1197 (2013).
- 247. Akers, J. C. *et al.* Optimizing preservation of extracellular vesicular miRNAs derived from clinical cerebrospinal fluid. *Cancer Biomarkers* **17**, 125–132 (2016).
- Abramowicz, A., Widłak, P. & Pietrowska, M. Different Types of Cellular Stress Affect the Proteome Composition of Small Extracellular Vesicles: A Mini Review. *Proteomes* 7, (2019).
- 249. Lener, T. *et al.* Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials an ISEV position paper. *J. Extracell. Vesicles* **4**, 30087 (2015).
- Xu, R., Greening, D. W., Zhu, H.-J., Takahashi, N. & Simpson, R. J. Extracellular vesicle isolation and characterization: toward clinical application. *J. Clin. Invest.* 126, 1152–1162 (2016).
- 251. Di Rocco, G., Baldari, S. & Toietta, G. Towards Therapeutic Delivery of Extracellular Vesicles: Strategies for In Vivo Tracking and Biodistribution Analysis. *Stem Cells Int.*

2016, 5029619 (2016).

- Rouger, K. *et al.* Systemic Delivery of Allogenic Muscle Stem Cells Induces Long-Term Muscle Repair and Clinical Efficacy in Duchenne Muscular Dystrophy Dogs. *Am. J. Pathol.* 179, 2501–2518 (2011).
- 253. Lorant, J. *et al.* Human MuStem cells, a promising therapeutic candidate for muscular dystrophies with immunomodulatory properties. np (2016).
- 254. Lardenois, A. *et al.* Quantitative proteome profiling of dystrophic dog skeletal muscle reveals a stabilized muscular architecture and protection against oxidative stress after systemic delivery of MuStem cells. *Proteomics* **16**, 2028–2042 (2016).
- 255. Robriquet, F. *et al.* Differential Gene Expression Profiling of Dystrophic Dog Muscle after MuStem Cell Transplantation. *PLoS One* **10**, e0123336 (2015).
- 256. Robriquet, F. *et al.* Identification in GRMD dog muscle of critical miRNAs involved in pathophysiology and effects associated with MuStem cell transplantation. *BMC Musculoskelet. Disord.* 17, 209 (2016).
- 257. Chinen, J. & Buckley, R. H. Transplantation immunology: Solid organ and bone marrow.
 J. Allergy Clin. Immunol. 125, S324–S335 (2010).
- 258. Maguire, G. Stem cell therapy without the cells. Commun. Integr. Biol. 6, e26631 (2013).
- 259. Vizoso, F. *et al.* Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 1852 (2017).
- 260. Matsuzaka, Y. *et al.* Characterization and Functional Analysis of Extracellular Vesicles and Muscle-Abundant miRNAs (miR-1, miR-133a, and miR-206) in C2C12 Myocytes and mdx Mice. *PLoS One* **11**, e0167811 (2016).
- 261. Vishnubhatla, I., Corteling, R., Stevanato, L., Hicks, C. & Sinden, J. The Development of Stem Cell-Derived Exosomes as a Cell-Free Regenerative Medicine. J. Circ. Biomarkers 3, 2 (2014).
- Lai, R. C., Yeo, R. W. Y. & Lim, S. K. Mesenchymal stem cell exosomes. Semin. Cell Dev. Biol. 40, 82–88 (2015).
- 263. Nakamura, Y. *et al.* Mesenchymal-stem-cell-derived exosomes accelerate skeletal muscle regeneration. *FEBS Lett.* **589**, 1257–1265 (2015).
- 264. Balbi, C. *et al.* First Characterization of Human Amniotic Fluid Stem Cell Extracellular Vesicles as a Powerful Paracrine Tool Endowed with Regenerative Potential. *Stem Cells Transl. Med.* 6, 1340–1355 (2017).
- 265. Théry, C. Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. *F1000 Biol. Rep.* 3, 15 (2011).

- 266. Simons, M. & Raposo, G. Exosomes vesicular carriers for intercellular communication. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 575–581 (2009).
- 267. Mathivanan, S., Ji, H. & Simpson, R. J. Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *J. Proteomics* **73**, 1907–1920 (2010).
- 268. Collot, M. *et al.* MemBright: A Family of Fluorescent Membrane Probes for Advanced Cellular Imaging and Neuroscience. *Cell Chem. Biol.* **26**, 600-614.e7 (2019).
- 269. Notice EP2861722 Procédé d'isolement de cellules souches et application associée dans la thérapie cellulaire. Available at: https://basesbrevets.inpi.fr/fr/document/EP2861722.html?p=6&s=1568234102243&cHash=3c66fd 11bd503f86faa7270cfcf630c1. (Accessed: 11th September 2019)
- 270. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–75 (1951).
- 271. Roose-Amsaleg, C. *et al.* Utilization of interferometric light microscopy for the rapid analysis of virus abundance in a river. (2017). doi:10.1016/j.resmic.2017.02.004
- Boccara, M. *et al.* Full-field interferometry for counting and differentiating aquatic biotic nanoparticles: from laboratory to Tara Oceans. *Biomed. Opt. Express* 7, 3736–3746 (2016).
- 273. Myriade Imagerie de particules nanométriques. Available at: http://www.myriadelab.com/fr/. (Accessed: 21st April 2019)
- Zhang, H.-C. *et al.* Microvesicles Derived from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Stimulated by Hypoxia Promote Angiogenesis Both In Vitro and In Vivo. *Stem Cells Dev.* 21, 3289–3297 (2012).
- 275. King, H. W., Michael, M. Z. & Gleadle, J. M. Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells. *BMC Cancer* **12**, 421 (2012).
- Chistiakov, D. *et al.* Cardiac Extracellular Vesicles in Normal and Infarcted Heart. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 63 (2016).
- 277. Rannou, A. Impact des cellules souches adultes MuStem sur l'infarctus du myocarde. http://www.theses.fr (Nantes).
- 278. Yu, X. *et al.* Mechanism of TNF-α autocrine effects in hypoxic cardiomyocytes: Initiated by hypoxia inducible factor 1α, presented by exosomes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **53**, 848– 857 (2012).
- 279. Akers, J. C. *et al.* Optimizing preservation of extracellular vesicular miRNAs derived from clinical cerebrospinal fluid. *Cancer Biomarkers* **17**, 125–132 (2016).
- 280. Lőrincz, Á. M. et al. Effect of storage on physical and functional properties of

extracellular vesicles derived from neutrophilic granulocytes. J. Extracell. Vesicles 3, (2014).

- 281. Théry, C. et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. J. Extracell. Vesicles 7, 1535750 (2018).
- 282. GRANGE, C. *et al.* Biodistribution of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in a model of acute kidney injury monitored by optical imaging. *Int. J. Mol. Med.* 33, 1055–1063 (2014).
- Rust, M. J., Bates, M. & Zhuang, X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat. Methods* 3, 793–796 (2006).
- 284. Gangadaran, P., Hong, C. M. & Ahn, B.-C. Current Perspectives on In Vivo Noninvasive Tracking of Extracellular Vesicles with Molecular Imaging. *Biomed Res. Int.* 2017, 1– 11 (2017).
- 285. Tian, T., Wang, Y., Wang, H., Zhu, Z. & Xiao, Z. Visualizing of the cellular uptake and intracellular trafficking of exosomes by live-cell microscopy. J. Cell. Biochem. 111, 488–496 (2010).
- 286. Verweij, F. J. *et al.* Live Tracking of Inter-organ Communication by Endogenous Exosomes In Vivo. *Dev. Cell* **48**, 573-589.e4 (2019).
- 287. Hyenne, V. et al. Studying the Fate of Tumor Extracellular Vesicles at High Spatiotemporal Resolution Using the Zebrafish Embryo. Dev. Cell 48, 554-572.e7 (2019).
- 288. Dougherty, J. A. *et al.* Extracellular Vesicles Released by Human Induced-Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Promote Angiogenesis. *Front. Physiol.* 9, (2018).
- 289. Qin, Y., Wang, L., Gao, Z., Chen, G. & Zhang, C. Bone marrow stromal/stem cellderived extracellular vesicles regulate osteoblast activity and differentiation in vitro and promote bone regeneration in vivo. *Sci. Rep.* 6, 21961 (2016).
- 290. Heinemann, M. L. *et al.* Benchtop isolation and characterization of functional exosomes by sequential filtration. *J. Chromatogr. A* **1371**, 125–135 (2014).
- 291. Jeffrey D. Stewart, Terése L. Masi, Andrew E. Cumming, Gyongyi M. Molnar, Bruce M. Wentworth, Kuber Sampath, John M. McPherson, P. C. Y. Characterization of proliferating human skeletal muscle-derived cells in vitro: Differential modulation of myoblast markers by TGF-β2. *J. Cell. Physiol.* **193**, 70–78 (2003).
- 292. Lai, R. C. et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion

injury. Stem Cell Res. 4, 214–222 (2010).

- 293. Xin, H. *et al.* Systemic Administration of Exosomes Released from Mesenchymal Stromal Cells Promote Functional Recovery and Neurovascular Plasticity After Stroke in Rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **33**, 1711–1715 (2013).
- 294. Gasser, O. & Schifferli, J. A. Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate antiinflammatory microparticles by ectocytosis. *Blood* **104**, 2543–8 (2004).
- 295. González, M. A., Gonzalez–Rey, E., Rico, L., Büscher, D. & Delgado, M. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Alleviate Experimental Colitis by Inhibiting Inflammatory and Autoimmune Responses. *Gastroenterology* **136**, 978–989 (2009).
- 296. Rani, S., Ryan, A. E., Griffin, M. D. & Ritter, T. Mesenchymal Stem Cell-derived Extracellular Vesicles: Toward Cell-free Therapeutic Applications. *Mol. Ther.* 23, 812– 823 (2015).
- 297. Del Fattore, A. *et al.* Immunoregulatory Effects of Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles on T Lymphocytes. *Cell Transplant.* **24**, 2615–2627 (2015).
- 298. Charrier, M. Définition du potentiel thérapeutique des cellules souches adultes MuStem humaines dans le contexte des dystrophies musculaires. *http://www.theses.fr* (Nantes).
- 299. Rannou, A. *et al.* Repair of myocardial infarction with human adult muscle-derived stem cells "MuStem". (2019).

Résumé

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une pathologie rare liée à l'X et de transmission récessive. Cette dystrophie est caractérisée par l'absence ou la non-fonctionnalité de la dystrophine, protéine essentielle au maintien et à la fonction des tissus musculaires. Bien qu'aujourd'hui il n'existe pas de traitement curatif de la DMD, les patients DMD ont une espérance de vie d'environ 20 à 30 ans grâce à la prise en charge symptomatique. Néanmoins, depuis quelques décennies, la recherche a évolué et a permis d'étudier de nouvelles thérapeutiques innovantes pouvant avoir un objectif curatif dans la DMD comme la thérapie génique ou la thérapie cellulaire.

L'UMR 703 INRA/Oniris PAnTher explore la faisabilité d'une thérapie cellulaire allogénique dans la DMD sur la base de l'utilisation de la cellule souche adulte musculaire hMuStem. Dans le cadre des protocoles de transplantation cellulaire, les produits de sécrétion, riches en vésicules extracellulaires (VEs) connues pour transporter des éléments essentiels aux communications intercellulaires sont de plus en plus mis en avant. Ces VEs pourraient expliquer les effets positifs observés sur les remodelages tissulaires comme fonctionnels, en persistant malgré la disparition des cellules dans le tissu hôte. L'UMR a engagé la mise au point de la production ainsi que la caractérisation des VE^{hMuStem}.

L'objectif de ce projet a tout d'abord été d'approfondir la caractérisation de ces VEs à travers de nouvelles approches d'imagerie en microscopie confocale et microscopie de super résolution. Grâce à un nouveau colorant marquant les bicouches lipidiques, il a été possible de visualiser les VEs par une technique STORM mais également d'observer *in vitro*, leur internalisation dans des cellules hMuStem et des myoblastes humains. Dans un second temps, une exploration de la fonctionnalité des VEs a été entreprise *in vitro*, avec des tests de prolifération et de différenciation sur les cellules hMuStem mères des VEs. Cela a permis de démontrer un léger effet d'induction de prolifération, suggérant un rôle autocrine des VE^{hMuStem}. Pour une concentration en VEs équivalente à celle sécrétée par une cellule hMuStem pour une cellule ensemencée, il est également observé une tendance à la diminution de différenciation. Après validation de ces effets, l'UMR souhaite comparer le potentiel des VE^{hMuStem} en co-injection VEs-cellules aux cellules seules dans le but de se placer dans un contexte de potentialisation de la stratégie de thérapie cellulaire.

Mots-clés : dystrophie musculaire de Duchenne, thérapie cellulaire, cellules souches, cellules hMuStem, vésicules extracellulaires, médecine régénératrice



UFR MEDECINE ET PHARMACIE



SERMENT DE GALIEN

En présence des Maitres de la Faculté, je fais le serment :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances,

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement,

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité,

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession,

De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens,

De coopérer avec les autres professionnels de santé.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

Version validée par la conférence des Doyens de facultés de Pharmacie le 7 février 2018