

Thèse de Doctorat

Charlotte SAURY

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

École doctorale : Biologie Santé

Discipline : Biologie cellulaire, biologie du développement animal

Spécialité : Technologies biomédicales, vectorisation, nanomédecine, thérapie cellulaire et génique, médecine régénératrice et biomatériaux

Unité de recherche : UMR 703 PAnTher, Physiopathologie Animale et bioThérapie du muscle et du système nerveux, INRA/Oniris

Soutenue le 15 Décembre 2017

Cellules souches dérivées du muscle humain « MuStem » : Modalités de préparation *in vitro* et caractéristiques biologiques pour une application clinique

JURY

Rapporteurs : **Christian DANI**, Directeur de recherche 1^{ère} classe Inserm, iBV Inserm U1091, Faculté de médecine, Nice
Danièle NOËL, Directeur de recherche 2^e classe Inserm, IRMB Inserm U1183, Hôpital Saint-Eloi, Montpellier

Examineurs : **Françoise NOROL**, Praticien hospitalier, AP-HP département biothérapie, Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière
Florence SABATIER, Professeur d'université – Praticien hospitalier, UMR 1076 Inserm, Université Aix Marseille

Directeur de Thèse : **Laëtitia GUEVEL**, Maître de conférences universitaire, UMR 703 PAnTher INRA/Oniris, Nantes

Co-directeurs de Thèse : **Karl ROUGER**, Chargé de recherche, UMR 703 PAnTher INRA/Oniris, Nantes
Bruno DELORME, Docteur, Macopharma, Mouvaux

Remerciements

Mes remerciements vont tout d'abord à Mesdames Danièle Noël, Florence Sabatier, Françoise Norol et Monsieur Christian Dani pour avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse et d'évaluer mes travaux.

Je remercie Marie-Anne Colle pour m'avoir accueillie au sein de l'UMR703 PAnTher INRA/Oniris et Monsieur Ronald De Lagrange au sein de Macopharma.

Je remercie Sophie Derenne et Valérie Trichet pour avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse et pour m'avoir suivie, conseillée et apporté un regard extérieur constructif sur mes travaux lors de ces réunions annuelles.

Je tiens à remercier chaleureusement Karl Rouger et Bruno Delorme pour leur collaboration qui a rendu possible ce contrat CIFRE et pour m'avoir fait confiance tout au long de ces quatre années. Je remercie sincèrement Laëtitia Guével pour m'avoir dirigée vers l'UMR il y a de nombreuses années de cela et pour avoir repris la direction de ma thèse en cours de route. Merci à vous deux Karl et Laeti pour votre dynamisme et votre optimisme à toute épreuve ! J'espère sincèrement que le projet MuStem perdurera et finira par aboutir, que tout le travail et le temps engagés finiront par payer !! Merci Karl pour les derniers instants à tout donner. Un grand merci à Sabrina Viau pour m'avoir encadrée, suivie de près et soutenue tout au long de cette thèse que ce soit à Lille puis à distance, ça a été un grand plaisir de travailler dans ton équipe.

Je remercie Aurélie Lardenois pour son expertise qui apporte énormément à tous les projets MuStem, ça a été un grand plaisir de travailler avec toi sur ces projets. Je remercie Blandine Lieubeau pour sa patience, sa disponibilité et son implication dans les projets de l'UMR703, pour ses conseils et remarques toujours très pertinentes. Un grand merci également à Rémy Le Guevel pour sa disponibilité et son expertise. Merci à Chantal Thorin pour sa réactivité et pour ses conseils statistiques nécessaires à l'ensemble des projets.

Je remercie également toute l'équipe R&D Biothérapie de Macopharma avec qui j'ai passé une très bonne année à Maco, à papoter en monopolisant le ViCell, à faire des montages de DM, à grignoter à tout-va ou à faire des merveilles. Je n'ai pas réussi à vous influencer

avec mon style vestimentaire (qui porte encore deux chaussures pareilles de nos jours ??!), mais j'ai réussi à m'imposer dans la comm' de Macopharma pour que vous ne m'oubliez pas. J'espère que la vidéo et les nouveaux catalogues ne changeront pas de sitôt ! Merci particulièrement à l'équipe culture Sabrina, Lucie, Pauline, Thomas et Marie (au fond de toi je sais que tu es plus culture) pour ces bons moments. Je regrette de ne pas avoir pu revenir plus souvent. Merci à tous ceux qui sont ou ne sont plus à Maco mais qui étaient là lors de mon passage dans le Nord.

Gros merci à mon double Lydie du bureau des lamentations. Comme moi, tu arriveras au bout ! Et on finira de toute façon par élever des chèvres, ouvrir un salon de thé ou un club de plongée aux Philippines (mais avec un doctorat) ! Merci à toute l'équipe des doctorants, les vieux (Kabé, Lydie) comme les petits encore tout frais (Alice, Marine et Julien). Marine, coach sportif, pour ta motivation sans faille. Alice, pour avoir couru avec nous pendant au moins 23 secondes un soir. Julien, pour ton potentiel de détective privé qui nous aura bien amusés et qui t'aura bien fatigué (preuve à l'appui). Bref, merci à la Nature Editorial Team, un gros projet qui nous aura motivés bien plus que la thèse. Dark Chacha se souviendra de vous ! MUAHAHAHA Et comme on dit dans le coin : « Courage, courage ! »

Merci aussi à la team véto, Elie, Florian et Bérangère pour vos fous rires communicatifs (même au-delà des murs) et votre bonne humeur permanente. Bref, merci à toute cette équipe de doctorants pour la bonne ambiance qui règne au laboratoire. Ne changez pas ! Et merci à Judith, collègue de thèse, d'avoir accepté de me laisser une « petite » place dans son projet. Merci à Virginie, pour sa bonne humeur permanente. Sans oublier bien sûr Cindy et Candice, un vrai plaisir d'avoir partagé ces quelques années avec vous que ce soit au labo ou en dehors !!!

Je remercie très sincèrement Isabelle Leroux pour sa bonne humeur constante et tout le soutien et l'organisation qu'elle apporte en culture. Sans toi, la culture ne tournerait certainement pas aussi bien. Je remercie finalement l'ensemble des membres de l'UMR703 PAnTher pour la bonne ambiance de travail qu'il y règne.

Enfin, un grand merci à tous mes amis, qui m'ont permis de déconnecter le temps de week ends ici ou là entre Dublin, Madrid, Lausanne, Nice, Paris et j'en passe. Particulièrement à Hélo qui est également passée par là ! Par, ailleurs, une attention spéciale,

à ma binôme des bancs, de fac qui, m'a tout appris, sur la rédaction, des introductions, conclusions et, tout autre blabla et sans ,qui j'aurais, eu beaucoup, de peine, à écrire ce, manuscrit. Et surtout à savoir où placer les virgules, et ce, sans excès. Autrement dit à chercher des noises comme dirait Jibi.

Merci à mes parents pour m'avoir supportée et soutenue pendant ces années de doctorat mais également toutes mes années d'études. Enfin, je ne peux terminer sans remercier celui qui a partagé toutes ces années depuis le début, à distance puis ensemble. Merci de m'avoir supporté me plaindre à longueur de temps et de m'avoir attendu autant de longues soirées avec un bon petit plat à mijoter.

Une page se tourne.

Sommaire

Avant-propos	1
Revue bibliographique	3
CHAPITRE 1. THERAPIE CELLULAIRE ET CELLULES SOUCHES	3
<i>I. Introduction à la thérapie cellulaire</i>	3
I.1. Définition et principe	3
I.2. Modalités des thérapies cellulaires	4
I.2.1. Transplantation autologue	5
I.2.2. Transplantation allogénique	6
I.3. Cadre réglementaire	7
<i>II. Cellules souches : Définition et catégories.....</i>	9
II.1. Caractéristiques des cellules souches.....	9
II.2. Spécialisation des cellules souches.....	10
II.3. Origine des cellules souches.....	11
II.3.1. Cellules souches embryonnaires	11
II.3.2. Cellules souches fœtales et placentaires	12
II.3.3. Cellules souches adultes.....	13
II.3.4. Cellules souches pluripotentes induites	14
<i>III. Evolution de la démarche de thérapie cellulaire</i>	16
III.1. Débuts de la thérapie cellulaire	16
III.2. Thérapie cellulaire : 4 ^{ème} pilier de la médecine moderne ?	17
CHAPITRE 2. DEFINITION D'UN PRODUIT DE THERAPIE CELLULAIRE	20
<i>I. Confection du produit cellulaire à usage clinique.....</i>	20
I.1. Respect des bonnes pratiques de fabrication	20
I.2. Procédé de production d'un produit de thérapie cellulaire	21
I.2.1. Prélèvement de l'échantillon biologique	22
I.2.2. Sélection et purification de l'agent cellulaire	24
I.2.3. Amplification <i>ex vivo</i>	26
I.2.3.1. Systèmes de culture et automatisation	27
a. Culture statique	28
b. Bioréacteurs en suspension.....	29
c. Bioréacteurs en conditions adhérentes	30
I.2.3.2. Milieu de culture	31
I.2.3.3. Eléments matriciels.....	34
I.2.3.4. Densité cellulaire	37

I.2.3.5. Nombre de passages et temps de culture	38
I.2.3.6. Paramètres physico-chimiques	40
I.2.4. Différenciation du produit cellulaire	41
I.2.5. Distribution du produit cellulaire	42
I.2.5.1. Conservation / Banking	43
I.2.5.2. Transport	45
I.2.6. Conditionnement du produit cellulaire	45
I.2.6.1. Pré-conditionnement	45
I.2.6.2. Modalités d'administration	47
a. Voies d'abord	47
b. Doses et durée	48
II. <i>Identité du produit cellulaire</i>	50
III. <i>Pureté du produit cellulaire</i>	51
IV. <i>Efficacité du produit cellulaire</i>	51
V. <i>Potentialités</i>	53
VI. <i>Biodistribution du produit cellulaire</i>	55
VII. <i>Innocuité du produit cellulaire</i>	57
VII.1. Contamination par des agents pathogènes	57
VII.2. Risques immunologiques	59
VII.3. Tumorigénicité	60
VII.4. Sénescence cellulaire	62
VII.4.1. Généralités	62
VII.4.2. Voies de signalisation impliquées dans la sénescence	64
VII.4.3. Caractéristiques et biomarqueurs des cellules sénescents	67
VII.4.3.1. Arrêt du cycle cellulaire	67
VII.4.3.2. Transformation morphologique	68
VII.4.3.3. Augmentation de l'activité β -galactosidase associée à la sénescence	69
VII.4.3.4. Foyers d'hétérochromatine associés à la sénescence	69
VII.4.3.5. Foyers de dommages à l'ADN associés à la sénescence	70
VII.4.3.6. Résistance à l'apoptose	70
VII.4.3.7. Phénotype sécrétoire associé à la sénescence	71
CHAPITRE 3. DYSTROPHIES MUSCULAIRES ET CANDIDATS CELLULAIRES	73
I. <i>Dystrophies musculaires</i>	73
I.1. Généralités	73
I.2. Complexe protéique associé à la dystrophine	74
I.3. Conséquences de la déstabilisation du complexe associé à la dystrophine	76
I.4. Manifestations cliniques	78
I.5. Stratégies thérapeutiques	79
II. <i>Stratégies de thérapie cellulaire des dystrophies musculaires</i>	81
II.1. Généralités	81
II.2. Caractéristiques générales du candidat cellulaire idéal	82

II.3.	Cellules satellites et myoblastes	83
II.3.1.	Définition.....	83
II.3.2.	Potentiel thérapeutique.....	85
II.4.	Cellules souches à potentiel myogénique	87
II.4.1.	Cellules souches pluripotentes.....	87
II.4.2.	Cellules souches adultes.....	89
II.4.2.1.	Progéniteurs non-résidents du muscle	90
a.	Cellules souches hématopoïétiques	90
b.	Cellules souches mésenchymateuses	91
II.4.2.2.	Progéniteurs dérivés du muscle.....	92
a.	Cellules de la Side Population	93
b.	Cellules CD133 ⁺	94
c.	Mésoangioblastes / péricytes	95
d.	Cellules interstitielles PW1-positives.....	97
e.	Cellules myo-endothéliales.....	97
f.	Cellules exprimant l'aldéhyde deshydrogénase	98
g.	Cellules souches dérivées du muscle	99
	Positionnement des travaux de thèse	102
I.	<i>Contexte scientifique</i>	102
I.1.	Population cellulaire MuStem humaine	102
I.2.	Division Biothérapie de la société Macopharma.....	103
II.	<i>Objectifs des travaux de thèse</i>	103
	Résultats expérimentaux.....	104
	CHAPITRE 1. DEFINITION DES MODALITES DE PREPARATION COMPATIBLES AVEC UNE APPLICATION CLINIQUE	104
I.	<i>Positionnement général</i>	104
II.	<i>Matériels et méthodes</i>	105
II.1.	Origine des prélèvements musculaires humains	105
II.2.	Protocole d'isolement de la population hMuStem.....	107
II.3.	Evaluation du pouvoir prolifératif	108
II.4.	Analyses statistiques	108
III.	<i>Résultats</i>	108
III.1.	Alternatives aux enzymes de dissociation tissulaire de grade recherche.....	108
III.2.	Culture en conditions non adhérentes	110
III.3.	Alternative à la gélatine porcine comme élément matriciel.....	111
III.4.	Milieu de culture	112
III.4.1.	Sérum humain comme alternative au FBS pour l'expansion des cellules hMuStem.....	112
III.4.2.	Facteurs de croissance	114
III.5.	Optimisation de la densité d'ensemencement.....	115
III.6.	Remplacement de la solution de cryo-conservation	116
III.7.	Reproductibilité du protocole d'isolement et d'amplification des cellules hMuStem.....	117

CHAPITRE 2. ANALYSE DU LYSAT PLAQUETTAIRE COMME ALTERNATIVE NUTRITIVE POUR LA PRODUCTION DE LOTS CLINIQUES hMuStem	122
I. <i>Positionnement général</i>	122
II. <i>Démarche expérimentale</i>	122
III. <i>Résultats</i>	123
IV. <i>Article</i>	124
CHAPITRE 3. IMPACT DE L'AMPLIFICATION <i>IN VITRO</i> SUR LES CARACTERISTIQUES DE LA POPULATION hMuStem ..	167
I. <i>Positionnement général</i>	167
II. <i>Démarche expérimentale</i>	169
III. <i>Résultats</i>	169
IV. <i>Article</i>	170
Discussion générale	212
I. <i>Définition de conditions de culture compatibles avec la clinique</i>	213
II. <i>Impact du temps d'expansion ex vivo</i>	217
III. <i>Poursuite de la définition du produit cellulaire</i>	218
Annexes	220
Annexe 1. Produits de thérapie cellulaire ayant eu une AMM en Europe	220
Annexe 2. Description initiale de la population de cellules MuStem humaines (hMuStem)	222
Annexe 3. Valorisation scientifique	249
I. <i>Publications</i>	249
II. <i>Communication affichée</i>	249
Bibliographie	250

Liste des figures

Figure 1. Comparaison des thérapies autologue et allogénique	4
Figure 2. Stratégies multiples de transplantation de cellules souches.....	7
Figure 3. Hiérarchisation des cellules souches : Différents degrés de différenciation des cellules totipotentes aux cellules différenciées.	10
Figure 4. Localisation des cellules souches adultes	13
Figure 5. Représentation schématique des applications de thérapie cellulaire en médecine régénératrice et oncologie.	17
Figure 6. Procédé de production d'un produit de thérapie cellulaire	22
Figure 7. Systèmes de culture pour l'expansion des produits de thérapie cellulaire.	28
Figure 8. Structure des télomères	39
Figure 9. Voies potentielles de distribution d'un produit de thérapie cellulaire du site de production au patient.....	43
Figure 10. Caractéristiques attendues des tests de potentialité.	54
Figure 11. Représentation schématique des différentes techniques d'imagerie utilisées pour monitorer les thérapies cellulaires lors des études précliniques et cliniques	55
Figure 12. Rôles des voies p53 et p16-pRB dans la sénescence	65
Figure 13. Contrôle de la sénescence par les voies de signalisation p53 et p16-pRB	65
Figure 14. Dystrophine et organisation du DGC.....	75
Figure 15. Ré-arrangements au niveau du DGC suite à l'absence de dystrophine..	76
Figure 16. Conséquences primaires de l'absence de dystrophine.	77
Figure 17. Signe de Gower's illustré chez un jeune patient atteint de DMD.....	79
Figure 18. Principales stratégies thérapeutiques de la DMD	80
Figure 19. Propriétés myogéniques nécessaires pour une utilisation en thérapie cellulaire dans le cadre du traitement des dystrophies musculaires.	83
Figure 20. Division asymétrique lors de l'activation des cellules satellites.....	84
Figure 21. Principaux marqueurs actuellement utilisés pour l'identification des cellules satellites.....	85
Figure 22. Perspectives de thérapie cellulaire pour les dystrophies musculaires.....	86
Figure 23. Origine des types de cellules souches adultes au potentiel myogénique.....	90

Figure 24. Principales populations cellulaires retrouvées au sein des muscles squelettiques adultes, marqueurs et voies de différenciation.	93
Figure 25. Profil d'expression des fractions isolées par la méthode de preplating.	99
Figure 26. Remplacement des enzymes de dissociation tissulaire de grade recherche par des enzymes produites selon les GMPs.	110
Figure 27. Comparaison de l'amplification de cellules hMuStem en conditions adhérentes et non adhérentes.	111
Figure 28. Remplacement de la gélatine porcine par le substrat humain CELLstart™ CTS™.	112
Figure 29. Remplacement du FBS par un dérivé sanguin humain, le sérum humain.	113
Figure 30. Influence de la dose de cytokines additionnelles sur le potentiel prolifératif des cellules hMuStem.	115
Figure 31. Influence de la densité cellulaire d'ensemencement sur le potentiel prolifératif des cellules hMuStem.	116
Figure 32. Remplacement du milieu de congélation FBS/DMSO des cellules hMuStem par le milieu Synth-a-Freeze®.	117
Figure 33. Expression des rendements en MDCs et hMuStem en fonction de différents paramètres.	119
Figure 34. Potentiel prolifératif des cellules hMuStem dans les conditions de culture définies précédemment.	121
Figure 35. Expansion clinique <i>in vitro</i> des cellules souches : équilibre entre le nombre de cellules et la sécurité.	168

Liste des tableaux

Tableau 1. Isolement de cellules hMuStem : source, genre, âge des donneurs, type de muscle obtenu et conditions d'isolement.	106
Tableau 2. Isolement de cellules hMuStem : source, genre, âge des donneurs, type/quantité de muscle obtenu et rendements d'isollements en MDCs et cellules hMuStem.	118

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique	DGC	Dystrophine glycoprotein complex
Ag	Antigène	DMD	Duchenne Muscular Dystrophy
ALDH	Aldéhyde deshydrogénase	DMEM	Dulbecco'd modified Eagle's medium
ALP	Alkaline phosphatase	DMLA	Dégénérescence maculaire liée à l'âge
ALP	Phosphatase alcaline	DMSO	Diméthylsulfoxyde
AMM	Autorisation de mise sur le marché	EAC	Apithelial amniotic cell
ANSM	Agence nationale de sécurité des médicaments et produits de santé	EB	Embryoid body
ASC	Adipose stem cell	EC	Essai clinique
ATMP	Advanced therapy medicinal product	ECM	Extracellular matrix
BCL2	B-cell lymphoma-2	EG	Embryonic germ cells
bFGF	Basic fibroblast growth factor	EMA	European medicines agency
BMD	Becker Muscular Dystrophy	EPC	Epithelial stem cell
BMSC	Bone marrow-derived stem cells	ESC	Embryonic stem cells
BrdU	5-bromodeoxyuridine	FACS	Fluorescence-activated cell sorting
BSI	British standard institution	FBS	Fetal bovine serum
Cas9	CRISPR associated protein 9	FDA	Food and drug administration
CAT	Comité pour les thérapies avancées	FSC	Fetal stem cells
Cav3	Cavéoline-3	G-CSF	Granulocyte CSF
CD	Cluster of differentiation	GDP	Good distribution practices
CDC25	Cell division cycle 25	GF	Growth factor
CDK	Cyclin-dependant kinase	GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
CDKI	CDK inhibitor	GMP	Good manufacturing practices
CFU-F	Colony-forming unit-fibroblast	GRMD	Golden Retriever Muscular Dystrophy
CHMP	Comitte for medicinal products for human use	GVHD	Graft-versus-host disease
CIP1	CDK interacting protein 1	hDPSC	Human dental pulp-derived stem cells
CK	Creatine kinase	HLA	Human leucocyte antigen
CMV	Cytomegalovirus	HP1	Heterochromatin protein 1
CO ₂	Dioxyde de carbone	hPL	Human platelet lysate
CPA	Cryoprotective agent	HSC	Hematopoietic stem cell
CPD	Cumulative population doubling	HS	Human serum
CPP	Comité de protection des personnes	HSP	Heat-shock protein
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats	HSV-1	Herpes simplex virus type 1
CSA	Cellules souches adultes	hTERC	Human telomerase RNA component
CSC	Cardiac stem cell	hTERT	Human telomerase reverse transcriptase
DAPI	4'6'-diaminidino-2-phenylindole	hTR	Human telomeras RNA
DDR	DNA damage response	IBSP	Integrin binding sialoprotein
dECM	decellularized extracellular matrix	ICH	International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use

ICM	Inner celle mass	PFC	Perfluorocarbones
IFN	Interferon	PGE2	Prostaglandine E2
IGF	Insulin groth factor	PIC	PW1-positive interstitial cell
IGFBP7	IGF-binding protein 7	PME	Petite et moyenne entreprise
IM	Intramusculaire	pRB	Retinoblastoma protein
INK4A	Inhibitor of CDK4	PRP	Platelet-rich plasma
iPSC	Induced pluripotent stem cells	PSC	Pluripotent stem cell
ISSCR	International society for stem cell research	PTA	Produits thérapeutiques annexes
IV	Intraveineuse	PTC	Produit de thérapie cellulaire
KLF4	Kruppel-like factor 4	PVA	Poly(vinyl alcohol)
LT	Lymphocyte T	qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
MAB	Mesoangioblast	R&D	Recherche et développement
MAPK	Mitogen-activated protein kinase	ROCK	Rho-associated coiled-coil kinase
MCAM	Melanoma cell adhesion molecule	ROS	Reactive oxygen species
MD	Dystrophie musculaire	SAHF	Senescence-associated heterochromatin foci
MD	Muscular dystrophy	SASP	Senescence-associated secretory phenotype
MDC	Muscle-derived cell	SA-βGal	Senescence-associated β-galactosidase
MDPC	Myosphere-derived progenitor cell	SC	Satellite cell
MDSC	Muscle-derived stem cells	SCID	Severe combined immunodeficiency
MDSC	Muscle-derived stem cells	SCNT	Somatic cell nuclear transfer
mdx	X-Chromosome Linked Muscular Dystrophy	SDF	Senescence-associated DNA-damage foci
MEC	Myoendothelial cell	SDI1	<i>senescent cell-derived inhibitor 1</i>
MEF	Mouse embryonic fibroblast	SG	Sarcoglycan
MEM	Minimum essential medium	SIPS	Stress-induced premature senescence
MLPA	<i>Multiplex ligation-dependant probe amplification</i>	SMALD ⁺	Skeletal muscle ALDH positive cell
MMP	Metalloproteinase	SMS	Senescence messaging secretome
MNC	Mononucleated cell	SOX2	SRY-related high mobility group box protein-2
MRF	Myogenic regulatory factor	SP	Side population
MRI	Magnetic resonance imaging	SPECT	Single photoon emission computed tomography
MSC	Mesenchymal stem cell	SSEA	Stage-specific embryonic antigen
MTI	Médicament de thérapie innovante	TALEN	Transcription activator-like effector nuclease
MTI-PP	Médicament de thérapie innovante préparé ponctuellement	TGF	Transforming growth factor
Myf5	Myogenic regulatory factor 5	tPA	Tissue plasminogen activator
MyoD	Myogenic differentiation 1	TPE	Très petite entreprise
NICD	Notch1 intracellular domain	TRA	Tumor rejection antigen
nNOS	neuronal nitric-oxide synthase	TRPC1	Transient receptor potential cation channel 1
NSC	Neural stem cell	UCB-MSC	Umbilical cord blood-derived MSC
O ₂	Dioxygène	UCT-MSC	Umbilical cord tissue-derived MSC
OCT3/4	Octamer-binding transcription factor 3/4	uPA	Urokinase plasminogen activator
OIS	Oncogen-induced senescence	WAF1	<i>wildtype p53-activated fragment 1</i>
Pax7	paired-box 7	X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen		
Peg-3	Paternaly expressed gene-3		
PEO	Polyethylen oside		
PET	Positron emission tomography		

Avant-propos

Considérée comme le quatrième pilier de la médecine moderne, la thérapie cellulaire (TC) repose sur l'utilisation d'agents cellulaires capables d'évoluer et d'interagir avec leur environnement afin de mettre en place une réponse biologique complexe dépendante du contexte tissulaire au sein duquel ils se retrouvent. Elle représente une alternative à de nombreux traitements ayant pour objectifs le remplacement, la réparation ou la restauration de la fonction d'un tissu ou d'un organe lésé par un accident, une pathologie ou le vieillissement. Malgré un nombre croissant de publications et d'essais cliniques (ECs) engagés reflétant un engouement certain pour cette nouvelle discipline, le marché des thérapies cellulaires n'en est qu'à ses débuts avec seulement quelques produits ayant obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM).

Les dystrophies musculaires (DMs) regroupent un ensemble de maladies génétiques distinctes caractérisées par une perte musculaire progressive, dont le 1^{er} symptôme est une faiblesse musculaire de sévérité et distribution variables. Elles sont dues à des mutations sur les gènes codant pour différentes protéines localisées au niveau de la matrice extracellulaire, de la membrane plasmique, du cytoplasme, du sarcomère ou encore du noyau des cellules musculaires striées. La TC fait partie des orientations prometteuses en proposant un agent thérapeutique capable de délivrer le gène manquant dans les fibres musculaires dystrophiques par l'intermédiaire du phénomène de fusion intervenant physiologiquement dans le processus de régénération mais également de générer des précurseurs myogéniques.

Ces dernières années, l'UMR PAnTher a identifié une population de cellules souches (CSs) résidentes du tissu musculaire, nommées MuStem, et fait la preuve de concept de l'administration systémique chez le chien myopathe, modèle gros animal cliniquement pertinent de la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD). Cette administration évite en effet la dégradation de l'état clinique général des chiens myopathes, avec une stabilisation observée sur le long terme et s'accompagne d'une réduction des altérations du tissu musculaire. Plus récemment, l'UMR a identifié une population marginale de cellules dérivées de muscle sain humain (hMuStem) présentant des caractéristiques comparables aux cellules MuStem canines (cMuStem) en termes de déficit initial d'adhérence, lequel a été à la base de l'isolement de ces dernières. La démonstration de leurs caractéristiques phénotypiques, leurs potentiels de prolifération et de différenciation mais aussi leur comportement *in vivo* a conforté le positionnement des cellules MuStem comme potentiel candidat au traitement de pathologies musculaires. Néanmoins, ces 1^{ers} résultats ont été générés avec la population hMuStem produite dans des conditions de grade recherche incompatibles avec des applications

cliniques, limitant de fait quelque peu leur impact en termes de données supportives pour renforcer le positionnement de la population hMuStem en tant que produit thérapeutique. C'est dans un contexte de recherche préclinique que se sont inscrits mes travaux de thèse.

La revue de littérature est organisée en trois chapitres. Le 1^{er} rapporte un état des lieux des différentes stratégies de TC et de l'environnement réglementaire auquel elles sont confrontées. Le 2nd chapitre explicite les modalités de définition d'un produit de thérapie cellulaire (PTC), d'une part en termes de définition d'un protocole robuste, reproductible et respectant certaines normes de qualité comme les bonnes pratiques de fabrication (BPF ou GMP pour *good manufacturing practices*), et d'autre part en termes d'identité, de potentialités et d'innocuité. Finalement, le dernier chapitre présente les différents candidats cellulaires au traitement des DMs, positionne les cellules hMuStem et décrit mes travaux de recherche.

Les résultats expérimentaux sont également organisés en trois axes. Le 1^{er} axe a eu pour objectif de poursuivre la définition de conditions de culture compatibles avec un transfert clinique, initiée peu avant mon arrivée au sein de l'UMR, tout en s'assurant du maintien des caractéristiques originales des cellules hMuStem. L'étude des conséquences du changement de la source des nutriments et GFs sur ces propriétés a fait l'objet d'un 2nd chapitre qui vient en complément du 1^{er} axe. Enfin, une étude longitudinale de ces propriétés au cours du temps d'expansion *ex vivo* a été mise en place dans l'objectif de définir la fenêtre optimale d'expansion autrement dit d'optimiser la préparation des lots cellulaires en termes d'efficacité et de sécurité.

En conclusion de ce travail qui participe à faire avancer le développement du produit cellulaire pour une perspective clinique, une discussion générale mettant en perspective les résultats obtenus est présentée.

Revue bibliographique

Chapitre 1. Thérapie cellulaire et cellules souches

I. Introduction à la thérapie cellulaire

I.1. Définition et principe

La TC désigne la greffe de cellules visant à remplacer, réparer ou restaurer la fonction d'un tissu ou d'un organe lésé par un accident, le vieillissement ou une pathologie. En cela, elle représente une alternative à de nombreux traitements ou une proposition pour des maladies orphelines. Elle se positionne également dans des contextes pathologiques pour lesquels la greffe d'organe apparaissait comme la seule alternative. La TC pourrait en effet permettre de pallier aux problèmes de faible disponibilité des organes sains et des problèmes de compatibilité entre donneurs et receveurs, par injection des cellules du patient lui-même avant que l'organe ne soit totalement défaillant. Contrairement aux traitements pharmacologiques qui reposent sur l'administration de petites molécules chimiques naturelles ou synthétiques plus ou moins complexes ayant une action ciblée, les cellules ont la capacité d'interagir avec l'environnement biologique/tissulaire dans lequel on les place, par la réception et l'intégration de nombreux signaux. Ces derniers leur permettent de migrer vers des sites spécifiques du corps et de mettre en place une réponse cellulaire complexe dépendante du contexte tissulaire dans lequel elles se retrouvent (Fischbach et al., 2013).

Plusieurs types cellulaires sont envisagés pour des utilisations en TC :

- des cellules différenciées et fonctionnelles comme les chondrocytes, les cellules des îlots de Langerhans, les lymphocytes T (LT)...
- des précurseurs ou progéniteurs issus de CSs mais étant déjà engagés dans une voie de différenciation tels que les progéniteurs érythroïdes et lymphoïdes, les cellules satellites (SCs pour *satellite cells*)...
- des CSs dotées d'un fort potentiel de prolifération et de différenciation parmi lesquelles les cellules souches mésenchymateuses (MSCs pour *mesenchymal stem cells*), les cellules souches hématopoïétiques (HSCs pour *hematopoietic stem cells*).

Deux principales stratégies de traitement sont proposées par ces approches de TC. D'une part, il est envisagé d'agir directement sur la régénération tissulaire par remplacement des cellules

lésées ou mortes et/ou par intégration de la niche dans un état non différencié activable en réponse à certains signaux pour générer à nouveau des cellules filles capables de remplacer les cellules lésées. D'autre part, les CSs peuvent avoir un effet indirect sur le micro-environnement tissulaire, par l'intermédiaire de leur activité paracrine et des interactions cellules-cellules qu'elles génèrent, pouvant agir sur la régénération ou encore sur la réponse immunitaire.

I.2. Modalités des thérapies cellulaires

Comme nous venons de l'évoquer, plusieurs sources de cellules sont envisagées pour les stratégies de TC. Ces cellules peuvent provenir du patient lui-même ou d'un donneur de la même espèce (Figure 1). On parle alors respectivement de thérapie autologue et allogénique. Certaines stratégies plus marginales proposent également l'utilisation de cellules provenant d'une espèce différente (transplantation xénogénique) ou encore de lignées cellulaires immortalisées, présentant des avantages en termes d'approvisionnement. Ces dernières sont cependant très peu favorisées au vue du contexte immunitaire non favorable, des risques de transmission virale ou encore d'induction de tumeur (Edge et al., 1998). Les modalités autologues et allogéniques sont majoritaires.

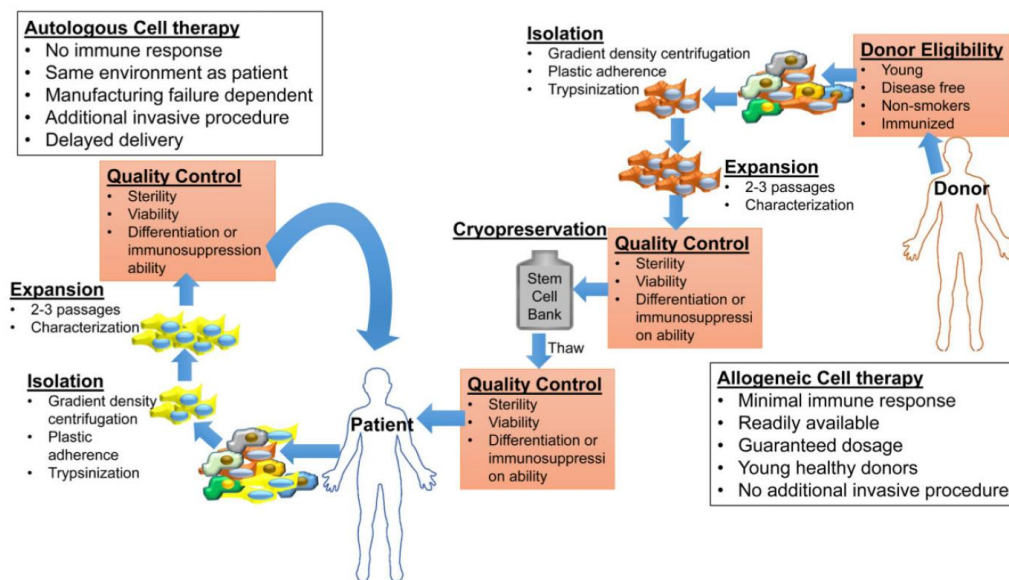


Figure 1. Comparaison des thérapies autologue et allogénique (Karantalis et al., 2015). La thérapie cellulaire allogénique offre de nombreux avantages par comparaison à la transplantation autologue. Les cellules souches sont issues de donneurs sains, ce qui permet de s'affranchir de toute comorbidité associée à l'état pathologique. Les cellules allogéniques peuvent être amplifiées et conservées dans des banques cellulaires pour être rapidement disponibles et mobilisables en cas de besoin.

I.2.1. Transplantation autologue

La transplantation autologue désigne l'injection de cellules provenant du même organisme. Ce traitement personnalisé présente deux avantages majeurs (Mason and Dunnill, 2009) :

- la reconnaissance des cellules transplantées comme appartenant au « soi » permet d'éviter le rejet immunitaire. Le coût des traitements immunosuppresseurs et leurs effets secondaires peuvent ainsi être évités (Mason and Dunnill, 2009).

- dans le cas de protocoles de production rapides, cette modalité peut être une alternative économiquement intéressante aux produits commercialisés dans le sens où le prélèvement, la production et l'injection des cellules d'intérêt peuvent être rapidement réalisés par les cliniciens en milieu hospitalier, sous réserve de conformité aux normes GMP (Mason and Dunnill, 2009). C'est le cas par exemple des CSs isolées à partir du tissu adipeux du patient, dont la forte disponibilité permet l'isolement d'une quantité de cellules suffisante, ne nécessitant alors pas d'amplification (Fraser et al., 2006). Néanmoins, des procédés plus longs qui font en outre appel à des sites de productions éloignés de la clinique, génèrent des délais qui peuvent ne pas être envisageables pour des patients dans un état critique. Bien qu'encore interdites en France, certaines entreprises proposent aujourd'hui de pallier à cette limite. Contre forte rémunération, elles proposent en effet de produire et conserver les CSs du sang et tissu du cordon ombilical, du tissu adipeux ou encore de pulpe dentaire en prévoyance d'un éventuel besoin (Future Health Biobank, CryoSave...).

Des limites à cette stratégie ont toutefois été identifiées. Le caractère personnalisé de cette approche implique une gestion et des procédures séparées pour tous les prélèvements, comme cela peut être le cas également pour certaines modalités allogéniques, nécessitant un personnel technique et une traçabilité irréprochables. Afin de limiter les risques de cross-contamination entre les différents lots cellulaires lors de la production, des précautions supplémentaires en termes de manipulations sont nécessaires. Les coûts de production (réactifs, équipements dédiés) et des contrôles qualité qui ne peuvent pas être partagés entre les lots rendent cette approche économiquement peu attractive (van den Bos et al., 2013; Ratcliffe et al., 2011). De plus, l'acte chirurgical de prélèvement n'est pas anodin, surtout pour des patients déjà affaiblis par leur pathologie. La condition du patient influence donc fortement le choix ou non de cette procédure autologue. En outre, l'âge et la condition du patient induisent une forte variabilité entre les lots et ne permettent pas toujours d'obtenir des

CSs efficaces ou en nombre suffisant, là où la transplantation allogénique peut bénéficier de cellules de jeunes donneurs ayant un historique plus restreint et donc présenter moins de risques d'anomalies (Mason and Dunnill, 2009; Ratcliffe et al., 2011). Enfin, en ce qui concerne les patients atteints de maladies génétiques, une correction *ex vivo* des cellules s'avère nécessaire, ce qui peut engendrer une réaction immunitaire dirigée contre le transgène et ainsi limiter les avantages initiaux de la transplantation autologue.

I.2.2. Transplantation allogénique

La transplantation allogénique consiste en l'injection de cellules issues d'un donneur sain de la même espèce que le patient à traiter. Les cellules d'un individu peuvent donc être utilisées auprès de différents patients. Les avantages majeurs de cette approche sont la production possible en larges quantités, la disponibilité qui en découle et la rapidité de mobilisation des cellules en cas de besoin. Cela est rendu possible par la création de banques de cellules préalablement qualifiées et sur lesquelles ont été réalisés les différents contrôles qualité, permettant dans le même temps de réduire les coûts (Mason and Dunnill, 2009; Ratcliffe et al., 2011). De plus, la standardisation des procédés de production et de contrôle qualité permettent de limiter la variabilité entre les lots cellulaires. Le fait de pouvoir disposer de cellules de sujets plus jeunes présente également un avantage pour limiter les risques d'anomalies génétiques. Cette stratégie permet également d'épargner au patient un affaiblissement supplémentaire dû à l'acte chirurgical de biopsie.

Toutefois, l'utilisation de telles cellules est confrontée au rejet immunitaire de la part de l'organisme receveur et induit le recours à un traitement immunosuppresseur pouvant avoir de forts effets secondaires (Mason and Dunnill, 2009) et ce, malgré l'identification du potentiel immunomodulateur de certains types cellulaires comme les MSCs (Aggarwal and Pittenger, 2005; Le Blanc and Ringdén, 2007; Karantalis et al., 2015; Di Nicola et al., 2002). De plus, la production à large échelle présentée comme un avantage peut également être un inconvénient. Il a en effet été démontré qu'une amplification trop importante pouvait avoir des effets négatifs sur l'efficacité thérapeutique et la sécurité du produit cellulaire, avec notamment l'apparition d'anomalies génétiques mais également de cellule sénescents. Ces points seront abordés dans le chapitre 3. Le risque de transmission de virus ou prion, bien que rare, est également une limite de cette approche. Le développement d'outils de détection et la mise en place de contrôles qualité des cellules permettent de réduire ce risque bien que le risque nul n'existe pas.

Les deux stratégies thérapeutiques décrites ci-dessus présentent donc des avantages et des limites inhérentes aux types cellulaires envisagés mais également à la technique de transplantation. La diversité des stratégies est représentée sur la Figure 2. Les différents types cellulaires évoqués seront détaillés dans le paragraphe II.

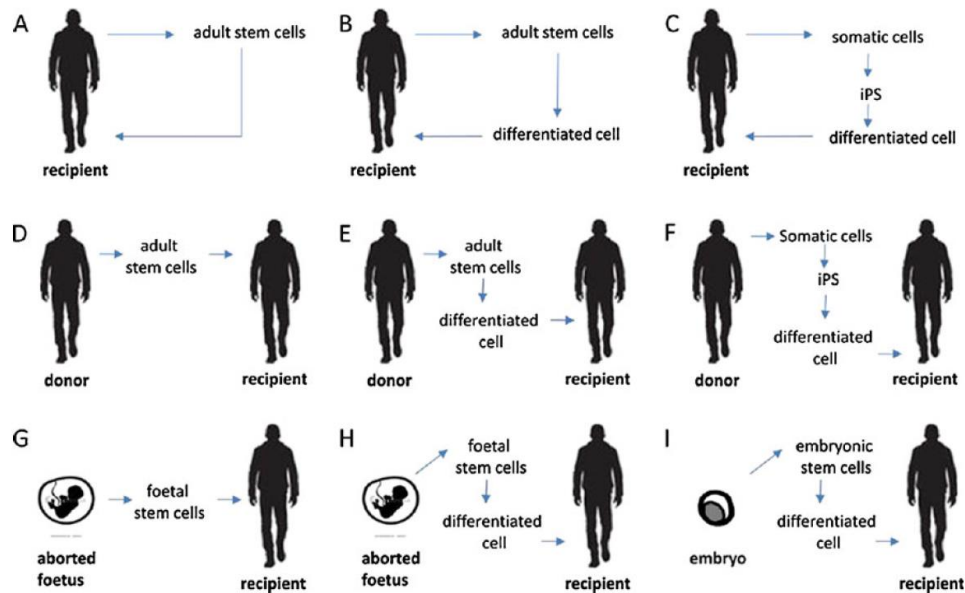


Figure 2. Stratégies multiples de transplantation de cellules souches (Preynat-Seauve and Krause, 2011). Isolement et transplantation autologue (a-c) ou allogénique (d-i) de cellules souches adultes (a, b, d, e), fœtales (g, h), embryonnaires (i) ou pluripotentes induites (c, f), directement après l’isolement (a, d, g) ou après une/des étapes de différenciation *ex vivo* (b, c, e, f, h, i).

I.3. Cadre réglementaire

Le cadre réglementaire régissant les thérapies cellulaires est différent de celui mis en place pour les produits pharmacologiques. La complexité biologique inhérente aux cellules, la criticité et la diversité des protocoles de production dont chaque étape peut influencer le devenir de la cellule ou encore l’utilisation de nombreux composés biologiques expliquent la difficulté à mettre en place des lignes directrices globales et la complexité du cadre réglementaire actuel.

Les différentes instances réglementaires nationales et internationales, telles que l’Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM), l’Agence européenne des médicaments (EMA pour *European Medicines Agency*), l’Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA pour *Food and Drug Administration*), le Conseil international d’harmonisation des exigences techniques pour l’enregistrement des médicaments à usage humain (ICH pour *International Conference on Harmonisation of*

Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use), ou encore l'Institution des standards britanniques (BSI pour *British Standard Institution*) ayant leurs spécificités de systèmes et de voies d'évaluation et d'approbation, un grand nombre de directives et documents ont été élaborés. Ces documents incluent des recommandations pour la collecte, le procédé, l'évaluation, la conservation et la distribution des cellules pour assurer la sécurité et la fiabilité des produits cellulaires.

En Europe, la TC est couverte par le terme de médicament de thérapie innovante (MTI) ou *advanced therapy medicinal product* (ATMP), au même titre que la thérapie génique, les médicaments issus de l'ingénierie tissulaire/cellulaire et les médicaments combinés de thérapie innovante (associant un MTI avec un dispositif médical) (Règlement (EC) No 1394/2007, réformant la directive 2001/83/EC et le règlement (EC) No 726/2004). On parle également de MTI préparé ponctuellement (MTI-PP) lorsqu'un produit est préparé ponctuellement à l'attention d'un malade déterminé. Il sera alors régulé au niveau national. De plus, on distingue ces MTIs (et MTI-PPs), tissus ou cellules ayant subi des manipulations substantielles (manipulations non substantielles listées en annexe 1 du règlement n°1394/2007) ou dédiés à un usage non homologue à la fonction d'origine, des préparations cellulaires qui regroupent les tissus ou cellules humains ne subissant pas de manipulation substantielle et destinées à des applications autologues. Ces dernières sont également régulées au niveau national.

Les demandes d'autorisation pour les ECs sont réalisées au niveau national auprès de l'ANSM et du comité de protection des personnes (CPP) pour la France, alors que le processus de demande d'AMM est centralisé en Europe. Cette demande d'AMM implique dans un 1^{er} temps le Comité pour les Thérapies Avancées (CAT pour *Committee for Advanced Therapies*) de l'EMA, créé en 2007, qui évalue la qualité, la sécurité et l'efficacité du produit cellulaire. L'approbation finale revient dans un 2nd temps au comité pour les produits médicaux à usages humains (CHMP pour *Committee for Medicinal Products for Human use*) de l'EMA.

Les MTIs ou ATMPs étant considérés comme des médicaments, ils doivent être fabriqués conformément à la directive 2003/94/EC sur les GMPs et aux recommandations décrites dans EudraLex (volume 4). Il convient également de respecter d'autres directives relatives aux dons, à l'obtention et aux contrôles des cellules et tissus (Directives 2004/23/CE, 2006/17/CE et 2006/86/CE). Finalement, le site de production devra recevoir une autorisation

par l'ANSM. Enfin, il est nécessaire de prendre en considération l'ensemble des éléments inclus dans la loi de bioéthique (Loi n°2011-814) pour évaluer la faisabilité de la commercialisation au niveau national et ce, malgré l'obtention de l'AMM au niveau européen.

L'environnement réglementaire, encore récent et méfiant vis-à-vis de ce domaine dont on a encore peu de retour sur le long terme, fait partie des nombreux facteurs participant à l'allongement du temps de développement des thérapies cellulaires. De plus, sa complexité fait que peu de laboratoires académiques ou très petites (TPE) / moyennes entreprises (PME) maîtrisent l'intégralité de ce cadre réglementaire, qui est en outre adapté au cas par cas au vu de la diversité des stratégies thérapeutiques développées.

II. Cellules souches : Définition et catégories

II.1. Caractéristiques des cellules souches

L'organisme humain est composé de plus de cent mille milliards de cellules, unité élémentaire du vivant. Environ deux cents types cellulaires ont été identifiés et diffèrent par leur origine et leur niveau de spécialisation. Minoritaires au sein de l'organisme, les CSs se distinguent des cellules différenciées spécialisées et se définissent par deux propriétés spécifiques :

- leur capacité d'auto-renouvellement, à savoir la capacité à se diviser pendant de très longues périodes, permettant d'assurer le maintien d'un stock constant de CSs rapidement mobilisables en cas d'atteinte tissulaire. Deux modalités de division ont été identifiées. Contrairement à la division symétrique qui permet de générer deux cellules filles identiques à la cellule d'origine qui peuvent ensuite se différencier selon les signaux environnementaux, la division asymétrique génère deux cellules filles différentes. En effet, l'une des deux cellules est identique à la cellule mère, assurant ainsi le maintien d'un stock de CSs quiescentes, alors que la 2nd cellule hérite de facteurs initiant son engagement dans un programme de différenciation (Neumüller and Knoblich, 2009).

- leur plasticité, autrement dit la capacité à générer un ou plusieurs types cellulaires différenciés en fonction des signaux environnants.

Ces deux propriétés leur permettent d'assurer le fonctionnement des organes tout au long de la vie de l'organisme en permettant le maintien de l'intégrité des tissus par remplacement des cellules altérées au cours du renouvellement naturel du tissu, d'un accident, du vieillissement ou d'une pathologie.

II.2. Spécialisation des cellules souches

Quatre catégories de CSs ont pu être distinguées en fonction de la diversité des types cellulaires auxquels elles peuvent donner naissance, fortement liée au stade de développement : les CSs totipotentes, pluripotentes, multipotentes et unipotentes (Kolios and Moodley, 2013) (Figure 3).

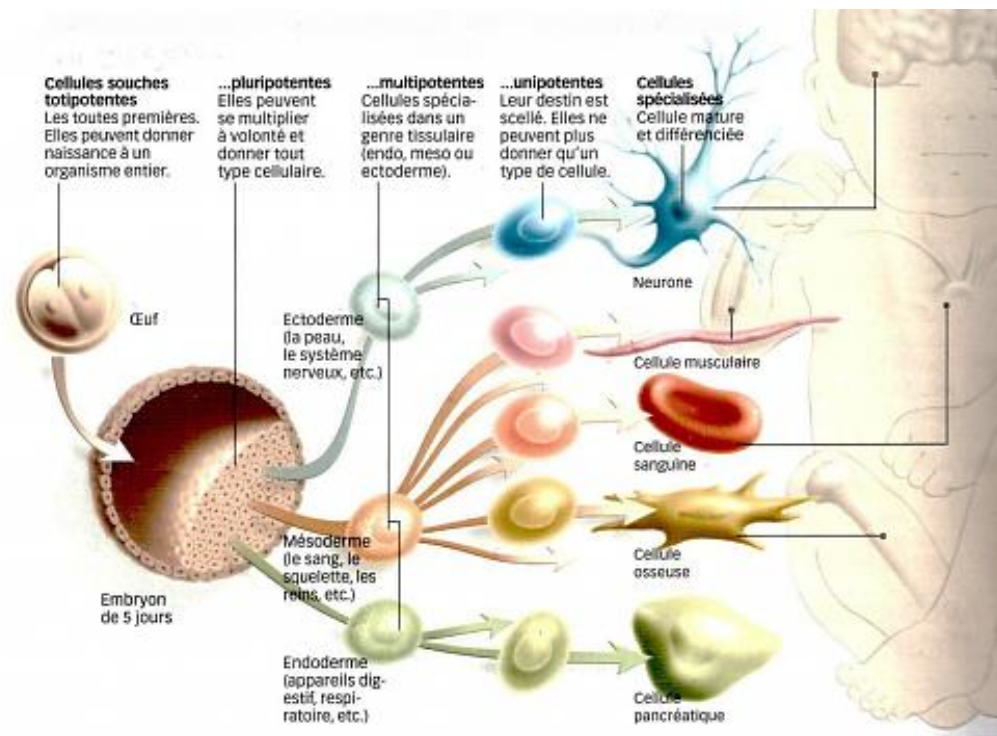


Figure 3. Hiérarchisation des cellules souches : différents degrés de différenciation des cellules totipotentes aux cellules différenciées (Science & Vie, 2006).

Les CSs totipotentes, ou blastomères, sont les cellules issues des 1^{ères} divisions de l'œuf fécondé (zygote). Elles sont à l'origine de toutes les lignées cellulaires de l'organisme issues des trois feuillet embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme) ainsi que des annexes extra-embryonnaires (placenta, membranes). La cellule totipotente peut donc potentiellement conduire seule au développement d'un organisme entier.

Les cellules pluripotentes, ou CSs embryonnaires (ESCs pour *embryonic stem cells*), proviennent de la masse cellulaire interne (ICM pour *inner cell mass*) du blastocyste et forment le bouton embryonnaire. Contrairement aux cellules totipotentes, les CSs pluripotentes sont capables de générer plus de 200 types cellulaires constituant un individu hormis les annexes embryonnaires. Elles ne peuvent de ce fait pas aboutir à la formation d'un organisme dans sa totalité.

Les CSs multipotentes sont dites « déterminées », soit déjà engagées dans un programme tissulaire spécifique, limitant leur potentiel de différenciation à quelques types cellulaires. On les retrouve à différents stades du développement, du stade fœtal au stade adulte. C'est le cas des HSCs qui peuvent générer toutes les cellules de la lignée sanguine tels que les globules rouges, les lymphocytes, les polynucléaires ou encore les macrophages.

Finalement, les CSs unipotentes ou progéniteurs ne peuvent donner qu'un seul type cellulaire mais conservent leur propriété d'autorenouveaulement, les distinguant ainsi des précurseurs. C'est le cas notamment des CSs intestinales qui assurent la régénération de l'intestin.

II.3. Origine des cellules souches

En considérant cette fois-ci leur origine, les CSs peuvent être classées en quatre principales catégories. Elles peuvent provenir de l'embryon (ESCs), du fœtus (FSC pour *fœtal stem cells*) ou de l'organisme adulte (cellules souches adultes ; CSA). La dernière catégorie concerne les cellules pluripotentes induites (iPSCs pour *induced pluripotent stem cells*). Cette partie rapporte les principales caractéristiques de ces cellules, qui seront discutées plus en détails dans le chapitre 3, pour l'application thérapeutique qui nous intéresse, à savoir les pathologies musculaires.

II.3.1. Cellules souches embryonnaires

Les ESCs sont des cellules pluripotentes issues de l'ICM du blastocyste. Isolées chez la souris en 1981, elles sont capables de générer tous les types cellulaires issus des trois feuillets embryonnaires et de proliférer indéfiniment *in vitro* dans un état indifférencié (Evans and Kaufman, 1981), leur conférant ainsi un incroyable potentiel pour des applications de médecine régénératrice. Isolées en 1998, les ESCs humaines sont définies par une forte activité télomérase et par l'expression des marqueurs de surface suivants : les antigènes

spécifiques du stade embryonnaire (SSEA pour *stage-specific embryonic antigen*) SSEA-3 et SSEA-4, les antigènes de rejet tumoraux (TRA pour *tumor rejection antigen*) TRA-1-60 et TRA-1-81, la phosphatase alcaline (ALP pour *alkaline phosphatase*) ou encore les facteurs de transcription Nanog et Oct-4 qui permettent le maintien dans un état indifférencié (Kolios and Moodley, 2013; Mimeault et al., 2007; Thomson et al., 1998). Elles sont également caractérisées par la capacité à générer des tératomes après injection dans un modèle murin immunodéficient (SCID pour *severe combined immunodeficiency*) (Thomson et al., 1998). Les conditions de culture sont primordiales pour le maintien des cellules dans un état indifférencié ou pour les engager dans une voie de différenciation particulière. Celles-ci sont aujourd'hui bien définies et permettent d'obtenir des quantités de cellules indifférenciées considérables généralement en présence de nombreux facteurs de croissance (GFs pour *growth factors*) et de cellules nourricières (généralement des fibroblastes embryonnaires) (Kolios and Moodley, 2013; Yao et al., 2006). Il a néanmoins été démontré une accumulation importante d'anomalies génétiques au cours de la culture (Spits et al., 2008). De plus, l'utilisation de ces cellules est aujourd'hui limitée par leur fort pouvoir mitogène et tumorigène (Cunningham et al., 2012) ainsi que par des considérations d'ordre éthique quant à l'utilisation d'embryons humains (Mimeault et al., 2007; Zarzeczny and Caulfield, 2009).

II.3.2. Cellules souches fœtales et placentaires

Des CSs ont pu être isolées à différents stades du développement fœtal. Parmi ces cellules, les CSs germinales (EG pour *embryonic germ cells*) sont dérivées de tissus primitifs (entre 5 et 9 semaines). Malgré leurs propriétés intéressantes (pluripotence et fort potentiel prolifératif), leur utilisation à grande échelle semble difficile à concevoir et soulève au même titre que les ESCs des préoccupations éthiques (Zare et al., 2014). Une alternative plus sécuritaire aux ESCs réside dans l'utilisation des cellules épithéliales amniotiques (AEC pour *amniotic epithelial cells*) dérivées de la membrane du placenta dans le sens où ces cellules sont capables de se différencier dans les lignées issues des trois volets embryonnaires, de proliférer avec des taux importants et ce, sans perte de leur pluripotence et sans présenter de potentiel tératogène (Mimeault et al., 2007; Zare et al., 2014). Plus récemment, une autre population de CSs possédant ces mêmes avantages et représentant une source facilement accessible, a été isolée à partir du liquide amniotique (De Coppi et al., 2007). Finalement, le sang de cordon ombilical, ou sang placentaire, constitue une source intéressante de HSCs, dans le sens où d'une part il implique des manipulations peu nombreuses, non invasives et

facilement réalisables, et d'autre part il limite le risque d'infections (Barker and Wagner, 2003). Des CSs multipotentes ont également pu être isolées à partir de différents tissus fœtaux, tels que le sang, la moelle osseuse ou encore le foie et les reins. Néanmoins, bien que leurs propriétés intrinsèques soient prometteuses, ces cellules soulèvent au même titre que les ESCs des problèmes éthiques.

II.3.3. Cellules souches adultes

Les CSAs sont présentes au sein de nombreux tissus et organes adultes appartenant aux trois feuilletts germinaux, dont le sang, la moelle osseuse, la peau ou encore les muscles (Figure 4). Leur rôle principal est de maintenir l'intégrité des tissus afin de préserver leur fonction, en assurant le renouvellement des cellules mortes naturellement ou après une lésion. Deux types de tissus peuvent être distingués : les tissus à renouvellement rapide (épithélium intestinal, épiderme, sang...) au sein desquels les CSs vont fonctionner en permanence tout au long de la vie de l'individu et rester sous une forme active, et les tissus quiescents à renouvellement lent (muscle, foie, cerveau...) au sein desquels les CSs sont quiescentes et activées seulement lors de lésions tissulaires (Coulombel, 2003; Mimeault et al., 2007). À l'état de quiescence, ces cellules sont généralement localisées dans un micro-environnement appelé « niche », dont les changements, que ce soit par interactions cellulaires ou réception de signaux divers, vont influencer leur comportement (Mimeault et al., 2007).

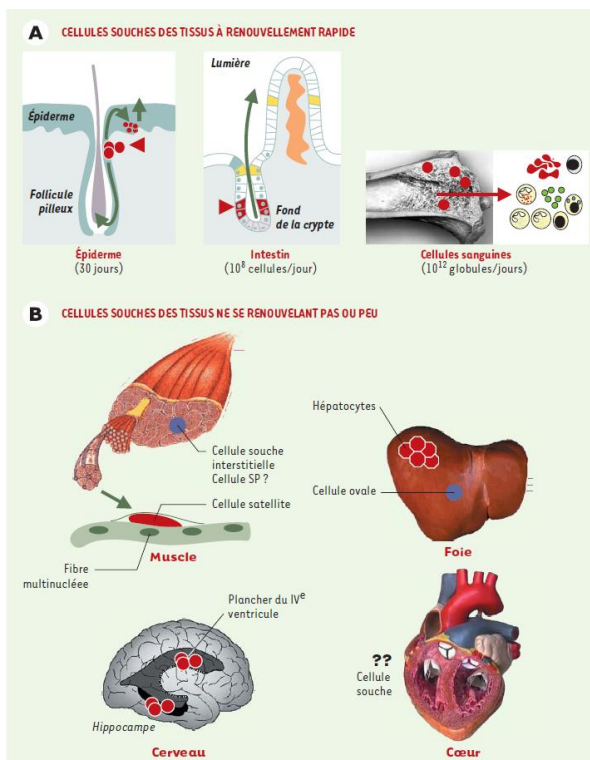


Figure 4. Localisation des cellules souches adultes (Coulombel, 2003). Les cellules souches adultes sont présentes et actives en permanence au sein de tissus à renouvellement rapide (épiderme, intestin, système hématopoïétique) mais on les retrouve également dans des tissus dits quiescents au sein desquels elles ne s'activent que suite à des dommages dus à un accident, une pathologie ou le vieillissement.

La plupart de ces cellules sont multipotentes ou unipotentes et donc présentent un potentiel de différenciation moindre par rapport aux ESCs et FSCs, mais bénéficient d'un potentiel de prolifération important. Contrairement à ces cellules, elles ne sont généralement pas tumorigènes et présentent l'avantage de pouvoir provenir du patient lui-même (transplantation autologue), évitant ainsi les risques de réaction immunitaire. Par ailleurs, leur utilisation soulève moins de problèmes éthiques.

La diversité des CSAs offre des perspectives thérapeutiques dans de nombreux domaines. Les plus décrites et utilisées en clinique sont les cellules dérivées de la moelle osseuse (BMSCs pour *bone marrow-derived stem cells*), dont font partie les HSCs et les MSCs ou encore les cellules progénitrices endothéliales (EPCs pour *endothelial progenitor cells*). Des CSs ont également pu être isolées à partir de nombreux autres organes, comme les SCs dans le muscle squelettique, les cellules souches cardiaques (CSCs pour *cardiac stem cells*) ou encore les cellules souches neuronales (NSCs pour *neural stem cells*) (Mimeault et al., 2007; Preynat-Seauve and Krause, 2011; Zare et al., 2014). Les MSCs sont aujourd'hui les plus étudiées, favorisées par la facilité d'accès et un niveau de manipulation *ex vivo* réduit (Stuart and Pattavilakom, 2015). Elles sont capables de se différencier dans de nombreux types cellulaires spécifiques de différents tissus quand elles sont placées dans des conditions de culture adaptées (os, cartilage, tissu adipeux...) et bénéficient d'un comportement immun privilégié grâce à leurs propriétés immunomodulatrices, limitant le rejet de greffe (Aggarwal and Pittenger, 2005; Le Blanc and Ringdén, 2007; Meirelles et al., 2009; Di Nicola et al., 2002). Initialement dérivées de la moelle osseuse (Friedenstein et al., 1976), ces cellules peuvent aujourd'hui être isolées à partir de nombreux tissus (tissu adipeux, placenta, cartilage, muscles...) (Crisan et al., 2008; García-Gómez et al., 2010). En termes d'efficacité thérapeutique, différentes études *in vitro* et *in vivo* utilisant les MSCs ont montré une efficacité comparable des approches autologues et allogéniques concernant la suppression de la réponse immunitaire et la stimulation de la régénération tissulaire (Karantalis et al., 2015; Muraca et al., 2017). Malgré leur statut immun privilégié, leur survie *in vivo* reste limitée, indiquant que leur effet thérapeutique n'est pas dû à leur persistance au sein des tissus (Muraca et al., 2017).

II.3.4. Cellules souches pluripotentes induites

Une avancée majeure dans le domaine des CSs a été la découverte en 2006 par l'équipe de Takahashi et Yamanaka, d'un ensemble de gènes (récapitulant le programme

génétique des ESCs) capables de réinitialiser le programme de différenciation de cellules somatiques différenciées murines (fibroblastes), générant ainsi des cellules pluripotentes, appelées cellules souches pluripotentes induites (iPSCs pour *induced pluripotent stem cells*) (Takahashi and Yamanaka, 2006). Peu de temps après, des iPSCs humaines ont été parallèlement générées à partir de fibroblastes de sujets adultes, grâce à deux cocktails de quatre gènes : Octamer-binding transcription factor 3/4 (*OCT3/4*), SRY-related high mobility group box protein-2 (*SOX2*), l'oncoprotéine *c-MYC* et le Kruppel-like factor 4 (*KLF4*) (Takahashi et al., 2007) ou *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* et *LIN28* (Yu et al., 2007). Ces cellules sont comparables aux ESCs en ce qui concerne les taux de prolifération, le phénotype ou encore le niveau de pluripotence mais présentent l'avantage de pallier aux problèmes éthiques inhérents à l'utilisation d'embryons humains. Il est possible de générer des iPSCs autologues (du patient lui-même) et donc non immunogènes, à partir d'un échantillon de tissu prélevé de façon peu invasive (Stuart and Pattavilakom, 2015). Néanmoins, le nombre important de manipulations nécessaires à la programmation des iPSCs, leur maintien en culture et leur différenciation vers une lignée spécifique, sont autant de facteurs de risques : risque de formation de tératomes dû à la présence de cellules indifférenciées résiduelles au sein de la population de cellules différenciées dérivées d'iPSCs et risque d'aberrations chromosomiques qui peuvent soit être présentes initialement dans les cellules somatiques utilisées pour la reprogrammation, soit résulter du procédé de reprogrammation ou des conditions de culture. De nombreuses équipes travaillent sur l'optimisation de ce procédé, et notamment sur l'étape de reprogrammation afin d'améliorer le rendement mais également la sécurité (Herberts et al., 2011; Muraca et al., 2017; Stuart and Pattavilakom, 2015).

Une autre technologie récente et prometteuse de reprogrammation de cellules somatiques pour des applications autologues est la technologie de transfert nucléaire de cellules somatique (SCNT pour *Somatic cell nuclear transfer*) qui consiste à transférer le noyau d'une cellule somatique dans un oocyte allogénique, induisant la reprogrammation du noyau à un état pluripotent comparable aux ESCs (Tachibana et al., 2013). Cette technique encore récente pourrait être une alternative moins contraignante aux iPSCs.

Cette 1^{ère} partie non exhaustive illustre bien la diversité des CSs pouvant être présentées comme candidates à la TC. Considérant la capacité de différenciation importante de ces cellules, de nombreuses pathologies actuellement sans traitement sont ciblées par ces stratégies prometteuses. Elles présentent chacune des avantages et des limites, inhérents aux caractéristiques intrinsèques de la cellule (quantité initiale, facilité d'amplification *in vitro*, potentiel de différenciation, prolifération...) ou à leur origine pouvant notamment soulever des problèmes éthiques.

III. Evolution de la démarche de thérapie cellulaire

III.1. Débuts de la thérapie cellulaire

La 1^{ère} démonstration de TC a été réalisée en Suisse dès 1931. L'état critique d'un patient suite à la détérioration de ses glandes parathyroïdes lors d'une opération chirurgicale a amené le professeur Paul Niehans à injecter une préparation cellulaire issues de glandes parathyroïdes de veau, pensant initialement que les hormones contenues dans cette solution participeraient à la stabilisation de l'état du patient. L'amélioration clinique du patient fût rapide et permanente, lui offrant de nombreuses années à vivre, et ce, sans effet secondaire et sans nécessité de renouvellement du traitement. Ce 1^{er} succès incita alors le Pr Niehans à délaisser la transplantation de glandes intactes au profit d'extraits d'organes injectables qu'il prépara ensuite à partir de différents organes.

Bien que l'identification d'un ancêtre commun à toutes les cellules sanguines ait été évoquée dès 1909 par le chercheur russe Alexander Maximov, introduisant alors l'idée de multipotence et de CSAs, il faudra attendre 1957 pour la 1^{ère} transplantation de moelle osseuse humaine par le médecin ED Thomas comme nouvelle approche au traitement de cancer (Thomas et al., 1957) et encore 11 ans supplémentaires pour observer le 1^{er} succès de transplantation de HSCs (Tavassoli and Crosby, 1968). La prise de conscience de l'importance de sélection du donneur et le développement de techniques permettant d'évaluer la compatibilité donneur-receveur dans le but d'éviter le rejet de greffe et la réaction du greffon contre l'hôte (GVHD pour *graft-versus-host disease*) permirent progressivement d'améliorer le traitement et d'observer d'importants succès. Plus d'un million de transplantations de HSCs ont été réalisées depuis, et les travaux initiaux de ED Thomas lui permirent de se voir décerner le prix Nobel en 1990 (Appelbaum, 2007).

III.2. Thérapie cellulaire : 4^{ème} pilier de la médecine moderne ?

Les thérapies cellulaires à base de HSCs sont aujourd'hui un traitement de choix pour les cancers du sang ou les affections de la moelle osseuse. En parallèle, d'autres stratégies thérapeutiques à base de CSs sont actuellement à l'étude pour un large spectre de pathologies qui restent sans traitement (Figure 5).

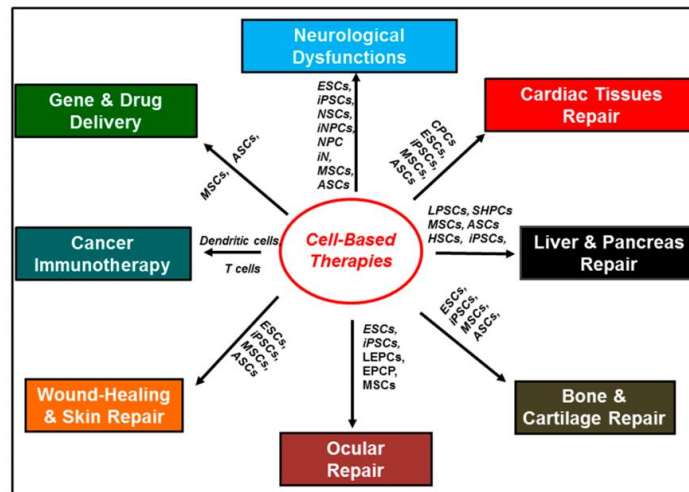


Figure 5. Représentation schématisée des applications de thérapie cellulaire en médecine régénératrice et oncologie (Ngen and Artemov, 2017). Les abréviations correspondent aux différents types cellulaires suivants : embryonic stem cells (ESCs); neural stem cells (NSCs); neural progenitor cells (NPCs); mesenchymal stem cells (MSCs); induced pluripotent stem cells (iPSC); induced neuronal cells (iN); induced neuronal progenitor cells (iNPCs); adipose-derived stem cells (ADSCs); embryonic germinal stem cells (EGC); endothelial progenitor cells (EPCs); cardiac progenitor cells (CPCs); lens epithelial progenitor cells (LEPCs); epithelial progenitor cells (EPCP); small hepatocytes-like progenitor cells (SHPCs); liver stem cells/progenitor cells (LPSCs); sinusoidal endothelial progenitor cells (SEPCs); hematopoietic stem cells (HSCs); and adipose stem cells (ASCs).

En effet, grâce aux avancées des connaissances et des technologies, des études de plus en plus nombreuses relatent l'identification voire jusqu'à la preuve de concept chez l'animal de nouveaux candidats thérapeutiques, apportant de grands espoirs aux patients et à la communauté scientifique. Les MSCs, les ESCs ou encore les iPSCs représentent la majorité de ces nouvelles stratégies.

En 2010, plus de 2500 ECs avaient été initiés et ce nombre n'a cessé de croître (Mason et al., 2011). La diversité des bases de données, la dénomination très variable de ces traitements, l'absence de rapports ou de publications de résultats, qu'ils soient bons ou mauvais ou encore la mauvaise qualité de certains rapports compliquent la quantification des ECs. Par des approches plus ou moins similaires, différentes études ont néanmoins rapporté

un état des lieux des ECs réalisés ces dernières années (Bubela et al., 2012; Fung et al., 2017; Li et al., 2014; Trounson and McDonald, 2015). Malgré les grands espoirs et le nombre conséquent de laboratoires travaillant sur cette nouvelle approche, les propositions thérapeutiques aboutissant à un EC sont peu nombreuses, notamment pour des raisons de coûts et de temps de recherche et développement (R&D) comprenant les études réglementaires nécessaires à la conception du dossier. Bien que les ESCs soient largement représentées dans la littérature, compte tenu de leurs potentiels d'expansion et de différenciation leur conférant une attractivité particulière, le nombre d'études aboutissant à un EC est cependant beaucoup plus restreint (Kimbrel and Lanza, 2015; Ratcliffe et al., 2013). De la même façon, un seul EC utilisant les iPSCs a été rapporté. Initié en 2014 sur un patient atteint de dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), cet EC a été suspendu après inclusion du 2nd patient, suite à l'identification d'une mutation au niveau d'un oncogène (Muraca et al., 2017). Les ECs sont dominés par l'utilisation des CSAs qui ne partagent pas les mêmes préoccupations éthiques que les ESCs et principalement les HSCs ou les CSs dérivées de sang de cordon ombilical. Grâce à leur comportement immun privilégié, les MSCs représentent aujourd'hui l'outil le plus prometteur avec 4435 publications contre 3797 pour les HSCs dans la seule année 2015 (Muraca et al., 2017). Depuis 2007, un nombre grandissant d'ECs utilisant ces cellules ont été initiés (Bubela et al., 2012; Fung et al., 2017; Li et al., 2014; Trounson and McDonald, 2015) avec 374 ECs identifiés en 2015, soit trois fois plus qu'en 2011 (Trounson and McDonald, 2015). Il est également intéressant de noter que plus de 87% des ECs sont à des stades précoces (Phases I/II) et seulement 1% arrive en phase IV, illustrant un succès limité de transfert des études précliniques à l'Homme, dont la cause principale identifiée reste la difficulté de financement. En ce qui concerne les modalités d'administration, il a été rapporté des proportions comparables de thérapies allogénique (55%) et autologue (45%) (Ratcliffe et al., 2013).

Les résultats précliniques prometteurs et la forte communication nécessaire à l'obtention de fonds ont soulevé des espoirs importants de la part des investisseurs, des patients et du public qui ne sont pas totalement en phase vis-à-vis de l'avancement réel des développements cliniques (Bubela et al., 2012). Certaines publications permettent néanmoins de tempérer ces espoirs en repositionnant la complexité des processus cellulaires générant des études précliniques et un transfert clinique très longs et économiquement lourds. Il a été estimé que ce développement de la preuve de concept vers la clinique nécessiterait une vingtaine d'année (Bubela et al., 2012; Daley, 2010).

Finalement, malgré un nombre grandissant de publications et d'ECs, rares sont ceux qui parviennent à obtenir l'AMM. Depuis 2009, seuls six produits de TC ont obtenu en Europe l'approbation du CHMP de l'EMA, dont deux utilisant des CSs, et seulement la moitié est encore sur le marché à l'heure actuelle (Annexe I). Outre atlantique, la FDA ne bénéficie pas d'un catalogue beaucoup plus important. Outre les produits de transplantation de progéniteurs hématopoïétiques (HPC Cord Blood), le marché américain propose des produits cellulaires indiqués pour la réparation de dommages cartilagineux (Carticel, chondrocytes autologues, 2007 ; MACI, 2013) ou mucogingivaux (GINTUIT, kératinocytes et fibroblastes allogéniques, 2012), de cancers de la prostate (Provenge[®], 2010) ou encore pour le traitement des rides (Laviv/Azficel-T, fibroblastes autologues, 2011). En effet, si la route jusqu'à l'AMM est déjà difficile, le maintien sur le marché reste complexe. Des raisons sécuritaires mais surtout économiques (coûts de production et marché très restreint) rendent ces thérapies innovantes très vulnérables (Dodson and Levine, 2015).



Cet état des lieux des publications et des nombreux ECs engagés reflète l'engouement certain pour ces nouvelles stratégies thérapeutiques de la part des chercheurs, de l'industrie, des patients mais également du grand public. Néanmoins, le faible nombre de produits actuellement sur le marché eu égard aux nombreux candidats thérapeutiques illustre également bien les difficultés auxquelles sont confrontés les laboratoires industriels ou académiques. Ces difficultés d'ordres financiers et technologiques, dues à la complexité biologique de ces nouveaux traitements, la longueur de transfert des travaux expérimentaux vers la clinique, la réglementation encore jeune et méfiante ou encore un positionnement économique difficile, génèrent des dérives pouvant avoir des conséquences désastreuses, qui se manifestent notamment par une augmentation du tourisme médical auquel les pays développés n'échappent pas (Barclay, 2009; Bubela et al., 2012; Fung et al., 2017; Turner and Knoepfler, 2016).

Chapitre 2. Définition d'un produit de thérapie cellulaire

Le Chapitre 1 a permis d'explorer la diversité des stratégies de TC actuellement développées en termes de candidats cellulaires et d'applications thérapeutiques. L'objectif de ce 2nd chapitre est de détailler les prérequis nécessaires à la définition d'un produit de thérapie cellulaire (PTC) dans le but de réaliser une demande d'EC. Cette définition passe tout d'abord par une maîtrise du procédé de production qui doit être assurée à toutes les étapes allant du prélèvement biologique au conditionnement. Ensuite, le candidat cellulaire doit être caractérisé par les études précliniques qui permettent de documenter certains aspects tels que l'identité de la population cellulaire, la potentialité ou encore l'efficacité, afin de définir des spécifications qui seront utilisées lors des contrôles qualité, et qui sont intrinsèquement liées à son procédé de préparation. Finalement, l'évaluation des risques associés à la stratégie de TC doit permettre de s'assurer de son innocuité.

I. Confection du produit cellulaire à usage clinique

I.1. Respect des bonnes pratiques de fabrication

La maîtrise de la qualité d'un PTC repose sur le respect des GMPs, un ensemble de principes qui doivent être appliqués à toutes les étapes du procédé de production (Sheu et al., 2014). La définition d'un procédé de production robuste permet en effet d'assurer l'homogénéité et la reproductibilité, tout en maintenant un risque de contamination minimum. Ces normes sont érigées par une législation nationale ou internationale et leur respect est contrôlé par les agences règlementaires respectives, telles que l'EMA ou la FDA. En Europe, elles sont définies dans les directives 2003/94/EC et 91/356/EEC (Sart et al., 2014a; Sheu et al., 2014). Ces principes s'appliquent aux locaux de production et aux matériels mais impliquent également la formation du personnel et la mise en place d'un système qualité de documentation et de traçabilité.

Souvent négligées dans les 1^{ères} phases de développement dans la mesure où elles engendrent des coûts et des contraintes importants, ces mesures doivent être prises en compte le plus tôt possible au cours du développement du PTC. Les spécifications de la population cellulaire présentée comme candidat thérapeutique (efficacité, sécurité...) devront en effet être obtenues dans des conditions robustes et reproductibles compatibles avec une application

clinique. Le transfert de protocoles de grade recherche à des protocoles respectant les standards GMPs représente toutefois un challenge de taille, car contrairement aux produits pharmacologiques, les propriétés du produit cellulaire peuvent varier en réponse à des variations de leur environnement. Les 1^{ères} phases de développement préclinique, dont la preuve de concept chez l'animal, étant généralement réalisées dans des conditions de grade recherche, il est nécessaire de démontrer l'impact de tout changement dans le protocole sur l'identité, les potentialités et l'innocuité du produit cellulaire (Campbell et al., 2015). Il est en effet préférable que tous les produits qui entrent en contact avec des organes, tissus ou cellules au cours du protocole de production bénéficient d'un statut (dispositif médical, marquage CE ou produit thérapeutique annexe (PTA)) qui implique notamment le respect de règles de bonnes pratiques dont les GMPs. En pratique, beaucoup d'éléments n'ont pas de statut et il est alors nécessaire de documenter l'innocuité, la qualité et l'efficacité *in vitro* revendiquée.

I.2. Procédé de production d'un produit de thérapie cellulaire

Les PTCs peuvent différer par leur source, leur quantité initiale, leur niveau d'homogénéité (population clonale ou mélange de différentes populations cellulaires), leur potentiel de prolifération ou encore leur niveau de différenciation. Il en découle une multitude de procédés de production. Malgré la diversité des candidats thérapeutiques, de nombreuses similitudes sont retrouvées au niveau du procédé qui peut généralement être divisé en différentes étapes clés, applicables selon les protocoles (Figure 6) :

- le prélèvement de l'échantillon biologique (tissu, cellules)
- la sélection / l'isolement de la population cellulaire d'intérêt
- l'amplification *in vitro*
- la formulation / le conditionnement
- le stockage et / ou la distribution aux sites d'administration
- le conditionnement et l'administration du produit cellulaire au patient

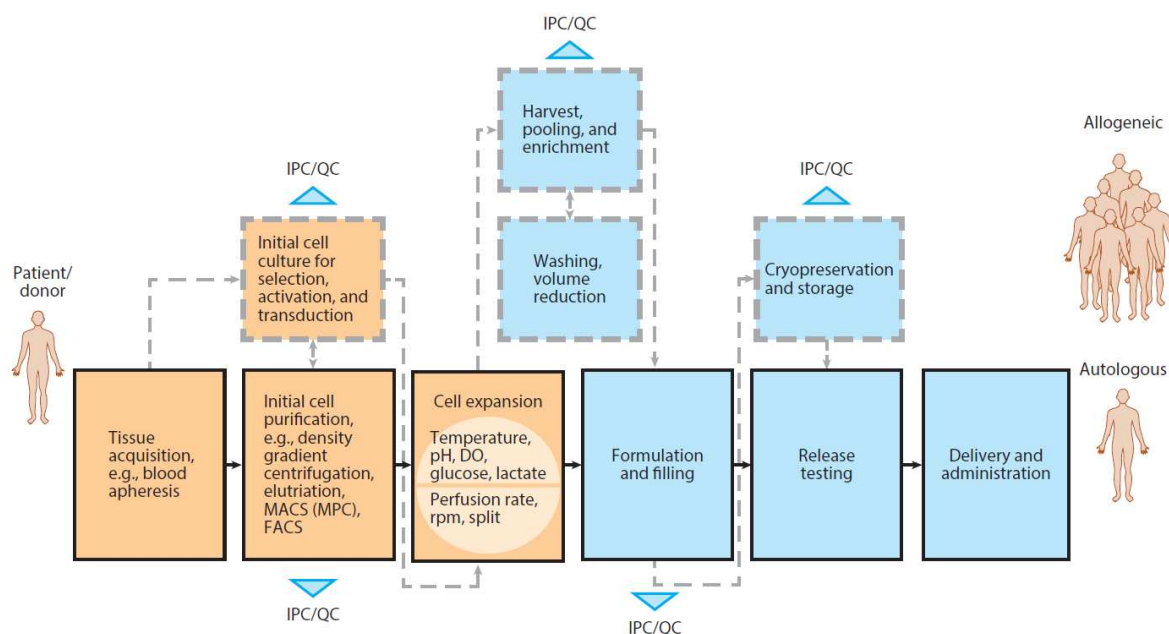


Figure 6. Procédé de production d'un produit de thérapie cellulaire (Roh et al., 2016). Après acquisition du prélèvement biologique, les cellules d'intérêt sont sélectionnées/purifiées puis potentiellement amplifiées dans des conditions de culture maîtrisées. Après récupération, les cellules sont conditionnées puis stockées ou distribuées vers les sites d'administration. Avant administration, des contrôles qualité de libération des lots cliniques sont réalisés. Abréviations : DO, dissolved oxygen ; FACS, fluorescence-activated cell sorting ; IPC, In-process control ; MACS, magnetic activated cell sorting ; QC, quality control.

La durée du procédé de production est variable, allant de quelques semaines notamment pour les modalités autologues qui ne nécessitent pas d'amplification importante, à plusieurs mois pour des protocoles plus complexes comme ceux impliquant les cellules pluripotentes qui nécessitent, en plus de la phase de reprogrammation, une phase de différenciation (Ratcliffe et al., 2011). Ces différentes étapes, leur potentiel de transfert clinique et les difficultés / contraintes qu'elles génèrent sont discutés dans cette 1^{ère} partie.

I.2.1. Prélèvement de l'échantillon biologique

Le procédé de production débute par l'identification de la source du prélèvement. Dans le cas de cellules autologues, chaque produit cellulaire sera issu d'un donneur différent, introduisant une hétérogénéité des populations cellulaires due aux différences d'âge, de genre, de condition de santé ou encore environnementales. Les modalités allogéniques requièrent quant à elles un criblage et la vérification de l'éligibilité du donneur par compatibilité du complexe majeur d'histocompatibilité (HLA pour *human leucocyte antigen*) complète ou partielle (Roh et al., 2016). Ce donneur peut être identifié au sein de banques qui auront

préalablement établi la sécurité du produit. L'âge du donneur, la taille, l'origine du prélèvement ou encore les conditions de traitement de ces prélèvements sont autant de paramètres à prendre en compte, introduisant une variabilité non négligeable, bien qu'il soit aujourd'hui encore difficile de déterminer des critères de sélection (identité, efficacité, sécurité...) pour qualifier un « bon donneur ».

L'âge du donneur est un paramètre majeur à prendre en compte. En effet, la moelle osseuse issue de jeunes patients contiendrait une concentration beaucoup plus importante d'unités formant des colonies (CFU-Fs pour *colony-forming unit-fibroblasts*) que celle de patients plus âgés. De plus, les MSCs qui en découlent présenteraient des capacités de prolifération et de différenciation supérieures (Baxter et al., 2004; Stolzing et al., 2008). Une importante hétérogénéité fonctionnelle a également été observée entre différentes populations d'iPSCs, qui serait due à la rétention d'une mémoire génétique donneur-spécifique issue des cellules somatiques d'origine (Kyttälä et al., 2016).

Outre les variations entre les donneurs, l'origine tissulaire du prélèvement peut également introduire des variabilités. C'est le cas par exemple des MSCs qui peuvent être isolées à partir de différents tissus et organes, dont les principaux sont la moelle osseuse, le tissu adipeux, le sang de cordon ou le cordon ombilical lui-même. L'évaluation du phénotype et des fonctionnalités de ces différentes populations ont révélé qu'elles n'étaient pas toutes équivalentes (Jin et al., 2013; Phinney and Sensebé, 2013; Sensebé et al., 2011; De Ugarte et al., 2003). De plus, bien qu'encore moins utilisées car elles représentent des sources moins abondantes, les MSCs issues de tissus fœtaux ou néonataux (cordon ombilical, membrane amniotique) seraient plus primitives (Bellavia et al., 2014; Sensebé et al., 2011). En ce qui concerne les iPSCs, elles sont généralement issues de fibroblastes facilement isolés à partir de biopsies de peau. Bien qu'accessibles, de telles biopsies restent invasives et la faible efficacité de reprogrammation ne positionnent pas les fibroblastes comme des candidats de choix. D'autres sources de cellules somatiques ont depuis été proposées, dont le sang, l'urine ou encore les kératinocytes dérivés de follicule pileux. Ces derniers, en plus d'être facilement accessibles, bénéficient d'une meilleure efficacité de reprogrammation (Raab et al., 2014). Ils nécessitent néanmoins des conditions de culture plus coûteuses et sont moins stables (5 passages) en culture que des fibroblastes (5-10 passages) (Raab et al., 2014). Présentant chacun leurs avantages et inconvénients, il apparaît nécessaire de prendre en compte tous les paramètres (condition du patient, coût, efficacité...) afin de choisir la source la plus adaptée.

Finalement, certains prélèvements biologiques peuvent nécessiter d'être acheminés aux sites de production, impliquant généralement l'utilisation de solutions de conservation afin de maintenir l'intégrité du tissu et/ou des cellules à basse température (4-8°C ou congélation <-60°C). Il est nécessaire de bien définir ces conditions de conservation de tissus avant isolement. L'utilisation de prélèvements de moelle osseuse congelés permettrait par exemple de faciliter la logistique et limiter les variabilités lors d'un schéma à multiples injections, mais pourrait induire des variabilités en termes de viabilité ou de phénotype dont les implications cliniques doivent être évaluées (Kaplan et al., 2017). D'autres prélèvements nécessitent une prise en charge et l'isolement des cellules d'intérêt très rapidement. C'est le cas des MSCs dérivées de sang de cordon dont le temps entre la collecte et l'isolement ne doit pas excéder 15 heures (Bieback et al., 2004).

I.2.2. Sélection et purification de l'agent cellulaire

La population d'intérêt est généralement localisée au sein d'un tissu ou fluide biologique constitué de nombreux types cellulaires. Une étape de sélection / purification de la population d'intérêt est alors nécessaire (Figure 6). Les techniques et les protocoles utilisés sont très variables et dépendent du type cellulaire, plusieurs stratégies étant par ailleurs parfois proposées pour la même population cellulaire. C'est le cas des MSCs pour lesquelles de nombreuses stratégies d'isolement sont utilisées et apportent différents degrés de pureté. En effet, alors que des MSCs peuvent être isolées à partir de fluides (sang de cordon, extrait de moelle osseuse...), les cellules souches adipeuses (ASCs pour *adipose stem cells*) sont quant à elles isolées par aspiration ou excision de tissu adipeux, ce qui nécessite l'utilisation d'enzymes de dissociation. Après un gradient de densité qui permet d'isoler les cellules mononucléées (MNCs pour *mononucleated cells*) du sang ou de la moelle osseuse, les BM-MSCs et ASCs sont généralement isolées sur la base de leur propriété d'adhérence au plastique. D'autres procédés d'isolement vont au contraire se baser sur le déficit d'adhérence ou adhérence tardive comme c'est le cas pour les cellules souches dérivées du muscle (MDSCs pour *muscle-derived stem cells*). Après une 1^{ère} étape de dissociation mécanique et enzymatique permettant d'obtenir les cellules dérivées du muscle (MDCs pour *muscle-derived cells*), la technique de preplating qui consiste en une succession de transferts de surnageant, permet de séparer les fibroblastes et myoblastes qui adhèrent dans les 1^{ères} phases, des MDSCs qui ne vont adhérer qu'après plus de 72h (Qu-Petersen et al., 2002). D'autres populations cellulaires bénéficient quant à elles de marqueurs spécifiques qui leur permettent

d'être isolées par des méthodes de tri cellulaire (FACS, tri sur colonne par affinité ou magnétique...). C'est le cas par exemple des cellules circulantes AC133⁺ exprimant l'antigène CD133 (Torrente et al., 2004) ou des HSCs isolées par FACS sur la base de l'expression du cluster de différenciation (CD pour *cluster of differentiation*) CD34 seul ou d'un ensemble de marqueurs (CD34⁺, CD90⁺, Lin⁻), qui permet d'améliorer les taux de pureté (Domen et al., 2006). Certaines équipes ont notamment ajouté une étape d'enrichissement par immunomagnétisme sur la base de l'expression de certains antigènes tels que STRO-1 (Gronthos et al., 2003), le CD49a (Deschaseaux and Charbord, 2000), le CD200 (Delorme et al., 2008) ou encore le CD271 (récepteur de faible affinité au facteur de croissance nerveuse) (Quirici et al., 2002) dans le but de purifier la population de MSCs.

En ce qui concerne les iPSCs, l'étape de sélection de la population de cellules somatiques d'origine est poursuivie par l'étape d'induction de la pluripotence ou de dédifférenciation. Traditionnellement, les iPSCs sont générées par transfert d'un ensemble de gènes de reprogrammation (*OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *NANOG*, *LIN28* et *c-MYC* ; paragraphe II.3.4) par l'intermédiaire d'un vecteur rétroviral ou lentiviral. Néanmoins, l'utilisation en clinique de cette méthode d'insertion virale des gènes au sein du génome est limitée par les risques de tumorigénicité associés à l'altération de l'intégrité génétique (Kumar et al., 2017). Des méthodes alternatives ont depuis été proposées telles que l'utilisation de plasmides, d'adénovirus ou encore de protéines recombinantes. Celles-ci restent néanmoins moins efficaces. Plus récemment, l'utilisation de transposons, éléments génétiques mobiles non viraux, est apparue comme l'alternative la plus sécuritaire et cliniquement pertinente (Kumar et al., 2017).

Un élément important à considérer dans la notion de sélection / purification des cellules d'intérêt est qu'elles sont présentes et isolées en quantités très limitées. En ce qui concerne les CSAs, les HSCs ne représentent par exemple que 0,1 à 0,3% des cellules de la moelle osseuse (Spangrude et al., 1988). Selon Pittenger et al., la fréquence des MSCs au sein de la moelle osseuse serait encore bien plus faible et estimée entre 0,001 et 0,01% des cellules mononucléées, et en quantité moindre dans le sang périphérique et le sang de cordon (Wexler et al., 2003). Le rendement d'obtention des cellules pluripotentes n'est également pas très élevé en raison d'une part du faible nombre de cellules composant l'ICM du blastocyste dans le cas des ESCs et d'autre part du rendement de transformation des iPSCs qui est généralement très faible (Stadtfield and Hochedlinger, 2010). Alors qu'elle est évaluée à 0,01-0,5% à partir de fibroblastes, l'efficacité d'isolement est beaucoup plus importante à partir de

cellules urinaires (0,1-4%) ou de kératinocytes (1-2%) (Raab et al., 2014). Une étape d'amplification *in vitro* s'avère dans la majorité des cas nécessaire pour atteindre la dose thérapeutique souhaitée.

Finalement, la définition d'un protocole et de procédures standardisés ainsi que l'utilisation de composés produits dans le respect des normes GMPs sont nécessaires pour le développement d'un procédé de production de PTC robuste et reproductible dans le sens où tous les paramètres d'isolement (volume, temps, concentration, produit utilisé...) peuvent fortement influencer le rendement, la pureté et les caractéristiques de la population cellulaire (Bieback et al., 2004; Chang et al., 2009; Fennema et al., 2009; Seeger et al., 2007).

I.2.3. Amplification *ex vivo*

Considérée comme une manipulation substantielle (EMA/CAT/571134/2009), l'étape d'amplification *ex vivo* est nécessaire pour la majorité des applications cliniques pour lesquelles la transplantation des cellules fraîchement extraites n'est pas envisageable. Les quantités initiales de cellules étant généralement très faibles (paragraphe I.2.2) au regard des doses thérapeutiques évaluées (10^8 à 10^{10} cellules par patient en fonction de l'application thérapeutique), la mise en place de systèmes de production à large échelle devient indispensable au cours de l'avancement dans le développement clinique. Il a par exemple été évalué que la dose optimale pour la transplantation de HSCs pour un adulte de 70 kg allait de $4,2 \cdot 10^8$ à $5,6 \cdot 10^8$ cellules CD34⁺ ou encore que 10^9 PSCs étaient nécessaires pour obtenir suffisamment d'îlots pancréatiques dans le cadre du diabète de type I (Wang et al., 2014a). Même dans le cas de doses thérapeutiques plus faibles, cette amplification *ex vivo* s'avère nécessaire dès lors que l'on considère la multiplication du nombre de patients et les quantités de cellules nécessaires aux contrôles qualité. De fait, la production à large échelle dans des conditions robustes, reproductibles et respectant les GMPs représente un obstacle majeur dans le développement d'un PTC. Différents paramètres de culture, qui doivent être pris en compte dans leur ensemble, seront discutés dans cette partie : les systèmes de culture (adhérence/suspension, manuel/automatisé...), la composition de l'environnement cellulaire (milieu de culture, matrice...), la densité cellulaire d'ensemencement ou encore les paramètres physicochimiques. Une attention particulière sera également portée à la définition de conditions de culture respectant les GMPs mais également les lignes directrices (*Guidelines for stem cell research and clinical translation*, 2016) éditées en 2016 par la société internationale de recherche sur les CSs (ISSCR pour *International Society for Stem*

Cell Research) qui conseillent d'utiliser au maximum des produits définis pour limiter les variabilités et de limiter l'utilisation de produits d'origine animale.

1.2.3.1. Systèmes de culture et automatisation

Alors que la thérapie autologue repose sur la production en parallèle d'un grand nombre de lots cellulaires différents, la thérapie allogénique peut nécessiter une seule production à plus large échelle pour le traitement de plusieurs patients. Le choix du système de culture le plus adapté sera donc fortement lié aux modalités de traitement et à l'avancement dans le développement clinique (Ratcliffe et al., 2011). En effet, les études précliniques et cliniques (phase I, II) qui ne nécessitent pas une production à grande échelle (peu de patients, faibles doses...) peuvent être réalisées dans les conditions standards de culture statique en deux dimensions (2D) des cellules adhérentes, à savoir sur des flasques simples qui présentent l'avantage de pouvoir visualiser l'ensemble des cellules (Figure 7A). Néanmoins, bien que de nombreux ECs actuellement en cours en contexte allogénique utilisent encore ce système de culture (Hanley et al., 2013), l'encombrement, la lourdeur des manipulations rarement réalisées en système clos et le volume de milieu nécessaire ne sont pas transférables à une plus large échelle. Il est donc fortement conseillé d'anticiper ce besoin en amont des ECs afin de transférer le protocole au plus tôt. Plusieurs options sont alors envisagées, des conditions de culture statique à large échelle possiblement automatisables à l'utilisation de bioréacteurs dans des conditions adhérentes ou en suspension.

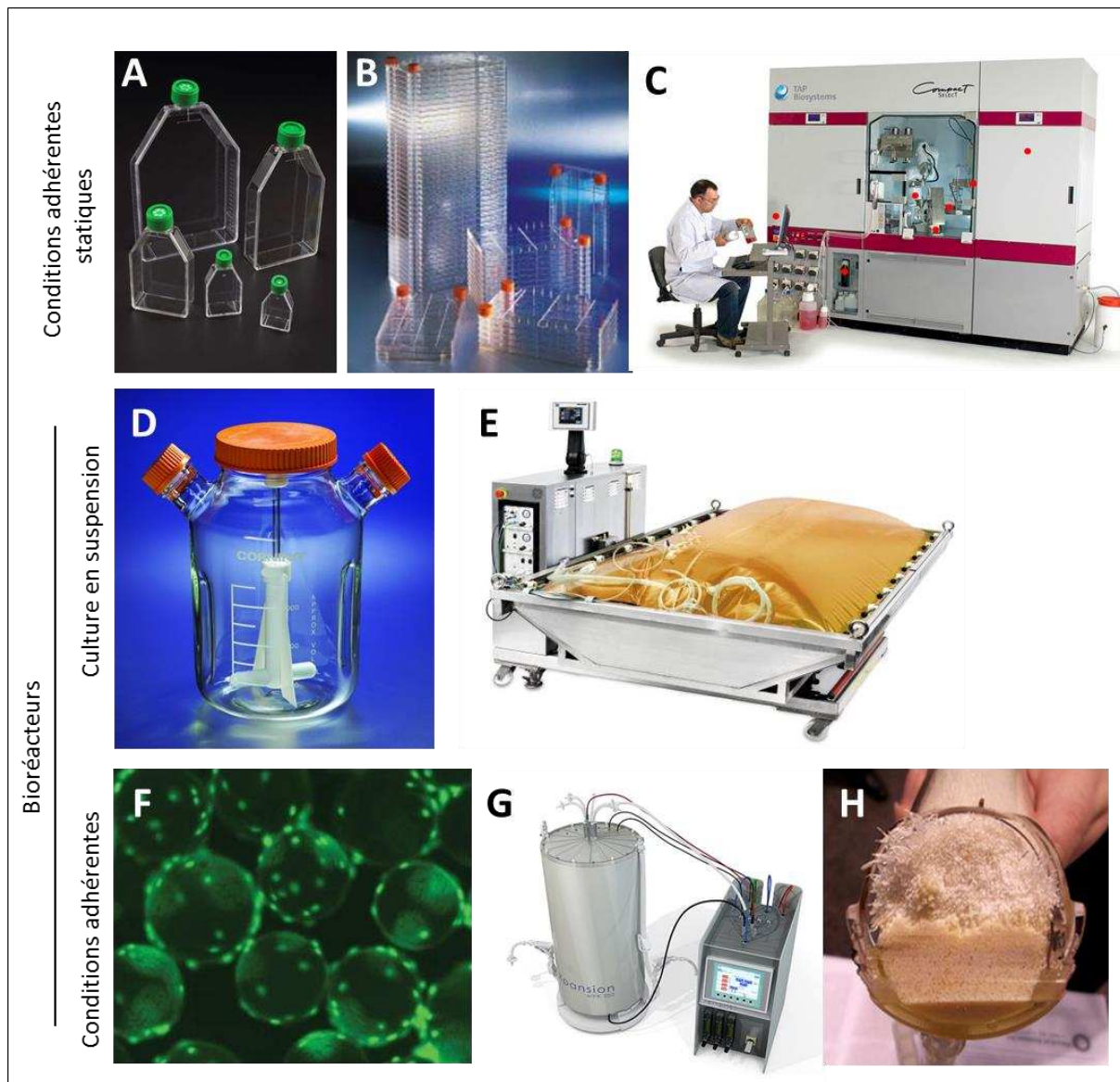


Figure 7. Systèmes de culture pour l'expansion des produits de thérapie cellulaire. A-C : Conditions de culture adhérentes statiques en flasques classiques (A, Corning) ou multi-étages (B, Corning) à manipulation manuelle ou automatisée (C, Compact Select, TAP Biosystems). D-F : Systèmes de culture en suspension au sein d'un bioréacteur rotatif (D, Corning) ou bioréacteur à vagues (E, WAVE SYSTEM1000EH, GE Healthcare Life Sciences) ou dans des conditions semi-adhérentes grâce à l'ajout de microporteurs (F, Pall SoloHill®). G-H : Systèmes clos de culture en bioréacteur multiplaques (G, Xpansion® Multiplate bioreactor system, Pall Life Sciences) ou en bioréacteur à fibres creuses (H, Hollow fiber bioreactor system, FiberCell Systems).

a. Culture statique

L'outil se rapprochant le plus des conditions initiales de cultures adhérentes est le flasque multi-étage (jusqu'à 40 étages) qui permet d'augmenter la surface et de limiter le nombre de manipulations (CellFactory Systems de Nunc, CellSTACK® de Corning...). Certains dispositifs de poches et tubulures pouvant être reliés dans des conditions stériles peuvent en outre être associés à ces systèmes et générer un système quasi-clos (MC3 System

de Macopharma). Ils restent cependant très encombrants et très consommateurs de milieu (Figure 7B). Des automates capables de prendre en charge une partie des étapes de la culture en 2D ont également été développés pour limiter les variations dues à l'expérimentateur et générer un système quasiment clos (Compact SelecT de TAP Biosystems ou 3D CellHost de Hamilton), les phases de préparation des milieux n'étant par exemple pas encore pris en compte sur ces modèles (Figure 7C) (Ratcliffe et al., 2011; Sart et al., 2014a; Wang et al., 2014a). Finalement, l'uniformité de la densité cellulaire, de l'apport nutritif, des échanges gazeux ou encore de la température est également difficilement atteignable, ce qui peut accroître l'hétérogénéité de la population en termes de croissance, phénotypes ou degrés de différenciation (Campbell et al., 2015; Sheu et al., 2014). En plus d'assurer la reproductibilité d'un procédé, l'automatisation doit permettre de réduire au maximum le nombre de manipulations par des opérateurs qui représentent une source majeure de contaminations et de variabilités (Mason and Hoare, 2007; Ratcliffe et al., 2011). Finalement, l'utilisation d'un système clos est très fortement conseillée pour tout protocole de production, afin de limiter les contaminations particulières et microbiologiques de l'air et des surfaces depuis le prélèvement biologique jusqu'à l'administration chez le patient.

b. Bioréacteurs en suspension

Les bioréacteurs, utilisés depuis longtemps pour la culture de cellules en suspension, permettent un meilleur contrôle de l'environnement direct des cellules grâce à de nombreux capteurs qui mesurent la concentration en nutriments et GFs, la tension en O₂, le pH, mais également les déchets métaboliques. Il en résulte une optimisation des rendements de production (Sart et al., 2014a). Il en existe différentes sortes, dont le plus utilisé est le bioréacteur rotatif en raison de sa simplicité d'utilisation (Figure 7D) (Ratcliffe et al., 2011; Roh et al., 2016; Sart et al., 2014a). Certaines cellules d'ordinaire cultivées dans des conditions adhérentes comme les MSCs semblent bien s'adapter à la culture 3D avec la formation d'agrégats cellulaires qui augmentent le potentiel thérapeutique et l'efficacité de différenciation (Sart et al., 2014b). La culture en suspension a également été proposée en bioréacteur rotatif pour amplifier des cellules pluripotentes dans un état indifférencié et pour induire une différenciation efficace en cardiomyocytes (Chen et al., 2015; Fan et al., 2015). Pour ces dernières, l'ajout d'un inhibiteur de la *Rho-associated coiled-coil kinase* (ROCK) est nécessaire pour diminuer l'apoptose et permettre la survie de cellules pluripotentes dissociées à l'état de cellules uniques et pour maintenir une agrégation uniforme en suspension (Watanabe et al., 2007). Outre l'impact d'un changement dans les conditions de culture

(meilleure gestion des apports et déchets des cellules), les cellules cultivées en bioréacteurs pourront être soumises i) à des stress mécaniques dus aux flux de milieu ou ii) aux collisions qui vont être perçues par des mécanorécepteurs, lesquelles vont influencer la viabilité et le devenir des cellules (Fan et al., 2015). Ainsi, il a été démontré que les taux de prolifération et la différenciation ostéogénique de MSCs sont influencés par les forces de flux associées à un bioréacteur à perfusion (Liu et al., 2010) alors que ces forces en bioréacteur rotatif vont favoriser leur différenciation adipocytaire (Meyers et al., 2005). Parmi les alternatives pour protéger les cellules contre les différents stress auxquels elles peuvent être confrontées et permettre un meilleur contrôle de la taille des agrégats cellulaires peut être citée la micro-encapsulation par exemple dans des fibres d'hydrogels d'alginate (Ikeda et al., 2017). Le bioréacteur à vague (Figure 7E), système semi-clos constitué d'une poche de culture placée sur un système d'agitation, est une autre alternative au bioréacteur rotatif pour la culture de cellules en suspension (Roh et al., 2016).

Certains types cellulaires restent néanmoins réticents à la culture en suspension. Afin de palier à cette limite, des microporteurs de différentes natures (polystyrène, polymères, cellulose, verre...) et tailles (60 à 800 μm) ont été développés (HyClone™, HyQSphere™, Pall SoloHill®, GE Healthcare Cytodex™...) (Figure 7F). Utilisés en association avec un bioréacteur, ils procurent une surface de culture considérable et peu d'encombrement par rapport aux systèmes de culture multi-étages (Roh et al., 2016; Sheu et al., 2014). La sélection du microporteur le plus adapté nécessite une caractérisation avancée notamment par le contrôle de la morphologie cellulaire et l'organisation du cytosquelette dans la mesure où les propriétés physiques et biochimiques de ces microporteurs vont impacter le devenir des cellules (prolifération, différenciation...) (Chen et al., 2011a; Sart et al., 2014a). De la même façon que pour la culture en suspension, les stress mécaniques générés par le mélange du milieu dans le bioréacteur et les chocs entre les microporteurs peuvent induire une différenciation inadaptée et la perte de la pluripotence (Leung et al., 2011).

c. Bioréacteurs en conditions adhérentes

Finalement, d'autres bioréacteurs se rapprochent plus de la culture en conditions adhérentes, avec un système de perfusion du milieu qui présente l'avantage de contrôler l'environnement des cellules et de limiter les manipulations. C'est le cas du bioréacteur à plaques parallèles Xpansion System développé par Pall Life Sciences (Figure 7G) qui combine un système de plaques multiples très peu encombrant avec un système de perfusion

et de contrôle des paramètres du milieu, le tout en système clos, qui est ensuite placé dans un incubateur standard. Un autre développement qui mime les conditions adhérentes de la culture en flasque est le bioréacteur à fibres creuses (Figure 7H), constitué d'une cartouche contenant des milliers de fibres de polystyrène creuses et perméables. Les cellules sont ensemencées à l'intérieur des fibres et le milieu de culture circule doucement dans la cartouche, permettant des échanges gazeux et de nutriments entre l'intérieur et l'extérieur des fibres. La configuration inverse est également possible, les cellules dans l'espace inter-fibres et le milieu qui circule dans le circuit interne. Tous les paramètres du milieu et de l'environnement peuvent être contrôlés et ce système présente l'avantage de fonctionner en système clos, en pouvant être ensemencés en simple connexion stérile avec les dispositifs médicaux (poches de cellules, milieux) adaptés. (Nold et al., 2013; Roh et al., 2016; Rojewski et al., 2013; Sheu et al., 2014).

Tous ces systèmes de culture sont très prometteurs, de plus en plus performants et adaptés aux besoins cliniques. Ils sont encore néanmoins confrontés à certaines limites, notamment au niveau des contrôles qualité du produit cellulaire au cours du procédé de production. Contrairement aux systèmes de culture en flasques classiques, les nouveaux systèmes en condition adhérente ou suspension ne permettent pas ou peu d'avoir une visualisation du produit cellulaire. Ils nécessitent également d'être optimisés, ne permettant pas à ce jour d'apporter un système clos et automatisé pour l'intégrité du procédé de production, de la récupération des cellules au conditionnement pour l'administration. Ils nécessitent pour certains l'ensemencement d'une quantité initiale de cellules importante, ce qui requiert une pré-amplification en système 2D classique, et donnent bien souvent des rendements cellulaires moins importants que ceux espérés par rapport aux coûts de production engagés. Une difficulté supplémentaire de tous ces systèmes réside au niveau de l'étape de récupération et de dissociation des cellules pour lesquelles plusieurs étapes d'amplification sont nécessaires, que ce soit à partir de microporteurs ou d'agrégats cellulaires en suspension (Tozetti et al., 2017). Toutes les étapes annexes, dont les étapes de lavages et de réduction du volume sont également encore rarement intégrées dans les systèmes clos et difficilement transférables à large échelle (Heathman et al., 2015; Nienow et al., 2014; Roh et al., 2016).

1.2.3.2. Milieu de culture

La composition en nutriments et GFs du milieu de culture est un paramètre essentiel qui conditionne le comportement des cellules très sensibles à leur environnement, en régulant

la survie, la prolifération ou encore la différenciation. Les milieux de croissance basiques, comme le milieu essentiel minimum (MEM pour *minimum essential medium*) ou le *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) apportent principalement du glucose, des vitamines, des acides aminés et des sels nécessaires au maintien de l'osmolarité des cellules (Fan et al., 2015). Ces milieux sont généralement disponibles dans une version produite selon les normes GMPs.

Conventionnellement, la complémentation de ces milieux basiques avec du sérum de veau fœtal (FBS pour *fetal bovine serum*) ainsi que des GFs, permet d'apporter les signaux nécessaires à l'adhésion, la survie et la prolifération de la plupart des CSs (Barnes and Sato, 1980; Takahashi et al., 2007; Thomson et al., 1998; Wang et al., 2014a). Néanmoins, ces composés d'origine animale représentent d'une part une source potentielle de contaminations par des pathogènes tels que les mycoplasmes, les virus ou encore le prion, et d'autre part induisent des risques de réaction immunitaire par augmentation de l'immunogénicité des cellules (Jin et al., 2015; Kuznetsov et al., 2000; Tekkätte et al., 2011; van der Valk et al., 2004). Il a en effet été observé que des cellules cultivées en présence de composés d'origine animale pouvaient internaliser et exprimer à leur surface des protéines non humaines, augmentant ainsi le risque de réaction immunitaire (Grinnemo et al., 2008; Horwitz et al., 2002; Spees et al., 2004). Le FBS est également sujet à de fortes variabilités entre les lots (Tekkätte et al., 2011; Zheng et al., 2006) et la production actuelle n'est pas suffisante pour approvisionner tous les procédés de TC actuellement en développement (Brindley et al., 2012). Finalement, les élevages intensifs d'animaux et leurs sacrifices pour récupérer le sérum des fœtus, ainsi que les procédures de prélèvements et la souffrance de l'animal soulèvent des considérations éthiques non négligeables (Jochems et al., 2002; Tekkätte et al., 2011). De grands progrès ont néanmoins été réalisés depuis les dernières années pour s'affranchir des composés d'origine animale.

Dans un 1^{er} temps, différents dérivés de produits sanguins humains ont été proposés comme alternatives au FBS tels que le sérum, le plasma ou encore les concentrés plaquettaires. L'intérêt du sérum humain (HS pour *human serum*) d'origine autologue et allogénique a été rapporté par de nombreuses équipes et pour de nombreux types cellulaires (Bieback et al., 2009; Ellerström et al., 2006; Kobayashi et al., 2005; Kocaoemer et al., 2007; Kyllönen et al., 2013; McDevitt and Palecek, 2008; Patrikoski et al., 2013; Shahdadfar et al., 2005; Stute et al., 2004; Tozetti et al., 2017; Yamaguchi et al., 2002) alors que d'autres études ont rapporté des taux d'amplification limités pour des MSCs cultivées avec du sérum

allogénique (Shahdadfar et al., 2005; Spees et al., 2004). Bien qu'une origine autologue serait idéale pour éviter les réactions immunitaires, cette approche semble limitée par la difficulté de contrôle de la qualité de sérums individuels et par la disponibilité de larges quantités requises par le transfert clinique (Mannello and Tonti, 2007). L'utilisation de pool de sérums AB (provenant de donneurs de groupe sanguin AB) a été proposée (Bieback et al., 2009; Kocaoemer et al., 2007; Poloni et al., 2012; Tozetti et al., 2017; Yamaguchi et al., 2002). D'autres alternatives dérivées de concentrés plaquettaires, comme le lysat plaquettaire humain (hPL pour *human platelet lysate*) ou le plasma riche en plaquettes (PRP pour *platelet-rich plasma*), ont été décrits comme étant plus riches en GFs que le FBS (Dessels et al., 2016). Ces deux suppléments ont été largement décrits comme améliorant la prolifération et maintenant la multipotence de MSCs, bien qu'il ait été rapporté que le hPL, au même titre que le PRP, pourrait favoriser la différenciation ostéogénique (Bernardo et al., 2007a; Bieback et al., 2009; Doucet et al., 2005; Fekete et al., 2012; Lohmann et al., 2012; Lucarelli et al., 2003; Masoudi et al., 2016; Shih and Burnouf, 2015). Néanmoins, des effets biologiques hétérogènes ont été observés, reflétant les importantes variabilités observées dans les protocoles de préparation selon les laboratoires (Burnouf et al., 2016; Dohan Ehrenfest et al., 2014; Horn et al., 2010; Lei et al., 2009; Masoudi et al., 2016; Weibrich et al., 2002). Finalement, bien qu'actuellement utilisées en clinique, ces alternatives restent non définies dans la mesure où elles contiennent un mélange complexe de GFs, hormones, protéines de la matrice extracellulaire (ECM pour *extracellular matrix*) et autres molécules. Le risque de contamination n'est par ailleurs pas totalement exclu malgré les tests actuellement réalisés.

Parallèlement, des efforts ont donc été mis en œuvre pour développer des milieux plus définis afin d'assurer la reproductibilité du protocole. Les milieux mTeSR1 (STEMCELL Technologies) et StemPro (invitrogen), dépourvus de sérum mais non exempts d'éléments d'origine animale (fragment V de la BSA), ont été validés par *The International Stem Cell Initiative Consortium* à l'issue d'une étude comparative de 8 milieux réalisée en 2010 sur 12 lignées d'ESCs au sein de 4 laboratoires différents. Seuls ces deux milieux permettaient une bonne adhésion et le maintien dans un état indifférencié (Wang et al., 2014a). D'autres milieux définis et exempts de composés d'origine animale ont également été proposés mais font l'objet de résultats contradictoires (Chase et al., 2010; Jung et al., 2010; Mannello and Tonti, 2007; Rajala et al., 2007). Il a notamment été observé que 7 populations différentes de MSCs répondaient différemment aux 6 milieux sans sérum testés (Tan et al., 2015). Plus récemment, un milieu exempt d'éléments d'origine animale et totalement défini a été proposé.

Constitué de seulement 8 composants (milieu E8), il est commercialisé sous le nom de Essential 8 (Invitrogen) et TeSR-E8 (STEMCELL Technologies) (Chen et al., 2011b). Ce milieu, aujourd'hui fréquemment utilisé supporte notamment l'expansion des iPSCs en suspension et représente un avantage en termes de coûts par rapport aux précédents (Wang et al., 2013a, 2014a). Le milieu StemPro® MSC XenoFree (Invitrogen) semble également être une bonne alternative pour la culture des MSCs (Agata et al., 2009; Riis et al., 2016; Wuchter et al., 2016).

Enfin, bien qu'il existe encore une connaissance incomplète des mécanismes impliqués dans le maintien de la pluripotence et de l'auto-renouveau des CSs, la compréhension de l'implication de certaines voies de signalisation permet aujourd'hui d'apporter de nouvelles stratégies de complémentarité et d'améliorer la composition des milieux définis. Il a par exemple été démontré que les voies du bFGF (*basic fibroblast growth factor*) et du TGF (*transforming growth factor*) / Activin / Nodal sont nécessaires au maintien de l'auto-renouveau des cellules pluripotentes (Fan et al., 2015). Néanmoins, l'ajout de GFs doit prendre en considération leur variabilité d'efficacité inter-lots et leur stabilité qui peut être très limitée comme pour le bFGF, entraînant des coûts considérables dus aux fréquents changements de milieu. De petites molécules dotées d'une durée de vie plus importante comme la trimipramine et l'ethopropazine ont toutefois récemment été identifiées et proposées comme alternative au bFGF pour assurer le maintien de la capacité d'auto-renouveau des ESCs (Kumagai et al., 2013).

1.2.3.3.Éléments matriciels

Outre le milieu de culture, les interactions cellules-cellules et cellules-ECM induites par différentes molécules d'adhésion comme les intégrines sont nécessaires à la survie et la prolifération des CSs (Fan et al., 2015; Wang et al., 2014a). Ces interactions, qui sont en partie induites par des éléments du milieu de culture et notamment le sérum, peuvent être limitées lors de l'utilisation de milieux sans sérum. Pour pallier à ce besoin et permettre la culture *ex vivo* de ces cellules, différentes stratégies ont été développées. L'utilisation de cellules nourricières et le revêtement des supports de culture avec des substrats protéiques permettent notamment de fournir ce type d'interactions.

Plusieurs alternatives ont été proposées pour la culture des cellules pluripotentes initialement cultivées sur un tapis de fibroblastes embryonnaires murins (MEF pour *mouse embryonic fibroblasts*) irradiés qui fournissent de nombreux facteurs et signaux nécessaires à

leur survie. Différents types de cellules nourricières humaines ont été proposées en remplacement des MEFs tels que des fibroblastes issus de différents organes adultes (muscles, peau, moelle osseuse...) ou dérivés d'une lignée d'ESCs allogéniques (Fan et al., 2015; McDevitt and Palecek, 2008; Wang et al., 2014a). Cette stratégie, qui permet de s'affranchir de cette lignée cellulaire d'origine animale, reste néanmoins très contraignante en raison de la nécessité de synchroniser les cultures et d'assurer leur disponibilité constante, ce qui ajoute des coûts et une main-d'œuvre non négligeables.

Différents substrats protéiques d'origines diverses ont été proposés pour remplacer les cellules nourricières, tout en assurant le maintien de la viabilité, la prolifération et la pluripotence. Le Matrigel (BD Biosciences), composé de 60% de laminine, 30% de collagène IV, 8% d'entactine et de nombreux GFs, est actuellement le substrat le plus répandu pour les cultures 2D et 3D de différents types cellulaires. Cependant, son origine animale, la variabilité entre les lots ou encore sa faible stabilité n'en font pas un candidat de choix pour une production clinique (Wang et al., 2014a). Des alternatives exemptes de composés d'origine animale ont depuis été proposées pour la culture des cellules pluripotentes, allant du simple revêtement de laminine purifiée (Xu et al., 2001) au mélange plus complexe de collagène IV, fibronectine, laminine et vitronectine (Ludwig et al., 2006) et à l'utilisation de HS (Ding et al., 2015) ou encore à l'utilisation de protéines recombinantes comme c'est le cas pour des produits commercialisés, comme les Laminin-511 et 521 (BioLamina), le Vitronectin XF (STEMCELL Technologies) ou encore le CELLstart (Invitrogen) (Wang et al., 2014a). La laminin-521 a été validée pour l'expansion de myoblastes, précurseurs musculaires traditionnellement cultivés sur divers substrats dont la laminine 111, la fibronectine, la gélatine, le collagène IV ou encore le Matrigel (Penton et al., 2016). Le CELLStart a notamment été validé par de nombreuses équipes pour d'autres types cellulaires comme les MSCs qui, dans des conditions sans sérum (milieu StemPro®, ThermoFisher Scientific), nécessitent l'utilisation de revêtements (Agata et al., 2009; Riis et al., 2016; Wuchter et al., 2016). L'utilisation de ces substrats a également été rapportée dans des conditions de culture en suspension. Des microporteurs ont par exemple été recouverts de laminine ou vitronectine, permettant la culture de hESCs pendant 20 passages sans perte de pluripotence (Heng et al., 2012). Des supports pré-coatés ont également été développés mais sont difficilement transférables en clinique, en raison de l'incompatibilité avec les techniques de stérilisation qui dénaturent les protéines et des conditions de stockage contraignantes. Enfin, des surfaces

plastiques synthétiques ont été développées et ont montré un réel intérêt en termes de facilité d'utilisation et de transférabilité (Wang et al., 2014a).

Finalement, tous ces systèmes de culture restent malgré les développements technologiques assez éloignés du micro-environnement dans lequel les CSs évoluent *in vivo*. Bien qu'ils apportent certains GFs et permettent des interactions avec des protéines de l'ECM, peu de signaux structurels et biomécaniques dus à l'organisation particulière et complexe de ces protéines au sein de la niche sont perçus par les cellules en systèmes de culture classiques. Bien que ce micro-environnement et les interactions cellules-ECM ne soient encore pas intégralement compris, d'importants efforts sont alloués au développement de matrices et substrats 3D qui permettent de mieux mimer la niche naturelle des CSs et progénitrices en culture. De nombreux paramètres entrent en jeu et peuvent influencer la croissance et l'état de différenciation des cellules : le matériau, la porosité, la taille des pores, les propriétés mécaniques, la stabilité du matériau, la biocompatibilité, l'hydrophobicité ou encore la bio-activité (Fan et al., 2015; Placzek et al., 2009). Des matériaux naturels avec une activité biologique, ou synthétiques qui ne présentent pas d'activité biologique directe mais dont la structure permet de créer la forme macroscopique et la micro-architecture souhaitée entrent dans la composition de ces structures 3D afin de permettre la circulation optimale des nutriments et métabolites mais également favoriser les interactions cellulaires (Placzek et al., 2009).

Les hydrogels, matériaux polymères fortement hydratés (>30% d'eau), sont les plus utilisés. Ils peuvent être constitués de polymères synthétiques (polyéthylène oxide, PEO ou encore poly(vinyl alcool), PVA) ou naturels (alginate, chitosan, collagène ou encore acide hyaluronique) (Saldin et al., 2017). Un hydrogel mixte, constitué de polymères naturels (Alginate) et synthétiques (Polyacrylamide) approuvés par la FDA, a par exemple été proposé pour l'expansion de BM-MSCs (Rana and Ramalingam, 2017). De nombreux hydrogels sont dérivés de composants de l'ECM qui peuvent être obtenus par décellularisation de tissus puis solubilisation. Initialement obtenus à partir de tissus porcins, ils peuvent maintenant être obtenus à partir de tissus humains (tissus adipeux, tendons...) et être utilisés pour la culture ou l'administration de cellules (Saldin et al., 2017). Plus récemment, certaines équipes ont proposé des hydrogels contenant du hPL, qui permettent une libération progressive des GFs et le maintien de taux d'expansion et de différenciation de MSCs comparables voire supérieurs à des conditions de culture standards (Bouckennooghe et al., 2016; Walenda et al., 2012). Une autre stratégie consiste à utiliser l'ECM produite par des cultures de MSCs dans un système

classique (plastiques traités pour la culture). Ces supports, appelés dECM (pour *decellularized ECM*), sont générés par la décellularisation de cette culture initiale. Chen *et al.* ont démontré que ce type de support permettait d'améliorer le maintien du caractère souche de MSCs par une augmentation de la formation de CFU, une différenciation spontanée limitée et un potentiel de régénération osseuse *in vivo* plus important (Chen et al., 2007). Procédé difficilement transférable en clinique, des efforts sont actuellement portés sur le développement de produits issus de cette dECM pour une utilisation simplifiée comme les autres revêtements actuellement sur le marché (Anasiz et al., 2017; Shakouri-Motlagh et al., 2017).

1.2.3.4. Densité cellulaire

La densité cellulaire d'ensemencement est un paramètre crucial pour la culture de cellules adhérentes, qui conditionne les taux d'expansion, le nombre d'étapes d'amplification (passage) et les fonctions de la majorité des types cellulaires. Alors que certaines populations cellulaires sont facilement dissociables à l'état de cellule unique, les cellules pluripotentes (ESCs et iPSCs) supportent peu la dissociation enzymatique. La maîtrise de la densité cellulaire d'ensemencement est alors plus difficile.

Une très faible densité est généralement préconisée pour la 1^{ère} étape de culture des MSCs, alors que des densités de 1000 à 4000 cellules/cm² pour les phases suivantes d'amplification sont un bon compromis entre la taille du support et le maintien du caractère progéniteur des cellules (Colter et al., 2001; Fossett and Khan, 2012; Sensebé et al., 2011). Ensemencer les cellules à ces densités plus élevées requiert un nombre de passages plus important en raison d'une diminution du nombre de doublements de population (CPD pour *cumulative population doublings*) par passage, mais permet néanmoins de faciliter la déplétion de cellules contaminantes (Sensebé, 2008).

Outre la densité d'ensemencement, il est nécessaire de maîtriser la densité à partir de laquelle les cellules doivent être récupérées et ensemencées dans un autre support. En effet, les interactions cellules-cellules observées dans des conditions de confluence peuvent entraîner une différenciation non souhaitée de certains types cellulaires. C'est le cas des myoblastes, dont la différenciation en myotubes est fortement liée aux interactions cellulaires (Krauss et al., 2005) et dont les passages sont généralement réalisés bien avant la confluence afin de les maintenir dans un état indifférencié. D'autre part, une augmentation de la densité cellulaire entraîne une augmentation de la consommation des éléments nutritifs du milieu, qui

a été identifiée comme principale cause d'apparition de dommages à l'ADN (*acide désoxyribonucléique*) et d'altérations génomiques sur des hESCs (Jacobs et al., 2016).

1.2.3.5. Nombre de passages et temps de culture

Le passage est l'étape qui consiste à dissocier les cellules adhérentes de leur support lorsque le niveau de confluence souhaité est atteint, afin de récupérer les cellules ou de les réensemencer sur un plus grand support. La récupération des cellules est généralement réalisée par une dissociation enzymatique qui n'est pas anodine et peut avoir un impact sur la viabilité cellulaire. L'enzyme la plus utilisée est la trypsine porcine, généralement en solution avec de l'EDTA mais dont l'origine animale n'en fait pas un composant de choix pour les applications cliniques. Le TrypZean (Sigma) et TrypLE™ Select (Invitrogen) sont deux alternatives exemptes de composés animaux. Ce dernier a d'ores et déjà été utilisé pour la préparation clinique de MSCs (Brooke et al., 2009). La dissociation enzymatique des ESCs entraînant une mortalité importante, le passage de ces cellules est généralement réalisé par fragmentation mécanique du tapis cellulaire, toutefois fastidieuse et peu reproductible (Couture, 2010). Limiter le nombre de passages pour limiter l'exposition à l'enzyme est ainsi préconisé, ce qui permet également de limiter les risques de contaminations inhérents aux systèmes de culture encore majoritairement non clos.

Le nombre de passages réalisés est conditionné par la quantité de cellules souhaitées pour l'application thérapeutique, par la densité d'ensemencement et le degré de confluence en fin de passage. Souvent utilisé à tort pour identifier les capacités prolifératives d'une population cellulaire, ce paramètre est fortement dépendant des conditions de culture et n'est donc pas comparable d'un laboratoire à un autre. Il est donc plus pertinent de parler de nombre de CPD pour caractériser le potentiel prolifératif d'une population.

Contrairement aux ESCs qui peuvent être théoriquement maintenues en culture indéfiniment, une limitation significative à la production à large échelle et à l'amplification des CSAs est le raccourcissement progressif des télomères qui limite leur potentiel d'auto-renouvellement (Encadré 1) (Hiyama and Hiyama, 2007). Une diminution des taux de prolifération et de la multipotence ayant été observée après plusieurs passages successifs de MSCs, il est conseillé de ne pas dépasser 20 CPD (Banfi et al., 2000; Tarte et al., 2010). Montarras *et al.* ont également démontré que l'administration de précurseurs myogéniques ayant passé du temps en culture induisait une régénération musculaire moins efficace que l'administration de cellules fraîchement isolées (Montarras et al., 2005). Néanmoins, la

stabilité des propriétés cellulaires dépend de chaque population, de l'historique du donneur ou encore de la source du prélèvement. Des résultats très différents ont été décrits selon les types cellulaires et les laboratoires (Liu et al., 2016), ce qui confirme que le temps limite d'expansion devrait être évalué au cas par cas. En ce qui concerne les iPSCs générées à partir de cellules somatiques, le temps de culture apparaît comme un élément essentiel dans le sens où des anomalies ont pu être observées lorsque les cellules d'origine étaient maintenues trop longtemps en culture (Raab et al., 2014).

Encadré 1 : Télomères, télomérase et sénescence rélicative

Au cours de la division des cellules somatiques, la machinerie de réplication n'est pas capable de répliquer la totalité des chromosomes et chaque division s'accompagne d'une perte de 50 à 300 nucléotides (Levy et al., 1992; Olovnikov, 1973). L'intégrité des chromosomes au cours des divisions cellulaires est cependant protégée par des régions d'ADN, de 5 à 25 kilobases chez l'Homme, localisées aux extrémités des chromosomes linéaires, appelées les télomères. Leur séquence nucléique, leur structure tridimensionnelle (boucle t) et la participation de nombreuses protéines constituant le télosome (Figure 8), permettent de masquer l'extrémité de la molécule d'ADN, la rendant inaccessible aux protéines de reconnaissance des dommages à l'ADN. Néanmoins, les télomères raccourcissent à chaque division cellulaire jusqu'à atteindre une longueur critique responsable de l'entrée des cellules en sénescence rélicative : c'est la limite de Hayflick (Allsopp et al., 1995).

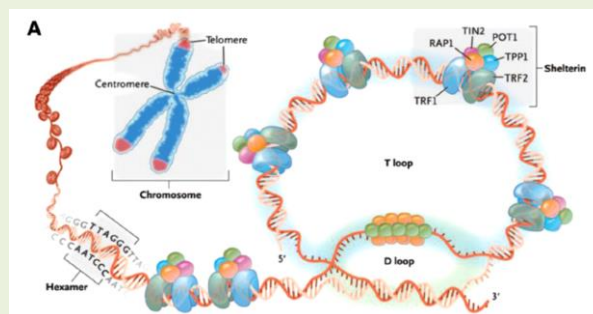


Figure 8. Structure des télomères (Kovacic et al., 2011)

Des télomères trop courts ou déstabilisés sont en effet reconnus comme des dommages à l'ADN, initiant l'activation de deux grandes voies de signalisation des cassures de l'ADN ou DDR (*DNA damage response*), permettant d'une part l'arrêt du cycle cellulaire et d'autre part l'engagement des processus de réparation (d'Adda di Fagagna et al., 2003; Herbig et al., 2004; Takai et al., 2003). Parmi les effecteurs de ces voies de DDR, l'activation de la protéine p53 et l'inactivation de la phosphatase CDC25 (*Cell division cycle 25*) conduisent à un arrêt du cycle cellulaire, transitoire si les dommages à l'ADN sont traités de manière efficace par la machinerie de réparation des dommages, ou permanent pour des dommages trop sévères et non réparables. Les cellules sont dans ce cas dirigées vers les voies de signalisation de mort cellulaire (apoptose) ou vers un état irréversible d'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence rélicative.

Téломérase

Les ESCs bénéficient d'une capacité de prolifération infinie grâce à une forte expression de l'enzyme qui compense le raccourcissement des télomères, nommée téломérase. Contrairement aux cellules somatiques, les CSAs (cellules souches de la peau ou des intestins, HSCs, MSCs...) bénéficient d'une capacité de prolifération étendue, mais n'expriment pas ou à des taux très faibles la téломérase, ce qui explique le raccourcissement progressif des télomères aboutissant à la sénescence (Fehrer and Lepperdinger, 2005; Hiyama and Hiyama, 2007).

La téломérase est une ADN polymérase ARN dépendante dotée d'une activité transcriptase inverse (Greider and Blackburn, 1985). Elle est constituée d'une sous-unité enzymatique, hTERT (*human telomerase reverse transcriptase*), d'une matrice d'ARN, hTERC (*human telomerase RNA component*) ou hTR (*human telomerase RNA*) et est associée à différentes protéines dont le rôle exact est actuellement peu connu. Sa fonction principale est de compenser l'érosion des télomères lors de la prolifération cellulaire, par ajout de séquences nucléotidiques spécifiques à l'extrémité 5' des régions télomériques.

1.2.3.6. Paramètres physico-chimiques

Outre le milieu de culture et les GFs, la maîtrise de l'environnement physico-chimique avec le pH, la tension en dioxygène (O₂), dioxyde de carbone (CO₂) et la température (T°), est essentielle pour assurer la reproductibilité d'un protocole de production de TC. Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'uniformité de ces paramètres dépend en grande partie du système de culture (paragraphe I.2.3.1) et les cultures statiques qui ne possèdent pas de systèmes de mélange peuvent être sujets à l'introduction d'une hétérogénéité fonctionnelle au sein de la même population cellulaire en raison de l'importante plasticité des cellules face à leur micro-environnement (Campbell et al., 2015; Heathman et al., 2015).

Alors que les conditions de culture standard comprennent un pH à 7,4, 20% d'O₂, 5% de CO₂ et une température de 37°C, ces paramètres peuvent être adaptés en fonction du type cellulaire. Par exemple, alors qu'un faible pH (7,1) permet d'accroître l'expansion de progéniteurs des mégacaryocytes, un pH élevé (7,6) influence leur différenciation et maturation (Placzek et al., 2009).

La tension en O₂ apparaît aujourd'hui comme un axe majeur d'optimisation de l'efficacité thérapeutique des TCs qui s'appuie sur le postulat que celle considérée comme « normoxie » dans les laboratoires est finalement bien supérieure à celle rencontrée au sein de l'organisme. De nombreuses équipes ont ainsi observé que cultiver sur le long terme différentes populations de MSCs en condition de faible tension en O₂ (1-10%), dites

« hypoxiques » bien que plus proches des valeurs physiologiques, permettrait de retarder l'état de sénescence cellulaire de 8 à 20 PDs (Fehrer et al., 2007; Jin et al., 2010; Kim et al., 2016; Tsai et al., 2011). L'impact sur la multipotence diffère selon les équipes (Choi et al., 2017). Alors que certaines ont observé une augmentation de la capacité de différenciation adipogénique (Jin et al., 2010), chondrogénique (Adesida et al., 2012; Jin et al., 2010) et ostéogénique (Tsai et al., 2011), d'autres ont observé une réduction de ce potentiel (Fehrer et al., 2007). Ces conditions de culture favoriseraient également leur stabilité cytogénétique et limiteraient le risque tumoral (Bigot et al., 2015; Choi et al., 2017). Les conditions de culture standard semblent également être sous-optimales pour la culture des cellules pluripotentes. Outre des taux d'expansion et une expression des marqueurs de pluripotence OCT-4, SOX2 et NANOG plus importants lors de culture de hESCs à de faibles concentrations en O₂ (Hawkins et al., 2013), la génération des iPSCs ainsi que leur différenciation vers la voie d'intérêt seraient également améliorées (Hawkins et al., 2013; Prado-Lopez et al., 2009; Shimada et al., 2012).

I.2.4. Différenciation du produit cellulaire

En fonction de la perspective thérapeutique et du candidat cellulaire, une étape de différenciation peut être nécessaire à l'issue de la phase d'amplification *ex vivo* sous un état indifférencié. C'est notamment le cas pour les cellules pluripotentes (ESCs et iPSCs) dont l'injection est exclue en raison du risque de formation de tératomes et tératocarcinomes que cela peut générer (Fong et al., 2010). Ces cellules peuvent théoriquement se différencier dans tous les types cellulaires des trois feuilletts germinaux. Bien que la mise en place de protocoles de différenciation efficaces soit laborieuse et coûteuse (Kimbrel and Lanza, 2015), des protocoles sont aujourd'hui proposés pour la différenciation vers de nombreux types cellulaires dont les cellules osseuses (Sheyn et al., 2016), musculaires (Swartz et al., 2016) ou encore pancréatiques (D'Amour et al., 2006; Kumar et al., 2017). Les rendements de différenciation sont rarement de 100% et peuvent aboutir à la génération d'une population cellulaire hétérogène. Des étapes supplémentaires de sélection de la population d'intérêt (Kelly et al., 2011) ou d'élimination des cellules indifférenciées sont alors nécessaires (Neofytou et al., 2015).

Contrairement aux cellules pluripotentes, les MSCs peuvent être administrées dans un état indifférencié. En effet, bien que leur potentiel de régénération ait été traditionnellement associé à leur plasticité, de nombreuses applications thérapeutiques s'appuient aujourd'hui sur

leur potentiel immunomodulateur, leur action sur l'angiogénèse ou encore leur support à la croissance et la différenciation des CSs et progéniteurs locaux, lesquels ont été majoritairement associés à leur fonction paracrine (de Girolamo et al., 2013; Meirelles et al., 2009). Certaines équipes ont comparé l'efficacité thérapeutique de cellules différenciées et indifférenciées. Bien qu'Ullah et al. n'aient pas observé de différence en termes de potentiel de régénération nerveuse entre des cellules souches dérivées de la pulpe dentaire (hDPSCs pour *human dental pulp-derived stem cells*) et ces cellules différenciées en cellules neuronales (Ullah et al., 2017), une meilleure efficacité thérapeutique des MSCs différenciées en cellules pancréatiques beta a été démontrée (Wassef et al., 2016). Selon l'application thérapeutique et la voie d'administration notamment, les deux possibilités doivent être évaluées pour attester de la meilleure configuration.

L'administration de cellules différenciées présente l'avantage d'éviter les différenciations non souhaitées, bien que la formation de tissus ectopiques ne soit pas exclue pour des modalités d'administration systémique. Les cellules indifférenciées bénéficient toutefois de propriétés de migration et un tropisme généralement plus importants que les cellules différenciées ainsi qu'un potentiel de prolifération plus élevé leur conférant la capacité de proliférer après administration (Srijaya et al., 2014).

Finalement, les exigences de définition de conditions compatibles avec la clinique requises pour la phase d'expansion doivent également être appliquées pour la phase de différenciation (Neofytou et al., 2015). Des efforts de développement ont notamment été menés pour la définition de conditions sans sérum et exemptes d'origine animale, avec par exemple l'utilisation de hPL et de PRP respectivement pour la différenciation d'iPSCs en MSCs (Luzzani et al., 2015) et en cellules productrices d'insuline (Enderami et al., 2017) ou encore pour la différenciation d'ESCs (Outten et al., 2011). Le transfert à large échelle pour cette étape de différenciation représente une problématique majeure dans le développement de ces thérapies (Chen et al., 2015; Fan et al., 2015).

I.2.5. Distribution du produit cellulaire

La stratégie de distribution est un élément essentiel dans le développement d'un PTC dans le sens où il conditionne les modalités de sa conservation et de sa production (Figure 9). Les 1^{ères} stratégies impliquent la fabrication / synthèse du PTC dans un centre de production centralisé et la mise en place d'un système de conservation et de distribution du PTC vers les

différents centres d'administration où le produit devra être de nouveau préparé. D'autres stratégies consistent à développer une petite structure GMP dans chaque centre ou hôpital impliqué dans l'EC au sein de laquelle se dérouleront toutes les étapes de la fabrication à l'administration du PTC (« production au lit du patient »). Le choix de la stratégie dépend des modalités (autologues/allogéniques), du procédé de production et de la faisabilité d'une étape de conservation (Coopman and Medcalf, 2014).

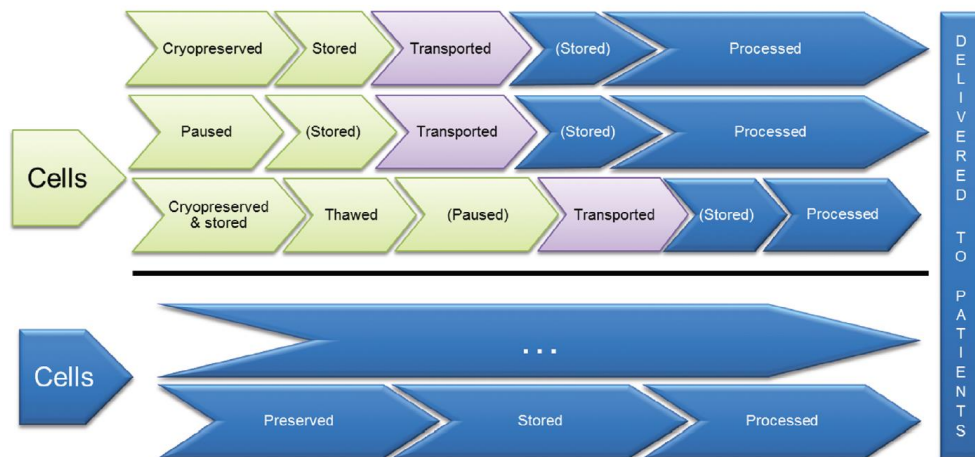


Figure 9. Voies potentielles de distribution d'un produit de thérapie cellulaire du site de production au patient (Coopman and Medcalf, 2014). Les cellules sont dans un 1^{er} temps isolées, décongelées à partir d'une banque de cellules et/ou amplifiées avant d'être directement administrées au patient ou conservées (cryoconservation ou conditions hypothermiques). Certaines étapes sont réalisées directement au niveau de la clinique (bleu), d'autres au niveau d'un site de production centralisé (vert). Certaines voies requièrent une étape de transport (violet).

1.2.5.1. Conservation / Banking

Les stratégies qui consistent à fabriquer le PTC au sein d'une structure GMP centralisée nécessitent la mise en place d'un système de conservation qui permet d'augmenter la durée de vie du PTC, facilitant la logistique en termes de distribution aux différents sites d'administration, de préparation des patients ou encore de contrôles qualité de libération des lots qui sont très chronophages (Ratcliffe et al., 2011). Les quelques thérapies allogéniques qui sont encore distribuées vers les sites d'administration dans un format non congelé nécessitent de maintenir un niveau de production constant pour répondre rapidement à la demande, générant des coûts considérables (Heathman et al., 2015). La conservation permet également des schémas cliniques à plusieurs injections sans nécessité de dupliquer le procédé de production. Le développement de ces techniques a également permis aux banques de cellules de voir le jour et de proposer des PTC mobilisables rapidement (Coopman and Medcalf, 2014).

La conservation dans des conditions réfrigérées (4-8°C) permet de conserver certains types cellulaires sur des durées assez restreintes. C'est le cas des HSCs ou encore des produits ChondroCelect et Carticel qui peuvent être respectivement conservés 24-48h, 48h et 72h en milieu de culture avant administration (Coopman and Medcalf, 2014). La cryoconservation, à savoir le maintien à des températures négatives, majoritairement dans la phase gazeuse de cuves d'azote liquide à -196°C, est toutefois la plus utilisée. On la retrouve dans plus de 80% des demandes faites à la FDA pour des produits à base de MSCs (Coopman and Medcalf, 2014). Cette technique nécessite l'utilisation d'agents cryoprotecteurs (CPA pour *cryoprotective agent*), dont le plus utilisé est le diméthylsulfoxyde (DMSO), qui protègent les cellules durant la congélation et qui sont souvent associés à du milieu de culture ou du sérum (Asghar et al., 2014; Jang et al., 2017). Ces produits sont néanmoins cytotoxiques à des températures positives, de façon temps et dose-dépendante, ce qui peut avoir un fort impact sur la quantité et l'intégrité des cellules. De plus, des effets secondaires ont été rapportés chez des patients après infusion de suspensions cellulaires contenant du DMSO (Shu et al., 2014; Windrum et al., 2005), suggérant la nécessité d'implémenter une étape d'élimination de cet agent (lavage, centrifugation, passage...). Il a également été démontré que la congélation pouvait avoir un effet négatif sur la viabilité, l'adhésion ou encore les fonctions métaboliques ou immunomodulatrices de différents types cellulaires (Coopman and Medcalf, 2014; Ratcliffe et al., 2011). La réalisation d'un passage post-décongélation permettrait néanmoins de retrouver l'intégrité des cellules décongelées et de s'affranchir des cellules subissant une apoptose tardive (François et al., 2012; Peters et al., 2008; Terry et al., 2006). On peut également rappeler les risques apportés par la présence du FBS dans les milieux de conservation et la nécessité de s'en affranchir. Alors que certaines équipes proposent l'utilisation de dérivés humains tel que le hPL comme substituts au FBS dans le milieu de congélation (Wang et al., 2017), des solutions complètement définies et exemptes d'origine animale sont développées (Synth-a-Freeze® de Gibco™...) (Roh et al., 2016).

La vitrification est proposée comme méthode alternative à la congélation lente conventionnelle (Asghar et al., 2014; Jang et al., 2017). Elle consiste à transformer instantanément la suspension cellulaire aqueuse dans un état solide par exposition directe à l'azote liquide et présente l'avantage d'être plus rapide, moins chère et réalisée dans un plus faible volume. Elle est néanmoins plus difficile à réaliser que la méthode traditionnelle et nécessite de très fortes concentrations en CPA (40-60%) (Jang et al., 2017). Finalement, il a

été démontré que l'intégration des cellules dans une double émulsion permettait d'améliorer leur viabilité après congélation (Dluska et al., 2017)

Un exemple représentatif de cette difficulté de conservation a été l'échec de la phase III du produit Prochymal pour une application de GVHD résistante aux stéroïdes, qui, selon les responsables, pourrait être dû à la formulation en produit congelé pour les phases cliniques, alors que les essais précliniques chez l'animal avaient été réalisés avec des cellules fraîchement isolées et amplifiées (Galipeau, 2013). Ceci illustre bien la nécessité d'évaluer l'impact de la congélation sur le type cellulaire d'intérêt dès les 1^{ères} phases de développement préclinique chez l'animal.

1.2.5.2. Transport

Le transport du PTC doit respecter certaines lignes directrices édictées dans le recueil des bonnes pratiques de distribution (GDP pour *good distribution practices*) qui requièrent la preuve que le transport n'affecte pas la qualité et l'intégrité du PTC (Coopman and Medcalf, 2014). Un contrôle de la température doit être assuré à toutes les étapes de transit et de transport, une variation de celle-ci pouvant en effet impacter la survie ou l'intégrité du PTC. Les cellules conservées par cryoconservation et vitrification sont généralement transférées respectivement dans de la carboglace (< -78°C) et dans de l'azote liquide (environ -160°C) (Roh et al., 2016). La qualité du PTC peut néanmoins être impactée pendant le transfert. Les forces mécaniques de vibration que subissent les produits lors du transport ne doivent en effet pas être négligées. Nikolaev *et al.*, ont en effet démontré que des MSCs conservées à +4°C étaient sensibles aux vibrations et que cette sensibilité augmentait avec le temps de conservation (Nikolaev et al., 2012). Il apparaît donc nécessaire de définir des modalités de conservation qui ne seront pas impactées par ce transport.

1.2.6. Conditionnement du produit cellulaire

1.2.6.1. Pré-conditionnement

L'un des problèmes majeurs rencontrés en TC est la mort massive et rapide des CSs après administration, à l'origine d'une moindre efficacité thérapeutique. Le contexte pathologique qui peut être caractérisé par un état ischémique ou hypoxique, une inflammation, une forte dégradation de l'ECM, un stress oxydatif ou encore une forte réaction immunitaire, s'avère peu favorable à la survie et l'intégration des cellules transplantées. Les

facteurs physiques liés à l'injection telle que la pression exercée sur les cellules participent également à ce faible taux de survie (Liu et al., 2016; Sart et al., 2014c). Afin d'améliorer les taux de survie et le potentiel thérapeutique de ces cellules en prévision de leur injection dans un environnement peu favorable, différentes stratégies de pré-conditionnement du PTC ont été proposées (Sart et al., 2014c). Parmi elles, les pré-conditionnements environnementaux (hypoxie, stress oxydatif, choc thermique ou expositions à des GFs) consistent à placer les cellules dans des conditions qui miment l'environnement auquel elles feront face *in vivo* afin qu'elles sur-expriment des facteurs de survie ou de différenciation. L'intégration des cellules dans une structure 3D est également envisagée pour les protéger lors de l'administration (Sart et al., 2014c).

Comme nous l'avons évoqué dans le paragraphe I.2.3.6, la culture en hypoxie (1-10% de tension en O₂) favorise la prolifération et le maintien de l'état souche de nombreux types cellulaires lors de l'expansion *ex vivo*. De nombreuses études ont également démontré l'intérêt d'une étape (de quelques heures à quelques jours) de pré-conditionnement hypoxique préalablement à l'injection. Par exemple, un prétraitement hypoxique de 48h (à 1% O₂) améliore l'efficacité de régénération musculaire de myoblastes après injection dans le modèle murin dystrophique *mdx* (Liu et al., 2012). Francis et al. ont démontré qu'une incubation de 12h à 0,1% d'O₂ améliorerait la différenciation neuronale d'ESCs humaines et leur survie dans des conditions stressantes (stress oxydatif et nutritif) (Francis and Wei, 2010). Alors qu'un pré-conditionnement de 24-72h à 0,5% O₂ améliore la différenciation neuronale et stimule l'angiogénèse de MSCs par comparaison à des cellules maintenues en « normoxie » (20%) (Wei et al., 2012), une étape de pré-conditionnement à 5% d'O₂ lors de l'expansion ne semble pas être favorable à la différenciation chondrocytaire et adipocytaire (Boyette et al., 2014). Outre le stress hypoxique, un léger stress oxydatif (100 µM d'H₂O₂ pendant 2 jours) semble améliorer la fonction cardiaque et diminuer la fibrose dans un modèle d'ischémie-reperfusion chez le rat après implantation de progéniteurs cardiaques par rapport à des cellules non traitées (Pendergrass et al., 2013). Un choc thermique avant administration permettrait également d'améliorer la survie des cellules injectées par sur-expression de certaines protéines de choc thermique (HSP pour *heat shock protein*) (Sart et al., 2014c). Finalement, l'exposition à des GFs comme le TGF- α aurait également un effet bénéfique sur le rôle cardioprotecteur des MSCs (Herrmann et al., 2010).

Parallèlement à l'administration de suspensions cellulaires, se développent des outils d'ingénierie tissulaire qui permettent l'administration des CSs ou matures au sein de structures 3D injectables constituées de matrices biologiques (protéiques, polymères...) ou encore de structures 3D plus complexes au sein desquelles peuvent être par exemple emprisonnés des GFs pour stimuler une différenciation spécifique (paragraphe I.2.3.3) (Atala et al., 2012; Shafiq et al., 2016; Zhang, 2017). Ces biomatériaux, qui doivent être biocompatibles et biodégradables, permettent d'apporter une matrice qui favorise la migration et l'ancrage des cellules dans le tissu, mais aussi de créer un environnement protégé vis-à-vis du système immunitaire (Sart et al., 2014c; Zhang, 2017). L'utilisation d'un hydrogel injectable a par exemple amélioré significativement la survie d'oligodendrocytes dérivés d'iPSCs et limité la formation de tératomes par stimulation de la différenciation après transplantation dans un modèle rongeur de lésion de la moelle épinière (Führmann et al., 2016). En plus des contraintes liées au contexte pathologique, l'encapsulation dans ce genre d'hydrogel permettrait de limiter la mort cellulaire due au stress induit par le flux au sein de la seringue (Aguado et al., 2012). Outre les hydrogels, une récente avancée dans le développement de supports 3D pour la transplantation de cellules est le développement de tissus décellularisés, qui présentent l'avantage de conserver l'architecture complexe de l'ECM (Godier-Furnémont et al., 2011; Yang et al., 2008).

1.2.6.2. Modalités d'administration

a. Voies d'abord

La voie d'administration est un paramètre essentiel à considérer rapidement au cours du développement du PTC. Elle conditionne en effet la quantité de cellules à injecter, le nombre d'administration et donc le procédé de production. En fonction de la cible thérapeutique et du candidat cellulaire, de nombreuses stratégies locales ou systémiques ont été proposées (Srijaya et al., 2014). Ces dernières reposent sur la propriété de tropisme des CSs, à savoir la capacité à migrer vers un tissu particulier grâce à la réception de signaux médiés par des chimiokines et autres facteurs solubles (Stuart and Pattavilakom, 2015). Les cellules administrées par cette voie devront également être capables de passer à travers la barrière endothéliale (Kurtz, 2008). Alors que l'infusion intraveineuse (IV) est peu invasive et donc souvent favorisée, l'administration locale de cellules dans des zones peu accessibles comme le cerveau ou le cœur nécessite des chirurgies très invasives (administration intra-coronarienne, intra-craniale...). L'administration locale présente l'avantage d'apporter une

concentration importante de cellules au site d'administration malgré une dose totale nécessaire généralement moins importante, et peut bénéficier des conditionnements en structures 3D qui favorisent l'implantation des cellules (paragraphe I.2.6.1). Elle est néanmoins non applicable dans le cas de pathologies non ciblées touchant une grande partie de l'organisme, comme par exemple la myopathie de Duchenne. Certaines équipes ont également proposé de combiner plusieurs voies d'administration pour améliorer l'efficacité du traitement (Geffner et al., 2008). Skuk *et al.* soulèvent également l'importance du volume d'injection et du choix de la taille de l'aiguille d'injection, un diamètre trop important pouvant entraîner des dommages tissulaires important de la zone traitée (Skuk et al., 2014).

Il apparaît néanmoins nécessaire de s'assurer que les cellules transplantées ne vont pas aller s'intégrer dans des zones autres que celles d'intérêt, ce qui pourrait avoir un effet négatif sur la fonctionnalité et l'homéostasie de ces tissus. Après injection IV, les cellules sont majoritairement retrouvées dans les organes filtres, comme les poumons, la rate, le thymus, les reins ou encore le foie. Alors que leur présence dans le poumon peut avoir des conséquences délétères, bien qu'aucun effet secondaire de ce type n'ait à ce jour été rapporté, la présence de MSCs au sein de la rate pourrait avoir des effets bénéfiques dans le sens où elles pourraient y exercer leurs propriétés d'immunomodulation pour faciliter leur intégration (Kurtz, 2008). L'absence d'outils performants permettant de suivre le devenir des cellules après administration *in vivo* ajoute une difficulté supplémentaire dans le choix de la voie d'administration (Srijaya et al., 2014). Ce choix doit finalement être accompagné du meilleur taux de régénération avec le moins d'effets secondaires.

b. Doses et durée

Fortement liées à la voie d'administration et au conditionnement, la dose et la durée de traitement dépendent de l'application thérapeutique et du candidat cellulaire. Les études précliniques et cliniques en cours rapportent en effet des doses très variables, même au sein d'un même type cellulaire. Alors que la dose de BM-MSCs autologues administrée par voie intrathécale était de 3 à $5 \cdot 10^7$ cellules/kg pour des patients atteints de sclérose en plaques, $5 \cdot 10^6$ à $6 \cdot 10^6$ cellules/kg ont été transplantées pour le traitement de dommages à la moelle épinière et seulement $1 \cdot 10^6$ cellules/kg ont été administrées par IV pour traiter des patients atteints de lupus érythémateux réfractaires (Srijaya et al., 2014). Comme nous l'avons évoqué précédemment, la dose efficace peut également dépendre du temps de culture. Certaines études ont en effet démontré que l'administration de précurseurs myogéniques ayant passé du

temps en culture induisait une régénération moins efficace et nécessitait une dose 10 fois supérieure à l'administration de cellules fraîchement isolées pour obtenir la même efficacité thérapeutique (Montarras et al., 2005). De plus, la dose dépend de l'état de différenciation du candidat cellulaire. En effet, il est probable qu'un plus grand nombre de cellules différenciées soit nécessaire par rapport à des progéniteurs qui bénéficient d'un potentiel de prolifération plus important leur conférant la capacité de proliférer après administration (Srijaya et al., 2014). La densité de la suspension cellulaire apparaît également comme un facteur critique d'efficacité, une meilleure survie cellulaire une semaine post-injection ayant été attribuée à des myoblastes injectés à de faibles doses et de faibles densités (Pellegrini and Beilharz, 2011). La mise en place d'études précliniques est donc nécessaire pour évaluer l'efficacité et la sécurité des différentes modalités d'administration.



La définition de conditions de culture qui permettent d'obtenir suffisamment de cellules pour réaliser une application thérapeutique ciblée ainsi que les contrôles qualité nécessaires à la libération des lots est une problématique de taille. Cette partie a en effet illustré les difficultés auxquelles sont confrontés les laboratoires lors du transfert du protocole de grade recherche à un procédé de production à large échelle compatible avec l'application clinique, dans le sens où chaque évolution dans le protocole allant de la source du donneur à la voie d'administration, peut avoir un impact significatif sur le devenir de la cellule et son potentiel thérapeutique. Il est donc nécessaire d'évaluer l'impact que génère chaque changement sur les cellules qui sont très sensibles à leur environnement. De plus, tout le système de culture doit être pris en compte comme un ensemble, dans le sens où la modification de l'un des paramètres peut influencer le choix d'un autre paramètre. Un milieu de culture évalué comme optimum dans des conditions adhérentes classiques ne le sera peut-être pas pour une culture sur microporteurs en suspension. De plus, bien qu'il soit important de s'inspirer des avancées et validations effectuées par d'autres équipes de recherche, ce qui convient pour une population cellulaire peut ne pas convenir pour une autre. Finalement, la validation d'un procédé de production nécessite de s'assurer que tous les composants du procédé de production (GFs, milieu, matrices, etc.) seront disponibles en quantités suffisantes pour supporter le transfert du procédé à plus large échelle pour les phases cliniques et post-AMM. Il a notamment été suggéré d'intégrer une redondance dans la définition des produits utilisés afin de pouvoir pallier rapidement à un potentiel défaut d'approvisionnement et assurer la continuité de la production (Ratcliffe et al., 2011). La fonctionnalité, la

reproductibilité et l'innocuité de tous ces composants doivent également être vérifiées (Campbell et al., 2015).

II. Identité du produit cellulaire

La détermination d'une carte d'identité de la population cellulaire est un critère essentiel dans la définition d'un PTC. Une caractérisation phénotypique avancée doit en effet être réalisée durant la phase de développement préclinique dans le but d'identifier des marqueurs spécifiques ou un panel de marqueurs. Ces marqueurs peuvent indiquer le type cellulaire, l'état de pluripotence, l'engagement dans une voie de différenciation ou encore l'état de différenciation terminale (EMA/CAT/571134/2009, 2011). Les protocoles d'isolement et de production du PTC pouvant considérablement impacter le produit cellulaire final, cette caractérisation complète doit pouvoir aboutir à la définition de critères libératoires déterminables grâce à des tests reproductibles permettant de s'assurer que le produit final correspond bien à la population d'intérêt. Cette carte d'identité est généralement documentée par des profils d'expression d'antigènes de surface analysés par cytométrie en flux. La libération des lots cliniques des MSCs requiert par exemple des taux d'expression supérieurs à 95% pour les antigènes de surface CD105, CD73 et CD90, et moins de 2% pour les antigènes hématopoïétiques CD14, CD34, CD45 et HLA-DR (Dominici et al., 2006; Mendicino et al., 2014). Les cellules MSCs dérivées de tissus adipeux exprimeront néanmoins les marqueurs CD34 et CD54 (De Ugarte et al., 2003), illustrant la nécessité de définir des critères libératoires propres à chaque population cellulaire. De plus, ces marqueurs ne peuvent pas être utilisés seuls car ils ne sont finalement pas spécifiques et retrouvés exprimés dans un grand nombre de populations cellulaires, dont les cellules périvasculaires, péricytes et fibroblastes de différents tissus (Covas et al., 2008; Phinney and Sensebé, 2013). L'hétérogénéité des protocoles de production que nous venons d'évoquer, de la source du prélèvement aux conditions de culture, ajoute une difficulté majeure pour la définition de critères standards, même au sein d'une même population. Au même titre que les MSCs, une multitude de lignées d'iPSCs ont été générées et décrites, possédant des fonctionnalités différentes bien que regroupées sous un même nom, illustrant la nécessité d'établir des critères standards pour la validation de ces différentes populations (Yaffe et al., 2016).

III. Pureté du produit cellulaire

L'identité et la pureté d'une population cellulaire sont intrinsèquement liées dans le sens où les tests d'identité peuvent renseigner sur la présence de cellules contaminantes non désirées. L'obtention d'une suspension pure de la population cellulaire d'intérêt est importante dans le sens où la contamination par d'autres types cellulaires ou par des cellules indifférenciées peuvent avoir des effets indésirables majeurs sur l'efficacité thérapeutique mais également sur la sécurité. En effet, même avec une proportion très faible ($< 0,2\%$) d'hESCs indifférenciées, des tératomes ont pu être observés *in vivo* après injection de cellules β différenciées sécrétrices d'insuline (Schriebl et al., 2010). Alors que la détection de ces cellules indifférenciées résiduelles est nécessaire, par exemple par évaluation de l'expression des marqueurs TRA-1-60 et Oct-4 au sein d'une population cellulaire dérivée d'ESCs (Sart et al., 2014a), la mise en place de techniques permettant l'élimination de ces cellules indifférenciées permet d'augmenter la pureté et la sécurité du produit cellulaire. Lorsque ces cellules résiduelles sont présentes, différentes techniques ont été proposées pour les éliminer dont le tri par FACS sur certains marqueurs, l'induction spécifique de l'apoptose ou encore la sélection magnétique (Knoepfler, 2009; Sart et al., 2014a; Tang et al., 2011).

IV. Efficacité du produit cellulaire

Comme nous l'avons évoqué précédemment (Chapitre 1), les TCs visent à remplacer, réparer ou restaurer la fonction d'un tissu ou d'un organe lésé à la suite d'un accident, du vieillissement ou d'une pathologie. Les études précliniques d'efficacité, fortement liées aux études de biodistribution détaillées dans le paragraphe VI, doivent donc démontrer l'effet thérapeutique du traitement, au niveau tissulaire comme au niveau de l'état clinique et requièrent communément l'utilisation d'un ou plusieurs modèles animaux pertinents dont le choix dépend du type cellulaire et de l'application thérapeutique (*Guidelines for Stem Cell Research and Clinical Translation*, ISSCR 2016). Ces modèles animaux doivent refléter au mieux la pathologie humaine et les modalités de transplantation (protocole de production défini compatible avec la clinique, voie d'administration, régime immunosuppresseur, dose...) doivent être les plus proches possible de celles qui seront réalisées lors des ECs (Frey-Vasconcells et al., 2012). Ces études doivent idéalement permettre d'apporter des pistes de mode d'action, de définir les modalités optimales de la transplantation, d'induire une modification de l'état pathologique du modèle animal, et ce de façon durable (*Guidelines for Stem Cell Research and Clinical Translation*, ISSCR 2016).

Le choix du modèle animal (espèce, état physiologique, âge...) n'est pas réglementé mais sa pertinence doit être justifiée. Les modèles petits animaux, majoritairement rongeurs, sont généralement favorisés en raison de leur facilité de manipulation et leur faible coût. Les modèles gros animaux doivent quant à eux être envisagés lorsqu'ils apportent un avantage en termes de modélisation de la pathologie humaine (*Guidelines for Stem Cell Research and Clinical Translation*, ISSCR 2016), mais peuvent être néanmoins limités par la faible disponibilité des outils d'analyses (anticorps, réactifs...). De plus, le modèle animal utilisé pour la 1^{ère} preuve de concept, généralement réalisée en contexte allogénique, n'est pas forcément transposable aux études d'efficacité du PTC équivalent humain, en raison des modalités xénogéniques qui nécessitent entre autre l'utilisation d'un modèle immuno-compromis/supprimé ou l'implémentation d'un régime immunosuppresseur important pouvant compromettre l'état ou la survie du modèle initial (Frey-Vasconcells et al., 2012). Les résultats de ces études peuvent se présenter sous forme de taux de survie, de récupération de la fonction d'un organe ou d'améliorations au niveau du comportement général, par la mesure de différents paramètres tels que le score clinique, l'intégration des cellules dans les tissus d'intérêt, la présence de régénération, la différenciation ou encore la réparation/l'amélioration de la lésion tissulaire. L'identification de biomarqueurs peu invasifs et facilement mesurables, qui reflètent la progression / l'amélioration de l'évolution de la pathologie est idéalement souhaitée pour définir l'efficacité du traitement.

Enfin, la législation visant à limiter l'expérimentation animale, le développement d'outils permettant de reproduire des organes et tissus sains ou pathologiques *ex vivo* tels que les organoïdes, semble prometteur pour apporter des compléments d'information pour renseigner l'efficacité du PTC (Lancaster et al., 2013; Yin et al., 2016). Ils peuvent dans certains cas être plus sensibles et rapides que les tests *in vivo* et présentent l'avantage d'être moins coûteux et chronophages (Rayment and Williams, 2010). Finalement, bien que ces études soient requises par les instances réglementaires lors de l'élaboration du dossier de demande d'EC, la barrière de l'espèce et les variations entre les protocoles ne permettent généralement pas de prédire avec certitude l'effet thérapeutique réel que ces cellules généreront chez l'homme.

V. Potentialités

L'objectif de l'évaluation de la potentialité est d'identifier les paramètres essentiels à l'efficacité du PTC afin de définir les tests et contrôles reproductibles et pertinents permettant de s'assurer de la qualité et de la stabilité du produit cellulaire final lors de la libération des lots cliniques (Bravery et al., 2013; Pimpaneau et al., 2015). Ces tests sont également nécessaires pour vérifier la comparabilité du produit lors d'une modification dans le protocole de production au cours du développement clinique (Bravery et al., 2013). Au même titre que l'évaluation de l'identité, la difficulté technique de l'évaluation des potentialités d'un produit pour une application thérapeutique avec des méthodes standardisées repose sur la complexité biologique, la versatilité du produit et la limitation des connaissances sur le mode d'action et les mécanismes mis en jeu (Bravery et al., 2013; Wagner, 2012). La compréhension des mécanismes d'action du produit cellulaire est un avantage non négligeable pour la définition de tests de potentialités pertinents.

Ils comprennent généralement des tests basés sur l'expression de marqueurs mais également des tests fonctionnels (EMA/CAT/571134/2009, 2011). En effet, malgré l'identification de certains marqueurs connus pour être impliqués dans des mécanismes biologiques, comme des marqueurs de surface, cela ne peut confirmer en soi que le produit sera biologiquement actif et exercera l'effet attendu (Bravery et al., 2013; Coopman and Medcalf, 2008). La définition de ces tests dépend donc du type cellulaire et de l'application thérapeutique et sera évaluée par les instances réglementaires au cas par cas. Bien qu'il ne soit pas nécessaire d'évaluer toutes les propriétés biologiques du PTC, ceux-ci pouvant exercer leur efficacité biologique par l'intermédiaire d'un très grand nombre de fonctions, plusieurs paramètres considérés comme les plus pertinents pour l'application thérapeutique devront être retenus (Bravery et al., 2013). Les caractéristiques attendues pour ces tests de potentialités sont représentés dans la Figure 10.

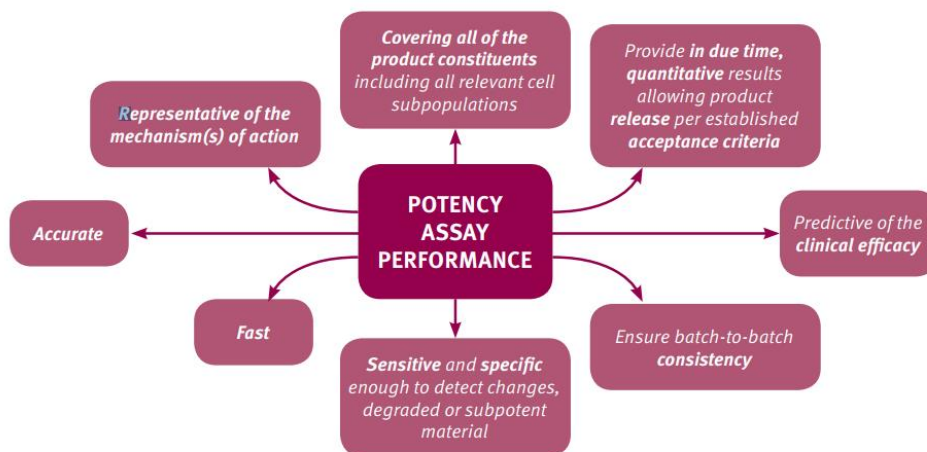


Figure 10. Caractéristiques attendues des tests de potentialité (Pimpaneau et al., 2015).

Parmi ces tests, la viabilité du produit cellulaire est l'un des 1^{ers} paramètres à déterminer, bien que ce ne soit pas le paramètre le plus pertinent pour évaluer l'activité biologique du produit cellulaire, soit par l'utilisation du bleu Trypan et comptage manuel à l'hématocytomètre, soit par d'autres méthodes transférables à plus larges échelles et plus robustes telles que la cytométrie en flux ou encore les compteurs automatisés (Rayment and Williams, 2010). Un élément essentiel qui doit être vérifié avant la libération des lots est l'adéquation avec le degré de différenciation souhaité, par l'utilisation de marqueurs pertinents ou de tests de différenciation. Selon le candidat thérapeutique, pourront également être évalués l'expression de certaines substances d'intérêt (protéine recombinante, GFs, enzymes, cytokines...) ou encore les interactions cellulaires (activation/inhibition immunitaire...) (EMA/CAT/571134/2009, 2011). Les tests *in vitro* sont généralement favorisés dans le sens où les tests *in vivo* peuvent générer des délais peu compatibles avec la libération des lots cliniques. En guise d'exemple, les critères minimums utilisés actuellement pour la libération des lots cliniques de MSCs sont l'adhérence aux surfaces de culture standard, la genèse de cellules présentant un phénotype fibroblastique, qui expriment un panel de marqueurs de surface précédemment décrit (paragraphe II) et qui se différencient au moins vers les lignages adipo-, ostéo- et chondrogénique (Dominici et al., 2006; Mendicino et al., 2014). Bien que largement utilisées en clinique, ces techniques sont loin d'être standardisées. Elles sont très chronophages et peuvent fortement différer selon les laboratoires (Bieback et al., 2010). Le développement de tests standardisés corrélés à l'efficacité thérapeutique en fonction de l'application thérapeutique apparaît essentiel.

VI. Biodistribution du produit cellulaire

Contrairement aux médicaments pharmacologiques dont il est aujourd'hui facile d'établir des données de biodistribution, un point majeur repose sur l'évaluation du devenir des cellules après injection *in vivo*. Comme nous l'avons évoqué dans le paragraphe I.2.6.2, les différentes voies d'administration aboutissent à des schémas de dissémination différents. Les modalités d'administration systémiques peuvent notamment induire des effets dangereux pour le patient dans le cas où les cellules seraient piégées dans les poumons ou dans l'environnement micro-vasculaire, comme cela a pu être rapporté après injection IV de cellules dérivées du tissu adipeux (Jung et al., 2013). L'évaluation de la biodistribution permet d'obtenir des informations d'efficacité mais également de sécurité, notamment pour s'assurer du risque de formation tissulaire ectopique (Goldring et al., 2011).

Les études histopathologiques et quantitatives (qPCR pour *quantitative polymerase chain reaction*) restent les études standards pour évaluer la présence des cellules au sein des tissus et organes (Baker and Assaf, 2015). Leurs limites résident dans le fait qu'elles nécessitent la réalisation de biopsies, voire le sacrifice de l'animal, et ne permettent pas de réaliser un suivi longitudinal (Heslop et al., 2015). Un certain nombre de tissus cibles et non ciblés tels que les gonades sont en règle générale examinés (Frey-Vasconcells et al., 2012). Avec les récentes avancées en techniques d'imagerie, monitorer la survie, la migration, la biodistribution et l'intégration des cellules transplantées est devenu possible, et ce de façon non invasive. Différentes techniques sont aujourd'hui utilisées pour les études précliniques et cliniques (Figure 11).

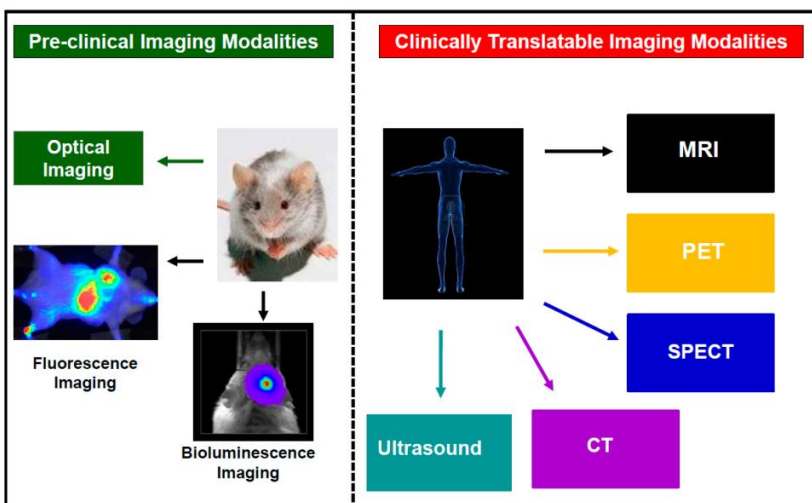


Figure 11. Représentation schématique des différentes techniques d'imagerie utilisées pour monitorer les thérapies cellulaires lors des études précliniques et cliniques (Ngen and Artemov, 2017). Les abréviations correspondent aux techniques suivantes : magnetic resonance imaging (MRI) ; positron emission tomography (PET) ; single photon emission computed tomography (SPECT) et computed tomography (CT).

Ces différentes techniques d'imagerie nécessitent le marquage direct ou indirect des cellules (Kircher et al., 2011). Les marquages directs permettent de monitorer le devenir des cellules i) soit sur de courtes périodes par l'utilisation de radionucléides associée à l'imagerie en tomographie par émission de positrons (PET pour *positron emission tomography*) ou tomographie par émission monophotonique (SPECT pour *single photon emission computed tomography*) (Rodriguez-Porcel et al., 2008), ii) soit sur de plus longues périodes par l'utilisation de dérivés d'oxyde de fer dont le suivi peut aller jusqu'à plus de 3 semaines (Zhu et al., 2006). Bien que généralement moins sensible que l'imagerie nucléaire, l'imagerie par résonance magnétique (MRI pour *magnetic resonance imaging*) apporte un suivi sur du long terme et une résolution spatiale généralement meilleure par l'utilisation d'agents de contraste comme la fluorine-19 (¹⁹F) ou les perfluorcarbonés (PFC), dont certains sont déjà approuvés par la FDA (Ngen and Artemov, 2017). Plus récemment, l'utilisation de nanoparticules de différentes natures a été proposée comme agent de marquage (Accomasso et al., 2016). L'inconvénient majeur de ces techniques est la perte du signal par dilution au cours des cycles de division (Jurgielewicz et al., 2017).

Le marquage indirect consiste quant à lui à introduire un gène rapporteur codant une protéine qui permet de générer un contraste au niveau des cellules viables. C'est le cas par exemple des récepteurs de la transferrine et de la ferritine qui sont impliqués dans l'homéostasie du fer et dont l'augmentation de la concentration permet de générer un faible contraste mais détectable par MRI. La transmission de ce gène lors des divisions cellulaires lui confère une stabilité dans le temps beaucoup plus importante que les modalités de marquage direct (Jurgielewicz et al., 2017). Cette modalité est néanmoins plus rare en clinique en raison de la nécessité de la manipulation génétique des cellules (Heslop et al., 2015).

Finalement, quelle que soit la modalité utilisée, il est nécessaire d'évaluer l'impact de ce marquage sur la fonctionnalité des cellules, dans le sens où une légère modification dans un processus biologique peut avoir un effet non négligeable sur le devenir et le comportement des cellules et ainsi générer des interprétations inexacts des études de biodistribution et d'efficacité.

VII. Innocuité du produit cellulaire

Les études réglementaires précliniques requises pour le développement de médicaments conventionnels (absorption, distribution, métabolisme, excrétion et toxicité) sont difficilement applicables aux thérapies cellulaires, en partie à cause d'un manque de technologies permettant de monitorer la migration et la différenciation des cellules transplantées et d'une connaissance partielle des mécanismes d'action *in vivo* (Basu et al., 2015). Les risques cliniques associés aux thérapies cellulaires dépendent de nombreux facteurs. D'une part, les caractéristiques intrinsèques aux différents types de CSs qui confortent leur potentiel thérapeutique (prolifération, différenciation, migration, activité paracrine...) peuvent également les rendre dangereuses pour le patient. Contrairement aux molécules pharmacologiques, une partie des cellules va s'intégrer dans les tissus pour une durée indéterminée. On ne peut donc pas exclure que des effets indésirables ne soient observés sur du moyen / long terme. D'autre part, des facteurs de risques extrinsèques dépendent du niveau de manipulations lors du procédé de production, des 1^{ères} étapes de production à celles de conditionnement. Finalement, les modalités de traitement (autologue ou allogénique), la voie d'administration et le contexte pathologique au sein duquel elles vont être transplantées génèrent des risques potentiels qu'il est important d'évaluer.

Plusieurs paramètres sont donc pris en compte lors de l'évaluation de l'innocuité d'un PTC. D'une part, les risques de contamination de la préparation cellulaire lors du procédé de production et de conditionnement et d'autre part, les risques intrinsèques au produit cellulaire tels que les risques immunologiques et tumorigènes ainsi que l'état de sénescence cellulaire. Bien que les modèles animaux permettent aujourd'hui d'évaluer nombre de paramètres dont le comportement post-administration, la biodistribution, le mode d'action, l'efficacité et la toxicité, la prédiction de la toxicité ou de réactions immunitaires chez l'Homme reste complexe (Ratcliffe et al., 2013). La définition de contrôles pertinents, efficaces et reproductibles pour s'assurer de l'innocuité du PTC, représente une difficulté supplémentaire au cours du développement.

VII.1. Contamination par des agents pathogènes

Les risques de contaminations virales, microbiennes ou fongiques concernent tous les types cellulaires et peuvent avoir des conséquences désastreuses pour le patient.

D'une part, le risque majeur provient du procédé de production du PTC. Peu bénéficient aujourd'hui d'un procédé de production totalement clos et de nombreuses étapes nécessitent des manipulations non automatisées, sources potentielles de contamination par le manipulateur (Ratcliffe et al., 2011). Ces risques sont néanmoins fortement réduits lors du respect rigoureux des GMPs, et la stérilité du produit peut être évaluée par des tests microbiologiques plus ou moins rapides (Rayment and Williams, 2010). De plus, l'amplification des CSs requiert parfois l'utilisation de composés non humains comme le FBS dans le milieu de culture ou des éléments matriciels, qui introduisent des risques supplémentaires de transmission de maladies en plus du risque immunologique (paragraphe I.2.3). D'importants efforts sont focalisés sur le remplacement de ces différents composés par des produits définis, synthétiques ou encore humains. Toutefois, malgré le bénéfice de la traçabilité et des contrôles qualité déjà mis en place pour le circuit de transfusion, l'utilisation des produits sanguins proposés comme alternatives au FBS, comme le hPL ou le HS, n'exclut pas le risque de transmission de pathogènes. En raison de la réémergence de certains virus ou de l'apparition de nouveaux virus ou variants conjointement à l'absence d'outil de diagnostic non dédié, il est aujourd'hui difficile d'évaluer le risque viral d'un produit sanguin. De nouvelles technologies ont néanmoins récemment été proposées pour inactiver de façon non sélective des pathogènes potentiellement présents au sein de produits sanguins (Schlenke, 2014; Viau et al., 2017a).

La transmission de tels pathogènes peut d'autre part provenir de la source initiale des cellules. La transmission donneur-receveur intervenant dans le cas de transplantation autologue est en effet l'un des 1^{ers} facteurs de risque, partagé avec la transplantation tissulaire pour laquelle quelques cas ont été rapportés (Kainer et al., 2004; Tugwell et al., 2005). Afin d'éviter tout risque de contamination donneur-receveur, un certain nombre de pathogènes sont testés, parmi lesquels le HIV-1 et 2, les virus de l'hépatite A et B, le cytomegalovirus (CMV) ou encore l'agent responsable de la syphilis (*Treponema pallidum*). En outre, bien que les MSCs soient sensibles aux infections par le CMV et le virus Herpes simplex de type 1 (HSV-1) *in vitro*, aucun ADN de CMV n'a pu être détecté dans une culture de MSCs issues d'un patient porteur de ce virus (Sundin et al., 2006).

Un autre aspect du risque viral découle de l'affaiblissement du système immunitaire du patient par le traitement immunosuppresseur utilisé notamment pour les modalités de transplantation allogénique, qui devient alors favorable à la contraction ou la réactivation de

virus latents. C'est le cas du virus de l'herpès souvent réactivé lors de transplantations allogéniques de HSCs (Herberts et al., 2011).

Les techniques standards incluent notamment le test de stérilité de 14 jours, l'identification de bactéries par le marquage Gram et des tests de détection des endotoxines et mycoplasmes. Ces techniques, plutôt chronophages et donc dans l'impossibilité de donner des résultats avant la libération de certains lots cellulaires, sont progressivement remplacées par de nouveaux automates délivrant des résultats plus rapidement (Hocquet et al., 2014; Roh et al., 2016; Sheu et al., 2014).

VII.2. **Risques immunologiques**

L'immunogénicité est un facteur de risque beaucoup plus critique en médecine régénératrice que pour les médicaments conventionnels. L'administration de CSs peut influencer le système immunitaire de l'hôte, soit par induction directe d'une réponse immunitaire, soit par un effet immunomodulateur (Herberts et al., 2011).

Bien que les transplantations allogéniques prennent en compte la compatibilité HLA donneur-receveur, les risques de rejet des cellules transplantées ne peuvent être exclus et peuvent compromettre l'efficacité thérapeutique. L'utilisation de traitements immunosuppresseurs limite ce risque mais peut induire des effets secondaires importants (Mason and Dunnill, 2009). Comme décrit précédemment, certaines populations cellulaires, comme les ESCs et les MSCs, sont faiblement immunogènes et bénéficient de propriétés immunomodulatrices (Herberts et al., 2011; Sensebé et al., 2010). Les MSCs sont en effet capables d'inhiber *in vitro* la prolifération et/ou la fonction de différentes populations de l'immunité innée et adaptative (Le Blanc and Ringdén, 2007). Ce comportement immunoprivilégié permet d'une part de faciliter leur activité intrinsèque de régénération au sein de l'organisme et d'autre part d'être utilisées en support de greffes de HSCs pour limiter le risque de GVHD (Uccelli et al., 2008). De même que les iPSCs, ces cellules peuvent devenir plus immunogènes lors de leur différenciation, en raison par exemple de l'acquisition de molécules du CMH, ou suite à l'administration dans des sites non physiologiques (Cao et al., 2014; Herberts et al., 2011).

VII.3. Tumorigénicité

L'une des préoccupations majeures de l'utilisation de CSs pour des applications thérapeutiques est le risque de formation de tumeurs, dépendant de multiples facteurs. La limite entre les CSs et les cellules cancéreuses est en effet aujourd'hui encore difficilement définissable, de nombreux facteurs et voies de signalisation étant communes à ces deux états cellulaires.

D'une part, les liens entre la pluripotence et la tumorigénicité peuvent en effet être illustrés par le fait que parmi les gènes utilisés pour produire les iPSCs sont retrouvés les oncogènes *MYC* et *KLF4* (Takahashi et al., 2007) et d'autres gènes liés à la tumorigénicité tels que *SOX2*, *NANOG* ou encore *OCT3* (Knoepfler, 2009). En effet, bien que *MYC* ait été un des 1^{ers} oncogènes identifiés, son rôle essentiel dans le maintien de l'auto-renouveaulement et la pluripotence des ESCs n'a été que récemment décrit (Knoepfler, 2009).

D'autre part, les ESCs et iPSCs partagent avec les cellules cancéreuses une capacité de prolifération illimitée, rendue possible par l'expression de la télomérase. La plupart des CSAs dont les MSCs ne présentant pas d'activité télomérase, l'arrêt de la réplication dû au phénomène de sénescence réplivative réduit en effet considérablement ces risques de transformation. De par leur nature, les cellules pluripotentes ESCs et iPSCs indifférenciées sont également intrinsèquement caractérisées par la formation de tératomes lorsqu'elles sont administrées *in vivo* (Fong et al., 2010). Bien que différenciées avant administration, la présence de cellules prolifératives et indifférenciées résiduelles peut persister. Comme nous l'avons évoqué dans le paragraphe 0, la mise en place de systèmes permettant de purifier la population cellulaire d'intérêt et/ou d'identifier la présence de cellules contaminantes permet de limiter ce risque.

De plus, le risque tumorigène est fortement lié aux conditions et à la durée d'amplification des cellules (Goldring et al., 2011; Knoepfler, 2009). En effet, l'expansion *in vitro* de CSs dans des conditions non physiologiques peut entraîner une accumulation de dommages à l'ADN et d'anomalies génétiques, augmentant le risque de transformation cancéreuse par expression d'un oncogène ou échappement par exemple au mécanisme de sénescence réplivative (Herberts et al., 2011; Sverdlov and Mineev, 2013). L'impact de ces altérations sur le potentiel tumorigène est encore cependant peu connu. Bien que des aberrations génétiques et chromosomiques aient été détectées lors de culture sur le long-terme

de MSCs, cela n'a pas été associé à un risque de transformation tumorale (Bernardo et al., 2007b; Tarte et al., 2010). La transformation spontanée de MSCs humaines a en effet été définie comme un événement rare (Achille et al., 2011; Wang et al., 2005) et il n'a à ce jour été reporté aucune tumorigénicité lors des ECs réalisés avec des MSCs. L'évaluation du caryotype apparaît néanmoins comme un paramètre essentiel à documenter pour s'assurer de la stabilité génétique de la population cellulaire lors de la phase d'expansion *in vitro*. Le choix de la technique est également important dans le sens où les analyses standards de caryotypes ne permettent pas de détecter de faibles altérations génétiques qui peuvent potentiellement altérer le phénotype (Maitra et al., 2005). Enfin, Okamoto *et al.* ont également décrit une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la transformation tumorale lors de l'expansion prolongée de HSCs (Okamoto et al., 2007).

Enfin, en plus du risque de formation de tumeur par les cellules elles-mêmes, les CSs pourraient affecter la croissance de cellules tumorales existantes. Peu étudié pour les CSs pluripotentes, plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont rapporté des effets contradictoires sur le comportement des MSCs vis-à-vis de la croissance tumorale (Cuiffo and Karnoub, 2012; Djouad et al., 2003; Lazennec and Jorgensen, 2008; Uccelli et al., 2008), dépendants de la nature des cellules cancéreuses, du statut immunitaire du modèle animal ou encore du site d'injection. De la même façon que le traitement immunosuppresseur, les MSCs pourraient par leur comportement immunomodulateur créer un environnement propice à la propagation des cellules tumorales en partie par réduction de leur clairance par le système immunitaire (Lazennec and Jorgensen, 2008). Ce lien de cause à effet, difficile à évaluer, n'a pas encore été rapporté chez l'Homme bien que les MSCs soient utilisées en clinique pour de nombreuses applications depuis 1995 (Sensebé et al., 2010).

Finalement, il apparaît essentiel de documenter le risque de tumorigénicité de cellules amplifiées *in vitro* pour des applications cliniques. Outre les études précliniques *in vivo* sur petit animal (généralement rongeur immunodéficient) toujours requises par les instances réglementaires pour attester de l'absence de tumorigénicité (Heslop et al., 2015), certains tests *in vitro* peuvent également être mis en place dans l'optique de sécuriser la libération du produit cellulaire, parmi lesquels l'évaluation de la présence de cellules très prolifératives et indifférenciées, notamment par le tests de formation de colonies en agar mou, l'évaluation de l'expression des marqueurs de pluripotence et de la télomérase ou encore l'étude du caryotype révélant les anomalies et instabilités génétiques (EMA/CAT/571134/2009, 2011; Kuroda et al., 2012).

VII.4. Sénescence cellulaire

VII.4.1. Généralités

La sénescence cellulaire a pour la 1^{ère} fois été décrite en 1961 par Hayflick et Moorhead comme le potentiel limité des cellules à proliférer en culture *in vitro* (Hayflick, 1965; Hayflick and Moorhead, 1961). Cet arrêt de la prolifération, non corrélé à une augmentation de la mort cellulaire, identifie les cellules sénescents comme viables, métaboliquement actives, mais plus capables de se diviser malgré des conditions de culture optimales. Cet état cellulaire, identifié depuis par le terme sénescence répllicative ou sénescence intrinsèque, est aujourd'hui imputé au phénomène de raccourcissement progressif de l'extrémité des chromosomes, les télomères, au cours des divisions cellulaires. Ce raccourcissement, aboutissant à la sénescence répllicative ou l'apoptose, a suggéré l'existence d'une horloge mitotique interne déterminant la durée de vie répllicative d'une cellule.

Depuis la description de la sénescence cellulaire, la « limite de Hayflick » a été proposée comme reflétant le vieillissement cellulaire mais également le processus de vieillissement de l'organisme dans son ensemble (Allsopp et al., 1995). Les CSAs participant activement à la régénération et au renouvellement de nombreux tissus de l'organisme tout au long de la vie, la sénescence cellulaire serait corrélée à la diminution de leur capacité de régénération au cours du vieillissement (Ho et al., 2005). L'âge du donneur est donc un paramètre important à prendre en compte dans l'élaboration du protocole de TC. En outre, des cellules isolées sur un jeune patient mais amplifiées *in vitro* pendant de longues périodes pourraient également partager des caractéristiques communes avec des cellules isolées à partir d'un patient plus âgé. L'une des caractéristiques conférant aux CSs un réel intérêt thérapeutique est leur capacité de différenciation vers plusieurs types cellulaires. Cependant, de récentes études ont démontré que le potentiel de différenciation des MSCs murines et humaines après des temps de culture *in vitro* prolongés était fortement réduit, ce qui pourrait limiter leur potentiel intérêt thérapeutique (Banfi et al., 2000; Baxter et al., 2004; Bonab et al., 2006; Wagner et al., 2008). De la même façon, il a été observé que des myoblastes sénescents étaient toujours capables de se différencier et fusionner pour former des myotubes mais dans une moindre mesure par rapport à des myoblastes non sénescents (Bigot et al., 2008). Outre la réduction du potentiel thérapeutique par une altération de la différenciation, du phénotype ou encore une diminution du potentiel prolifératif et migratoire, l'injection de cellules

sénescentes pourrait avoir des effets non désirables sur l'organisme à travers un phénotype sécrétoire fortement altéré.

La majorité des dommages tissulaires sont totalement pris en charge par les mécanismes de réparation de l'organisme. Cependant, des dommages excessifs ou irréparables au sein de tissus peuvent induire la mort cellulaire (apoptose), la sénescence ou encore une mutation oncogène. La division des cellules avoisinantes ou des cellules progénitrices/souches permet le remplacement des cellules apoptotiques. Néanmoins, la division cellulaire augmente le risque de fixation d'une mutation oncogène, générant un pool de cellules potentiellement malignes ou pré-malignes au sein du tissu. Inversement, les cellules sénescentes ne sont pas remplacées et leur nombre peut augmenter avec l'âge. Ces cellules sécrètent de nombreux facteurs qui peuvent altérer voire inhiber les fonctions des cellules environnantes, générant des cellules non fonctionnelles. De plus, ces cellules peuvent stimuler la prolifération et la progression des cellules malignes environnantes, et ainsi compromettre la fonction du tissu et faciliter la progression cancéreuse.

La sénescence est également un mécanisme de protection permettant d'empêcher la division de cellules pouvant présenter des anomalies suite à des dommages ou à l'exposition à des stress cellulaires. En effet, outre le raccourcissement ou la déstabilisation des télomères, différents stimuli sont capables d'induire l'entrée en sénescence : les stress génotoxiques responsables de dommages à l'ADN (stress oxydatif, rayons X...), l'activation d'oncogènes comme Ras, ou encore des conditions de culture inadaptées (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007; Collado et al., 2007; Kuilman et al., 2010; Salama et al., 2014). On parle alors de sénescence prématurée ou sénescence extrinsèque qui intègre la sénescence induite par des dommages à l'ADN (*DNA-damage-initiated senescence*), par un stress (SIPS pour *stress-induced premature senescence*) ou encore par un oncogène (OIS pour *oncogen-induced senescence*).

Il est aujourd'hui bien connu que des conditions de culture *in vitro* inadaptées peuvent être responsables d'une entrée en sénescence prématurée indépendante des télomères. En effet, évoluant dans l'organisme au sein d'un environnement spécifique, les cellules doivent s'adapter *in vitro* à un environnement artificiel, caractérisé par des concentrations de nutriments et de GFs différentes, des concentrations en O₂ généralement supérieures, ainsi que l'absence de partenaires cellulaires et autres composants de l'ECM. Chaque facteur, seul ou en synergie avec d'autres, peut induire un « choc » et aboutir à la SIPS (Sherr and

DePinho, 2000). Il a par exemple été observé que l'exposition chronique de cellules épithéliales au TGF- β ou de fibroblastes humains à une cytokine anti-proliférative comme l'interféron- β (IFN- β) induisaient l'entrée en sénescence par l'intermédiaire de différentes voies de signalisation (Moiseeva et al., 2006; Zhang and Cohen, 2004). D'autres études plus récentes ont également mis en évidence l'importance de la composition du milieu de culture en GFs et autres suppléments, en observant notamment que l'entrée en sénescence en culture de MSCs humaines est retardée dans un milieu contenant du hPL à la place du FBS (Griffiths et al., 2013; Rubio-Azpeitia and Andia, 2014). Les kératinocytes et cellules épithéliales humaines expriment spontanément la protéine suppresseur de tumeur p16 et entrent prématurément en sénescence dans des conditions de culture standards, alors qu'ils peuvent atteindre la sénescence répllicative lorsqu'ils sont cultivés en présence d'un tapis de cellules nourricières (fibroblastes) (Ramirez et al., 2001). Des études plus ou moins récentes ont également démontré que la tension en O₂ influence fortement la durée de vie des cellules *in vitro*. En effet, différents types cellulaires présentent une durée de vie allongée en conditions « hypoxiques », c'est à dire à des valeurs plus physiologiques (<10%) comparées à des cellules maintenues à 21% d'O₂ (Packer and Fuehr, 1977; Parrinello et al., 2003; Tsai et al., 2011; Yuan et al., 1995). Dans ce sens, le stress oxydatif initie la sénescence prématurée dans de nombreux types cellulaires, bien qu'une meilleure résistance des CSs telles que les MSCs ait été observée, par rapport à des cellules différenciées (Brandl et al., 2011a; Burova et al., 2013; Parrinello et al., 2003; Yuan et al., 1995).

VII.4.2. Voies de signalisation impliquées dans la sénescence

Les voies de signalisation impliquées dans l'induction et le maintien de la sénescence peuvent varier selon les types cellulaires, l'organisme ou encore les stimuli d'induction de la sénescence (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007; Itahana et al., 2004; Kuilman et al., 2010) (Figure 12).

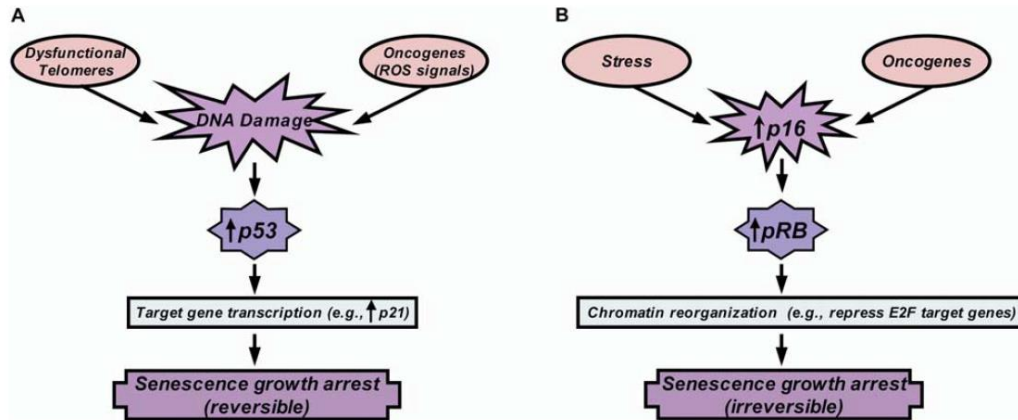


Figure 12. Rôles des voies p53 et p16-pRB dans la sénescence (Campisi, 2005). (A) La voie de signalisation p53 est préférentiellement induite en cas de dommages à l'ADN, de télomères dysfonctionnels ou encore suite à des stress génotoxiques induits par les ROS. (B) La voie de signalisation pRB est préférentiellement induite par d'autres stress ou l'activation d'oncogènes.

Les deux voies de signalisation majoritaires sont les voies p53 et p16^{INK4A} (*inhibitor of CDK4*)-pRB (*Retinoblastoma protein*), qui interagissent mais qui sont également capables d'inhiber la progression du cycle cellulaire de façon indépendante (Figure 13).

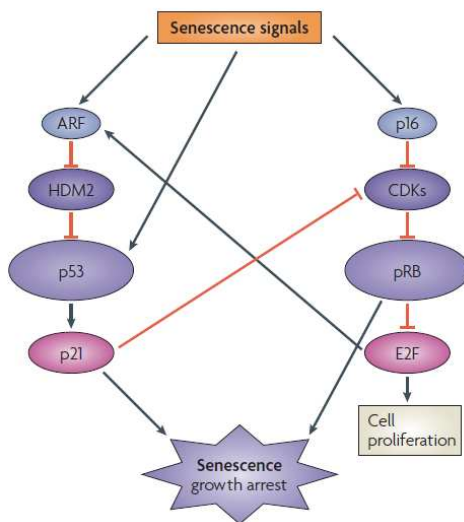


Figure 13. Contrôle de la sénescence par les voies de signalisation p53 et p16-pRB (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007). En fonction de leur nature, les signaux de sénescence engagent les voies p53 et / ou p16-pRB. CDK, Cyclin dépendant kinase; ARF, alternate-reading-frame protein; HDM2, E3 ubiquitin-protein ligase; pRB, retinoblastoma protein.

D'un point de vue mécanistique, l'activation du facteur de transcription p53 par différents signaux de sénescence induit d'une part l'expression du gène codant pour p21, inhibiteur des CDKs (CDKI), autrement appelé CIP1 (*CDK interacting protein 1*), WAF1 (*wildtype p53-activated fragment 1*) ou encore SDI1 (*senescent cell-derived inhibitor 1*). p21 est exprimé de manière permanente dans les cellules sénescents, tandis que son expression

est transitoire dans les cellules quiescentes. Il exerce en partie son activité inhibitrice en se liant aux CDK2s et avec une moindre affinité CDK4, empêchant la formation du complexe Cycline-CDK, levant ainsi l'inhibition de la protéine pRB. L'accumulation de la forme hypophosphorylée active de cette dernière entraîne la formation d'un complexe avec le facteur de transcription E2F1, inhibant sa liaison à l'ADN et donc son activité transcriptionnelle. En conséquence, les protéines de transition G1/S ne sont pas exprimées, bloquant ainsi la progression du cycle cellulaire. p53 est négativement régulée par la protéine HDM2 (*E3 ubiquitin-protein ligase*) par une ubiquitination qui facilite sa dégradation. HDM2 est quant à elle négativement régulée par la protéine ARF (*alternate-reading-frame protein*), activée par différents signaux de sénescence et également par le facteur E2F.

D'autre part, certains signaux de sénescence induisent l'expression d'un autre CDKI, la protéine p16, capable d'empêcher la phosphorylation et l'inactivation de pRB, aboutissant de la même façon à l'arrêt du cycle cellulaire (Lukas et al., 1995). Bien que les mécanismes spécifiques de la voie p16-pRB ne soient encore que partiellement connus, cette voie semble cruciale dans la ré-organisation de l'hétérochromatine, et notamment dans la génération des foyers d'hétérochromatine associés à la sénescence (SAHF pour *senescence-associated heterochromatin foci*) impliqués dans le silencing des gènes cibles du facteur de transcription E2F, nécessaires à la prolifération (Narita et al., 2003). Ces SAHFs sont plus apparents dans le cas d'OIS (Di Micco et al., 2007; Zhang and Adams, 2007).

Les stimuli qui génèrent des dommages à l'ADN et donc une DDR, tels que des radiations ionisantes ou des télomères non fonctionnels, induisent préférentiellement la sénescence via la voie p53/p21 (Campisi, 2005; d'Adda di Fagagna et al., 2003; Herbig et al., 2004) (Figure 12). Dans beaucoup de types cellulaires, les dommages à l'ADN et des télomères non fonctionnels engagent néanmoins dans un 2nd temps la voie p16-pRB comme 2nde barrière à l'expansion de cellules endommagées (Jacobs and de Lange, 2004; Stein et al., 1999). D'autres signaux peuvent aussi activer en 1^{er} lieu la voie p16-pRB. En effet, les voies p53 et p16^{INK4A}-pRB peuvent être indépendamment ou simultanément engagées lors d'une OIS, selon le type cellulaire ou encore l'oncogène. Contrairement aux cellules murines pour lesquelles l'inactivation de p53 ou de son régulateur p19^{ARF} permet d'empêcher l'OIS dû à l'activation de RAS (Serrano et al., 1997), les cellules humaines semblent préférentiellement utiliser la voie p16^{INK4A} (Ben-Porath and Weinberg, 2005). De plus, il est aujourd'hui connu que l'oncogène RAS induit p16 et la formation des SAHFs (Narita et al., 2003; Ohtani et al., 2001; Zhang et al., 2005). Cependant, l'activation oncogénique entraînant une répllication de

l'ADN abusive, les cellules subissent un stress réplicatif s'illustrant par une accumulation de dommages à l'ADN, pouvant générer de fortes DDR et la génération de SDFs (*senescence-associated DNA-damage foci*), entraînant préférentiellement l'activation de la voie p53 (d'Adda di Fagagna, 2008; Di Micco et al., 2007). Il a par ailleurs été observé sur des fibroblastes humains (Duan et al., 2005), des chondrocytes (Brandl et al., 2011b) et des MSCs (Brandl et al., 2011a), que des dommages oxydatifs sont corrélés à un raccourcissement accéléré des télomères, et impliquent au niveau moléculaire une accumulation des facteurs p53 et p21, sans exclure toutefois l'implication de la voie p16^{INK4A}-pRB.

Enfin, bien que ces deux voies de signalisation ensemble ou indépendamment aboutissent à la sénescence cellulaire, ces deux voies se différencient par leur réversibilité. En effet, un arrêt du cycle cellulaire engageant la voie p53 peut être évité par l'inactivation de p53, alors qu'une fois que la voie p16-pRB est engagée, l'arrêt du cycle cellulaire est irréversible et ne peut être rétabli par l'inactivation de p53, pRB ou p16. Le maintien des zones d'hétérochromatine à l'origine de la répression des gènes cibles d'E2F, initiée par la voie p16-pRB, serait en effet irréversible et ne dépendrait plus de p16 ou pRB (Beauséjour et al., 2003).

VII.4.3. Caractéristiques et biomarqueurs des cellules sénescences

L'établissement de la sénescence est un processus complexe et dynamique accompagné de changements morphologiques et moléculaires. La chronologie de ces changements et leur nature étant toutefois très dépendants du type cellulaire, il n'existe à ce jour pas de biomarqueur spécifique des cellules sénescences. Leur identification *in vitro* et *in vivo* repose donc sur l'association de plusieurs marqueurs, dont une liste non exhaustive est proposée ci-dessous (Collado et al., 2007; d'Adda di Fagagna, 2008; Kuilman et al., 2010; Lawless et al., 2010).

VII.4.3.1. Arrêt du cycle cellulaire

Le paramètre central de l'état de sénescence est l'arrêt irréversible du cycle cellulaire et donc l'incapacité des cellules à se diviser, malgré des conditions de culture optimales. Le cycle cellulaire comporte les phases G1, S (synthèse de l'ADN), G2 et M (Mitose). Les cellules sénescences présentent généralement une quantité d'ADN typique de la phase G1 et ne sont plus capables d'initier la réplication de l'ADN, mais certains stimuli comme des oncogènes peuvent induire l'entrée en sénescence avec un contenu en ADN typique de la

phase G2 (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007; Di Leonardo et al., 1994). Son analyse ne peut toutefois pas être utilisée seule car non spécifique de la sénescence. En effet, l'absence d'activité répliquative ne permet pas de différencier l'arrêt irréversible des cellules sénescents, des arrêts du cycle cellulaire temporaires ou permanents (phase G0), respectivement observés pour des cellules quiescentes ou en état de différenciation terminale.

L'absence d'activité répliquative peut être évaluée par simple détermination du nombre de CPD ou par l'incorporation de BrdU (*5-bromodeoxyuridine*) ou de thymidine tritiée (*3H-Thymidine*). L'immunomarquage des marqueurs PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) et Ki-67 permet également de discriminer les cellules non engagées dans le cycle cellulaire. Les inhibiteurs du cycle cellulaire peuvent également participer à la caractérisation des cellules sénescents. Les acteurs des deux principales voies de signalisation impliquées dans l'initiation et le maintien de la sénescence (Voies p53 et p16^{INK4A}-pRB précédemment décrites) sont par exemple fréquemment utilisés comme biomarqueurs des cellules sénescents. D'une part, les cellules sénescents peuvent être caractérisées par une augmentation de l'activité ou de l'expression de p53, ou encore par un profil de phosphorylation particulier (sérine 15), par l'accumulation de p21^{CIP1/WAF1}, du facteur p19^{ARF} ou encore de la protéine pRB dans sa forme active hypophosphorylée. D'autre part, une augmentation significative de l'expression de p16^{INK4A}, également impliquée dans l'activation de pRB, peut également être détectée dans les cellules sénescents.

VII.4.3.2. Transformation morphologique

L'étalement de la cellule, des volumes nucléo et cytoplasmiques accrus, la vacuolisation du cytoplasme ou encore une multinucléation ont été observés après activation par HRAS^{G12V}, un stress ou encore des dommages à l'ADN. Bien que l'origine de ces changements morphologiques soit peu connue, différentes hypothèses sont proposées. Parmi elles, l'augmentation globale de la synthèse protéique ou encore une ré-organisation du cytosquelette et notamment du réseau de vimentine au cours de la sénescence de fibroblastes, induirait une augmentation de l'étalement des cellules (Nishio et al., 2001).

VII.4.3.3. Augmentation de l'activité β -galactosidase associée à la sénescence

Le marqueur le plus utilisé actuellement pour l'identification des cellules sénescents est la détection de l'activité d'une enzyme endogène, la β -galactosidase associée à la sénescence (SA- β Gal pour *senescence associated β -galactosidase*) (Dimri et al., 1995). L'augmentation du nombre et du volume des lysosomes au cours de la sénescence (Kurz et al., 2000) induit une augmentation de la quantité de SA- β Gal endogène, permettant sa détection à pH6 par un test enzymatique utilisant le substrat X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) dont le produit forme un précipité bleu détectable par microscopie (Debacq-Chainiaux et al., 2009; Itahana et al., 2013).

L'utilisation de l'activité de cette enzyme, qui ne semble pas directement impliquée dans les mécanismes de sénescence, reste controversée dans la mesure où des marquages positifs ont été observés pour des fibroblastes non sénescents subissant des stress comme une confluence prolongée en culture ou un déficit d'apport nutritif dans le milieu de culture. De plus, difficilement quantifiable, cette méthode marquerait seulement les cellules présentant une morphologie très étalée (Wagner et al., 2008). Toutefois, cette méthode rapide et efficace reste très largement acceptée par la communauté scientifique lorsqu'elle est couplée à une autre technique.

VII.4.3.4. Foyers d'hétérochromatine associés à la sénescence

Certaines cellules sénescents peuvent également être identifiées par la détection des SAHFs. La chromatine, constituée d'ADN génomique et de protéines associées (histones), peut se retrouver sous une forme condensée appelée hétérochromatine, caractérisées par une activité transcriptionnelle très faible, voire inexistante. Au cours de la sénescence, ces SAHFs génèreraient des zones transcriptionnellement inactives au niveau de gènes cibles du facteur de transcription E2F, associés à la prolifération et à l'entrée dans le cycle cellulaire, empêchant ainsi leur transcription (Narita et al., 2003). Générant une granularité nucléaire observable par simple marquage de l'ADN au DAPI (4'6'-diaminidino-2-phenylindole) (Aird and Zhang, 2013; Narita et al., 2003), les SAHF peuvent également être détectés par leur enrichissement en protéines spécifiques de l'hétérochromatine, telle que la protéine HP1 (*heterochromatin protein 1*) et des modifications spécifiques des histones, telles que la méthylation sur la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9m) ou la présence du variant d'histone macroH2A.

VII.4.3.5. Foyers de dommages à l'ADN associés à la sénescence

Les SDFs, résultant de l'accumulation de facteurs de la DDR, peuvent être détectés dans des cellules engagées dans les voies de sénescence suite à l'apparition de télomères non fonctionnels (sénescence répliquative) ou suite à d'autres sources de dommages de l'ADN. L'accumulation de différents facteurs de la DDR est utilisée pour localiser / quantifier les SDFs, dont la forme phosphorylée de l'histone H2AX (γ -H2AX) ou encore la protéine 53BP1 (d'Adda di Fagagna et al., 2003; Herbig et al., 2004; Takai et al., 2003).

VII.4.3.6. Résistance à l'apoptose

De la même façon que le phénomène de sénescence, l'apoptose ou mort cellulaire programmée est considérée comme un mécanisme suppresseur de tumeur. Alors que la sénescence empêche la prolifération de cellules stressées ou endommagées en réponse à d'importants stress cellulaires, l'apoptose contrôle leur destruction et leur rapide élimination par phagocytose. Il a été observé que certaines cellules devenaient résistantes à différents signaux apoptotiques quand elles étaient sénescents (Chen et al., 2000; Marcotte et al., 2004; Wang, 1995), propriété proposée pour expliquer la stabilité des cellules sénescents en culture ainsi que leur nombre croissant au cours du vieillissement. L'échappement des cellules sénescents à la mort cellulaire par apoptose a été associée à une augmentation de l'expression de la protéine anti-apoptotique BCL-2 (*B-cell CLL/lymphoma 2*) (Wang, 1995). Il a plus tard été proposé que les fibroblastes sénescents échappent à l'apoptose par une régulation négative de la caspase-3 (Marcotte et al., 2004).

Le facteur de transcription p53 joue également un rôle prépondérant dans ces deux mécanismes. Alors qu'il active des gènes impliqués dans la régulation de la mort cellulaire dans les cellules apoptotiques, il cible préférentiellement les gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire dans les cellules sénescents. Une différence de modifications post-traductionnelles de p53 (nombre et localisation des phosphorylations) a été observée entre les cellules sénescents et apoptotiques, pouvant refléter une activité ou des gènes cibles différents, spécifiques de l'un ou l'autre des mécanismes (Jackson and Pereira-Smith, 2006). Cependant, les mécanismes de détermination pour l'une ou l'autre des voies sont à ce jour peu connus.

VII.4.3.7. Phénotype sécrétoire associé à la sénescence

Les cellules engagées en sénescence répliquative ou prématurée restent métaboliquement actives et subissent d'importants changements dans leur profil transcriptionnel, notamment au niveau de nombreux facteurs sécrétés associés à l'inflammation, la prolifération ou encore l'altération de la MEC. Ce phénotype sécrétoire particulier des cellules sénescents, nommé SASP (*senescence-associated secretory phenotype*) ou SMS (*senescence messaging secretome*), serait corrélé à des dommages à l'ADN persistants (Campisi, 2005; Coppé et al., 2010; Kuilman and Peiper, 2009; Rodier et al., 2009). Outre le renforcement de la sénescence au niveau de la cellule elle-même, le SASP présenterait différents effets sur les cellules environnantes (immunomodulation, modulation du microenvironnement, renforcement de la sénescence...).

Le SASP constitue un réseau très complexe mettant en jeu de nombreux facteurs, comprenant des facteurs solubles (interleukines, chimiokines, GFs), des protéases, des composants de l'ECM et autres protéines sécrétées (Campisi, 2005; Coppé et al., 2010; Kuilman and Peiper, 2009). Parmi les facteurs solubles, la sécrétion de l'IL-6, cytokine pro inflammatoire majoritaire du SASP a été associée à la sénescence induite par des dommages à l'ADN persistants dans différents types cellulaires. Elle affecterait les cellules avoisinantes exprimant le récepteur correspondant, telles que les cellules épithéliales et endothéliales. L'IL-1 et l'IL-8, également sur-exprimées par les cellules sénescents, agiraient respectivement sur les cellules environnantes par l'activation du facteur de transcription NF- κ B et de façon autocrine en renforçant le SASP. De plus, des facteurs liés à l'IGF (*insulin-growth factor*) comme l'IGFBP-7 (*IGF-binding protein 7*) seraient capables d'induire l'entrée en sénescence et l'apoptose des cellules environnantes. Finalement, d'autres facteurs solubles sont associés au SASP, tels que les GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) et G-CSF (*granulocyte-CSF*), la prostaglandine E2 (PGE2) et Cox-2, enzyme responsable de la production de PGE2 et d'autres prostaglandines. Les protéases sur-exprimées dans le SASP regroupent des métalloprotéinases (MMP-1, -3 et -10) ainsi que des protéases à sérine, dont les activateurs du plasminogène de type urokinase ou tissulaire (uPA ou tPA), le récepteur à l'uPA ainsi que leurs inhibiteurs, les PAI-1 et -2 (Coppé et al., 2010). Finalement, les cellules sénescents sur-expriment et sécrètent également des protéines insolubles comme la fibronectine, connue pour interagir avec de nombreuses molécules, récepteurs membranaires, composants du cytosquelette ou autres molécules de l'ECM,

pouvant ainsi altérer l'adhésion, la survie, la croissance et la migration des cellules environnantes (Coppé et al., 2010).



Cette 2^e partie introductive, qui décrit les modalités de définition d'un PTC pour une présentation clinique, illustre également les difficultés auxquelles sont confrontées les équipes de recherche. En effet, malgré une preuve de concept obtenue principalement chez le petit animal comme très prometteuse, elles sont souvent confrontées à une 1^{ère} difficulté, à savoir la définition d'un protocole robuste, reproductible et compatible avec une application clinique, de l'origine du prélèvement à l'administration chez le patient. Le respect des normes de GMPs peut d'une part entraîner de nombreux changements dans le procédé de production pouvant impacter le devenir de l'agent cellulaire. D'autre part, les doses utilisées chez le petit animal étant très inférieures aux doses administrées chez l'Homme, la transposition à large échelle, même pour des modalités autologues peut parfois être très complexe, d'autant plus que doivent être considérées les doses nécessaires aux contrôles qualité pour la libération des lots cliniques. Ces besoins engendrent notamment des temps d'amplification qui sont souvent différents de la preuve de concept et qui peuvent avoir un impact négatif sur le potentiel thérapeutique du candidat cellulaire, en termes d'efficacité et de sécurité. Les équipes de recherche sont également confrontées à des difficultés pour la caractérisation de l'agent cellulaire et la définition de contrôles qualité d'identité et de tests de potentialité robustes et pertinents qui en découlent. Enfin, la prise en compte des risques associés aux thérapies cellulaires par différentes études *in vitro* et *in vivo* peuvent être un frein au développement, sans discuter des coûts que l'intégralité cette démarche implique.

Chapitre 3. Dystrophies musculaires et candidats cellulaires

I. Dystrophies musculaires

I.1. Généralités

Les DMs regroupent plus de 30 maladies génétiques distinctes caractérisées par une perte musculaire progressive, dont le 1^{er} symptôme est une faiblesse musculaire de sévérité et distribution variables. Elles se distinguent par l'âge auquel elles se manifestent (enfance ou adulte), la sévérité, le mode de transmission (liée au chromosome X, autosomale récessive ou dominante) ou encore le groupe de muscles initialement affectés (Emery, 2002). Les DMs sont dues à des mutations sur les gènes codant différentes protéines localisées au niveau de l'ECM, de la membrane plasmique, du cytoplasme, du sarcomère ou encore du noyau des cellules musculaires striées. Malgré l'identification de ces mutations, la compréhension des mécanismes physiopathologiques qui en découlent est encore incomplète (Negroni et al., 2016).

Parmi ces DMs, les dystrophinopathies regroupent deux pathologies associées à des mutations sur le gène de la dystrophine (ou gène *DMD*), la DMD et la dystrophie musculaire de Becker (BMD pour *Becker Muscular Dystrophy*) (Becker and Kiener, 1955; Hoffman et al., 1987). Identifié en 1986 au niveau du locus Xp21.2 du chromosome X, le gène *DMD* comprend 79 exons, s'étend sur 2,4 millions de paires de bases (pb) et représente ainsi le plus long gène connu chez l'Homme (Shieh, 2013). Les anomalies du gène *DMD*, dont le taux très élevé peut être imputé en partie à sa grande taille, peuvent être des mutations, des délétions, des insertions ou des duplications (Lapidos et al., 2004). La DMD, forme la plus sévère des DMs, est due à une mutation qui engendre une rupture du cadre de lecture aboutissant à une protéine tronquée non fonctionnelle. A l'inverse, lorsque le cadre de lecture est maintenu, une protéine tronquée mais fonctionnelle peut être produite et le phénotype observé est alors moins sévère (BMD) (Aartsma-Rus et al., 2006). La DMD est également la plus fréquente des DMs, son incidence étant aujourd'hui reportée à un garçon nouveau-né sur 3500 à 5500 naissances (Moat et al., 2013; Wicklund, 2013). Avec une incidence inférieure à 20 sur 100000 individus et une sévérité moins élevée, la DM facio-scapulo-humérale (FSHD) et les dystrophies myotoniques (DM1 et DM2) représentent les formes les plus fréquentes de désordres neuromusculaires touchant les adultes. Alors que la 1^{ère} touche principalement les

muscles faciaux, des épaules et des membres, la DM1 est caractérisée par un déficit musculaire, une myotonie et des désordres systémiques (troubles cardiaques, du sommeil, de la vision ou encore atteinte endocrinienne). Finalement, les dystrophies musculaires des ceintures (LGMD pour *Limb Girdle Muscular Dystrophy*) regroupent un ensemble de DMs qui se manifestent par une faiblesse musculaire affectant les muscles du bassin et des cuisses (ceinture pelvienne) ainsi que des épaules (ceinture scapulaire) (Wicklund, 2013).

I.2. Complexe protéique associé à la dystrophine

Le complexe associé à la dystrophine (DGC pour *dystrophin glycoprotein complex*) est un complexe protéique qui permet de connecter le cytosquelette d'actine sous-sarcolemmal à l'ECM. Il est constitué de différentes glycoprotéines : les dystroglycanes (DGs, α et β), les sarcoglycanes (SG ; α , β , γ et δ), le sarcospan, les dystrobrevines (α) et les syntrophines ($\alpha 1$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$ et $\gamma 2$). Le lien intracellulaire du DGC est fourni par la dystrophine, protéine cytoplasmique d'environ 427 kDa localisée principalement dans les muscles squelettiques et dans le muscle cardiaque, bien qu'également retrouvée en plus faible quantité dans les cellules nerveuses (Koenig et al., 1988; Lapidos et al., 2004). Cette protéine est en effet constituée de plusieurs domaines structuraux lui permettant d'interagir d'une part avec l'actine du cytosquelette et d'autre part avec différentes protéines du DGC. Outre la DMD induite par une déficience au niveau de la dystrophine, la plupart de ces protéines sont également associées à des DMs (Figure 14) (Bhat et al., 2017).

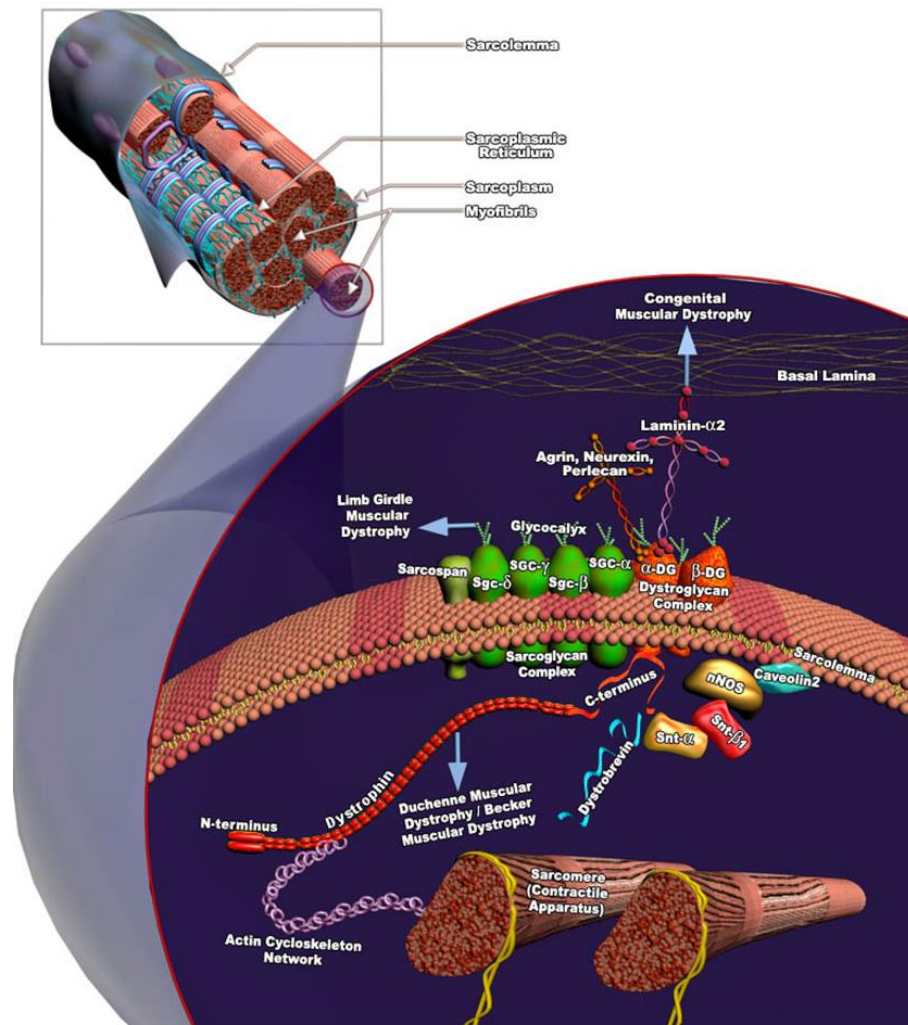


Figure 14. Dystrophine et organisation du DGC. La dystrophine constitue le cœur du DGC en interagissant avec le cytosquelette d'actine, différentes protéines transmembranaires (sarcospan, sarcoglycans, dystroglycans) et des protéines solubles (dystrobrevines et syntrophines). Une altération de l'intégrité de ces protéines peuvent induire différentes DMs, dont la DMD / BMD avec la dystrophine et la DM des ceintures (LGMD pour *limb girdle muscular dystrophy*) avec les sarcoglycans (Adapté de Qiagen).

La complexité du DGC lui permet d'assurer différentes fonctions : (i) la stabilisation et l'intégrité mécanique des membranes pour les protéger des cycles répétés de contraction/relaxation musculaire, (ii) le lien entre les structures intracellulaires comme le cytosquelette d'actine et les composants de l'ECM permettant la transmission de la force musculaire, et (iii) un rôle dans la signalisation intracellulaire (Bhat et al., 2017). Le DGC semble de plus impliqué dans la régulation de la fonction synaptique à la jonction neuromusculaire, en étant par exemple essentiel au regroupement des récepteurs à l'acétylcholine. Il semblerait également participer au maintien de l'homéostasie calcique, notamment par l'interaction de la dystrophine et la syntrophine- $\alpha 1$ avec la calmoduline,

protéine impliquée dans la régulation de la concentration de Ca^{2+} au sein des cellules (Bhat et al., 2017). Finalement, de par sa complexité et sa diversité d'interactions, il est facilement concevable que l'altération de l'une des protéines constituant ce complexe puisse avoir des répercussions considérables, au niveau du lien physique à la membrane, mais également au niveau de nombreuses voies de signalisation.

I.3. Conséquences de la déstabilisation du complexe associé à la dystrophine

Les conséquences moléculaires de l'absence d'une protéine du DGC, comme la dystrophine au sein des muscles de patients DMD, ne sont encore aujourd'hui pas totalement clairement identifiées, mais plusieurs hypothèses ont été formulées. De par son rôle central de protection contre les forces mécaniques au cours des contractions musculaires, l'absence de l'une de ces protéines entraîne une importante déstabilisation du complexe DGC (Figure 15). Alors que l'expression des protéines du cœur du DGC est fortement réduite, celle de certaines protéines associées (caveolin-3, canaux calciques...) est plus élevée (Allen et al., 2010). Cette perte d'intégrité du DGC aboutirait à la fragilisation du sarcolemme et une augmentation de sa perméabilité (Petrof et al., 1993), hypothèse confortée par l'augmentation conséquente des taux de créatine kinase (CK) sérique, enzyme musculaire soluble, observée dès la naissance chez les patients DMD.

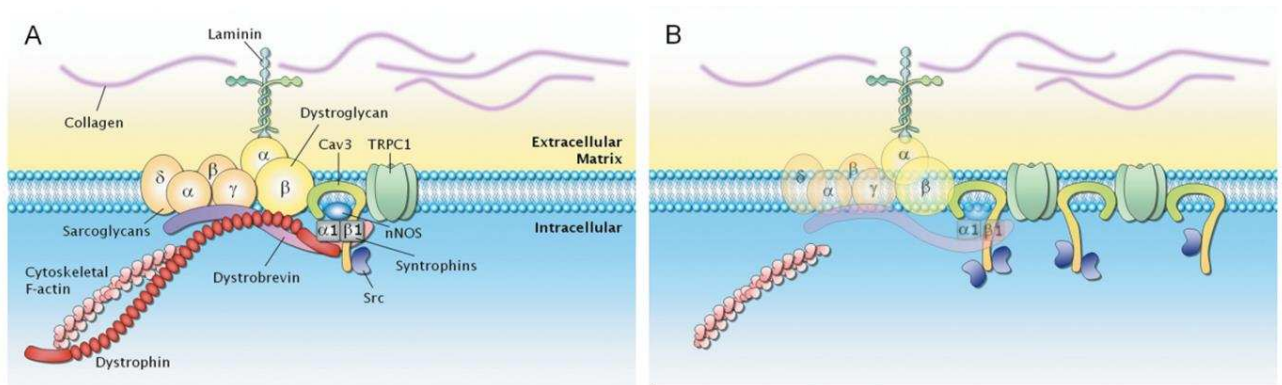


Figure 15. Ré-arrangements au niveau du DGC suite à l'absence de dystrophine. A : Muscle sain. B : Muscle dystrophique (Allen et al., 2010). Cav3, caveolin-3 ; TRPC1, transient receptor potential cation channel ; nNOS, neural nitric-oxide synthase.

Les deux conséquences directes de l'augmentation de la perméabilité sont une augmentation (i) du calcium intracellulaire et (ii) de la production de ROS. L'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire serait en partie médiée par l'activation de canaux calciques mécano-sensibles au sein de cavéoles surnuméraires et désordonnées en raison de l'augmentation de

l'expression de la cavéoline-3 (Figure 15) (Allen et al., 2010). L'augmentation du calcium cytosolique contribue d'une part à la faiblesse musculaire par l'activation de protéases calcium-dépendantes telles que les calpaïnes, qui vont participer à la destruction de constituants membranaires et ainsi augmenter l'entrée de calcium, aboutissant à la nécrose des fibres musculaires (Spencer and Mellgren, 2002). D'autre part, elle induit un changement de l'activité mitochondriale contribuant à l'augmentation de la production de ROS (Figure 16) (Burelle et al., 2010). L'augmentation des ROS serait quant à elle médiée par la NADPH oxydase et aurait de nombreuses conséquences dont l'activation du facteur de transcription NF- κ B impliqué dans différentes voies de signalisation contribuant à l'inflammation, la fibrose et l'atrophie musculaire (Kumar et al., 2004). La déstabilisation du DGC entraîne également des perturbations au niveau des protéines associées impliquées dans diverses voies de signalisation. C'est le cas de la *neuronal nitric-oxide synthase* (nNOS) qui est délocalisée de la membrane au cytoplasme, altérant gravement la réponse de vasoconstriction à l'activation du récepteur α -adrénergique à l'effort (Sander et al., 2000).

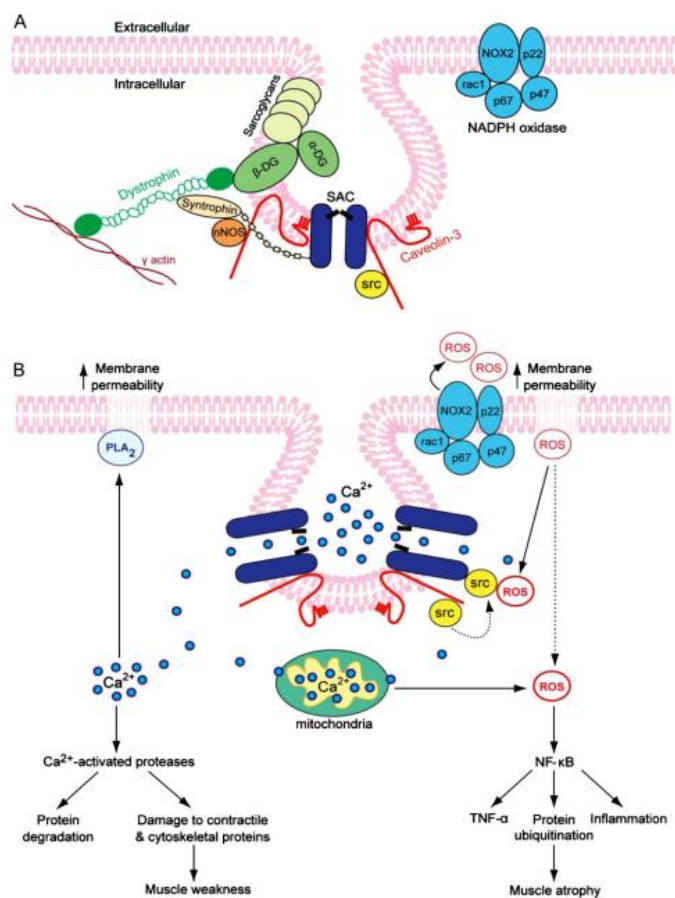


Figure 16. Conséquences primaires de l'absence de dystrophine. A : muscle sain. B : Voies activées dans le muscle dystrophique aboutissant à l'atrophie et la faiblesse musculaire. DG, dystroglycane ; nNOS, neuronal nitric-oxide synthase ; NOX2, unité catalytique de la NADPH oxydase et sous unités associées ; PLA2, phospholipase A2 ; ROS, reactive oxygen species ; SAC, stretch-activated channel (Allen and Whitehead, 2011).

Au niveau tissulaire, les biopsies de patients DMD sont caractérisées par la présence de foyers de fibres musculaires en dégénérescence ou nécrotiques, entourées par des foyers inflammatoires comprenant des macrophages et des LTs CD4⁺. Des fibres immatures, caractérisées par la présence de noyaux en position centrale sont également observées et reflètent l'activité de régénération des myoblastes (Deconinck and Dan, 2007). Ces derniers descendent des SCs, précurseurs musculaires localisés à l'état de quiescence en périphérie de la fibre musculaire et activés lors de lésions. Au cours de l'évolution de la maladie, l'activité de régénération diminue en raison de la sollicitation excessive aboutissant à l'épuisement des réserves de SCs. Les fibres musculaires sont alors progressivement remplacées par du tissu fibreux et adipeux, altérant l'activité contractile (Deconinck and Dan, 2007).

I.4. Manifestations cliniques

Nous ne traiterons dans la suite de cette partie que la DMD en raison de sa sévérité et de son incidence. Les signes de la maladie n'apparaissent généralement pas avant l'âge de 3 ans et se manifestent par une activité locomotrice retardée, une démarche anormale, une difficulté à se lever, une incapacité à sauter et des chutes fréquentes (Iwańczak et al., 2000). La faiblesse musculaire est dans un 1^{er} temps observée au niveau des membres inférieurs, associée à une hypertrophie de certains muscles comme les mollets et un raccourcissement des tendons d'Achille entraînant un déplacement sur la pointe des pieds (Beenakker et al., 2002). La faiblesse musculaire se propage progressivement ensuite à l'ensemble de la musculature. Au fil des années, la marche devient impossible et les enfants se retrouvent en fauteuil roulant autour de 11-12 ans.

L'atteinte cardiaque peut se manifester par une tachycardie persistante avant l'âge de 6 ans puis par une cardiomyopathie qui affecte un tiers des patients de 10 à 14 ans et l'intégralité des patients de plus de 18 ans. En raison de leur inactivité, la plupart des garçons ne présentent toutefois pas de symptôme de cette atteinte cardiaque (Nigro et al., 1990). L'atteinte respiratoire est quant à elle retrouvée chez tous les enfants, dont la capacité vitale forcée diminue de 4 à 8% par an après 12 ans (Khirani et al., 2014). Des troubles respiratoires du sommeil et notamment des événements d'apnée obstructive sont fréquemment observés dans les 1^{ères} années des enfants DMD, alors qu'une hypoventilation apparaît après 10 ans (Suresh et al., 2005). Les garçons DMD sont également fréquemment sujets à des complications orthopédiques, telles que les scoliose et les déformations de la colonne vertébrale. Ces dernières progressent rapidement après la perte de la marche et impactent

fortement la fonction respiratoire (Rodillo et al., 1988). Bien que les traitements aux corticostéroïdes diminuent le risque de scoliose, ils contribuent à augmenter le risque de fractures osseuses (King et al., 2007). Enfin, un retard global de développement, attesté par un quotient intellectuel moyen de 85 et notamment attribué à un trouble du langage, est parfois observé mais ne progresse toutefois pas avec la maladie. Ces enfants sont également sujets à de fortes perturbations émotionnelles (Leibowitz and Dubowitz, 1981).

L'établissement du diagnostic passe dans un 1^{er} temps par une observation de la démarche et le signe de Gowers, qui correspond à une obligation du patient à prendre appui avec ses mains sur ses cuisses pour se relever de la position assise (Figure 17). En complément, le dosage de taux élevés de la CK sérique (10 à 200 fois supérieurs à un enfant sain), enzyme relarguée par les fibres musculaires endommagées, est un bon indicateur de cette pathologie. Le diagnostic moléculaire, par MLPA (*multiplex ligation-dependant probe amplification*) ou puce chromosomique haute résolution, reste néanmoins la méthode de choix. Si ces tests sont négatifs, l'analyse du gène DMD par séquençage peut être réalisée mais cette approche très coûteuse n'est pas disponible dans tous les centres hospitalo-universitaires (CHU) (Laing et al., 2011). Finalement, une biopsie musculaire, qui permet de constater les lésions et les réorganisations histologiques, est réalisée en dernier recours lorsque le test génétique n'est pas concluant ou que le phénotype est atypique. Cette analyse histologique peut être complétée par un immunomarquage de la dystrophine.



Figure 17. Signe de Gower's illustré chez un jeune patient atteint de DMD. En raison de sa faiblesse musculaire, pour se lever de la position assise, l'enfant DMD va s'aider de ses bras pour pousser sur le sol puis sur ses jambes (Mah, 2016).

I.5. Stratégies thérapeutiques

Il n'existe à ce jour aucun traitement efficace pour la DMD. La prise en charge des patients par des traitements palliatifs et une meilleure surveillance notamment des fonctions

orthopédiques, respiratoires et cardiaques, a néanmoins permis d'améliorer considérablement l'espérance et la qualité de vie des dernières années (Passamano et al., 2012). Plusieurs approches thérapeutiques à différentes phases de développement clinique ont été proposées, comprenant des approches pharmacologiques (Guiraud and Davies, 2017), géniques (Chamberlain and Chamberlain, 2017; Nance et al., 2017) et cellulaires (Figure 18). Les 1^{ères} visent pour certaines à agir sur différentes voies de signalisation impliquées dans l'inflammation, la régulation de la masse musculaire ou la régénération musculaire et pour d'autres à sur-exprimer l'utrophine, homologue fœtal de la dystrophine. Les stratégies de thérapie génique visent quant à elles à réintroduire une version tronquée mais fonctionnelle de la dystrophine ou encore à faire exprimer une version tronquée de la protéine endogène en évitant la mutation par la technique de saut d'exon. Finalement, les approches de TC, qui seront détaillées dans cette dernière partie introductive, reposent sur l'administration de progéniteurs / CSs qui vont contribuer à la régénération et à la réparation tissulaire.

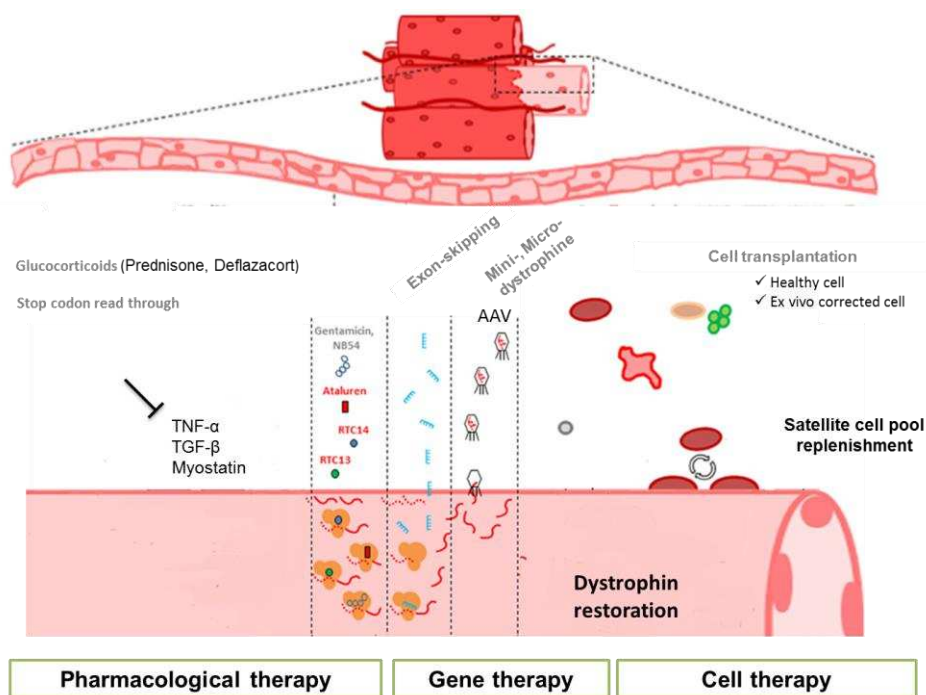


Figure 18. Principales stratégies thérapeutiques de la DMD (Adapté de Berardi et al., 2014). Les approches pharmacologiques (corticostéroïdes, anti-inflammatoires non stéroïdiens...) visent à agir sur différentes voies de signalisation impliquées dans l'inflammation, la régulation de la masse musculaire ou la régénération musculaire. L'administration de composés (Gentamicin, Ataluren, RTC14, RTC13) a également été proposée pour s'affranchir du codon stop prématuré. Les stratégies de thérapie génique visent à réintroduire une version tronquée mais fonctionnelle de la protéine par l'intermédiaire d'un vecteur viral (AAV pour *adeno associated virus*) ou en évitant la mutation par la technique de saut d'exon. Les approches de thérapie cellulaire reposent sur l'administration de progéniteurs / CSs qui vont contribuer à la régénération et à la réparation tissulaire.

II. Stratégies de thérapie cellulaire des dystrophies musculaires

II.1. Généralités

Deux stratégies de TC sont envisagées pour le traitement des DMs : alors que l'administration allogénique a recourt à des cellules issues d'un donneur sain qui vont exprimer la protéine manquante mais potentiellement induire une réaction immunitaire et ainsi nécessiter un traitement immunosuppresseur, les modalités autologues requièrent une modification génétique au préalable des cellules du patient afin qu'elles ré-expriment la protéine déficiente. Malgré l'absence d'immunogénicité des cellules transplantées, une réaction immunitaire contre la protéine transgénique n'est pas exclue (Negroni et al., 2016).

Deux principales voies d'administration sont explorées. La voie intramusculaire (IM) est employée lorsque l'atteinte musculaire est ciblée, mais pour une distribution plus large à tout l'organisme ou à un certain nombre de muscles, les administrations par voie sanguine locorégionales et systémiques sont favorisées comme pour le traitement de la DMD. Cette dernière approche implique que les cellules soient capables de survivre dans la circulation sanguine, migrer vers les muscles et traverser la barrière vasculaire (Negroni et al., 2016).

Les démonstrations d'efficacité doivent être réalisées dans des modèles animaux pertinents. Des modèles mammifères (petits et gros animaux) présentant des mutations naturelles sur le gène de la dystrophine ont été identifiés et largement utilisés pour les démonstrations précliniques de la DMD. Ces modèles présentent néanmoins une hétérogénéité en termes de phénotype ainsi que des avantages et inconvénients qui leur sont propres. Les modèles gros animaux, tels que le chien Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) (Kornegay, 2017; Sharp et al., 1992) et le porc (Hollinger et al., 2014; Klymiuk et al., 2013; Selsby et al., 2015), présentent des caractéristiques physiopathologiques plus proches de l'Homme que le modèle murin X-Chromosome Linked Muscular Dystrophy (*mdx*) (Bulfield et al., 1984; Partridge, 2013) et ses variants générés par exposition au N-éthylnitrosurée. Cependant, ils souffrent d'une grande variabilité phénotypique et requièrent la mise en place d'infrastructures très coûteuses et un entretien très chronophage. L'atteinte clinique du modèle *mdx* étant mineure en raison de phénomènes compensatoires notamment par la sur-expression d'utrophine (Rybakova et al., 2000), des modèles doubles mutants affectant les gènes de l'utrophine, de l' α -dystrobrevine, de l' α 7-intégrine ou encore du facteur de régulation myogénique MyoD ont été proposés afin de mieux modéliser le décours de la

pathologie (Vainzof et al., 2008). De par des coûts de maintenance et des manipulations facilitées, les modèles murins présentent néanmoins l'avantage d'obtenir des résultats sur des cohortes plus importantes. Plus récemment, des modèles de rats dystrophinopathes ont été générés grâce aux technologies CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) / Cas (*CRISPR associated protein*) (Nakamura et al., 2014) ou TALEN (*transcription activator-like effector nuclease*) (Larcher et al., 2014). Ce dernier modèle présente une physiopathologie proche de celle de l'Homme et en particulier une atteinte cardiaque qui n'est pas observée dans les modèles murin et canin (Larcher et al., 2014). Parmi les modèles proposés pour les autres DMs, peuvent être cités les modèles murins de sarcoglygonopathies ou LGMD de types 2D, 2E, 2C et 2F sarcoglycan-null (SG^{null}) générés par intégration de mutations par recombinaison homologue respectivement au niveau des quatre gènes codant les SGs ou encore le modèle murin spontané SJL/J de LGMD2B résultant d'une mutation au niveau du gène de la Dysferline (Vainzof et al., 2008).

II.2. Caractéristiques générales du candidat cellulaire idéal

Différents critères définissant le candidat idéal pour le traitement des DMs ont été identifiés. L'agent cellulaire doit présenter un potentiel myogénique stable lui conférant la capacité de fusionner avec les fibres musculaires du patient et ainsi exprimer la protéine déficiente (Figure 19). Il ne doit pas présenter de risque de différenciation vers un type cellulaire inapproprié. La colonisation de la niche satellitaire et la reconstitution du stock de cellules satellites augmente son potentiel thérapeutique dans le sens où les cellules seront capables de participer à plusieurs cycles de régénération et donc avoir un effet durable. Comme nous l'avons évoqué précédemment, en raison de l'atteinte de l'ensemble de la musculature chez les patients DMD, le candidat cellulaire devra être administrable par voie systémique et donc avoir la capacité de survivre dans la circulation sanguine et traverser la barrière endothéliale vasculaire. L'utilisation de ce candidat en clinique implique d'autre part qu'il soit facilement accessible, isolé et amplifié dans des conditions respectant les GMPs et compatibles avec la clinique, sans altération de son potentiel thérapeutique en termes d'efficacité et de sécurité. Enfin, un contexte immuno-privilégié apporte des avantages supplémentaires en termes de survie post-transplantation et de réduction des traitements immunosuppresseurs connus comme possédant de nombreux effets indésirables (Meng et al., 2011; Negroni et al., 2016). Différentes populations cellulaires sont aujourd'hui positionnées comme candidats thérapeutiques, répondant plus ou moins à l'ensemble de ces critères.

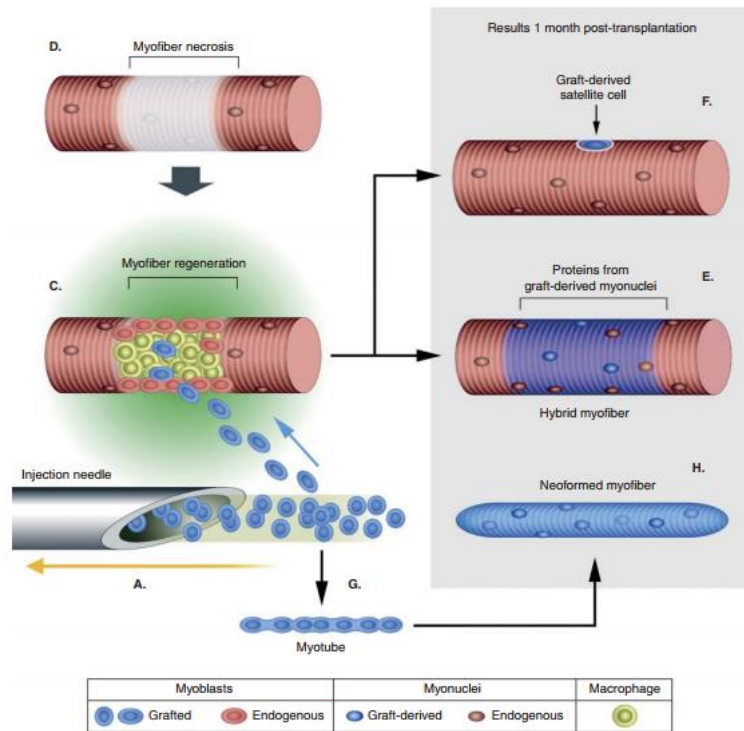


Figure 19. Propriétés myogéniques nécessaires pour une utilisation en thérapie cellulaire dans le cadre du traitement des dystrophies musculaires. Les cellules transplantées (A) doivent être capables de migrer vers les fibres en régénération (C) qui résultent de dommages et de nécrose (D). La régénération peut intervenir via la formation de nouvelles fibres musculaires (H) ou hybrides exprimant les protéines humaines (E et F), ainsi que par le renouvellement du stock de cellules satellites (Skuk and Tremblay, 2015).

II.3. Cellules satellites et myoblastes

II.3.1. Définition

Le précurseur musculaire physiologique est la SC identifiée en 1961 comme une cellule mononucléée localisée à la périphérie des fibres musculaires entre la lame basale et le sarcolemme (Mauro, 1961). Son importante capacité d'auto-renouvellement lui permet d'intervenir lors de la croissance ou lors de lésions musculaires (Wang et al., 2014b), et ce malgré sa faible abondance (2,5 à 6% des noyaux) (Tedesco et al., 2010). Exprimant le facteur de détermination myogénique *paired-box 7* (Pax7) dans un état quiescent en absence de signal, elle s'active en réponse à des dommages musculaires et co-exprime alors Pax7 et les facteurs de régulation myogénique (MRF pour *myogenic regulatory factor*) Myogenic regulatory factor 5 (Myf5) et Myogenic differentiation 1 (MyoD) (Figure 20). Les SCs activées, appelées alors myoblastes, prolifèrent et se différencient en myocytes qui fusionnent

entre eux ou avec les cellules existantes pour former de nouvelles fibres multinucléées. Une partie des SCs retourne à l'état de quiescence pour garantir le maintien du stock de SCs.

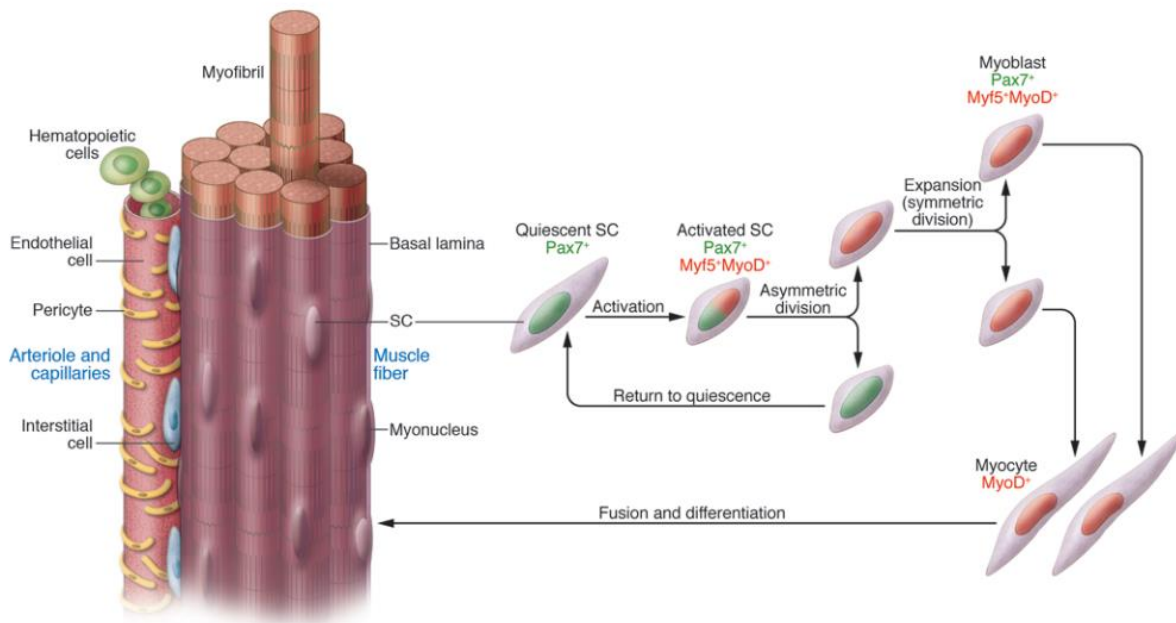


Figure 20. Division asymétrique lors de l'activation des cellules satellites (Tedesco et al., 2010). Les cellules quiescentes expriment Pax7 alors qu'elles expriment Myf5 et MyoD après activation. Une partie des cellules filles réintègre la niche satellitaire dans un état de quiescence tandis que l'autre partie se différencie en myocytes exprimant seulement MyoD puis fusionnent pour former de nouvelles fibres musculaires ou régénérer les fibres déjà existantes.

Les SCs sont aujourd'hui identifiées par l'expression de différents marqueurs dont le principal est Pax7 reflétant son état indifférencié et le maintien de son potentiel d'auto-renouveaulement (Seale et al., 2000). D'autres facteurs de transcription tels Pax3 et Myf5 ainsi que des protéines membranaires comme les molécules d'adhésion VCAM-1, NCAM-1, la M-cadhérine, le récepteur à la chimiokine CXCR4, c-Met ou encore des marqueurs plus récemment décrits comme le CD29, le CD82 ou encore le CD318, sont exprimés par les cellules quiescentes (Almeida et al., 2016; Uezumi et al., 2016; Xu et al., 2015) (Figure 21).

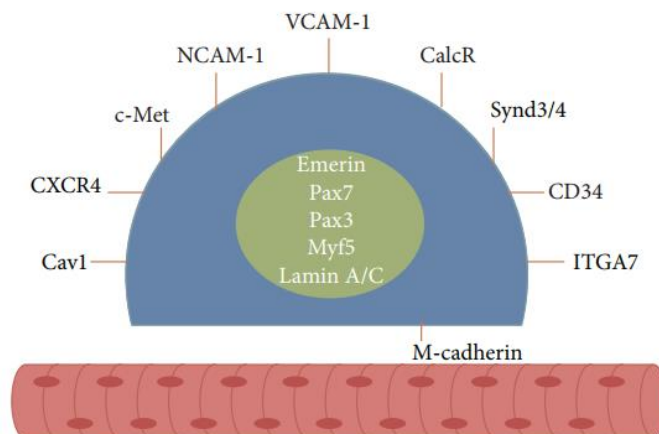


Figure 21. Principaux marqueurs actuellement utilisés pour l'identification des cellules satellites. Ces marqueurs comprennent des facteurs de transcription (Pax7, Pax3, Myf5...) et des protéines membranaires (Almeida et al., 2016).

II.3.2. Potentiel thérapeutique

Le myoblaste, descendant des SCs, a été le 1^{er} candidat proposé pour le traitement de la DMD. Suite à l'observation de la capacité de restauration de la dystrophine après injection intramusculaire de myoblastes issus de souris saines nouveau-nés dans le modèle murin *mdx* (Partridge et al., 1989), de nombreuses études ont rapporté la preuve de concept de l'injection de myoblastes murins adultes (Kinoshita et al., 1994) et humains dans ce même modèle (Huard et al., 1993, 1994). Les 1^{ers} ECs d'administration intramusculaire initiés dans les années 1990 n'ont cependant pas donné les résultats escomptés, ne démontrant pas de réel bénéfice clinique ni de restauration significative de l'expression de la dystrophine (Gussoni et al., 1992; Mendell et al., 1995). Une mortalité rapide et massive des myoblastes (Fan et al., 1996), une dissémination limitée à partir du site d'injection (Riederer et al., 2012), une incapacité à migrer du sang vers les tissus (Skuk and Tremblay, 2003) ainsi qu'une réponse immunitaire aiguë de l'hôte (Guérette et al., 1994) ont été suggérées pour expliquer l'échec de ces 1^{ers} essais.

Par ailleurs, il est aujourd'hui connu que les myoblastes murins sont moins efficaces que les SCs post-transplantation. En effet, des SCs fraîchement isolées et non amplifiées participent de façon efficace à la régénération musculaire, induisent l'expression de dystrophine et intègrent la niche satellitaire à une même efficacité thérapeutique que des doses 10 fois supérieures de cellules ayant passé du temps en culture (Montarras et al., 2005). En raison de la très faible proportion de SCs et de la faible disponibilité des prélèvements

musculaires, cette approche est néanmoins aujourd'hui encore peu envisageable en clinique. Actuellement, de nombreuses études visent plutôt à améliorer le potentiel thérapeutique des myoblastes (Figure 22).

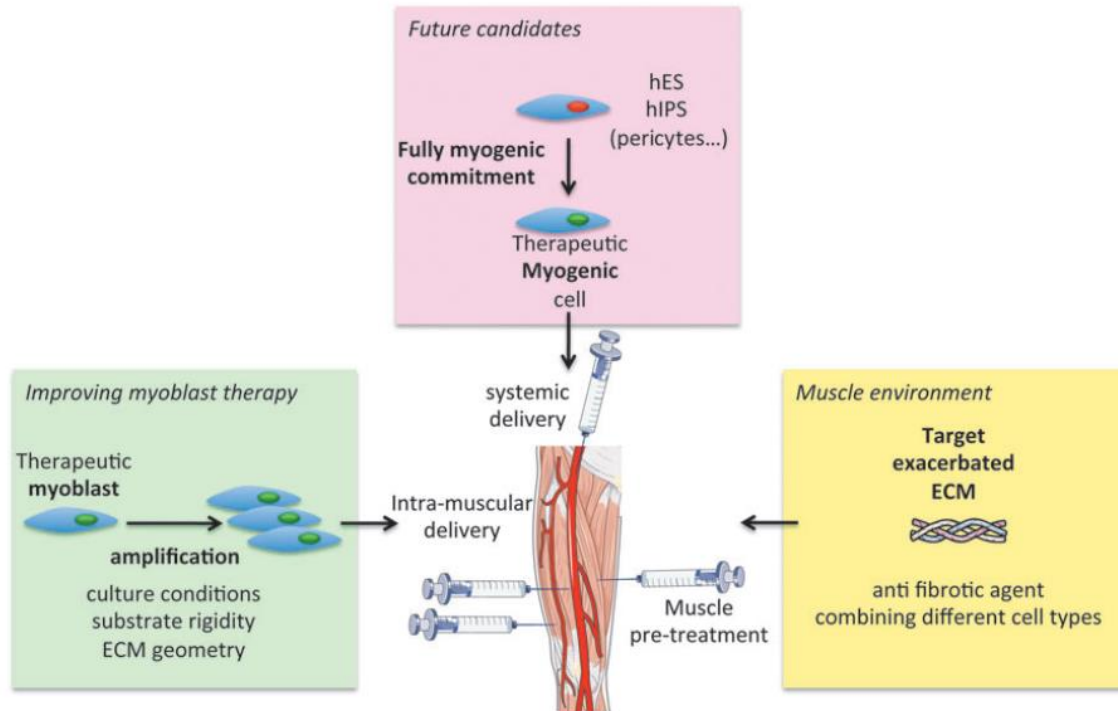


Figure 22. Perspectives de thérapie cellulaire pour les dystrophies musculaires. L'amélioration des conditions de culture des myoblastes (vert), le prétraitement musculaire pour améliorer la qualité musculaire avant administration (jaune) et le développement de nouveaux candidats à potentiel myogénique (rouge) font partie des futures perspectives (Negroni et al., 2016).

Afin d'améliorer leur dispersion, un protocole basé sur des multiples injections séparées d'1 mm a été proposé et démontre des taux d'expression de dystrophine d'environ 30% après 18 mois (Skuk et al., 2004, 2006, 2007). Ce protocole d'administration à haute densité est néanmoins peu envisageable pour une pathologie généralisée comme la DMD, ou ne sera préconisé que pour le traitement de muscles ciblés. Par ailleurs, une meilleure compréhension du micro-environnement de la niche satellitaire et des voies impliquées dans son activation et son auto-renouvellement permettra d'améliorer de façon pertinente les conditions de culture. Il a notamment été démontré qu'un prétraitement hypoxique avait un effet bénéfique sur l'auto-renouvellement des SCs et l'efficacité de transplantation (Liu et al., 2012), au même titre qu'un prétraitement thermique (Riederer et al., 2008). Comme nous l'avons discuté dans le 0, paragraphe I.2.6.1, les propriétés physiques de l'environnement de culture, telles que la rigidité ou l'élasticité participent également à réguler le devenir des SCs

(Engler et al., 2006; Gilbert et al., 2010). L'utilisation d'hydrogels a par exemple permis de maintenir les SCs dans un état indifférencié, d'augmenter la survie et d'améliorer l'auto-renouveaulement *in vitro*, en plus d'améliorer l'intégration des cellules après injection *in vivo* (Gilbert et al., 2010). Par ailleurs, l'utilisation d'un inhibiteur de la *p38 mitogen-activated protein kinase* (MAPK), dont l'activation a été corrélée à la différenciation des SCs, permet également d'améliorer significativement l'intégration de la niche satellitaire (Charville et al., 2015). Finalement, bien que cela engendre des procédures cliniques plus lourdes, la co-injection des myoblastes avec d'autres populations cellulaires pourrait améliorer leur potentiel thérapeutique. C'est le cas par exemple des macrophages qui améliorent la survie, l'expansion et la migration *in vivo* (Bencze et al., 2012; Lesault et al., 2012) ou encore des HSCs qui permettent d'induire une tolérance immunitaire (Parker et al., 2008).

II.4. Cellules souches à potentiel myogénique

II.4.1. Cellules souches pluripotentes

En raison de leur capacité de prolifération illimitée et leur potentiel de différenciation vers l'ensemble des types cellulaires des trois feuilletts germinaux, les cellules pluripotentes (ESCs et iPSCs) peuvent potentiellement être positionnées comme candidats thérapeutiques pour les DMs. Bien qu'il ait longtemps été difficile de dériver les cellules pluripotentes en cellules myogéniques, quelques stratégies semblent aujourd'hui prometteuses et peuvent être regroupées en deux catégories (Roca et al., 2015). Les 1^{ères} reposent sur l'induction de la différenciation en plusieurs étapes grâce à l'utilisation de petites molécules et cytokines permettant d'inhiber ou d'activer les voies impliquées dans la myogenèse. Les autres impliquent une reprogrammation directe par des facteurs de transcription spécifiques du muscle tels que *PAX3*, *PAX7* ou *MYOD1* (Miyagoe-Suzuki and Takeda, 2017).

Ainsi, après une 1^{ère} étape de différenciation d'hESCs en cellules mésenchymateuses sélectionnées sur la base de leur expression pour le CD73 après 4 semaines de culture, une 2^{ème} étape de sélection par FACS sur la base de l'expression du CD56 a permis d'isoler des précurseurs myogéniques Pax7⁺/MyoD⁻ (Barberi et al., 2007). Capables de fusionner spontanément pour former des myotubes, ces cellules participent également à la régénération dans un muscle lésé à la cardiotoxine et ont été retrouvées au sein du muscle transplanté 6 mois post-transplantation. Néanmoins, malgré l'affranchissement des cellules nourricières, des composés d'origine animale sont encore présents dans le protocole de préparation

(Barberi et al., 2007). Une stratégie similaire de génération de cellules CD56⁺ en deux étapes à partir de corps embryoides (EB pour *embryoid body*) a également été proposée (Awaya et al., 2012). Des résultats prometteurs indiquent une intégration de ces cellules sur le long terme et une réactivation lors de dommages musculaires grâce au renouvellement du pool de SCs. Ces stratégies restent néanmoins très lourdes pour des rendements peu importants. Plusieurs méthodes d'induction de progéniteurs musculaires reposent également sur l'activation de la voie de signalisation Wnt avec l'utilisation d'un inhibiteur de la GSK-3 β dans la 1^{ère} phase de culture, seul ou en association avec un inhibiteur de la protéine morphogénétique osseuse (BMP pour *bone morphogenetic protein*) 4 et du bFGF (Borchin et al., 2013; Chal et al., 2016; Shelton et al., 2014, 2016; Swartz et al., 2016).

Après une 1^{ère} preuve de concept chez la souris, Darabi *et al.* ont démontré que l'expression forcée de *PAX7* apporté par un vecteur lentiviral dans des cellules pluripotentes humaines, permettait de générer des précurseurs myogéniques capables, après administration intramusculaire, de s'intégrer au sein de muscles murins dystrophiques avec une capacité supérieure aux myoblastes, de restaurer une expression de dystrophine conséquente, d'améliorer la force musculaire et de coloniser la niche satellitaire (Darabi et al., 2011, 2012). De façon similaire, différentes stratégies de reprogrammation ont également été proposées avec le facteur *MYOD1*, révélant une efficacité de différenciation élevée (90%) et rapide (une dizaine de jours). L'intérêt thérapeutique de ce modèle est toutefois limité, d'une part par l'arrêt du cycle cellulaire suite à une expression prolongée de MyoD, et d'autre part par l'incapacité à générer des précurseurs myogéniques Pax3⁺ / Pax7⁺ (Miyagoe-Suzuki and Takeda, 2017; Rao et al., 2012).

Enfin, Tedesco *et al.* ont également proposé un protocole de différenciation des iPSCs en mésoangioblastes (MABs), progéniteurs dérivés de péricytes à potentiel myogénique, à partir de patients atteints de LGMD. Après transduction des cellules avec un lentivirus contenant le gène de l' α -SG, une amélioration du phénotype dystrophique des souris α -SG^{null} a pu être démontré (Tedesco et al., 2012).

Finalement, alors que les 1^{ères} méthodes sont majoritairement chronophages et peu efficaces, les autres méthodes sont plus rapides et bénéficient d'un meilleur rendement. Néanmoins, dans l'attente des nouvelles stratégies de reprogrammation plus sécuritaires (Chapitre 2 – paragraphe I.2.2), ces démarches sont toutefois encore peu favorisées pour des applications cliniques en raison des risques potentiels associés à la double reprogrammation

génétique (Roca et al., 2015). De plus, une hétérogénéité de différenciation vers la voie myogénique a été observée parmi des clones dérivés du même donneur et avec la même méthode, ajoutant la nécessité de l'identification et de la sélection des meilleurs candidats pour la différenciation (Miyagoe-Suzuki and Takeda, 2017). Malgré ces résultats prometteurs, les considérations éthiques liées à l'utilisation d'embryons pour les ESCs, les risques tumorigéniques associés aux caractéristiques intrinsèques des cellules pluripotentes (Chapitre 2 - paragraphe 0) en sus de ceux associés aux procédés de génération des iPSCs contribuent à limiter leur utilisation en clinique. Finalement, la plupart de ces démonstrations utilisent encore des produits d'origine animale (FBS, Matrigel®, cellules nourricières...) bien que des efforts soient fournis pour limiter leur utilisation et utiliser des milieux définis tel que le milieu E8 évoqué précédemment (Chal et al., 2016; Shelton et al., 2016).

II.4.2. Cellules souches adultes

Différentes populations de CSAs ont ces dernières années été proposées comme potentiels candidats thérapeutiques pour le traitement des DMs, suite à l'identification d'un potentiel myogénique *in vitro* parfois associé à un contexte *in vivo* sur des modèles animaux rongeurs ou canins. À différents stades de développement clinique, ces populations se distinguent par leur origine, leur procédé de production ou encore par leur caractéristiques phénotypiques et comportementales *in vitro* et *in vivo* (Negroni et al., 2016; Tedesco et al., 2010, 2017).

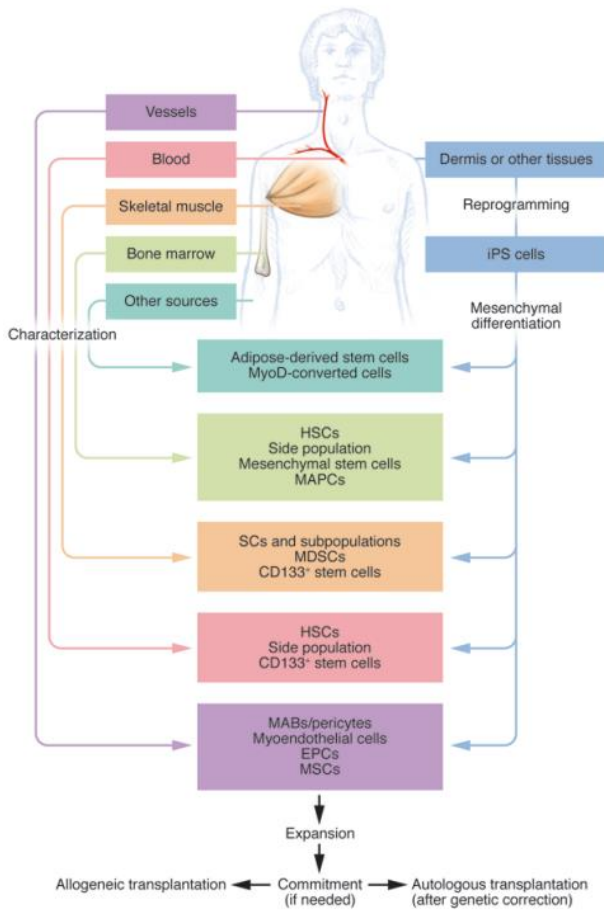


Figure 23. Origine des types de cellules souches adultes au potentiel myogénique (Tedesco et al., 2010). Des cellules souches possédant un potentiel myogénique sont retrouvées au sein de différents tissus adultes, dont les muscles, la moelle osseuse, le sang périphérique ou encore les vaisseaux sanguins. Comme nous l'avons évoqué précédemment, les iPSCs sont également dérivées de cellules somatiques adultes (fibroblastes, myoblastes). Après isolement, ces cellules peuvent être amplifiées *in vitro* puis transplantées.

II.4.2.1. Progéniteurs non-résidents du muscle

a. Cellules souches hématopoïétiques

Actuellement largement utilisées pour le traitement de leucémies ou défauts médullaires, les HSCs peuvent être isolées à partir de la moelle osseuse mais également de sang de cordon ombilical ou de sang périphérique. La voie actuellement favorisée en clinique pour leur collecte est l'aphérèse après administration de G-CSF permettant leur mobilisation dans le sang périphérique (Panch et al., 2017). Ces cellules, à l'origine de toutes les lignées de cellules sanguines, sont principalement isolées sur la base de l'expression des CD34 et CD45 (Domen et al., 2006). En termes de régénération musculaire, les HSCs semblent capables de migrer au niveau des sites de dommages musculaires, de se différencier en cellules musculaires et de participer à la régénération des fibres endommagées (Ferrari et al., 1998). Néanmoins, la faible intensité de restauration de la dystrophine observée dans le modèle murin *mdx* irradié ne démontre pas une participation conséquente de ces cellules à la régénération musculaire (Camargo et al., 2003; Gussoni et al., 1999; LaBarge and Blau, 2002). De plus, leur intérêt pour une application clinique est aujourd'hui limité par l'absence d'impact fonctionnel et de participation à la régénération dans le modèle canin pertinent de la DMD (Dell'Agnola et al., 2004; Kuhr et al., 2007). Néanmoins, il a été suggéré que ces

cellules puissent être utilisées pour induire la tolérance et améliorer l'intégration d'autres progéniteurs musculaires, permettant de s'affranchir des effets indésirables des traitements immunosuppresseurs (Parker et al., 2008).

b. Cellules souches mésenchymateuses

Comme évoqué dans le Chapitre I, le terme MSCs regroupe différentes populations de CSs stromales multipotentes non-hématopoïétiques capables de se différencier vers différentes voies mésodermiques (adipogénique, ostéogénique, chondrogénique). Isolées à partir de différents tissus adultes, elles font aujourd'hui l'objet de nombreux ECs pour diverses pathologies, notamment pour leurs propriétés immunomodulatrices. Les démonstrations ciblant les pathologies du muscle squelettique sont plus limitées et varient selon l'origine des MSCs.

Les BM-MSCs ne bénéficient pas d'un potentiel de différenciation myogénique *in vitro* spontané. *In vivo*, des fibres dystrophine⁺ ont été détectées dans des muscles *mdx* après transplantation de BM-MSCs murines transduites avec le gène humain de la microdystrophine (Xiong et al., 2010) ou de cellules humaines avec une expression forcée de Pax3 (Gang et al., 2009). Néanmoins, aucune amélioration de la contractilité n'a été observée. L'expression forcée du domaine intracellulaire de Notch1 (NICD pour *Notch1 intracellular domain*) et leur culture dans un milieu d'induction spécifique permet une importante différenciation *in vitro* (Dezawa et al., 2005) des cellules médullaires qui sont alors capables de participer à la régénération musculaire et d'intégrer la niche satellitaire après injection locale ou systémique dans un modèle de rat immunosupprimé lésé à la cardiotoxine. Un tropisme pour les muscles lésés a également été attribué à ces cellules qui ne sont pas retrouvées dans des organes non ciblés (cerveau, cœur, foie, reins et muscles non endommagés) 4 semaines post-injection. Elles restaurent l'expression de la dystrophine après injection IM dans un modèle murin *nude-mdx*. Enfin, l'injection IM de LacZ-BM-MSCs dans un modèle murin immunodéficient lésé à la cardiotoxine a révélé une implantation modeste avec la détection de 5% de fibres β -Gal⁺ (de la Garza-Rodea et al., 2011). Pour ces raisons, les BM-MSCs ne représentent aujourd'hui pas la source la plus prometteuse pour le traitement des DMs.

Une capacité à se différencier vers la voie myogénique *in vitro* dans un milieu d'induction spécifique a été démontrée pour des cellules dérivées du sang de cordon (UCB-MSc) et de tissus ombilicaux (UCT-MSc) (Gang et al., 2004; Secco et al., 2008). Par

ailleurs, si une infiltration des UCT-MSCs humaines et canines au sein des muscles dystrophiques a été observée après transplantation par voie systémique chez le chien GRMD, elle ne s'est en revanche pas accompagnée de l'expression des protéines musculaires comme la dystrophine (Zucconi et al., 2010, 2011).

Le meilleur potentiel myogénique est aujourd'hui attribué aux ASCs (Forcales, 2015). D'une part, elles sont capables de restaurer la dystrophine au sein de myoblastes DMD en différenciation ou différenciés *in vitro* (Vieira et al., 2008). D'autre part, lorsqu'elles sont administrées par un abord systémique, elles bénéficient d'une meilleure intégration au sein des muscles dystrophiques à partir de la circulation grâce à un tropisme musculaire (Liu et al., 2007; Vieira et al., 2008, 2012). Quand ces cellules sont issues de jeunes donneurs, une restauration de la dystrophine dans plus de 50% des fibres *mdx* est observée et persiste jusqu'à 6 mois post-injection IM, sans infiltration immunitaire (Rodriguez et al., 2005). Isolées à partir de tissus adultes, leur transplantation systémique chez la souris *mdx* lésée à la cardiotoxine engendre une participation à la régénération, la réexpression de dystrophine et l'intégration de la niche satellitaire (Liu et al., 2007). Une forte expression de dystrophine est également observée dans le modèle de la LGMD2B après administration systémique (Vieira et al., 2008). Par ailleurs, dans le modèle canin GRMD, 11 à 19% des fibres musculaires expriment la dystrophine humaine jusqu'à 6 mois après de multiples injections par voie systémique. La dystrophine n'est néanmoins pas retrouvée après 12 mois et aucune amélioration n'est constatée au niveau histologique (Vieira et al., 2012). De façon intéressante, ces dernières démonstrations n'ont pas été réalisées en présence d'immunosuppresseurs, confortant leur profil immunoprivilégié. En plus d'un potentiel d'amplification plus important, ces cellules adipeuses bénéficient d'une meilleure accessibilité.

II.4.2.2. Progéniteurs dérivés du muscle

Le tissu musculaire apparaît comme un tissu de choix pour l'isolement de populations à potentiel myogénique. Ces dernières années, en plus des SCs, une importante diversité de populations résidentes a en effet été identifiée (Figure 24) par l'utilisation de différentes méthodes : par tri cellulaire sur un ou plusieurs marqueurs, par exclusion du colorant Hoechst ou encore par tri sur des propriétés d'adhérence.

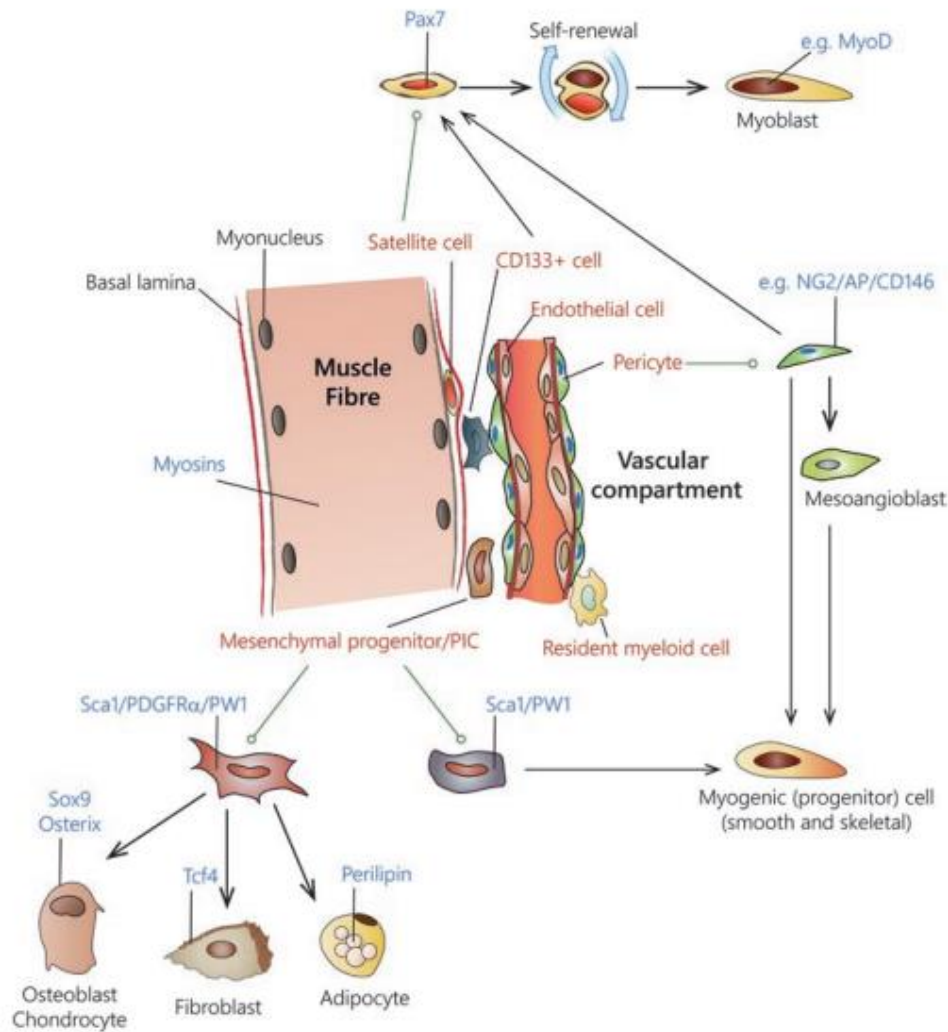


Figure 24. Principales populations cellulaires retrouvées au sein des muscles squelettiques adultes, marqueurs et voies de différenciation (Tedesco et al., 2017). Alors que les cellules satellites sont retrouvées dans une position sous-sarcolemmale, les cellules myo-endothéliales et péricytes sont associés au compartiment vasculaire. Les progéniteurs mésenchymateux, cellules PIC et cellules CD133⁺ sont quant à eux localisés au niveau de l'interstitium.

a. Cellules de la Side Population

Initialement identifiées au sein de la moelle osseuse par leur capacité à exclure le colorant Hoechst 33342 et représentant une fraction enrichie en HSCs (Goodell et al., 1996), une population cellulaire également identifiée comme Side Population (mSP) a été localisée au sein de l'interstitium de muscles squelettiques adultes et isolée de la même façon par FACS sur la base d'exclusion de ce colorant (Gussoni et al., 1999). En plus de reconstituer le système hématopoïétique de souris irradiées, ces cellules sont capables de se différencier en cellules musculaires (Asakura et al., 2002; Gussoni et al., 1999). Cette population mSP a été décrite comme hétérogène, en particulier sur la base de l'expression des marqueurs CD31 et CD45. Alors que seule la fraction CD45⁺ présente un potentiel hématopoïétique, le potentiel

myogénique est attribué aux deux populations CD45⁺ et CD45⁻ (Asakura et al., 2002; Ojima et al., 2004). La sous population CD31⁻/CD45⁻, qui représente 6% de la population mSP, a été identifiée comme bénéficiant du meilleur potentiel myogénique *in vitro* en co-culture avec des myoblastes et *in vivo* après injection dans un modèle murin immunodéficient lésé à la cardiotoxine (Uezumi et al., 2006). Les conditions de culture *in vitro* utilisées dans cette étude favorisent néanmoins leurs différenciations adipogénique et ostéogénique (Uezumi et al., 2006). Il a été suggéré que leur modeste participation à la régénération musculaire observée dans différents modèles murins par abords IM ou systémique (Asakura et al., 2002; Bachrach et al., 2004, 2006; Gussoni et al., 1999) pouvait être améliorée par la sur-expression du récepteur à la chimiokine CXCR4, leur conférant une meilleure capacité d'extravasation et de migration vers les tissus cibles (Perez et al., 2009). Par ailleurs, la co-injection de la population CD31⁻/CD45⁻ avec des myoblastes permettrait d'améliorer la prolifération et la migration de ces derniers, notamment par le biais d'une forte expression de la MMP-2 (Motohashi et al., 2008).

Peu d'études ont néanmoins rapporté leur isolement à partir de tissus humains, en raison des différences notamment au niveau de l'expression du transporteur ABCG2 qui est responsable de l'exclusion du colorant chez la souris mais non détecté chez l'Homme. Lapan *et al.* proposent, dans des conditions de milieu sans sérum, une sélection sur la base conjointe de l'exclusion du Hoechst et de l'expression de la *melanoma cell adhesion molecule* (MCAM). Malgré une importante capacité de fusion *in vitro*, leur intégration *in vivo* après administration IM dans un modèle *mdx* immunodéficient reste néanmoins limitée, nécessitant encore des optimisations (Lapan et al., 2012).

b. Cellules CD133⁺

Une population marginale de cellules circulantes représentant 0,06% des cellules mononuclées du sang périphérique, capables de participer à la régénération musculaire et coloniser la niche satellitaire après injection IM ou systémique dans le modèle murin immunodéficient *scid/mdx*, a été décrite en 2004 (Torrente et al., 2004). Ces cellules, isolées sur la base de l'expression de l'antigène CD133 (ou prominin-1), marqueur des HSCs et progéniteurs endothéliaux, expriment les marqueurs myogéniques Pax7, Myf5, MyoD, M-cadhérine, MRF4 et myogénine et sont capables de se différencier en myotubes *in vitro* seulement lorsqu'elles sont co-cultivées avec la lignée myogénique murine C2C12 ou des fibroblastes exprimant Wnt (Torrente et al., 2004).

Une population similaire a été décrite au sein de muscles adultes sains et DMD comme localisée au sein de l'interstitium et sous la lame basale des fibres musculaires (Benchaouir et al., 2007; Meng et al., 2014; Negroni et al., 2009). Ces cellules expriment Pax7 et partagent l'expression d'un certain nombre de gènes avec les myoblastes, péricytes et cellules mésenchymateuses (Meng et al., 2014; Negroni et al., 2009). Le rôle biologique de l'antigène AC133 est encore méconnu et son expression est rapidement perdue lors de la culture *in vitro*, empêchant le suivi du devenir de cette population après expansion et transplantation (Meng et al., 2014; Negroni et al., 2009). Ces cellules sont capables de s'intégrer au sein du muscle, contribuer à la régénération musculaire dans différents contextes et coloniser la niche satellitaire, et ce de façon plus importante que les myoblastes et les péricytes (Meng et al., 2015; Negroni et al., 2009). Par ailleurs, l'implantation de ces cellules isolées à partir de muscles DMD et corrigées par la technique de saut d'exon a également révélé une restauration significative de la dystrophine dans les muscles murins *scid/mdx*, confortant leur utilisation potentielle pour des modalités autologues (Benchaouir et al., 2007).

Suite à ces résultats encourageants, un EC de phase I a été initié dans le but d'évaluer la faisabilité et la sécurité de la transplantation autologue (Torrente et al., 2007). Sur les 8 patients DMD inclus, aucun effet indésirable local ni systémique n'a été observé suite à l'injection IM de ces cellules CD133⁺. En plus d'une conversion de fibres lentes en fibres rapides, une augmentation du nombre de capillaires par fibre musculaire a été observée, ce qui pourrait être lié à leur capacité à stimuler la vasculogénèse notamment par la sécrétion de VEGF (pour *vascular endothelial growth factor*) et leur potentiel de différenciation vers la voie endothéliale (Shi et al., 2009). Avant d'envisager la poursuite du développement clinique, une optimisation des conditions d'isolement et d'expansion *in vitro* est requise (Belicchi et al., 2010; Meng et al., 2014; Negroni et al., 2016).

c. Mésoangioblastes / péricytes

Initialement isolés à partir de l'aorte dorsale d'embryons murins, les MABs sont des progéniteurs mésodermiques aujourd'hui bien caractérisés chez l'Homme et initialement définis comme des péricytes (Dellavalle et al., 2007). Localisés sous la membrane basale des vaisseaux sanguins et caractérisés par une morphologie particulière en culture sous forme de cellules rondes peu adhérentes, ils peuvent être amplifiés jusqu'à 20 CPDs et possèdent un potentiel de différenciation myogénique spontané important (20-40%), bien qu'ils n'expriment pas les marqueurs myogéniques CD56, MyoD, Myf5 et myogénine. De façon

intéressante, une faible concentration en O₂ (3-5%) est essentielle pour l'isolement, la prolifération et le maintien de l'intégrité cytogénétique, autant de paramètres cruciaux pour une amplification efficace et sécuritaire en clinique. En outre, l'utilisation d'un support constitué d'un substrat élastique (40 µm de polydiméthylsiloxane, IBIDI) améliore significativement l'engagement et la différenciation myogénique de MABs humains, en conférant une rigidité très proche de celle retrouvée au sein des muscles (28 kPa, 300000 fois inférieure à celle des supports plastiques) (Tonlorenzi et al., 2017). Ils sont définis par l'expression du protéoglycane NG2, de la phosphatase alcaline (ALP), du récepteur β au PDGF (pour *platelet-derived growth factor*), du CD146 et l'α-actine des muscles lisses (α-SMA pour *α-smooth muscle actin*). Plus récemment, le marqueur PW1/*Paternaly expressed gene* (Peg)-3 a été proposé pour identifier les MABs compétents pour leur utilisation en clinique, son expression étant fortement corrélée avec leur capacité à traverser la barrière vasculaire et à se différencier en muscle. Ce marqueur étant de plus exprimé par toutes les populations de MABs de différents stades de développement et dans différentes espèces (Bonfanti et al., 2015; Tonlorenzi et al., 2017).

Leur capacité à traverser la barrière vasculaire et leur participation à la régénération musculaire leur a permis d'améliorer le phénotype dystrophique de différents modèles précliniques de DMs après administration intra-artérielle : la souris SG-α^{null}, la souris *mdx* ou encore le chien GRMD (Sampaolesi et al., 2003, 2006; Tedesco et al., 2011). Ces résultats attribuent également une meilleure efficacité à la transplantation allogénique de cellules issues de donneurs sains que de cellules autologues génétiquement corrigées par transduction avec un vecteur lentiviral pour apporter le gène de la dystrophine. Suite à ces résultats encourageants, un EC de phase I/IIa a été initié (Eudract 2011-000176-33). Cinq patients DMD, sélectionnés sur la base de l'identification d'un parent HLA-compatible, ont bénéficié de la transplantation de MABs par voie intra-artérielle (4 administrations à 2 mois d'intervalle) sous régime immunosuppresseur (tacrolimus) à des doses proches de celles utilisées lors des études précliniques chez le chien, soit entre 3,3 et 19,8.10⁶ cellules/kg (Cossu et al., 2015; Sampaolesi et al., 2006). Bien que la transplantation ait été bien tolérée par 4 patients, le dernier a développé une attaque cérébrale, bien que sans séquelle, dont la corrélation avec l'administration des cellules reste à démontrer. Les paramètres fonctionnels (force musculaire, mobilité, endurance, marche...) semblent indiquer la stabilisation temporaire de 2 des 3 patients ambulatoires, bien qu'aucune amélioration tissulaire (fibres en régénération, fibrose) ni expression de dystrophine n'aient été observées (Cossu et al., 2015).

De façon intéressante, Noviello *et al.* ont montré que malgré une faible immunogénicité, les MABs placés dans un contexte inflammatoire ou différenciés en myotubes stimulaient l'expansion de LTs allogéniques et y devenaient sensibles (Noviello et al., 2014). Par ailleurs, certaines équipes semblent indiquer que les MABs contribueraient à la génération de myofibroblastes, acteurs clé de la fibrose, voie qu'il serait préférable de limiter dans un contexte DMD (Greenhalgh et al., 2013).

d. Cellules interstitielles PW1-positives

Sur la base de l'expression du même marqueur précédemment évoqué pour la sélection des MABs compétents, une population de cellules interstitielles positives pour PW1 (PICs pour *PW1-positive interstitial cells*) a récemment été isolée. Ces cellules sont bipotentes par leur contribution à la régénération des muscles lisses et squelettiques *in vivo*. Elles sont capables de générer des SCs et renouveler le stock de PICs (Mitchell et al., 2010). Bien que les SCs quiescentes expriment également PW1, elles se distinguent par l'absence d'expression de Pax7 et leur localisation interstitielle. Les cellules murines expriment Sca-1 (*stem cell-antigen-1*), sont sélectionnées sur la base de leur profil d'expression CD34⁺/CD45⁻ et expriment un large nombre de gènes communs aux MSCs (Pannérec et al., 2013). Par ailleurs, plus récemment isolées chez le porc (pPICs), ces cellules expriment les marqueurs de pluripotence SSEA-3, SSEA-4 Oct3/4, Nanog et Sox2 ainsi que la sous-unité hTERT de la télomérase. Elles présentent des taux de prolifération importants avec des temps de génération inférieurs à 24h et la réalisation de 80 CPDs sans atteindre la sénescence. Contrairement aux cellules murines qui sont bipotentes, les pPICs semblent capables de se différencier également vers les voies cardiaques et endothéliales (Cottle et al., 2017; Lewis et al., 2014). Bien que ces cellules isolées à partir de modèles murins et porcins présentent des propriétés très intéressantes pour des applications cliniques (important potentiel d'expansion *in vitro*, potentiel de différenciation myogénique), l'absence d'étude reportant leur identification chez l'Homme limite leur projection pour les développements cliniques (Cottle et al., 2017; Lewis et al., 2014; Mitchell et al., 2010).

e. Cellules myo-endothéliales

Parmi les populations cellulaires dérivées du muscle squelettique, une population co-exprimant des marqueurs myogéniques et endothéliaux a été identifiée chez la souris (Tamaki et al., 2002). Ces cellules myo-endothéliales (MECs pour *myoendothelial cells* ou sk-34) sont isolées sur la base de leur profil d'expression CD34⁺/CD45⁻, n'expriment les MRFs qu'après

3 jours de culture et sont capables de fusionner pour former des myotubes spontanément en culture. Transplantées par voie IM dans un modèle de souris immunodéficient NOD/*scid*, ces cellules se différencient en cellules musculaires et cellules endothéliales vasculaires (Tamaki et al., 2002). Des résultats prometteurs ont été obtenus dans divers modèles animaux en termes de régénération au niveau des muscles squelettiques et cardiaque (Tamaki et al., 2002, 2005, 2008). Leur conditions d'expansion *in vitro* semblent encore peu adaptées dans la mesure où elles n'excluent pas l'engagement vers des types cellulaires non désirés (adipocytes ou fibroblastes) (Tamaki et al., 2005). Une population présentant un phénotype comparable (CD56⁺/CD34⁺/CD144⁺/CD45⁻) a été isolée à partir de prélèvements musculaires humains, capable de participer à la régénération musculaire après injection dans un modèle murin *scid* lésé à la cardiotoxine, et ce de façon plus importante que les cellules myogéniques CD56⁺/CD34⁻/CD144⁻/CD45⁻ (Zheng et al., 2007). En sus de leur importante participation à la régénération musculaire, leur positionnement comme candidat thérapeutique est consolidé par leur facilité d'isolement aisément transférable en clinique et l'absence de potentiel tumorigénique même après de longues périodes de culture.

f. Cellules exprimant l'aldéhyde deshydrogénase

L'activité de l'aldéhyde deshydrogénase 1A1 (ALDH), enzyme cytosolique détoxifiante impliquée notamment dans le métabolisme des aldéhydes xénobiotiques, est considérée comme l'un des marqueurs du potentiel de régénération de progéniteurs primitifs issus de la moelle osseuse, du sang de cordon ou du sang périphérique. Deux populations distinctes de cellules présentant une forte activité ALDH (SMALD⁺ pour *skeletal muscle ALDH⁺ cells*) ont été identifiées au niveau de l'endomysium de muscle squelettique humain, et représentent 2 à 4% des cellules mononucléées (Vauchez et al., 2009). Alors que la 1^{ère} population ALDH⁺/CD34⁺ présente un phénotype mésenchymateux associé à un potentiel de différenciation vers la voie adipogénique, la population ALDH⁺/CD34⁻ sur-exprime rapidement le CD56 *in vitro* et se différencie en myotubes. Après administration IM, cette 2^{nde} population contribue de façon majeure à la régénération musculaire, tout en intégrant également la niche satellitaire. Sa capacité à proliférer après injection *in vivo* représente un avantage considérable en terme de colonisation des muscles traités (Vauchez et al., 2009). L'expression de l'ALDH serait corrélée à une meilleure résistance au stress oxydatif, conférant un avantage pour la survie de myoblastes après transplantation (Jean et al., 2011). La faisabilité d'une injection systémique n'a cependant pas été rapportée pour le moment.

g. Cellules souches dérivées du muscle

Le terme de MDSCs (pour *muscle-derived stem cells*) regroupe aujourd'hui différentes populations dont les propriétés et profils phénotypiques diffèrent selon les espèces et selon les équipes en raison de variations dans les protocoles d'isolement. L'isolement des populations cellulaires évoquées ci-après est majoritairement basé sur leurs propriétés d'adhérence.

g.1. Progéniteurs à adhérence tardive PP/LTP/MDPCs

Initialement décrit pour la purification de myoblastes murins, le protocole de preplating a été adapté pour l'isolement d'une population cellulaire caractérisée par un déficit d'adhérence initial (Figure 25) (Qu et al., 1998). En effet, une fraction marginale appelée PP6 puis LTPs (pour *long-term proliferating cells*) représentant 1% des cellules totales dérivées du muscle a été isolée par une succession de transferts de surnageant ou preplating (PP1 à PP6). Les dernières fractions, correspondant aux SACs (*slow adherent cells*), ont montré une meilleure capacité de différenciation *in vitro* ainsi qu'un meilleur taux de survie après transplantation IM chez la souris (Qu et al., 1998). Une autre équipe n'a néanmoins pas observé de différence significative entre les myoblastes et les PP6 en termes de nombre de fibres dystrophine⁺ (Mueller et al., 2002).

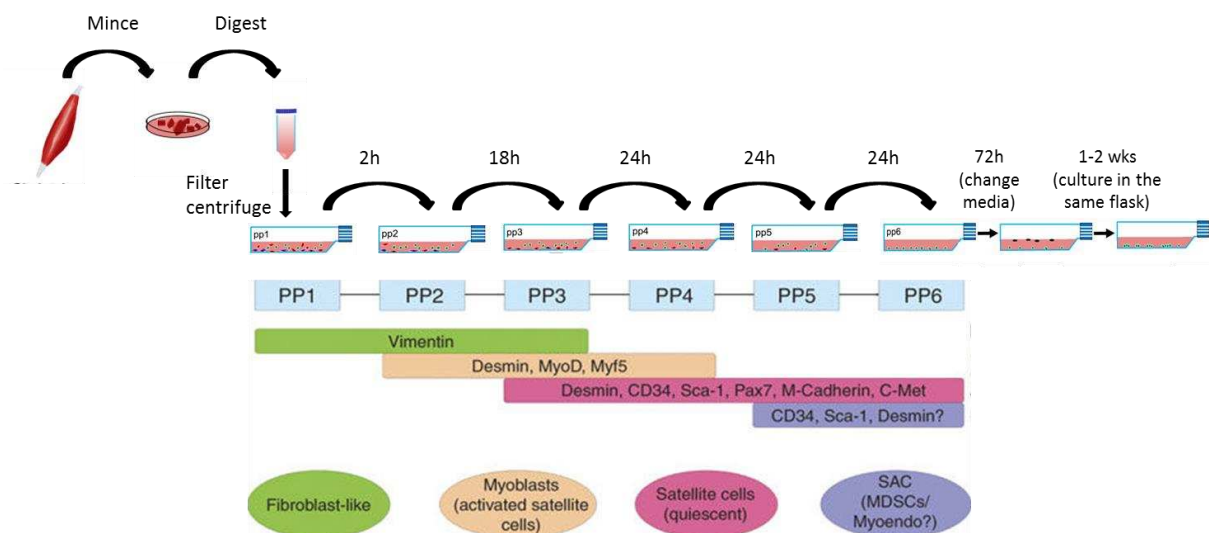


Figure 25. Profil d'expression des fractions isolées par la méthode de preplating. PP1 à PP6 représentent les preplatings 1 à 6. SAC : Slow adherent cells (D'après Gharaibeh et al., 2008; Lavasani et al., 2013).

Alors qu'elles sont caractérisées chez la souris par un profil d'expression FLK-1⁺/Sca-1⁺/desmin⁺/CD45⁻/CD34⁻ (Jankowski et al., 2001) ou CD34⁺ associé à une plus faible

expression de la desmine (Qu-Petersen et al., 2002; Torrente et al., 2001) chez la souris, elles sont présentées chez l'Homme comme étant CD45⁻/CD34⁺/Flk-1⁻/Sca1⁺/Desmine⁺ ou CD34⁻ (Chirieleison et al., 2012) et expriment parfois le CD133 (Alessandri et al., 2004). Ces cellules murines bénéficient d'une très forte capacité de prolifération *in vitro*, n'atteignant la sénescence qu'après 300 CPDs et conservant leurs caractéristiques jusqu'à 200 CPDs. Leur potentiel de régénération *in vivo* après administration IM, représenté par un grand nombre de fibres dystrophine⁺, reste également stable jusqu'à 200 CPDs (Deasy et al., 2005). En plus de la voie de différenciation myogénique, ces cellules sont capables d'emprunter d'autres voies de différenciation, dont les voies adipogénique, ostéogénique, chondrogénique ou encore hématopoïétique (Cao et al., 2003; Deasy et al., 2005; Huard et al., 2003; Qu-Petersen et al., 2002; Torrente et al., 2001).

Après injection IM chez la souris *mdx*, les PP6/LTPs participent efficacement à la régénération musculaire (Deasy et al., 2005; Qu-Petersen et al., 2002). Cela s'avère toutefois beaucoup plus modeste lors de modalités systémiques (Torrente et al., 2001). Une modeste contribution à la régénération, bien que supérieure à celle observée avec les myoblastes, a été rapportée pour les MDSCs humaines après injection IM dans un modèle *scid/mdx* (Chirieleison et al., 2012).

g.2. Cellules MuStem

Sur la base d'une adaptation du protocole de preplating initialement décrit par l'équipe de Johny Huard pour l'isolement des MDSCs murines, l'UMR 703 INRA/Oniris a isolé en 2011 une fraction de cellules à adhérence tardive à partir de muscles de chien sain (Rouger et al., 2011). Ces cellules, nommées cMuStem, sont caractérisées par un fort potentiel prolifératif *in vitro* et un phénotype de progéniteur myogénique précoce. Leur oligopotence a été démontrée par la détection de différents types de cellules différenciées (myotubes, adipocytes ou ostéocytes) après avoir été placées dans des conditions d'induction spécifiques. L'administration intramusculaire de ces cellules chez le chien dystrophinopathe GRMD immunosupprimé a dans un 1^{er} temps démontré leur capacité de survie et de participation à la régénération musculaire avec la formation de fibres dystrophine⁺ et de cellules en position satellitaire. De façon majeure, cette étude a rapporté dans un 2nd temps que leur administration systémique est associée à une stabilisation de l'état clinique général des chiens transplantés observée jusqu'à deux ans après la transplantation (Rouger et al., 2011). Des études plus récentes ont démontré un impact histologique positif illustré par une expression diffuse de dystrophine sur le long terme, une augmentation de l'activité de régénération caractérisée par

une persistance de fibres musculaires exprimant la myosine développementale et une réduction de l'espace occupé par l'endomysium. En parallèle de modifications au niveau des processus impliqués dans l'homéostasie lipidique et le métabolisme énergétique, une augmentation de la voie de dégradation dépendante de l'ubiquitine, des interactions structurelles entre les fibres musculaires et l'ECM ainsi qu'une réponse au stress oxydatif ont été démontrés par des approches transcriptomiques et protéomiques (Lardenois et al., 2016; Robriquet et al., 2015, 2016).

g.3. Myosphères

Une population cellulaire isolée à partir de muscle dans des conditions de culture non adhérentes a été caractérisée par une organisation particulière sous forme de myosphères et prend l'appellation de cellules progénitrices dérivées des myosphères (MDPCs pour *myosphere-derived progenitor cells*) (Arsic et al., 2008; Wei et al., 2011). Capables de proliférer en suspension dans des conditions de culture sans sérum en conservant cette morphologie, elles expriment chez l'Homme les marqueurs myogéniques CD56, Pax7, MyoD et la desmine ainsi que les marqueurs de pluripotence Nanog, Sox2 et Oct3/4. Elles se différencient *in vitro* vers les voies myogénique, ostéogénique et adipogénique (Wei et al., 2011). Les cellules murines participent à la régénération musculaire après administration IM chez la souris nude lésée (Sarig et al., 2006; Westerman et al., 2010) mais le potentiel de régénération *in vivo* des cellules humaines n'a, à ce jour, pas été décrit.



En conclusion, les différences phénotypiques et les principaux avantages et inconvénients sont reportés dans le tableau extrait de Lorant, Saury *et al.*, 2017 (Supplemental Table S1), reporté en Annexe II. Malgré le nombre conséquent de populations cellulaires présentant expérimentalement un potentiel de régénération musculaire dans des modèles animaux de DMs ou de lésions musculaires, beaucoup n'ont pas encore été clairement identifiées chez l'Homme et seulement deux d'entre elles ont fait l'objet des 1^{ères} phases d'EC. L'optimisation de ces thérapies innovantes reste donc plus que jamais un enjeu majeur dans l'optique de pouvoir proposer de nouvelles stratégies pour ces maladies orphelines.

Positionnement des travaux de thèse

I. Contexte scientifique

I.1. Population cellulaire MuStem humaine

En 2005, l'UMR703 INRA/Oniris a initié un programme de recherche dont l'objectif a été d'identifier un candidat cellulaire pour le traitement de la DMD. Depuis 2011, l'UMR a établi et conforté l'efficacité thérapeutique de l'injection systémique des cellules allogéniques cMuStem dans le modèle canin pertinent de la DMD (Lardenois et al., 2016; Robriquet et al., 2015, 2016), laissant envisager un intérêt à utiliser cet agent dans une démarche clinique de TC. Par la suite, une fraction de cellules à adhérence retardée a pu être isolée à partir de prélèvements musculaires humains. Ces cellules, nommées hMuStem, ont fait l'objet d'une caractérisation comportementale et phénotypique approfondie à laquelle j'ai contribué parallèlement à mes objectifs initiaux de doctorat (Lorant, Saury et al., 2017). Cette étude est reportée en Annexe II.

Forte d'une importante capacité proliférative permettant d'assurer $25,5 \pm 3,5$ PDs sur 38 jours d'expansion, la population hMuStem se compose de progéniteurs myogéniques précoces d'origine périvasculaire, comme en atteste l'expression d'une combinaison de marqueurs myogéniques (CD56, Myf5 et desmine) et péricytaire mésenchymateux (CD140b, CD146, ALP, CD29, CD44, CD73, CD90 et CD105). La population est par ailleurs exempte de cellules contaminantes de type hématopoïétique (absence d'expression de CD34 et CD45) et endothélial (absence d'expression de CD31 et CD144). Outre leur capacité de différenciation myogénique avérée, des potentiels ostéogéniques et adipogéniques ont pu être observés après induction dans des milieux spécifiques. De façon majeure, l'administration de ces cellules dans un muscle lésé de souris immunodéficientes montre une capacité d'intégration au sein du tissu musculaire et plus spécifiquement une participation active à la régénération musculaire avec jusqu'à 80% de noyaux retrouvés dans les fibres musculaires et la production de protéines humaines que sont la dystrophine et la spectrine. De façon intéressante, cette étude attribue un potentiel myogénique plus important aux lots présentant les plus forts taux de cellules CD56⁺.

Dans cette étude publiée en 2017 dans *Molecular Therapy*, la population MuStem humaine est décrite pour la 1^{ère} fois et la proximité avec son homologue canin, utilisé lors de la preuve de concept en 2011, conforte son positionnement de candidat à la TC. C'est sur cette description initiale que se sont appuyés mes travaux de thèse.

I.2. Division Biothérapie de la société Macopharma

La division Biothérapie de la société pharmaceutique Macopharma se positionne dans le domaine de la médecine régénératrice. Proposant actuellement une large gamme de produits et outils (milieux de culture et dispositifs médicaux produits dans le respect des normes GMPs) pour le développement de thérapies cellulaires, elle bénéficie également d'une expertise dans la standardisation et la sécurisation des processus d'amplification cellulaire. Un contrat CIFRE offrait dans ce contexte la possibilité à l'UMR de consolider un partenariat déjà initié lors de la caractérisation de la population hMuStem (Robriquet et al., 2012).

II. Objectifs des travaux de thèse

La partie introductive a permis dans un 1^{er} temps de décrire les modalités de définition d'un PTC pour une présentation clinique ainsi que les difficultés auxquelles sont confrontées les équipes de recherche avec la définition d'un protocole de production reproductible, robuste, transférable à large échelle et respectueux des normes GMPs mais aussi avec la définition du produit cellulaire en tant que tel, en termes d'identité, de potentialités ou encore de sécurité. Dans un 2nd temps, la population cellulaire hMuStem a été décrite parmi différents candidats à potentiel myogénique positionnés comme candidats thérapeutiques pour le traitement de la DMD.

Mes travaux de thèse se sont inscrits dans la démarche de recherche translationnelle engagée par le laboratoire afin de conforter le positionnement des cellules hMuStem comme candidat thérapeutique pour le traitement de la DMD. Ils sont divisés en trois chapitres principaux et abordent deux aspects de la définition d'un protocole de TC. Dans un 1^{er} temps, des études comparées ont été réalisées dans le but de remplacer les éléments du protocole qui n'étaient pas compatibles avec des applications cliniques (Chapitre 1). Une étude comparée plus approfondie a également été réalisée pour évaluer la faisabilité de l'utilisation du sérum humain (HS) et du lysat plaquettaire (hPL) comme alternative au FBS (paragraphe III.4.1 du Chapitre 1 et Chapitre 2). Dans un 2nd temps, l'impact du temps d'expansion *in vitro* sur les propriétés biologiques des cellules hMuStem a été évalué par la mise en place d'une étude longitudinale associant des études phénotypiques, fonctionnelles *in vitro* et transcriptomiques. La finalité de la démarche a été de définir la durée optimale d'amplification des cellules hMuStem (Chapitre 3).

Résultats expérimentaux

Chapitre 1. Définition des modalités de préparation compatibles avec une application clinique

I. Positionnement général

La TC est apparue depuis quelques années comme nouvelle alternative pour le traitement des DMs. La preuve de concept de l'injection systémique des cellules cMuStem en contexte allogénique chez le chien GRMD a été décrite par l'UMR 703 PAnTher en 2011 et un programme de recherche préclinique a été initié dans le but de développer un PTC pour le traitement de la DMD. Plus récemment, l'identification et la caractérisation de leur équivalent chez l'Homme (hMuStem), associées à la démonstration de leur potentiel de régénération *in vivo* après injection IM dans un modèle murin cryolésé, ont conforté le positionnement des cellules hMuStem comme potentiel candidat thérapeutique. Malgré ces résultats prometteurs, la proposition d'un PTC est conditionnée par la capacité à isoler et amplifier les cellules hMuStem dans des conditions compatibles avec des applications cliniques, c'est-à-dire n'utilisant que des composants susceptibles d'être autorisés par les autorités compétentes dans le cadre d'un EC de thérapie cellulaire (préférentiellement exempts d'origine animale et produits selon les GMPs ou possédant un marquage CE), tout en maintenant les caractéristiques des cellules MuStem initialement définies (Lorant, Saury et al., 2017). Au début de ma thèse, plusieurs entités du procédé de production ont été identifiées comme ne répondant pas à ces exigences :

- i) les enzymes de digestion utilisées pour le traitement du prélèvement musculaire et l'extraction des cellules mononucléées dérivées du muscle ;
- ii) l'apport nutritif d'origine animale, en l'occurrence le FBS, constituant essentiel du milieu de culture qui permet l'apport de nutriments et des GFs essentiels à la croissance cellulaire ;
- iii) l'élément matriciel d'origine animale (gélatine porcine) utilisée pour le revêtement des surfaces plastiques, nécessaire à l'adhésion et la croissance cellulaire ;
- iv) la solution cryo-protectrice d'origine animale (FBS / 10% DMSO) nécessaire à la conservation des cellules MuStem après amplification.

Dans un contexte de recherche translationnelle, la 1^{ère} partie de mon travail de thèse a consisté à définir un protocole d'isolement et d'expansion des cellules hMuStem compatible

avec un transfert clinique, en proposant et testant des alternatives aux différentes entités énumérées ci-dessus. Je me suis également attachée à optimiser les conditions de culture en terme de densité d'ensemencement et donc de nombre de passages.

Le transfert vers des applications cliniques implique également la définition d'un protocole de production à large échelle. Comme nous l'avons évoqué dans la partie introductive, différents systèmes de culture ont été proposés pour l'amplification clinique. Les bioréacteurs en suspension sont notamment intéressants en termes de volume d'expansion et bénéficient de systèmes d'homogénéisation et de contrôle du milieu, des apports nutritifs et des paramètres physico-chimiques. Ces conditions de culture en suspension ne conviennent cependant pas à tous les types cellulaires. Les cellules hMuStem étant originellement cultivées dans des conditions adhérentes, une étude comparative a été menée pour évaluer la faisabilité de l'utilisation de tels systèmes.

II. Matériels et méthodes

II.1. Origine des prélèvements musculaires humains

Les cellules hMuStem ont été isolées à partir de prélèvements musculaires correspondant à des déchets opératoires de patients ne présentant pas de pathologie musculaire connue (Tableau 1). D'une part, un partenariat mis en place avec le CHU de Nantes dans le cadre d'un dossier de biocollection enregistré auprès de la Direction de la Recherche Clinique nous a permis tout au long de ma thèse d'obtenir des biopsies de muscles posturaux (*Paravertebralis*) d'enfants de 12 à 19 ans atteints de scoliose malformative. D'autre part, nous avons également eu accès, en moindre quantité, à des prélèvements de muscles locomoteurs (*Fascia lata tensor*, *Quadriceps*) provenant de patients plus âgés (42 à 51 ans), grâce à la plate-forme de ressources biologiques MyoBank qui est reliée à l'Association Française contre les Myopathies (AFM). Tous les patients ont signé un accord de consentement et les protocoles ont été approuvés par le Département de Recherche Clinique du CHU de Nantes, selon les normes de l'ANSM. La conservation des échantillons biologiques a été réalisée en accord avec les normes nationales qui concernent l'utilisation de tissus humains pour la recherche (Permis : MESR/DC-2010-1199; CPP/29/10).

Tableau 1. Isolement de cellules hMuStem : source, genre, âge des donneurs, type de muscle obtenu et conditions d'isolement.

Source	Genre (F/M)	Age (ans)	Type de muscle	Conditions
CHU Nantes	F	17	Muscle paravertébral	Conditions de grade recherche : - Enzyme de dissociation tissulaire de grade recherche - FBS - Gélatine porcine - Densité d'ensemencement élevée (10000 cellules/cm ²)
	M	13	Muscle paravertébral	
	F	12	Muscle paravertébral	
	F	15	Muscle paravertébral	
	F	15	Muscle paravertébral	
	M	18	Muscle paravertébral	
	M	18	Muscle paravertébral	Conditions compatibles avec des applications cliniques : - Enzymes de dissociation tissulaires de grade GMP - HS - CELLstart™ - Densité d'ensemencement 2500 cellules/cm ²
	F	15	Muscle paravertébral	
	F	17	Muscle paravertébral	
	F	13	Muscle paravertébral	
	M	15	Muscle paravertébral	
	F	15	Muscle paravertébral	
	M	19	Muscle paravertébral	
	M	17	Muscle paravertébral	
	F	16	Muscle paravertébral	
	F	16	Muscle paravertébral	
	M	14	Muscle paravertébral	
	M	17	Muscle paravertébral	
	F	17	Muscle paravertébral	
	F	18	Muscle paravertébral	
F	12	Muscle paravertébral		
M	18	Muscle paravertébral		
Myobank	M	51	Quadriceps	
	F	52	Tenseur du Fascia Lata	
	F	42	Tenseur du Fascia Lata	
	M	55	Tenseur du Fascia Lata	
	M	58	Tenseur du Fascia Lata	

II.2. Protocole d'isolement de la population hMuStem

Les MDCs ont été isolées à partir du protocole de grade recherche précédemment décrit (Lorant, Saury et al., 2017) ou son adaptation pour répondre aux exigences des normes GMPs.

Les prélèvements musculaires fraîchement récupérés au bloc chirurgical sont placés jusqu'à 72 heures dans une solution de conservation d'organes (SCOT 30, Macopharma) additionnée de 2 UI/mL de pénicilline, 0,1 mg/mL de streptomycine et 0,25 µg/mL d'amphotéricin (PSF, Sigma-Aldrich). Les tissus sont finement dilacérés au scalpel et soumis à une 1^{ère} étape de digestion enzymatique (15 min, 37°C), soit avec un cocktail de collagénase de type VIII (2 000 U/g de tissu, Sigma-Aldrich) et de 0,2 % de hyaluronidase de type 1S (Sigma-Aldrich) de grade recherche, soit avec de la collagénase produite selon les normes GMP (20 PZ/g de tissu, Coger). Après centrifugation (100 g, 5 min), le surnageant est neutralisé avec du milieu HAM F12 (Invitrogen) contenant 20% de FBS (Eurobio) pour le protocole de grade recherche, ou 5% de HS (EFS Nantes) pour le protocole compatible avec la clinique. Le culot cellulaire est digéré (30 min, 37°C) avec 0,125% de Pronase E de grade recherche (Sigma-Aldrich) ou une protéase produite selon les GMPs (1,5 PZ/g de tissu, Coger). Les tissus digérés sont ensuite centrifugés (100 g, 5 min), le surnageant est poolé avec celui conservé lors de la 1^{ère} digestion enzymatique et soumis à de nouvelles centrifugations successives (300 g, 15 min). Les MDCs sont obtenues après trois étapes successives de filtration à travers des filtres nylon de 100-, 70- puis 40-µm de diamètre (BD Biosciences) et resuspendues dans du milieu HAM F12 contenant 2% de FBS ou 10 % de HS afin de déterminer le nombre de cellules et la viabilité grâce au principe d'exclusion du bleu trypan (VWR). Les cellules hMuStem sont isolées après 6 jours grâce à une adaptation du protocole de preplating précédemment décrit (Lorant, Saury et al., 2017).

Les cellules sont maintenues dans des conditions standard (+37°C, atmosphère humide, 5% CO₂) dans du milieu d'amplification correspondant à un milieu produit selon les GMPs (Macopharma), supplémenté avec 10% FBS / 1% PSF / 10 ng/mL bFGF (Miltenyi) / 25 ng/mL EGF (Miltenyi) ou 10 HS / 1 % PSF / 10 ng/mL bFGF / 2 ng/mL EGF. Les cellules sontensemencées sur gélatine (Biochrom) ou sur le substrat humain CELLstartTM CTSTM (Invitrogen) à 10000 ou 2500 cellules/cm², respectivement pour le protocole de grade recherche et le protocole compatible avec des applications cliniques. Le milieu est renouvelé deux fois par semaine.

II.3. Evaluation du pouvoir prolifératif

Afin d'évaluer le comportement prolifératif des cellules hMuStem soumises aux différentes conditions de culture, des triplicatas d'ensemencement sont réalisés à une densité contrôlée dans les différents milieux dans des plaques 6 puits (Invitrogen) préalablement coatées avec de la gélatine ou du CELLstart™, ou des plaques 6 puits à faible adhérence (ULA pour *ultra-low attachment*, Corning). Lorsque les cellules atteignent la confluence dans l'une des conditions, les cellules sont dissociées avec du TryPLE™ (Gibco) et centrifugées (410 g, 10 min). Les cellules sont ensuite resuspendues dans leur milieu de culture et le nombre de cellules viables est déterminé par exclusion du bleu trypan. Le nombre de PD et le temps de doublement (DT pour *doubling time*) sont calculés à chaque passage grâce aux formules suivantes : $\Delta PD = \log(nf/n0)/\log_2$ et $DT = (\log_2 \times T)/\log(nf/n0)$, où $n0$, nf et T sont respectivement les nombres de cellules initialement ensemencées, le nombre de cellules générées à l'issue du passage et la durée du passage en jours (Blasco et al., 1997). Le nombre de CPD est calculé en additionnant les PDs du passage avec ceux des passages précédents.

II.4. Analyses statistiques

Les résultats de prolifération sont présentés en valeurs de moyennes \pm SEM. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R (version 3.3.2). Les données ont été préalablement testées pour la normalité et l'indépendance des échantillons avant analyse, comme précédemment décrit (Pinheiro and Bates, 2009). Les différences statistiques ont été calculées avec un modèle linéaire à effet mixte (LME) en considérant le donneur comme paramètre aléatoire, suivi du test de comparaison multiple post-hoc de Tukey (Chow et al., 2003). Le test de rang de Wilcoxon et le test de Friedman suivi du test de comparaison multiple de Dunn ont été utilisés lorsque l'indépendance et la normalité des échantillons n'ont pu être validées. Les différences ont été considérées comme significatives pour les p-value suivantes : * < 0,05 ; ** < 0,01 ; *** < 0,001.

III. Résultats

III.1. Alternatives aux enzymes de dissociation tissulaire de grade recherche

Parmi les différentes entités identifiées de grade recherche, non utilisables dans un protocole clinique, l'isolement des MDCs à partir d'un prélèvement tissulaire nécessite

l'utilisation d'enzymes de digestion. Après dissociation mécanique, deux étapes de digestion successives par action d'un mélange de collagénase VIII/Hyaluronidase de type 1S puis de la Pronase E étaient initialement réalisées afin de dissocier efficacement les MDCs. Deux enzymes ont été testées comme alternatives : une collagénase et une protéase (Coger). Pour ce faire, trois prélèvements musculaires issus de 3 donneurs indépendants et préalablement dilacérés mécaniquement ont été divisés en deux parts égales et soumis en parallèle à ces deux combinaisons d'enzymes. Les rendements en MDCs puis en cellules hMuStem ont été déterminés, respectivement à l'issue de la dernière étape du procédé d'isolement et à l'issue du 1^{er} passage suivant le protocole de preplating (P0). D'une part, les conditions initiales de grade recherche ont permis d'obtenir des rendements de MDCs de 0,85 à 2,05.10⁶ cellules/gr de tissu, alors que l'utilisation des enzymes produites selon les GMPs a permis d'obtenir des rendements entre 0,39 et 2,45.10⁶ cellules/gr de tissu, permettant de noter une action similaire de ces enzymes (Figure 26A). En ce qui concerne les cellules observées à l'issue du protocole de preplating (P0), les deux conditions nous ont permis d'observer des colonies de morphologie comparable, constituées de cellules fusiformes et cellules rondes (Figure 26B), caractéristique de la population hMuStem (Lorant, Saury et al., 2017). Les quantités de cellules obtenues étaient également proches, entre 0,11 et 0,44.10⁶ cellules/gr de tissu pour la condition en grade recherche, et 0,16 et 0,45.10⁶ cellules/gr de tissu pour la condition GMP (Figure 26C). Bien que le faible nombre d'échantillons ne permettent pas de faire d'analyse statistique, aucune différence ne semble se dégager de cette comparaison.

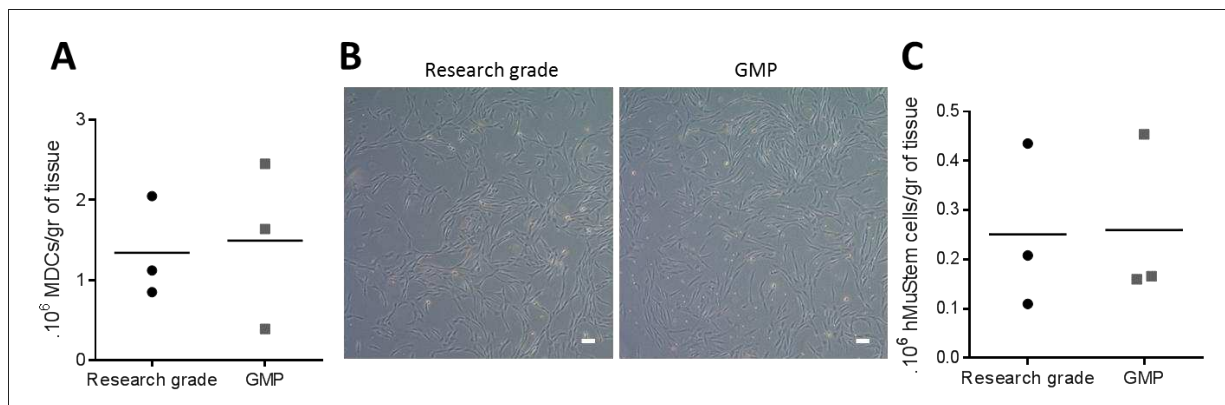


Figure 26. Remplacement des enzymes de dissociation tissulaire de grade recherche par des enzymes produites selon les GMPs. Rendements de production de MDCs (A, dernière étape du procédé d'isolement). Morphologie (B) et rendements (C) en cellules hMuStem à P0. Les rendements sont exprimés en millions de cellules par gramme de tissu musculaire, avec l'utilisation d'enzymes de dissociation tissulaire de grade recherche (noir) ou de grade GMP (gris). $n=3$ donneurs indépendants. Echelle : 100 nm.

Finalemment, les rendements en MDCs et de cellules MuStem semblent plus dépendre de la qualité et de la taille du prélèvement musculaire que des enzymes utilisées, nous permettant de valider ces enzymes de grade GMP pour l'isolement des MDCs et cellules hMuStem.

III.2. Culture en conditions non adhérentes

Afin d'évaluer la faisabilité de la culture en suspension, une étude préliminaire a été réalisée sur trois lots de cellules hMuStem placées en milieu contenant du FBS pendant 7 jours sur des supports ULA. Alors qu'une morphologie caractéristique des cellules hMuStem, avec une majorité de cellules fusiformes et quelques cellules rondes peu adhérentes, a été observée dans les conditions adhérentes classiques, les cellules cultivées en supports ULA forment des sphères flottantes de tailles variées présentant un centre très dense (Figure 27A). En termes de taux de prolifération, des taux d'amplification supérieurs à 12 ont été observés pour les cellules hMuStem cultivées dans des conditions adhérentes (Figure 27B). Malgré une impression de prolifération dans les conditions non adhérentes avec une progression de la taille des sphères au cours de la culture, très peu de cellules ont été récupérées à l'issue du passage avec des taux d'amplification inférieurs à 1, indiquant que le nombre de cellules récupérées est inférieur au nombre de cellulesensemencées. Bien que ces résultats aient été obtenus sur un nombre limité de lots cellulaires ne nous permettant pas de réaliser de test statistique, la différence incontestable en termes de quantité de cellules récupérées indique que ce système de culture en suspension est en l'état peu adapté à l'amplification des cellules

hMuStem. Les études suivantes ont donc été réalisées dans les conditions de culture adhérentes classiques.

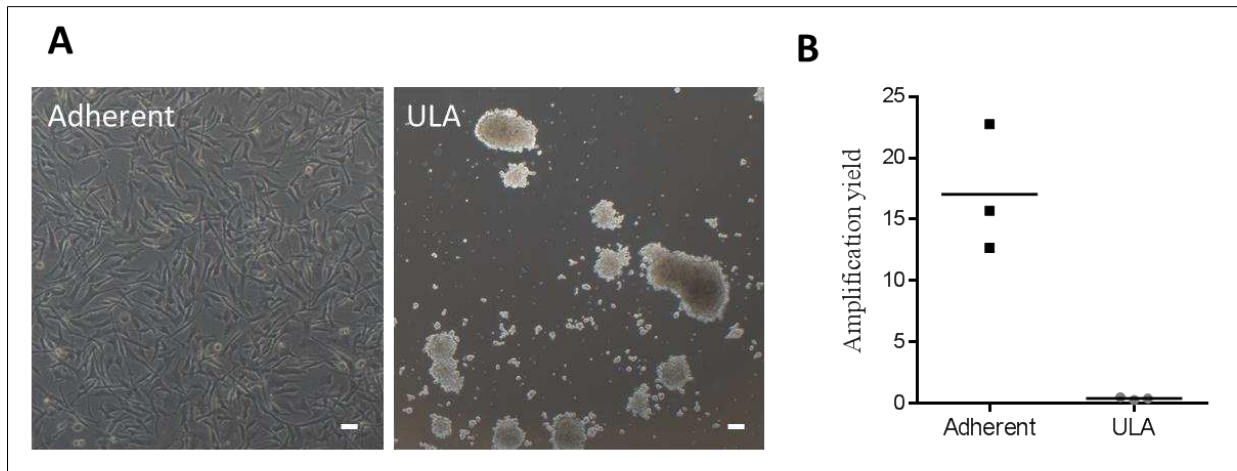


Figure 27. Comparaison de l'amplification de cellules hMuStem en conditions adhérentes et non adhérentes. Morphologie (A) et taux d'amplification (B) après 7 jours de culture dans des conditions adhérentes ou non adhérentes (ULA). $n=3$ donneurs indépendants. Echelle : 100 nm.

III.3. Alternative à la gélatine porcine comme élément matriciel

Dans le but de présenter une alternative à la gélatine porcine initialement utilisée comme support collagénique assurant l'adhésion et la prolifération des cellules hMuStem, une alternative humaine, le substrat défini CELLstartTM CTSTM, a été testée. Commercialisé par GibcoTM, il est exempt de composants d'origine animale et produit selon les normes GMPs. Six lots de cellules hMuStem ont été cultivés parallèlement sur ces deux supports pendant 4 passages de 3-4 jours, soit une durée totale de 14 jours. Une morphologie caractéristique des cellules hMuStem, avec une grande majorité de cellules fusiformes qui s'alignent à confluence et quelques cellules rondes, a été observée, indépendamment de la condition de culture (Figure 28A). En termes de taux de prolifération, les cellules hMuStem ont réalisé respectivement $23,6 \pm 0,6$ CPD et $23,7 \pm 0,6$ CPD en 14 jours, sur gélatine et substrat CELLstartTM (Figure 28B), suggérant le maintien des taux de prolifération en condition CELLstartTM. Les cinétiques de prolifération dans les deux conditions sont également comparables sur les passages précédents.

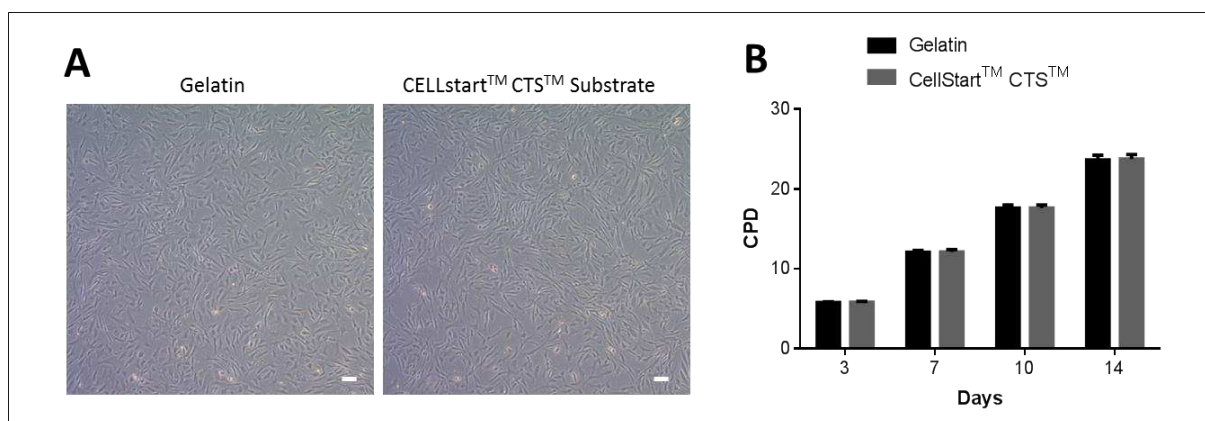


Figure 28. Remplacement de la gélatine porcine par le substrat humain CELLstart™ CTS™. Morphologie (A) et prolifération (B) de cellules hMuStem ensemencées sur supports de culture coâtés avec la gélatine (noir) ou le substrat humain CELLstart™ CTS™ (gris). $n=6$ donneurs indépendants. Echelle : 100 nm.

Finalement, ces résultats ont permis de conforter le remplacement de la gélatine porcine par l'alternative humaine CELLstart™ CTS™ pour l'ensemble du procédé de production des cellules hMuStem.

III.4. Milieu de culture

Le milieu de culture des cellules hMuStem est composé d'une part d'un milieu de base produit par Macopharma selon les normes GMPs, et d'autre part du FBS comme apport nutritif. Sont également ajoutés des GFs : le bFGF et l'EGF, respectivement à hauteur de 10 ng/mL et 25 ng/mL. Bien qu'encore couramment utilisé en laboratoire de recherche mais également en clinique, le FBS est fortement controversé en raison d'une variabilité inter-lots très importante, de son origine xénogénique induisant des risques immunologiques, de risques de contamination virale ou encore de raisons éthiques (paragraphe I.2.3.2 du Chapitre 2 de la partie introductive). Nous avons donc dans un 1^{er} temps testé une alternative humaine au FBS, provenant de sources sécurisées par le système transfusionnel : le HS de groupe sanguin AB. Dans une optique d'optimisation du protocole, nous avons dans un 2nd temps cherché à optimiser la concentration en GFs (bFGF et EGF).

III.4.1. Sérum humain comme alternative au FBS pour l'expansion des cellules hMuStem

Afin d'évaluer la faisabilité de l'utilisation du HS comme alternative au FBS, 6 lots de cellules hMuStem issus de donneurs indépendants ont été cultivés pendant 4 passages de 3-4

jours pour une durée totale de 14 jours, dans du milieu de prolifération additionné de FBS ou de HS, à des doses de 5 ou 10%. Dans un 1^{er} temps, des cultures composées majoritairement de cellules fusiformes, qui s'alignent en réseaux à plus forte densité, ainsi que quelques cellules rondes ont pu être observées, et ce, indépendamment de la condition de culture et de la dose de facteur nutritif (Figure 29A). À l'issue des 14 jours de culture, les CPDs ont été exprimés en % par rapport à la condition de référence 5% FBS (Figure 29B), pour laquelle une valeur moyenne de CPDs de $23,7 \pm 0,6$ a été obtenue. Bien que les différences entre les conditions soient relativement faibles (<5%), nous avons observé que le milieu supplémenté de 5% de HS induisait une diminution significative des taux de prolifération par rapport à la condition de référence ($p < 0,01$). Néanmoins, bien qu'aucun avantage significatif n'ait été observé en augmentant la dose de FBS de 5 à 10%, les taux de prolifération dans la condition 10 % de HS sont apparus significativement supérieurs à la condition 5% HS ($p < 0,001$), mais également à la condition de référence 5% FBS ($p < 0,001$).

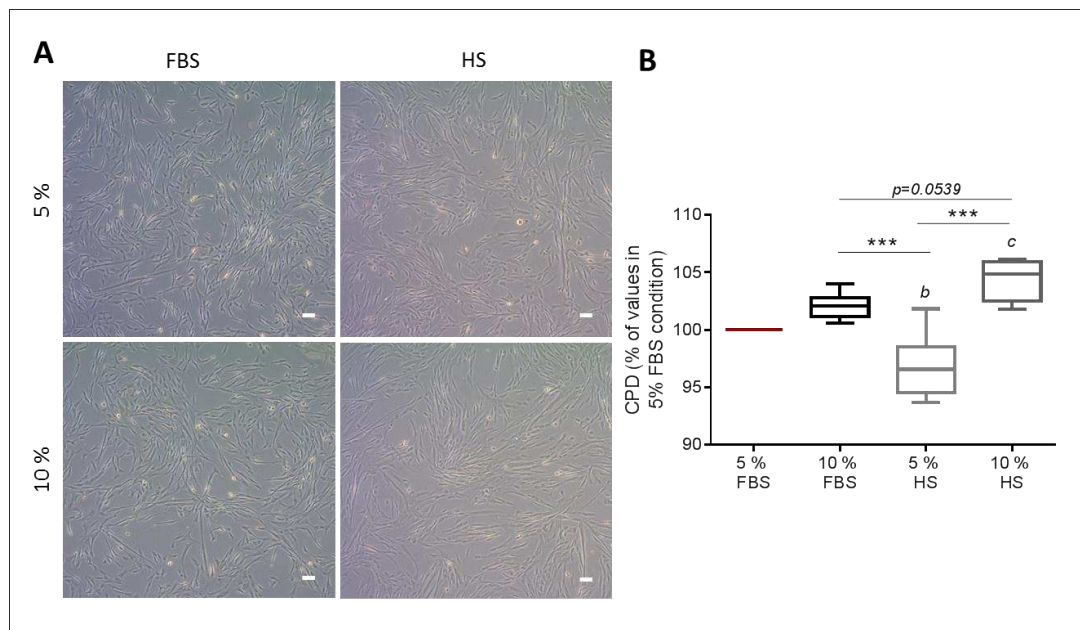


Figure 29. Remplacement du FBS par un dérivé sanguin humain, le sérum humain. Morphologie (A) et prolifération (B) des cellules hMuStem ($n=6$ donneurs indépendants) maintenues en culture pendant 14 jours en FBS (condition de référence) ou en HS, à des doses de 5 ou 10%. Échelle : 100 nm. LME puis test Tukey, ^b $p < 0,01$ et ^c $p < 0,001$ par rapport à la condition de référence 5% FBS et ^{***} $p < 0,001$.

Ces résultats ont permis de montrer que le HS pouvait assurer la prolifération des cellules hMuStem, à des taux comparables au FBS. L'inclusion de ce HS dès les 1^{ères} phases de l'isolement ainsi que l'impact sur les propriétés des cellules hMuStem (clonogénicité, engagement myogénique, phénotype et oligopotence) seront présentés dans le Chapitre 2.

III.4.2. Facteurs de croissance

Les résultats précédents ayant permis de valider la dose de 10% de HS pour remplacer les 5% de FBS, nous nous sommes ensuite demandés si les fortes doses de GFs bFGF (10 ng/mL) et EGF (25 ng/mL) initialement ajoutées étaient toujours nécessaires. Trois lots de cellules hMuStem ont été cultivés pendant 14 jours dans différentes conditions de cytokines. Les résultats de prolifération présentés sur la Figure 30 sont exprimés en facteurs d'amplification cumulés (en % par rapport à la condition de référence). Dans un 1^{er} temps, nous avons observé que le potentiel prolifératif des cellules hMuStem en absence de cytokine était fortement impacté, avec une diminution moyenne de 58,5% par rapport à la condition de référence, indiquant que l'ajout de ces cytokines apportait un réel avantage en termes de prolifération. Afin d'identifier l'implication de ces deux cytokines dans cet effet, des effets doses de bFGF (5 et 10 ng/mL) et d'EGF (2 à 25 ng/mL) ont été réalisés. En présence respectivement de 5 et 10 ng/mL de bFGF, la prolifération est restaurée à des taux de $95,4 \pm 10,6 \%$ et de $103,0 \pm 5,4 \%$ par rapport à la condition de référence. L'ajout d'EGF induit également une augmentation significative de la prolifération par rapport à la condition sans cytokine ($p < 0,001$), et ce dès la plus faible dose (2 ng/mL). L'augmentation de la dose ne s'accompagne en revanche pas d'effet additionnel. L'ajout d'EGF seul ne permet néanmoins pas de restaurer les taux de prolifération obtenus dans la condition de référence, avec des taux de prolifération de $56,1 \pm 7,0 \%$. Ces résultats indiquent que le bFGF est majoritairement impliqué dans la stimulation de la prolifération des cellules hMuStem. Bien que l'ajout de bFGF restaure totalement les taux de prolifération, nous avons conservé la plus faible dose d'EGF afin de conserver les cytokines ajoutées dans le milieu lors de la preuve de concept chez le chien. Les taux de prolifération étant plus homogènes dans la condition 10 ng/mL, nous avons finalement sélectionné le cocktail de cytokines suivant : 10 ng/mL de bFGF et 2 ng/mL d'EGF.

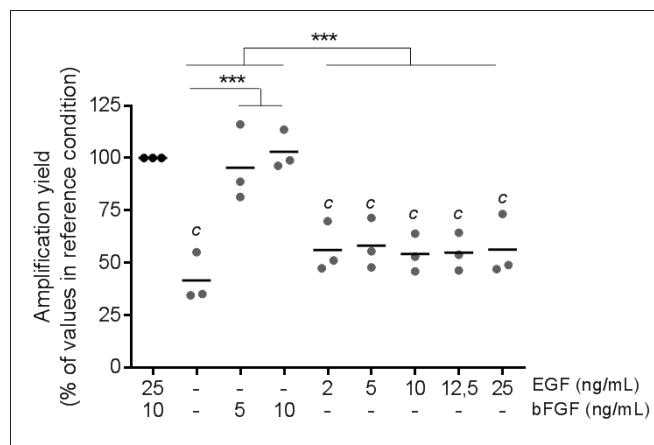


Figure 30. Influence de la dose de cytokines additionnelles sur le potentiel prolifératif des cellules hMuStem. Trois lots de cellules hMuStem ($n=3$ donneurs indépendants) ont été cultivés pendant 14 jours dans différentes conditions de cytokines. Les résultats sont exprimés en facteurs d'amplification (en % par rapport à la condition de référence). LME et test de Tukey, $^{\circ}p<0,001$ par rapport à la condition de référence et $***p<0,001$.

III.5. Optimisation de la densité d'ensemencement

Conditionnant le nombre de passages, c'est-à-dire le nombre de soumissions à la digestion enzymatique nécessaire au décollement des cellules puis à leur ré-ensemencement sur un nouveau support de culture, le choix de la densité cellulaire d'ensemencement apparaît comme un paramètre clé du protocole de production d'un produit cellulaire. Les cellules hMuStem, initialement ensemencées à une densité élevée (10 000 cellules/cm²), atteignaient rapidement la confluence, nécessitant un passage tous les 3-4 jours (Lorant, Saury et al., 2017). Après optimisation et enrichissement du milieu de culture avec l'inclusion du HS, nous avons évalué la capacité de prolifération des cellules hMuStem à des densités plus faibles, à savoir 5 000 et 1 000 cellules/cm². Trois lots de cellules hMuStem ($n=3$ donneurs indépendants) ont été ensemencés à ces différentes densités, et les passages ont été réalisés lorsque le tapis cellulaire atteignait environ 80% de confluence, sur une durée finale de 14 jours. Alors que quatre passages ont dû être réalisés pour les conditions 10 000 et 5 000 cellules/cm², seulement deux passages ont été nécessaires pour la condition 1 000 cellules/cm². De plus, alors que les cellules ensemencées à 10 000 cellules/cm² ont réalisé de 10,8 à 11,6 CPDs, celles ensemencées respectivement à 5 000 et 1 000 cellules/cm² ont réalisé 11,4 à 14,2 CPDs et 11,8 à 13,8 CPDs (Figure 31), et ce, sans altération de la morphologie. Cela correspond en moyenne à deux CPDs supplémentaires dans ces conditions de faible densité par rapport à la condition de référence. Bien que le faible nombre d'échantillons ne permette pas d'observer de différence significative, ces résultats suggèrent que la diminution

de la densité d'ensemencement serait un avantage en termes de prolifération et de nombre de passages.

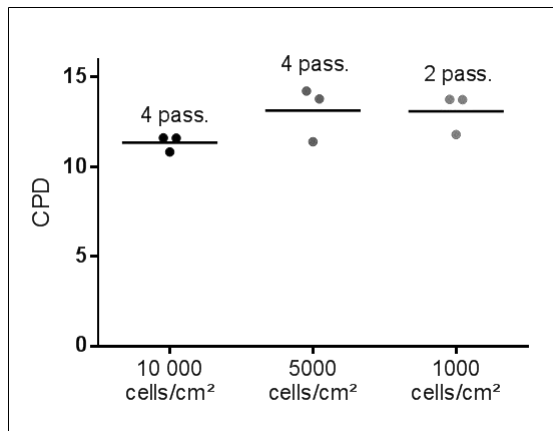


Figure 31. Influence de la densité cellulaire d'ensemencement sur le potentiel prolifératif des cellules hMuStem. Trois lots de cellules hMuStem ($n=3$ donneurs indépendants) ont été ensemencés à différentes densités (10 000, 5 000 et 1 000 cellules/cm²) pendant plusieurs passages et sur une durée totale de 14 jours. Les résultats sont présentés en CPDs.

Pour des raisons pratiques de taille de supports à ensemencer, nous avons sélectionné une densité cellulaire d'ensemencement intermédiaire de 2 500 cellules/cm².

III.6. Remplacement de la solution de cryo-conservation

Afin de préserver l'intégrité des cellules au cours de la congélation (-150°C), les cellules hMuStem étaient initialement conservées dans un milieu cryo-protecteur constitué de 10% de DMSO et de 90% de FBS. Afin de remplacer le FBS à cette dernière étape du procédé de production, une étude comparative de viabilité et de prolifération a été réalisée avec le milieu chimiquement défini et commercialisé par GibcoTM Synth-a-Freeze[®] CTSTM, lequel est exempt de tout composé protéique ou sérique et produit selon les normes GMPs. Sept lots de cellules hMuStem ont ainsi été congelés parallèlement dans les deux conditions de congélation à P3, en ampoules de 1.10^6 cellules. La viabilité à la décongélation et les capacités de prolifération sur trois passages post-décongélation ont été évalués à deux temps de cinétique : 3 et 6 mois. Des ampoules supplémentaires ont également été congelées pour une comparaison à des temps plus tardifs (12, 24 et 36 mois), mais n'ont pu être traitées durant le temps imparti de la thèse. Les taux de mortalité à 3 et 6 mois post-décongélation étaient respectivement de $7,8 \pm 1,3$ % et $6,4 \pm 1,5$ % en FBS/DMSO et de $5,6 \pm 1,0$ % et $7,0 \pm 1,9$ % en Synth-a-Freeze[®], indiquant que le Synth-a-Freeze n'altère pas la viabilité (Figure 32A). De plus, nous avons pu observer des morphologies spécifiques des cellules hMuStem,

comparables entre les deux conditions de congélation (Figure 32B). Quant aux taux de prolifération, les cellules hMuStem ont réalisé respectivement $7,8 \pm 0,2$ CPDs et $7,7 \pm 0,2$ CPDs dans les conditions FBS/DMSO et Synth-a-Freeze[®] à 3 mois post-congélation, ainsi que $7,8 \pm 0,4$ CPDs et $7,6 \pm 0,4$ CPDs à 6 mois post-congélation. Cela indique le maintien du potentiel prolifératif entre les deux conditions de congélation, mais également au cours du temps de congélation (Figure 32C). Malgré l'absence de données pour des temps de conservation plus tardifs (> 6 mois), aucune différence significative n'a été observée au niveau viabilité et prolifération entre les deux conditions de congélation, nous permettant de valider le Synth-a-Freeze[®] comme alternative au FBS/DMSO pour la congélation des cellules hMuStem.

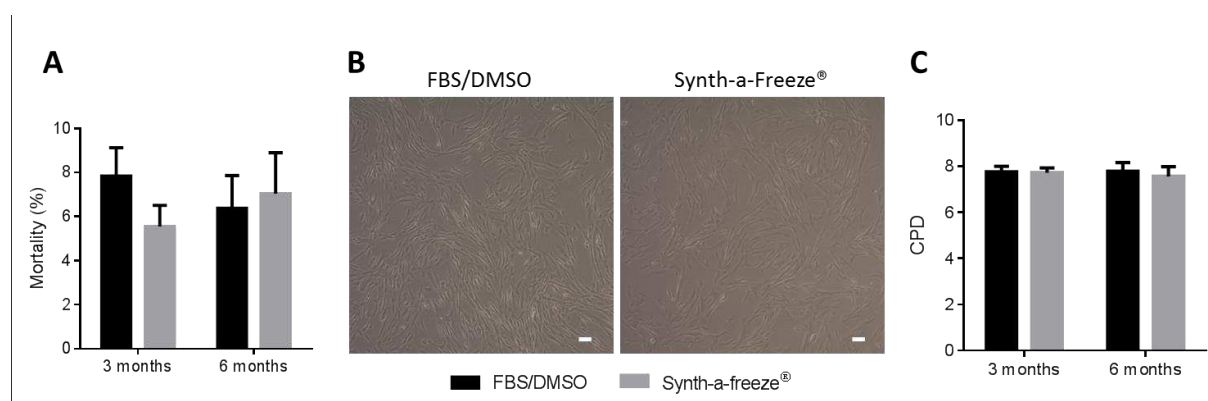


Figure 32. Remplacement du milieu de congélation FBS/DMSO des cellules hMuStem par le milieu Synth-a-Freeze[®]. Viabilité à la décongélation (A), morphologie (B) et taux de prolifération trois passages post-décongélation (C) de cellules hMuStem préalablement congelées (3 et 6 mois) en FBS/DMSO ou Synth-a-Freeze[®]. *n=7 donneurs indépendants. Échelle : 100 nm.*

III.7. Reproductibilité du protocole d'isolement et d'amplification des cellules hMuStem

Afin de s'assurer de la reproductibilité du protocole d'isolement et d'amplification des cellules hMuStem selon les nouvelles conditions de culture, comprenant entre autres les enzymes de dissociation tissulaire de grade GMP, le substrat humain CELLstart[™] CTS[™], le milieu de culture optimisé (HS, concentration en GFs) et la densité d'ensemencement (2 500 cellules/cm²), 21 lots de cellules ont été générés grâce à l'approvisionnement en biopsies musculaires provenant de deux sources : le service de clinique pédiatrique du CHU de Nantes, qui nous a permis de récupérer des prélèvements de muscle paravertébral de jeunes donneurs (13 à 19 ans) et la plate-forme commune de ressources biologiques Myobank sur le site de l'Institut de Myologie (Paris) qui a représenté une source de biopsies de muscles locomoteurs

et de donneurs plus âgés (> 42 ans). Les rendements en MDCs et en cellules hMuStem à P1 sont reportés dans le Tableau 2.

Tableau 2. Isolement de cellules hMuStem : source, genre, âge des donneurs, type/quantité de muscle obtenu et rendements d'isolements en MDCs et cellules hMuStem.

Source	Genre	Age (ans)	Type de muscle	Quantité de muscle (g)	Rendement MDCs ($\cdot 10^6$ /g de tissu)	Rendement hMuStem ($\cdot 10^6$ /g de tissu)	Durée P1 (jours)
Service de chirurgie pédiatrique du CHU de Nantes	M	18	Muscle paravertébral	4,3	1,2	0,131	10
	F	15	Muscle paravertébral	1,5	2,44	0,205	7
	F	17	Muscle paravertébral	2,1	1,9	0,179	6
	F	13	Muscle paravertébral	1,55	3,096	0,377	7
	M	15	Muscle paravertébral	2,5	1,760	0,517	6
	F	15	Muscle paravertébral	1,7	0,680	0,694	7
	M	19	Muscle paravertébral	1,8	0,250	0,111	10
	M	17	Muscle paravertébral	2,72	0,529	0,007	6
	F	16	Muscle paravertébral	1,4	0,714	0,143	6
	F	16	Muscle paravertébral	0,69	2,087	1,478	7
	M	14	Muscle paravertébral	1,27	2,400	0,231	7
	M	17	Muscle paravertébral	1,8	0,269	0,037	7
	F	17	Muscle paravertébral	2,6	0,600	0,021	7
	F	18	Muscle paravertébral	1,3	0,169	0,046	8
	F	12	Muscle paravertébral	1,8	0,520	0,170	7
M	18	Muscle paravertébral	2,5	0,392	0,160	7	
Myobank	M	51	Quadriceps	0,9	1,200	1,989	9
	F	52	Tenseur du Fascia Lata	1,8	0,606	0,027	10
	F	42	Tenseur du Fascia Lata	1,3	1,138	1,192	7
	M	55	Tenseur du Fascia Lata	3,4	0,510	0,021	7
	M	58	Tenseur du Fascia Lata	2,5	0,896	0,080	7

Dans un 1^{er} temps, nous avons observé des rendements moyens en MDCs de $1,19 \pm 0,24 \cdot 10^6$ et $0,87 \pm 0,14 \cdot 10^6$ /g de tissu respectivement pour les prélèvements jeunes/posturaux et âgés/locomoteurs et des valeurs médianes de 0,70 et 0,90 MDCs/g de muscle (Figure 33A). En ce qui concerne les cellules hMuStem, nous avons pu obtenir des rendements moyens de $0,28 \pm 0,09$ et $0,66 \pm 0,40 \cdot 10^6$ /g de tissu respectivement pour les prélèvements jeunes/posturaux et âgés/locomoteurs et des valeurs médianes de 0,17 et 0,08 hMuStem/g de muscle (Figure 33B).

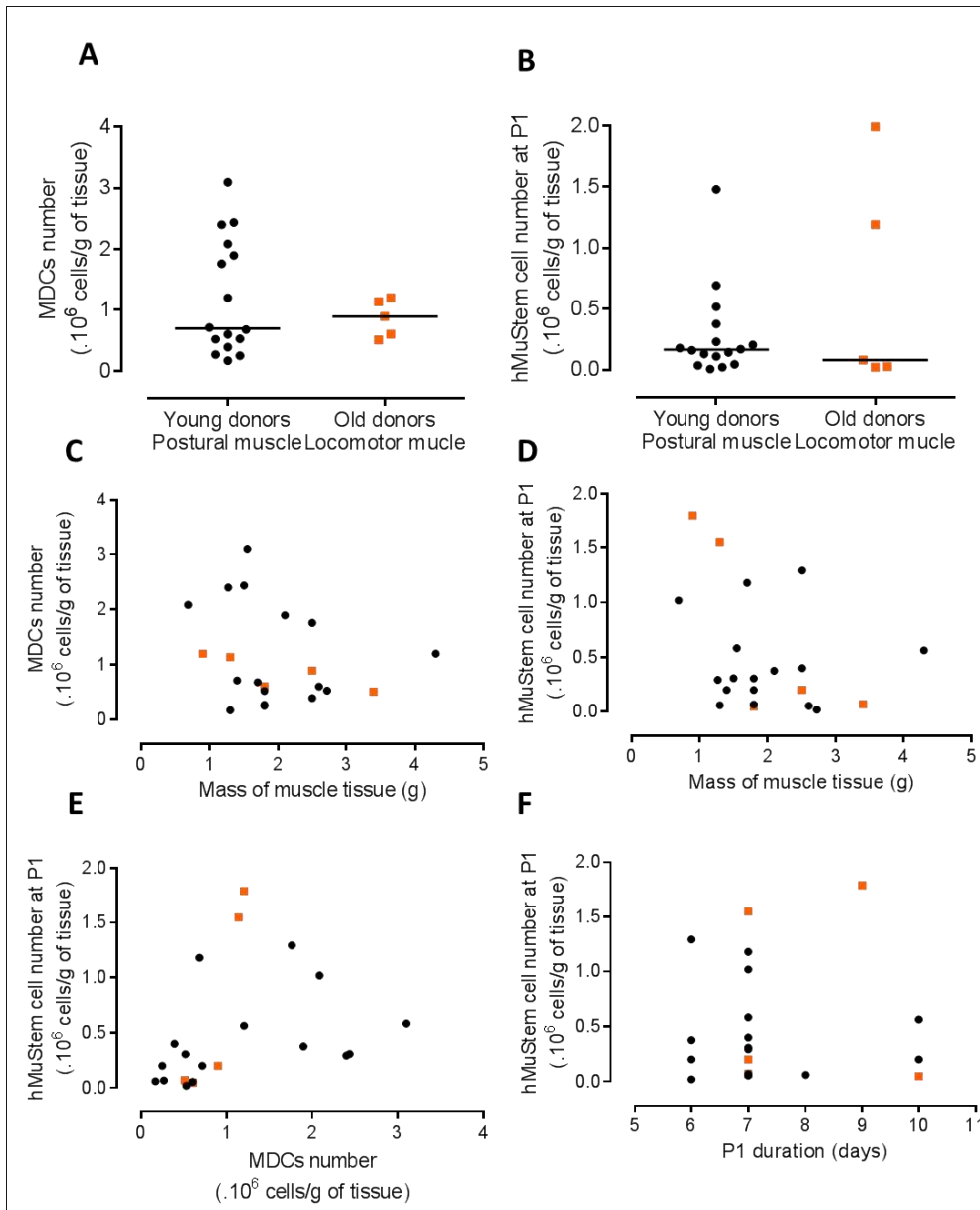


Figure 33. Expression des rendements en MDCs et hMuStem en fonction de différents paramètres : (A-B) en fonction de la source des prélèvements (muscle postural de jeunes donneurs versus muscle locomoteur de donneurs âgés), (C-D) en fonction de la masse du prélèvement musculaire. Rendements en cellules hMuStem en fonction de celui en MDCs (E) ou de la durée de la 1^{ère} phase d'expansion P1 (F).

Ces résultats ont dévoilé une importante hétérogénéité de rendements, retrouvée dans les deux sources de prélèvements et donc indépendante de la nature du muscle ou de l'âge du donneur. Nous avons souhaité savoir si nous pouvions déterminer d'autres facteurs influençant les rendements en MDCs ou cellules hMuStem. En reportant ces rendements en fonction de la masse du prélèvement biologique (respectivement Figure 33C et Figure 33D), nous avons pu observer une répartition aléatoire des données, démontrant une absence de corrélation entre ces deux paramètres. De la même façon, il ne semble pas y avoir de

corrélation entre le rendement de cellules hMuStem à P1 et celui de MDCs à l'issue de l'isolement pour les prélèvements jeunes/posturaux (Figure 33E), ni entre le rendement de cellules hMuStem et le temps du 1^{er} passage P1 (Figure 33F). Néanmoins, il semble y avoir une corrélation significative entre le rendement de cellules hMuStem à P1 et celui de MDCs à l'issue de l'isolement pour les prélèvements âgés/locomoteurs ($r = 0,9143$, $p < 0,05$), mais cela pourrait être dû au faible nombre de prélèvements traités (Figure 33E). D'autres paramètres, dont la qualité du prélèvement musculaire ou encore l'expérimentateur, pourraient avoir un impact sur le rendement mais les données actuelles ne permettent pas de l'évaluer. Ces résultats relèvent une réelle difficulté à prévoir le rendement d'isolement malgré des procédures bien définies.

Dans un 2nd temps, une étude de prolifération a été réalisée après isolement des cellules hMuStem, afin d'évaluer la reproductibilité du protocole d'amplification. À l'exception des lots S15-46 (MyoBank-AFM) et S16-06 (CHU, Nantes), et malgré les différences en termes de rendements d'isolement, les taux d'amplification sont apparus relativement homogènes au cours des 1^{ères} phases d'amplification (Figure 34A). Cela a été confirmé par la détermination des DTs moyens, qui sont de $1,20 \pm 0,07$ jours à P2, $1,05 \pm 0,06$ jours à P3 et $1,11 \pm 0,04$ jours à P4. Ils commencent à augmenter dès P5 avec une valeur moyenne de $1,32 \pm 0,13$ jours à P5 et $1,83 \pm 0,26$ jours à P6 (Figure 34B). De façon intéressante, nous avons également observé que les 5 prélèvements issus de Myobank-AFM avaient tendance à présenter des DTs supérieurs à ceux issus du CHU de Nantes, et ce, dès les passages précoces ($1,22 \pm 0,14$ jours vs. $1,00 \pm 0,06$ jours à P3 ; $1,29 \pm 0,07$ jours vs. $1,06 \pm 0,04$ jours à P4). Ces différences s'accroissent sur les passages suivants, avec des DTs de $1,92 \pm 0,36$ jours vs. $1,13 \pm 0,08$ jours à P5 et $2,97 \pm 0,89$ jours vs. $1,48 \pm 0,13$ jours à P6. Ces résultats ont révélé un potentiel prolifératif inférieur des lots isolés à partir des prélèvements Myobank-AFM (muscle locomoteurs de donneurs âgés) par rapport aux lots isolés à partir de muscles posturaux de jeunes donneurs. Deux variables intervenant dans cette étude, à savoir l'âge du donneur et le type de muscle, des isolements supplémentaires seront nécessaires pour conclure sur un éventuel effet de l'âge et/ou du type de muscle. Afin de se rapprocher du schéma d'un EC, il apparaît aujourd'hui nécessaire d'évaluer la capacité d'isolement et le potentiel d'amplification des cellules hMuStem idéalement isolées à partir de biopsies de muscle locomoteur de jeunes patients (<15 ans). Cette étude sera toutefois poursuivie dans la mesure où il n'est à ce jour pas exclu que les parents puissent être considérés comme donneurs.

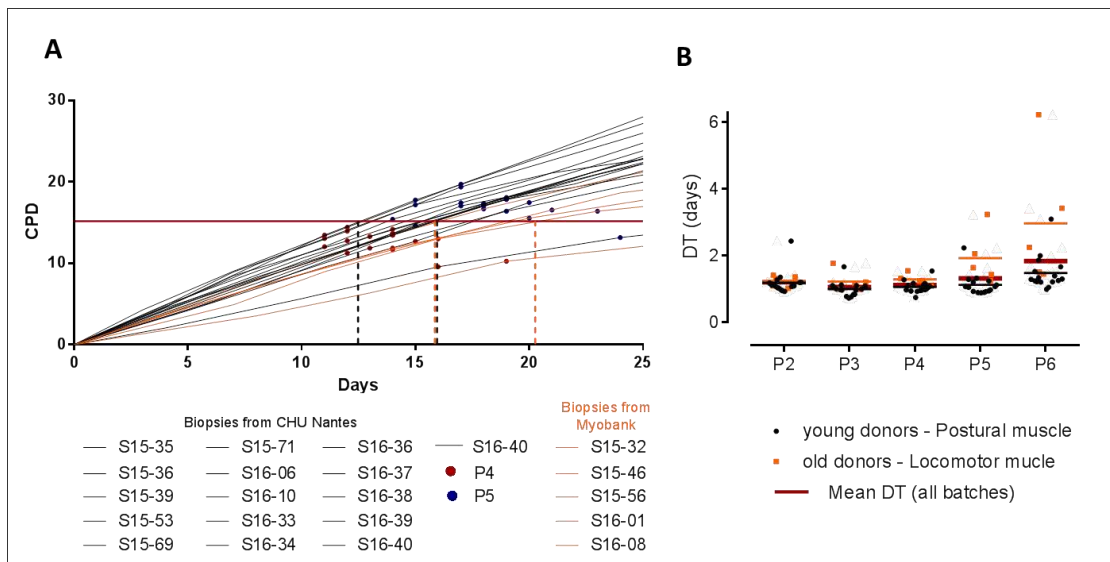


Figure 34. Potentiel prolifératif des cellules hMuStem dans les conditions de culture définies précédemment. Nombre de doublement de population cumulés (CPDs, A) et temps de doublement (DT, B) des 1^{ères} phases d'amplification (P2 à P6) pour les cellules hMuStem issues de muscles posturaux de jeunes donneurs (CHU Nantes, noir) ou de muscles locomoteurs de donneurs plus âgés (Myobank-AFM, orange). Les dates de passages sont reportées avec des points rouges (P4) ou bleus (P5).

Dans l'hypothèse d'un dessin d'EC comprenant 4 injections successives sur des enfants âgés de 7 à 8 ans (poids d'environ 25 kg) et un intervalle de doses compris entre $5 \cdot 10^6$ et $2 \cdot 10^7$ cellules/kg (en fonction de la quantité et de la qualité du prélèvement), le nombre de cellules nécessaire pour le protocole s'élèverait entre $5 \cdot 10^8$ et $2 \cdot 10^9$ cellules. Les contrôles qualité nécessitant potentiellement autant de cellules, le nombre de cellules nécessaire s'élèverait entre $1 \cdot 10^9$ et $4 \cdot 10^9$ cellules. À ce jour, les isolements nous permettent d'obtenir en moyenne $1 \cdot 10^5$ cellules hMuStem/gr de tissu à l'issue du 1^{er} passage. Quinze CPDs (Figure 34A) seront nécessaires pour générer plus de $4 \cdot 10^9$ cellules à partir de deux biopsies d'1 gr. Cela correspond à des temps de culture de 12,5 à 16 jours après le 1^{er} passage pour les lots jeunes/muscle posturaux alors que cela correspond à des temps de culture de 16 à 20 jours pour les lots âgés/muscles locomoteurs. Ces valeurs correspondent également à un nombre de passage compris entre P4 et P5, ce qui confirme la faisabilité d'un EC avec un nombre de cellules hMuStem suffisant à partir de 2 gr de tissu musculaire prélevés sur un donneur.

Ces résultats ont fait l'objet d'un poster présenté au 5^{ème} congrès international Myology en mars 2016 à Lyon.

Chapitre 2. Analyse du lysat plaquettaire comme alternative nutritive pour la production de lots cliniques hMuStem

I. Positionnement général

Malgré la définition de conditions de culture capables d'assurer l'amplification des cellules hMuStem dans le respect des normes GMPs, il convient de s'assurer que celles-ci permettent le maintien des propriétés des cellules hMuStem ainsi isolées et amplifiées. Les données sur la population humaine publiées au cours de ma thèse (Lorant, Saury et al., 2017) ont positionné les cellules hMuStem comme des progéniteurs myogéniques précoces d'origine périvasculaire/mésenchymateuse, capables, en sus de leur engagement myogénique, de se différencier vers les voies adipo- et ostéogéniques. La 2nde partie de ma thèse a consisté à évaluer l'impact de ces nouvelles conditions de culture sur ces propriétés.

Le HS, et notamment de groupe sanguin AB, en tant que produit sanguin humain, entre en compétition avec les besoins transfusionnels. L'approvisionnement apparaît aujourd'hui relativement difficile pour la communauté scientifique. Afin de se préparer à faire face à une potentielle indisponibilité de ce produit sanguin, nous avons souhaité tester une autre alternative. Le hPL, plasma humain enrichi en GFs d'origine plaquettaire, bénéficie également de la sécurisation du système transfusionnel et a aujourd'hui été approuvé par de nombreuses équipes travaillant notamment sur les MSCs, et ce jusqu'en clinique. De nombreuses études ont de plus démontré la sécurité et l'efficacité de l'utilisation de produits plaquettaires dont la date limite d'utilisation pour la transfusion était dépassée, proposant ainsi la valorisation d'un produit qui aurait été jeté et sans entrer en compétition avec les besoins transfusionnels (paragraphe I.2.3.2 du Chapitre 2 de la partie introductive). La division Biothérapie de Macopharma s'est récemment positionnée sur ce marché et propose un hPL caractérisé et standardisé de grade clinique (Viau et al., 2017b). La 2nde partie de ma thèse a donc également consisté à comparer l'utilisation du hPL à celle du HS pour l'isolement et l'amplification des cellules hMuStem.

II. Démarche expérimentale

Le détail du matériel et méthodes utilisés étant décrit dans l'article joint ci-après, seul un résumé des principaux points méthodologiques sera présenté ici.

Comme décrit précédemment, le partenariat mis en place avec le CHU de Nantes nous a permis d'obtenir des prélèvements musculaires de muscles posturaux de jeunes patients, ne présentant pas de pathologie musculaire et opérés principalement dans un contexte de scoliose aigüe. La variabilité des échantillons en termes de taille et de qualité a néanmoins engendré une difficulté à obtenir des prélèvements en quantité suffisante pour réaliser différents isolements en parallèle permettant de tester plusieurs conditions. Nous n'avons en effet pu obtenir que 3 biopsies de taille suffisante pour réaliser deux isolements en parallèle pour l'étude comparative du hPL et HS et n'avons donc pas pu comparer directement avec la condition de référence (FBS). Nous avons donc dans un 1^{er} temps comparé les propriétés de trois lots de cellules hMuStem isolées et amplifiées parallèlement en HS (hMuStem cells^{HS}) et en hPL (hMuStem cells^{hPL}), notamment par une étude de prolifération sur le long terme, des analyses phénotypiques (immunocytochimie, cytométrie en flux) ainsi qu'une analyse transcriptomique haut-débit par la technique de DGE-Seq (*digital 3'-gene expression sequencing*). Ce dernier projet a été réalisé dans le cadre d'une collaboration avec la plateforme iPSC de Nantes (IRS-UN, L. David) et pour laquelle nous avons pu bénéficier de l'expertise d'Aurélie Lardenois, bio-informaticienne au sein de l'UMR 703. L'engagement myogénique a été évalué dans des conditions de différenciation spontanée en contexte d'appauvrissement en sérum mais également dans un contexte de co-culture avec une lignée murine dystrophique. Le faible nombre d'échantillons ne nous permettant pas de statuer statistiquement, nous avons ensuite reproduit ces études comparatives sur 6 autres lots de cellules hMuStem, isolées et amplifiées en HS puis maintenues dans cette condition (hMuStem cells^{HS/HS}) ou cultivées en hPL (hMuStem cells^{HS/hPL}). La déplétion ou l'ajout de certains facteurs du hPL (TGF- β 1, fibrinogène, héparine) nous ont par la suite permis d'approfondir les modalités d'utilisation du hPL comme possible alternative pour la culture des cellules hMuStem.

III. Résultats

Dans cette étude, nous comparons les caractéristiques des cellules hMuStem isolées et amplifiées dans deux milieux de culture compatibles avec une application clinique, contenant 10% de HS ou de hPL. Nous montrons dans un 1^{er} temps que ces deux éléments nutritifs sont capables de supporter l'isolement et la prolifération des cellules hMuStem à des taux comparables voire supérieurs à ceux initialement obtenus dans la condition de référence utilisant du FBS. Sur le plan phénotypique, nous établissons qu'à l'image des cellules

hMuStem cells^{FBS}, la population hMuStem cells^{HS} se compose de progéniteurs myogéniques précoces d'origine périvasculaire et mésenchymateuse. Les cellules hMuStem^{hPL} partagent ce phénotype mais sont néanmoins moins engagées dans le programme myogénique, comme le démontre la moindre expression des facteurs de régulation myogénique Myf5, MyoD et le filament intermédiaire desmine. Dans le même sens, alors que nous observons des indices de fusion (FI pour *fusion index*) supérieurs à 17,6 % pour les cellules hMuStem^{HS}, moins de 4,9 % des cellules hMuStem^{hPL} sont capables de fusionner. Seuls 9 gènes sur plus de 14 000 séquencés ont été identifiés par l'étude transcriptomique comme différentiellement exprimés entre les deux conditions de culture, confirmant la proximité des deux populations cellulaires générées. Les capacités de différenciation adipogénique et ostéogénique des cellules sont maintenues dans les deux conditions de culture. Dans un 2nd temps, nous avons statistiquement confirmé les observations précédentes en évaluant l'impact du milieu hPL sur 6 autres lots de cellules hMuStem^{HS}. Alors que le TGF-β1 présent en plus forte quantité dans le hPL que dans le HS ne semble pas être impliqué dans la limitation de la différenciation myogénique, nous avons pu identifier l'héparine comme facteur limitant. Ainsi, l'utilisation de hPL défibrinogéné (hPL^{fd}) permet d'observer des taux de fusion plus élevés (16,5 ± 1,9 %). De façon intéressante, nous proposons également un protocole alternatif en deux étapes comprenant une 1^{ère} étape d'isolement et d'amplification en milieu supplémenté de hPL pour favoriser la prolifération des cellules dans un état peu différencié, puis une 2^{ème} étape de conditionnement pendant un passage en milieu conditionné de hPL^{fd} afin de potentialiser la myogénicité des cellules hMuStem.

IV. Article

Ces résultats font l'objet d'un article soumis à Stem Cell Research and Therapy (Submission ID : SCRT-D-17-00567).

Human serum and platelet lysate are appropriate xeno-free alternatives for clinical-grade production of human MuStem cell batches

Charlotte Saury^{1,2}, Aurélie Lardenois², Cindy Schleder², Isabelle Leroux², Blandine Lieubeau³, Laurent David^{4,5,6}, Laëtitia Guével^{2,7}, Sabrina Viau¹, Bruno Delorme^{1,*} and Karl Rouger^{2,*}

¹ Macopharma, Biotherapy division, Mouvaux, F-59420, France.

² PAnTher, INRA, École Nationale Vétérinaire, Agro-alimentaire et de l'alimentation Nantes-Atlantique (Oniris), Université Bretagne Loire (UBL), Nantes, F-44307, France.

³ IECM, INRA, Oniris, UBL, Nantes, F-44307, France.

⁴ Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie UMR1064, INSERM, UBL, Nantes, F-44093, France.

⁵ Institut de Transplantation Urologie Néphrologie (ITUN), CHU Nantes, Nantes, F-44093, France.

⁶ Inserm UMS016, SFR François Bonamy, iPSC core facility, Nantes, France ; CNRS UMS 3556, Nantes, France ; Université de Nantes, Nantes, France ; CHU Nantes, Nantes, France

⁷ Université de Nantes, UBL, Nantes, F-44000, France.

Corresponding author: Karl Rouger (KR); INRA, UMR 703, École Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes-Atlantique (Oniris), Route de Gachet, CS. 40706, F-44307 Nantes, France.

Phone: +33 (0) 240 687 873; Fax: +33 (0) 240 180 002; E-mail: karl.rouger@inra.fr;

Address reprint requests to Karl Rouger

Abstract

Background: Canine MuStem cells show demonstrated regenerative efficacy in a dog model of muscular dystrophy, and the recent characterization of human counterparts (hMuStem) have highlighted the therapeutic potential of this muscle-derived stem cell population. To date, these cells have only been generated in research-grade conditions. However, evaluation of the clinical efficacy of any such therapy will require the production of hMuStem cells in compliance with good manufacturing practices (GMPs). Because the current use of fetal bovine serum (FBS) to isolate and expand hMuStem cells raises several ethical, safety, and supply concerns, we assessed the use of 2 alternative xeno-free blood derivatives; human serum (HS) and a human platelet lysate (hPL).

Methods: hMuStem cells were isolated and expanded *in vitro* in either HS- or hPL-supplemented media and proliferation rate, clonogenicity, myogenic commitment potential, and oligopotency compared with that observed in FBS-supplemented medium. Flow cytometry and high throughput 3'-digital gene expression RNA-sequencing were used to characterize the phenotype and global gene expression pattern of hMuStem cells cultured with HS or hPL.

Results: HS- and hPL-supplemented media both supported the isolation and long-term proliferation of hMuStem cells. Compared with FBS-based medium, both supplements enhanced clonogenicity and allowed for a reduction in growth factor supplementation. Neither supplement altered the cell lineage pattern of hMuStem cells. *In vitro* differentiation assays revealed a decrease in myogenic commitment and in the fusion ability of hMuStem cells when cultured with hPL. In return, this reduction of myogenic potential in hPL-supplemented cultures was rapidly reversed by substitution of hPL with HS or fibrinogen-depleted hPL. Moreover, culture of hMuStem cells in hPL hydrogel and fibrinogen-depleted hPL demonstrated that myogenic differentiation potential is maintained in heparin-free hPL derivatives.

Conclusion: Our findings indicate that HS and hPL are efficient and viable alternatives to FBS for the preparation of hMuStem cell batches in compliance with GMPs.

Keywords: Adult stem cells, platelet lysate, human serum, muscle disease, cell therapy, good manufacturing practice

Background

In the last decade, the proof of concept of regenerative medicine for muscular dystrophies has been demonstrated using a variety of tissue-resident stem cell populations [1–8]. Preclinical findings have identified certain stem cell populations as promising candidates for the treatment of a variety of devastating and currently incurable diseases [9,10]. Owing to their relative scarcity in adult tissues, generating sufficient numbers of cells for clinical applications involves a protracted *ex vivo* expansion period. Moreover, given that the *in vitro* environment can alter the intrinsic features of stem cells, special care is required to ensure the safety and reparative efficacy of cultured stem cells. It is therefore important to define the appropriate culture conditions required to produce cell batches for clinical use in compliance with Good Manufacturing Practice (GMP) standards [11,12].

Fetal bovine serum (FBS) has been traditionally used *in vitro* as a source of growth factors (GF) and other elements essential for cell adhesion and proliferation [13]. However, its use has raised several concerns in recent years. FBS is not only a potential source of contamination by pathogens such as viruses, mycoplasmas, and prions, but can also increase cell immunogenicity as a result of the internalization of animal proteins during *in vitro* expansion [14–18]. In one cell therapy trial, antibodies against FBS proteins were detected in 1 out of 6 patients following cell infusion [19]. Other disadvantages include the significant batch-to-batch variation of FBS, and the possibility that the growing demand for FBS may soon exceed supply capacity [16,20,21]. Finally, the use of FBS raises several ethical concerns pertaining to serum harvesting practices and animal suffering [16,22]. Taken together, these issues underscore the need for alternative clinically transferable *in vitro* cell expansion protocols. Researchers have sought to develop fully defined media that can efficiently support cell proliferation, but with only partial success [23–25]. A variety of human blood derivatives including serum, platelet, and plasma concentrates have been tested, mainly using mesenchymal stem cells (MSCs). Some authors have proposed the use of human serum (HS) of both autologous and allogeneic origin [26–33], although studies have reported limited growth of MSCs cultured with allogeneic serum [18,31]. While HS of autologous origin may be ideal to avoid potential immune cross-reactions, its use is limited by difficulties associated with the quality control of individual sera and the limited availability of large quantities required for clinical applications [25]. Other proposed alternatives include pooled human AB-serum (*i.e.*, from type AB donors) [26,28,33,34] and human platelet lysate (hPL), which contains a higher concentration of GFs than other serum substitutes such as FBS and

platelet-rich plasma (PRP) [35]. In the case of hPL, heterogeneous biological effects have been reported owing to significant inter-laboratory variability in the preparation processes (resulting in variability in platelet concentrate units and platelet concentrations), as well as the presence of leukocytes, anticoagulants, and activators [36–40]. Both HS and hPL have been widely reported to promote the proliferation of MSCs and to maintain their capacity for multi-lineage differentiation toward adipogenic, osteogenic, and chondrogenic lineages [26,41–46], although certain hPL and PRP preparations may favor osteogenic differentiation [42,47]. Little data has been generated using myogenic cell cultures. Culture of primary human myoblasts in hPL-supplemented media results in poor differentiation, perhaps due to the lack of unidentified myogenesis-promoting factors present in FBS [48]. Mainly due to the presence of platelet-derived growth factor (PDGF), PRP promotes the growth of human muscle-derived progenitor cells (hMDPCs), including pre-plated MDPCs, myo-endothelial cells, and pericytes, while maintaining stemness [49]. Moreover, *in vitro* expansion in PRP-supplemented media causes no changes in the osteogenic, chondrogenic, or myogenic differentiation abilities of hMDPCs, or in their potential for *in vivo* myofiber regeneration. The combination of PRP and decorin, an inhibitor of transforming growth factor beta-1 (TGF- β 1), promotes proliferation and stimulates myogenic commitment in human myoblasts *in vitro* [50]. Finally, in the C2C12 immortalized mouse myoblast cell line, platelet-derived preparations rich in GFs stimulate the expression of late myogenic markers and intermediate filament proteins such as myosin heavy-chain (MyHC), desmin, and vimentin [51].

Based on their initial delayed adhesion properties, we isolated and characterized a population of adult stem cells (named MuStem cells) from healthy dog skeletal muscle, and demonstrated their efficacy following vascular delivery into the clinically relevant dog model of Duchenne Muscular Dystrophy (DMD), in which we observed persistent clinical stabilization and significant muscle repair [52–55]. More recently, we isolated and extensively characterized the human counterparts of these cells (hMuStem cells), and demonstrated their regenerative ability when delivered into injured muscle [56]. Taken together, these preclinical data point to hMuStem cells as a promising therapeutic candidate for patients with muscular dystrophy. However, the aforementioned findings were obtained using hMuStem cells generated in research-grade conditions, limiting their value as supportive data in submissions to regulatory agencies. In this study, we evaluated the effects on hMuStem cell features of 2 human blood derivatives used as FBS substitutes for the culture of stem cells. We evaluated the effects of pooled AB-HS (hereafter referred to as HS) and standardized, commercially available,

clinical-grade hPL on hMuStem cell isolation and on the *in vitro* proliferation rate, clonogenicity, differentiation ability, and phenotype of hMuStem cells.

Methods

Human skeletal muscle tissue

hMuStem cells were isolated from *Paravertebralis* muscle biopsies from 12 patients (aged 13–19 years) who were free of known muscular disease and underwent surgery for acute scoliosis at the Department of Pediatric Surgery of the Centre Hospitalier Universitaire (CHU), Nantes (France) (Table 1). All patients provided written informed consent. All protocols were approved by the Clinical Research Department of the CHU (Nantes, France), in accordance with the rules of the French Regulatory Health Authorities. Biological sample banking was compliant with national guidelines for the use of human tissue for research (Permit numbers: MESR/DC-2010-1199; CPP/29/10).

Table 1. Donor age and sex, and medium type used for *in vitro* preparation of hMuStem cells

ID number	Donor Age	Sex	Nutrient used in medium		Sample name
			Isolation	Expansion	
#1	15	F			hMuStem cells ^{FBS}
#2	15	F	FBS	FBS	
#3	18	M			
#4	13	F			hMuStem cells ^{HS}
#5	15	F	HS	HS	
#6	19	M			
#4	13	F			hMuStem cells ^{hPL}
#5	15	F	hPL	hPL	
#6	19	M			
#7	15	M			hMuStem cells ^{HS/HS}
#8	17	M		HS	
#9	14	F		or	
#10	18	M	HS	or	or
#11	15	F			hMuStem cells ^{HS/hPL}
#12	17	F		hPL	

hMuStem cell isolation and culture

Muscle-derived cells (MDCs) were isolated using either the previously described research-grade protocol [56] or an adapted, GMP-compliant version thereof. Briefly, freshly obtained muscle biopsies were stored for up to 3 days in organ preservation solution (Macopharma, Mouvaux, France) supplemented with 2 IU/mL penicillin / 0.1 mg/mL streptomycin / 0.25 µg/mL amphotericin B (PSF; Sigma-Aldrich, St Louis, USA). Muscle tissue was finely minced using a forceps and scalpel and enzymatically digested (15 min, 37°C) with either a mix of research-grade collagenase type VIII (2,000 U/g of tissue; Sigma-Aldrich) and 0.2% hyaluronidase type-1S (Sigma-Aldrich), or with GMP-compliant collagenase (20 PZ/g of tissue; Cogér, Paris, France). After centrifugation (100 × g, 5 min), the supernatant was neutralized with F12 HAM medium (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) containing either 20% FBS (Eurobio, Les Ulis, France) for the research-grade protocol or 5% HS (EFS, Nantes, France) or 5% hPL (MultiPL'100; Macopharma) for the GMP-compliant protocol. The pellet was digested (30 min, 37°C) with either 0.125% research-grade Pronase E (Sigma-Aldrich) or with GMP-compliant neutral protease (1.5 PZ/g of tissue; Cogér). Digested tissue was then centrifuged (100 × g, 5 min) and the supernatant was pooled with that obtained following the first enzymatic digestion step and centrifuged for an additional 15 min at 300 × g. MDCs were obtained after sequential filtering through 100-, 70- and 40-µm pore-diameter nylon meshes (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) and resuspended in F12 HAM medium containing either 2% FBS, 10% HS, or 10% hPL to assess cell number and viability using Trypan blue exclusion (VWR, Strasbourg, France). hMuStem cells were isolated after 6 days using a modified version of a previously described preplating technique [54,56]. They were cultured under standard conditions (37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂) in growth medium (GM) (Macopharma) supplemented with either 10% FBS / 1% PSF / 10 ng/mL human recombinant basic fibroblast growth factor (bFGF; Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany) / 25 ng/mL human recombinant epidermal growth factor (EGF; Miltenyi) (hMuStem cells^{FBS}), 10% HS / 1% PSF / 10 ng/mL bFGF / 2 ng/mL EGF (hMuStem cells^{HS}), or 10% hPL / 1% PSF / 2 ng/mL EGF (hMuStem cells^{hPL}). Heparin (5 IU/mL; Sanofi-Aventis, Frankfurt, Germany) was added to hPL-supplemented media to prevent gelation of the medium. Cells were seeded on CELLstart™ substrate (Invitrogen) at 2.5×10^3 cells/cm² and GM was replaced twice per week.

Three muscle biopsies (donors #4 to #6) were divided and hMuStem cells (hMuStem cells^{HS} and hMuStem cells^{hPL}; Table 1) were isolated and cultured in parallel using medium supplemented with HS and hPL, respectively. Given the limited number of biopsies of sufficiently large size to divide into 2 parts, 6 other batches of hMuStem cells (donors #7 to #12) were isolated using HS and then cultured either with HS or hPL and analyzed at passage 3 (P3) or 4 (P4) (corresponding to 8.3 ± 0.3 and 12.0 ± 0.3 cumulative population doublings [CPD], respectively). Expanded cells are referred to as hMuStem cells^{HS/HS} and hMuStem cells^{HS/hPL}, respectively (Table 1).

***In vitro* proliferation kinetics**

To define the proliferative properties of hMuStem cells cultured in different conditions, cells were seeded in triplicate at 2.5×10^3 cells/cm² and dissociated with TrypLETM (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA) when the first of the 3 cell layers reached confluence. After centrifugation ($410 \times g$, 10 min), cells were resuspended in appropriate supplemented GM and viable cell number was determined using Trypan blue staining. The number of population doublings (PD) was calculated at each passage using the following formula: $PD = \log(n_f/n_0)/\log(2)$, where n_0 and n_f are the number of cells initially plated and the number of cells harvested at the end of the passage, respectively [57]. The CPD was calculated as the sum of the PD of the passage and those of the previous passages.

Colony-forming unit assay

To evaluate the clonogenic potential of hMuStem cells, colony forming unit (CFU)-assays were performed by plating hMuStem cells^{HS} and hMuStem cells^{hPL} at P4 (corresponding to 13.7–14.5 CPD for highly proliferative batches and 9.6–11.8 CPD for poorly proliferative batches, respectively) in triplicate in gelatin-coated dishes (Corning, New York, USA) at low density (<5 cells/cm²) and in the appropriate supplemented GM. Medium was replaced every 4 days. After 8 days, cell layers were washed with phosphate buffered saline (PBS; PAA, Les Rumeaux, France), fixed with 4% paraformaldehyde (PFA; Sigma-Aldrich) for 10 min, and washed twice with PBS. Colonies were stained with May-Grünwald stain (Sigma-Aldrich) for 5 min at room temperature (RT), washed with distilled water and counterstained with Giemsa (1:20 in PBS; Sigma-Aldrich). The frequency of CFUs was determined as the mean number of cell clusters containing at least 50 cells divided by the number of cells initially seeded and expressed as a percentage.

Flow cytometry analysis

Immunophenotype analyses were performed on expanded hMuStem cells^{HS} and hMuStem cells^{hPL} (P4). Cells were incubated (30 min at 4°C in darkness) with Ab against the appropriate cell-surface marker (Additional file 1: Table S1) and washed 3 times with PBS / 2% HS. Fluorescence minus one control samples using isotype-matched antibody (Ab) were used as negative controls for gating and analyses for multicolor labeling. Labeled cells were acquired using a FACS Aria flow cytometer (BD Biosciences). Data were analyzed using FlowJo software (FlowJo, Ashland, Oregon, USA). At least 10⁴ and 3 × 10⁴ cells were analyzed for single and multicolor labeling protocols, respectively.

Table S1. List of antibodies used for hMuStem cell characterization by flow cytometry analysis

Primary antibody	Compagny and reference	Corresponding isotype
CD13-PE	BD Biosciences, 555392	Mouse IgG1-PE
CD29-PE	BD Biosciences, 555443	Mouse IgG1-PE
CD34-PE	BD Biosciences, 345802	Mouse IgG1-PE
CD44-PE	BD Biosciences, 555479	Mouse IgG2b-PE
CD45-PE	BD Biosciences, 555483	Mouse IgG1-PE
CD56-AF647	BD Biosciences, 562413	Mouse IgG1-AF647
CD73-PE	BD Biosciences, 550257	Mouse IgG1-PE
CD90-PE	BD Biosciences, 555596	Mouse IgG1-PE
CD105-PE	BD Biosciences, 560839	Mouse IgG1-PE
CD140b-PE	BD Biosciences, 558821	Mouse IgG2a-PE
CD144-PE	BD Biosciences, 560410	Mouse IgG1-PE
CD146-PE-Cy7	BD Biosciences, 562135	Mouse IgG1-PE-Cy7
Mouse IgG1 control-PE	BD Biosciences, 555749	N/A
Mouse IgG2b control-PE	BD Biosciences, 555743	N/A
Mouse IgG1 control-PE	BD Biosciences, 557714	N/A
Mouse IgG1 control-PE-Cy7	BD Biosciences, 557872	N/A
Mouse IgG2a control-PE	R&D Systems, IC003P	N/A

Immunofluorescence analysis

hMuStem cells cultured in the different supplemented GM were seeded at 3×10^4 cells/cm² on 4-well μ -slides (Ibidi, Planegg, Germany) coated with CELLstart™ substrate. Twenty-four hours later, cell layers were fixed with 4% PFA (10 min, RT), permeabilized with 0.3% Triton X-100 (20 min, 4°C) and incubated (60 min, RT) in blocking buffer (5% goat serum in PBS). Cells were then incubated with the appropriate Ab (listed in Additional file 2: Table S2). Finally, cells were counterstained (15 min, 37°C) with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) fluorescent cell-permeable DNA probe (Life Technologies Ltd, Paisley, UK). Two large random fields were analyzed and over 331 cells were counted per sample using Fiji image analysis software [58].

Table S2. List of antibodies used for hMuStem cell characterization by immunocytochemistry analysis

Primary antibody	Compagny and reference	Dilution	Incubation time and temperature	Secondary antibody
MYF5	Abcam, Ab125078	1:200	60 min, 37°C	GAR Alexa 488
MYOD	Dako, M3512	1:10	60 min, 37°C	GAM Alexa 488
MYOGENIN	DSHB, F5D	1:10	60 min, 37°C	GAM Alexa 488
DESMIN	Dako, M0706	1:50	60 min, RT	GAM Alexa 488
sMyHC	DSHB, MF20	1:500	60 min, 37°C	GAM Alexa 488
LAMIN A/C	Abcam, Ab108595	1:250	60 min, 37°C	GAR Alexa 550

Reverse-transcription and real-time semi-quantitative PCR

Total RNA was extracted using the RNeasy mini or micro kit following the manufacturer's instructions (Qiagen, Santa Clara, CA, USA), quantified using a NanoDrop spectrophotometer (Labtech, Wilmington, DE, USA) after DNase treatment (Ambion, Austin, TX, USA), and converted to cDNA by reverse transcription as previously described [56]. Oligonucleotide primers used for semi-quantitative RT-PCR analysis of gene expression were designed using Oligo Primer Analysis Software v.7 (Molecular Biology Insights Inc., Colorado Springs, CO, USA) and are listed in Additional file 3: Table S3. Data were

normalized to mRNA levels of the housekeeping gene *RPS18* and were calculated using the $2^{-\Delta Ct}$ method.

Table S3. List of primers used for RT-qPCR analysis

Gene symbol	Type		Sequence	Product (bp)	Accession number
<i>RPS18</i>	Housekeeping gene	For	5'-ACCAAGAGGGCGGGAGAA-3'	85	NM_022551.2
		Rev	5'-CTGGGATCTTGTACTGGCGTG-3'		
<i>MYF5</i>		For	5'-CCACGACCAACCCCAACCA-3'	122	NM_005593.2
		Rev	5'-TCCCGGCAGGCTATAGTAGT-3'		
<i>MYOD1</i>	Myogenic genes	For	5'-TTGCCACAACGGACGACT-3'	120	NM_002478.4
		Rev	5'-AGTGCTCTTCGGGTTTCAGG-3'		
<i>DES</i>		For	5'-TCCAGTCCTACCTGCGAGA-3'	214	NM_001927.3
		Rev	5'-TCCAGGGCCATCTTCACGTT-3'		
<i>PPARG</i>	Adipogenic gene	For	5'-ACTTCTCCAGCATTCTACTCC-3'	217	NM_138712.3
		Rev	5'-ACACGACATTCAATTGCCAT-3'		
<i>IBSP</i>	Osteogenic gene	For	Proprietary information	88	qHSACED0002933
		Rev	Proprietary information		

Digital gene expression sequencing

Total mRNA was extracted from hMuStem cells^{HS} (n=3) and hMuStem cells^{hPL} (n=3) at P4 and processed as described above. RNA integrity was determined using the Agilent Eukaryote Total RNA Nano kit with the 2100 Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA, USA). A high throughput 3' digital gene expression RNA-sequencing (DGE-seq) protocol was performed as previously described [59]. Briefly, the libraries were prepared from 10 ng of total RNA. The mRNA poly(A) tail was tagged with universal adapters, well-specific barcodes, and unique molecular identifiers (UMIs) during template-switching reverse transcription. Barcoded cDNAs from multiple samples were then pooled, amplified, and tagmented using a transposon-fragmentation approach that enriches for 3' ends of cDNA. A library of 350-800 base pairs (bp) was run on an Illumina HiSeq 2500 using a TruSeq Rapid SBS kit (Illumina, San Diego, CA, USA). Sequencing-derived data were deposited in the Gene Expression Omnibus [60] and can be accessed using GEO accession number GSE99085. Read pairs used for analysis fulfilled the following criteria: all 16 bases of the first read must have quality scores of at least 10 and the first 6 bases must correspond exactly to a designed well-specific barcode. The second reads were aligned to RefSeq human mRNA sequences (hg19, obtained

from the UCSC Genome Browser) using bwa version 0.7.4 4 with non-default parameter “-l 24”. Reads mapping to several positions in the genome were filtered out from the analysis. Digital gene expression (DGE) profiles were generated by counting the number of unique UMIs associated with each RefSeq gene for each sample.

Differential gene expression

Differential expression analysis was performed using the DESeq2 Bioconductor package version 1.14.1 [61]. The data were analyzed using a multi-factor design to take into account the differences between patients while estimating the effect attributable to culture conditions. Genes showing significant differences in expression between hMuStem cells^{HS} and hMuStem cells^{hPL} were identified using a fold-change threshold ≥ 2 and an adjusted p-value < 0.05 .

***In vitro* myogenic differentiation**

For myogenic differentiation, hMuStem cells were seeded at 3×10^4 cells/cm² on 24-well plates and cultured in media supplemented with either 10% HS or 10% hPL for 24 hours, after which HS or hPL was replaced with 1% FBS (differentiation medium, DM). After 4 days, cultures were fixed in 4% PFA, and incubated with 5% Triton X-100 (30 min, 4°C), 20% goat serum in PBS (20 min, RT), and finally anti-human sarcomeric myosin heavy chain isoform (sMyHC) Ab (1:500; Developmental Studies Hybridoma Bank/DSHB, Iowa City, IA, USA) for 60 min at 37°C. Specific Ab binding was then visualized using AlexaFluor® 488-coupled secondary Ab (1:500; Invitrogen) and nuclei were counterstained with DRAQ5 (1:1000; Biostatus, Loughborough, UK). The fusion index (FI) was determined as the ratio of nuclei within sMyHC⁺ myotubes (≥ 2 nuclei) to the total number of nuclei. Two random fields in each of 3 replicate wells were analyzed and at least 651 nuclei per well were considered.

The behavior of hMuStem cells was also assessed in co-culture experiments with dystrophic cells (D7 cell line, kindly provided by D. Yaffe from primary culture of an adult 129REJ dy/dy mouse). After expansion in different culture conditions, hMuStem cells and D7 cells were mixed at a ratio of 5:1 for a final density of 3×10^4 cells/cm² in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Invitrogen) / 10% FBS / 1% PSF for 1 day, after which FBS was replaced with 2% horse serum. After 4 days, multinucleated cells were visualized as described above by immunolabeling for sMyHC. Hybrid myotubes were detected using specific human

lamin A/C Ab (1:500; Abcam, Cambridge, UK) and combined with AlexaFluor® 555-coupled secondary Ab (1:200; Invitrogen).

***In vitro* adipogenic and osteogenic differentiation**

hMuStem cells (P4) were seeded in triplicate at 3×10^4 cells/cm² and cultured in appropriate supplemented GM for 1 day, after which they were incubated in specific adipogenic and osteogenic cell induction media for 14 and 21 days, respectively, as previously described [62]. Adipogenic differentiation was determined by the detection of small neutral lipid vesicles after staining with Nile Red and quantified using AdipoRedTM Assay Reagent (Lonza, Walkersville, MD, USA) following the manufacturer's instructions. Osteogenic differentiation was determined by calcium deposit staining with Alizarin Red S (ARS, Sigma) and quantified by optical density (O.D.) measurement after ARS dissolution, measured for each replicate well after extraction using 20% methanol / 10% acetic acid (250 μ L/cm², 15 min at 450 nm), as previously described [63]. Total RNA from undifferentiated and differentiated hMuStem cells was harvested for RT-qPCR analysis. Expression levels of the peroxisome proliferator activated receptor-gamma (PPAR γ) and the integrin binding sialoprotein (IBSP) genes were determined to assess adipogenic and osteogenic differentiation, respectively. Primers are listed in Additional file 3: Table S3.

Statistical analysis

Results are presented as the mean \pm standard deviation (SD) where technical replicates are presented, and as the mean \pm SEM when the number of samples is >3 . Statistical analyses were performed using R software (3.3.2 version). Data were tested for normality and independence before analysis, as previously described [64]. Statistical differences were calculated using a linear mixed effect (LME) model considering the donor as the random term, followed by Tukey's multiple comparison post-hoc test [65]. The Wilcoxon signed rank test or Friedman test followed by Dunn's multiple comparison test were used where appropriate for non-independent or non-normal data. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results

The *in vitro* growth ability of hMuStem cells is unchanged by substitution of FBS with either HS or hPL

To assess the validity of HS and hPL as alternatives to FBS in hMuStem cell culture, we first quantified proliferation rates of 3 hMuStem cells^{FBS} batches cultured in GM supplemented with either 10% HS or 10% hPL, and compared these results with those obtained in GM supplemented with 10% FBS. After 12 days, the number of CPDs recorded was 11.3 ± 0.7 and 10.7 ± 0.9 for hMuStem cells^{FBS} cultured with HS and hPL, respectively, compared with 9.9 ± 0.9 for those cultured in FBS (Fig. 1A). Compared with hMuStem cells^{FBS} cultured with FBS, those cultured with HS exhibited a significantly higher proliferation rate ($p < 0.05$), while that of cells cultured with hPL was unchanged, indicating that both human supplements support hMuStem cell expansion. Interestingly, culture in the research-grade GM in the absence of 10 ng/mL bFGF negatively affected the proliferation of hMuStem cells^{FBS} expanded in HS-supplemented medium, as evidenced by a 33.7% decrease in CPD, an effect not observed in hMuStem cells^{FBS} cultured in hPL-supplemented medium (Fig. 1B). Based on these findings, 2 clinical-grade GM were used in all subsequent *in vitro* experiments, supplemented either with 10% HS / 10 ng/mL bFGF / 2 ng/mL EGF (referred to as HS) or 10% hPL / 2 ng/mL EGF / 5 IU/mL heparin (referred to as hPL).

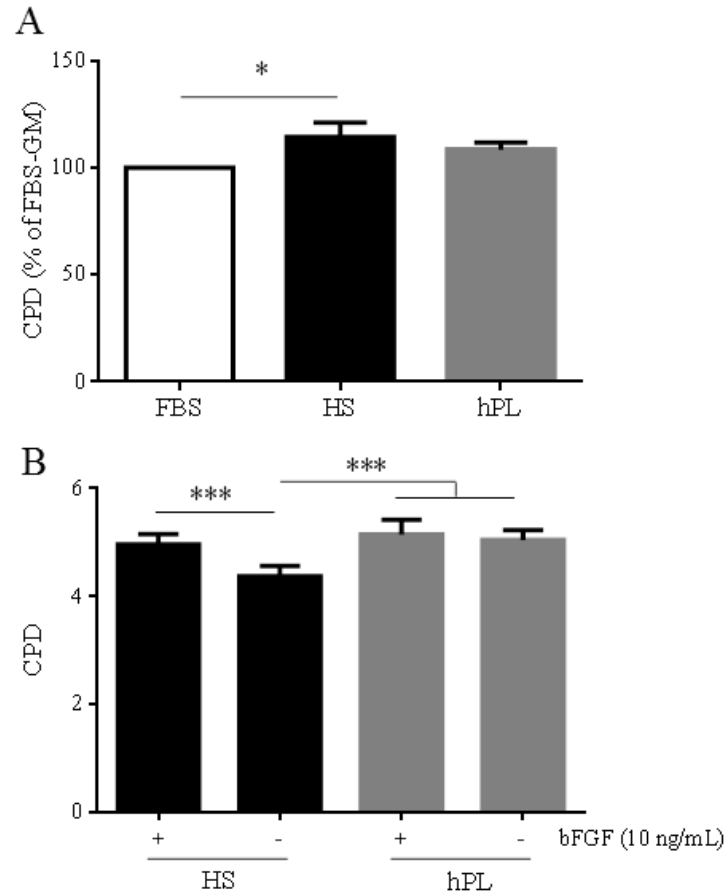


Figure 1. Proliferative behavior of hMuStem cells^{FBS} cultured *in vitro* in HS- or hPL-supplemented medium. (A) hMuStem cells^{FBS} (n=3, donors #1 to #3) were cultured for 14 days in growth medium (GM) supplemented with either 10% FBS, 10% HS, or 10% hPL. Proliferation rates were determined as the mean cumulative population doubling (CPD) number, expressed as a percentage of the corresponding values obtained for FBS-GM (*p<0.05, Friedman test). (B) hMuStem cells^{HS} (n=3, donors #4 to #6) were cultured for 6 days in GM supplemented with either 10% HS or 10% hPL, in the presence or absence of 10 ng/mL bFGF. Proliferation rates were determined as CPD (**p<0.001, LME model followed by Tukey's post-hoc test).

Both HS- and hPL-supplemented media support the isolation and growth of hMuStem cells

Muscle biopsies collected from 3 young donors were each divided to evaluate the isolation and expansion of MuStem cells in HS-GM and hPL-GM (hereafter referred to as hMuStem cells^{HS} and hMuStem cells^{hPL}, respectively) (Table 1). Both cell types began to proliferate after 5 to 7 days, resulting in the formation of pseudo-clonal cultures consisting predominantly of thin fusiform cells, as well as poorly adherent round cells (Fig. 2A, left panels, arrowhead). Over successive passages, the cells displayed a characteristic thin spindle-like morphology, and refringent round cells were consistently observed (Fig. 2A, middle panels, arrowhead in insert), as previously described for hMuStem cells^{FBS} [56]. Compared

with hMuStem cells^{HS}, which tended to rapidly align and occasionally fused spontaneously when highly confluent (Fig. 2, top right panels, arrow), hMuStem cells^{hPL} were smaller and more refractive, and tended to generate multilayer cultures without fusing, regardless of confluence and alignment (Fig. 2, bottom right panels). Next, we examined the direct effect of nutritive supplements on long-term hMuStem cell proliferation. Cells were maintained in their respective GM for up to 40 days and CPD was calculated at each passage. hMuStem cells^{HS} and hMuStem cells^{hPL} derived from donors #4 and #5 homogeneously generated between 31.0-33.8 and 31.4-33.5 CPDs by day 32, respectively (Fig. 2B). By contrast, at the same time point only 15.7 and 16.2 CPDs were recorded for donor #6-derived hMuStem cells^{HS} and hMuStem cells^{hPL}, respectively, indicating more limited proliferative potential. Despite the heterogeneity in intrinsic proliferative potential between cell batches, which is likely associated with patient history, no differences in CPD were observed between cells cultured using the 2 human nutritive substitutes. The clonogenic potential of the 6 hMuStem cell batches was evaluated at P4. The frequency of CFUs corresponded to 43.4% \pm 7.9% and 40.2 \pm 7.1% for hMuStem cells^{HS} and hMuStem cells^{hPL} respectively, suggesting comparable potential to form colonies in both conditions (Fig. 2C).

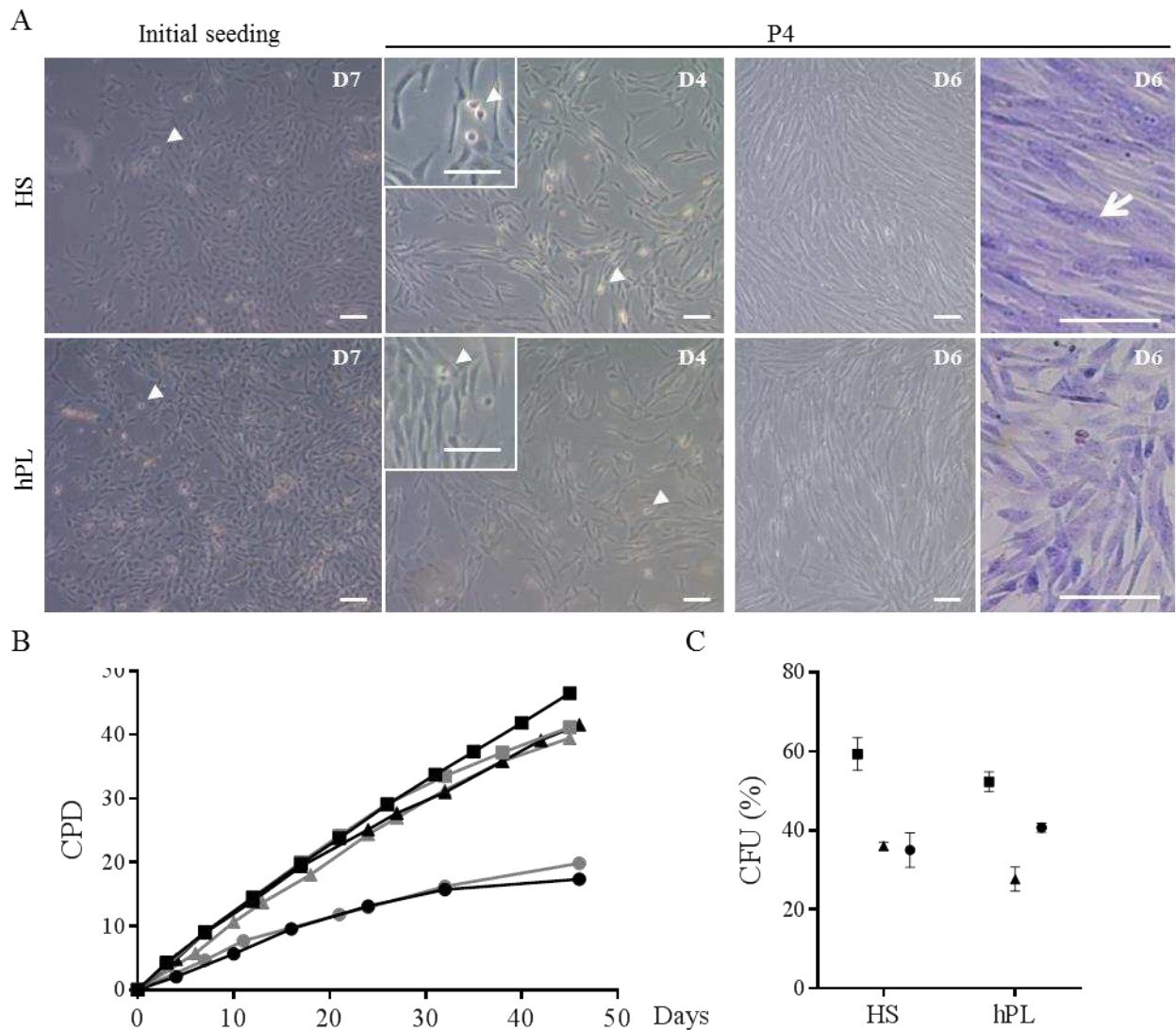


Figure 2. *In vitro* morphological and behavioral features of hMuStem cells^{HS} and hMuStem cells^{hPL}. (A) Phase contrast microscopy images of hMuStem cells^{HS} (upper panels) and hMuStem cells^{hPL} (lower panels) 7 days after initial seeding (left panels) and after 4 passages (P4). Cultures consisted primarily of spindle-shaped cells, as well as a small number of poorly adherent round cells (arrowheads). At P4, cells were cultured until reaching confluence and spontaneous fusion in hMuStem cells^{HS} was assessed at day 6 by May-Grünwald Giemsa staining of multinucleated cells (arrow, top right panels). No multinucleated cells were observed in hMuStem cells^{hPL} (bottom right panels). Scale bar, 100 μ m. (B) Long-term proliferation kinetics of cultured hMuStem cells^{HS} (black) and hMuStem cells^{hPL} (grey) from 3 independent donors. (C) Frequency of colony-forming units (CFU) in hMuStem cells^{HS} and hMuStem cells^{hPL} at P4. Data are presented as the mean \pm SD for each donor. Donors #4, #5, and #6 are represented by squares, triangles and circles, respectively.

hMuStem cells^{HS} and hMuStem cells^{hPL} share a similar mesenchymal/perivascular phenotype but have distinct myogenic signatures

hMuStem cells^{FBS} have been described as early myogenic progenitor cells of perivascular origin [56]. We investigated whether hMuStem cells cultured in HS-GM or hPL-GM shared a similar phenotype. Flow cytometry analysis revealed that hMuStem cells^{HS} and hMuStem

cells^{hPL} (n=3, P4) abundantly expressed (>99%) the typical MSC markers CD29, CD44, CD73, CD90, and CD105 (Fig. 3A), but were negative for classical hematopoietic (CD34, CD45) [66,67] and endothelial (CD144) cell markers (Fig. 3B), in agreement with previous observations in hMuStem cells^{FBS} [56]. As expected, the fraction of neural cell adhesion molecule (NCAM)/CD56⁺ cells was significant in all batches, with CD56⁺ cells accounting for 71%-99% of the entire population (Fig. 3C). The percentage of CD56⁻ cells was always slightly reduced in hMuStem cells^{hPL} versus hMuStem cells^{HS}; the CD56⁻ population was even undetectable in one sample (donor #6). In both hMuStem cells^{HS} and hMuStem cells^{hPL}, 2 populations were identified among CD56⁻ cells, depending on their expression of CD140b. A significant proportion of CD56⁻/CD140b⁺ cells expressed CD146, regardless of culture conditions (data not shown). Culture in HS-GM and hPL-GM poorly affected the expression by CD56⁺ cells of the well-known perivascular cell markers CD140b and CD146 (Fig. 3D). CD140b expression in CD56⁺ cells was low to moderate. In 2 samples (donors #4 and #5), CD56⁺ cells exhibited homogeneous expression of CD146 in both culture conditions, while in one sample (donor #6) the percentage of CD146⁺ cells was 44% in hMuStem cells^{HS} and 63% in hMuStem cells^{hPL}. Taken together, these results indicate that hMuStem cells cultured in HS-GM or hPL-GM share a similar phenotype, although culture in hPL resulted in a slightly less heterogeneous cell population. The main source of variation was the donor. The myogenic profile of hMuStem cells^{HS} and hMuStem cells^{hPL} was further analyzed based on their expression of the myogenic regulatory factors (MRFs) Myf5 and MyoD, and of muscle-specific intermediate filament desmin. We found that the proportions of Myf5⁺, MyoD⁺, and desmin⁺ cells were consistently smaller in hMuStem cells^{hPL} versus hMuStem cells^{HS}, which exhibited fold decreases of 2.6-3.0, 4.0-15.4, and 1.3-1.4, respectively (Fig. 3E-G). These data suggest that commitment to the myogenic lineage is reduced in hMuStem cells isolated and expanded in hPL-GM versus HS-GM.

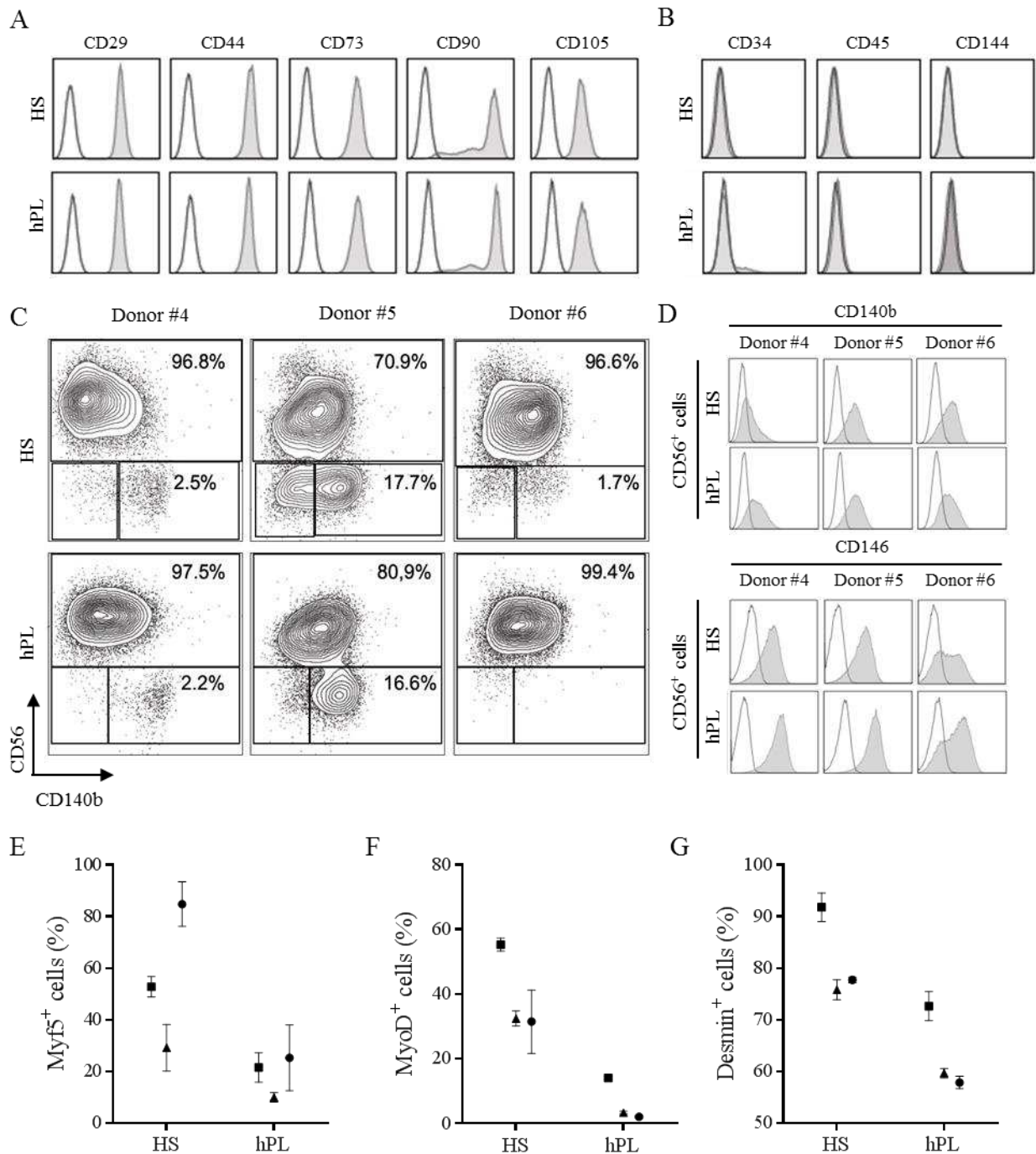


Figure 3. Phenotypic profile of hMuStem cells^{HS} and hMuStem cells^{hPL}. Flow cytometry comparison of mesenchymal (CD29, CD44, CD73, CD90 and CD105) (A), hematopoietic (CD34, CD45), and endothelial (CD144) (B) cell lineage markers in hMuStem cells^{HS} and hMuStem cells^{hPL}. The results of one representative donor out of 3 independent donors are presented. Myogenic (CD56) and perivascular (CD140b and CD146) cell lineage markers were analyzed either in the entire viable cell population (C) or in CD56⁺ cell subsets (D). Results are presented for 3 independent donors. Immunocytochemistry analysis of the myogenic regulatory factors (MRF) Myf5 (E), MyoD (F), and desmin (G) in hMuStem cells^{HS} and hMuStem cells^{hPL}. The proportions of positive cells recorded for 3 independent donors are presented. Donors #4, #5, and #6 are represented by squares, triangles, and circles, respectively. Data are presented as the mean \pm SD for each donor.

To further evaluate the effects of the nutritive substitutes HS and hPL on global gene expression in hMuStem cells, a DGE-seq protocol was performed. Of the 14,936 genes detected in at least 1 out of the 6 cell batches (hMuStem cells^{HS}, n=3; hMuStem cells^{hPL}, n=3), few differentially expressed genes were identified (Additional file 4: Table S4). The volcano plot in Figure 4 illustrates the general gene expression pattern in the 2 hMuStem cell preparations. Statistically significant differences in expression were assessed using a 2-fold change threshold associated with an adjusted p-value <0.05. Only 8 genes fulfilled these conditions, indicating very limited differences in the effects of the 2 human nutritive substitutes on gene expression in hMuStem cells. It should be noted that these genes did not correspond to any of the classical targets used to define cell lineage, including the genes included in the panel used for cytometry analysis in the present study. Five genes, corresponding to membrane metallo-endopeptidase (*MME*), thioredoxin interacting protein (*TXNIP*), mitogen-activated protein kinase 4 (*MAP4K4*), laminin subunit alpha 4 (*LAMA4*), and secretogranin II (*SCG2*) were upregulated in hMuStem cells^{hPL} versus hMuStem cells^{HS}. Previous studies have described heparin-induced induction of *TXNIP* and an interaction between heparin and *LAMA4* [68,69]. As such, the upregulation of these genes may be a result of the presence of heparin in hPL-GM. On the other hand, genes encoding the coagulation factor XIII A Chain (*F13A1*), methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2 (or NADP-dependent methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2-like protein) (*MTHFD2*), and the myogenic marker myosin light chain 2 (*MYL2*) were downregulated in hMuStem cells^{hPL} versus hMuStem cells^{HS}. Together, the results of cytometry, immunocytochemistry, and DGE-seq analysis show that while the mesenchymal/perivascular phenotype is maintained in hMuStem cells expanded in HS-GM or hPL-GM, hMuStem cells^{hPL} tend to display reduced myogenic commitment compared with hMuStem cells^{HS}.

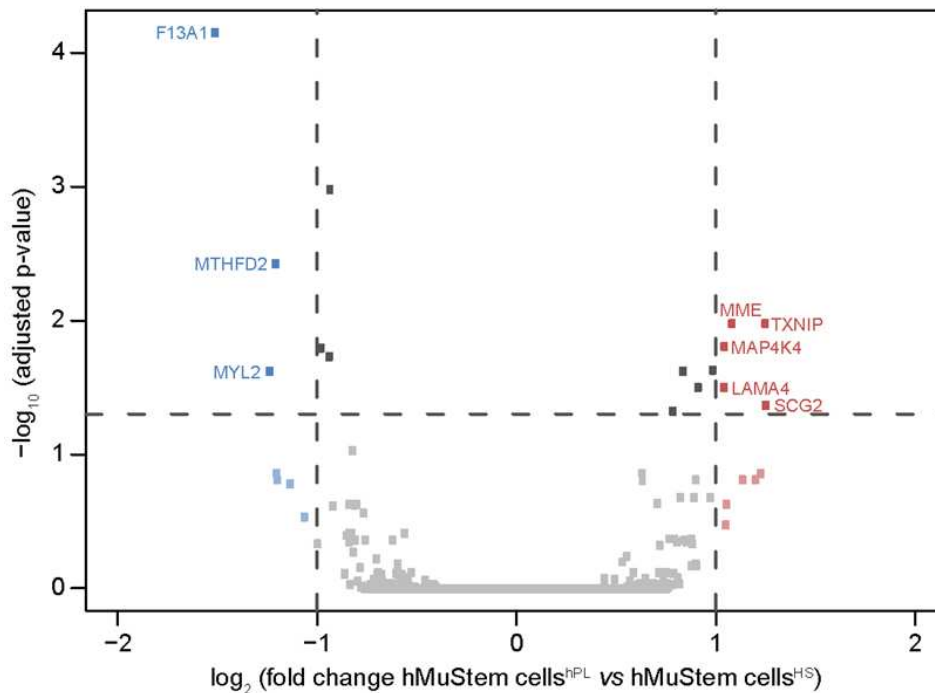


Figure 4. Differential gene expression in hMuStem cells^{HS} and hMuStem cells^{hPL} detected by digital gene expression-sequencing. The 14,936 expressed genes are represented by squares. Vertical dashed lines indicate cutoff values for significant fold-change (≤ 0.5 or ≥ 2). Blue squares represent downregulated genes (\log_2 (fold-change) ≤ -1) and red squares represent upregulated genes (\log_2 (fold-change) ≥ 1). The horizontal dashed line represents the adjusted p-value cutoff (adjusted p-value < 0.05). Gene names are specified for the 8 genes that showed significant differences in expression between hMuStem cells^{HS} and hMuStem cells^{hPL}.

hMuStem cells^{HS} and hMuStem cells^{hPL} are oligopotent cells with distinct myogenic commitment capabilities

Like canine MuStem cells [54], *in vitro* characterization of hMuStem cells^{FBS} has revealed a high myogenic differentiation potential [56]. After 4 days in DM, immunocytochemistry revealed that the proportions of MyoD⁺ and myogenin⁺ cells were consistently smaller in hMuStem cells^{hPL} versus hMuStem cells^{HS}, in which fold decreases of 1.2-2.5 and 2.1-3.9, respectively, were observed (Fig. 5A). Thus, as observed in cells expanded in GM, the proportion of cells positive for myogenic markers in DM was lower in hMuStem cells isolated and expanded in hPL than in HS. The fusion index (FI), corresponding to the percentage of nuclei inside multinucleated cells expressing sarcomeric myosin heavy chain (sMyHC), reached 17.6%-22.2% in hMuStem cells^{HS} and 2.3%-4.9% in hMuStem cells^{hPL}, suggesting that the ability to fuse is reduced in cells cultured in hPL versus HS (4.1-9.7 fold change), an effect that may be related to the reduced myogenic commitment of the former.

To further investigate these apparent differences in fusion rates, co-culture experiments were performed with the D7 dystrophic mouse cell line. Hybrid myotubes (*i.e.*, containing human and mouse nuclei) (Fig. 5B, arrow), were observed in cultures of both hMuStem cells^{HS} and hMuStem cells^{hPL}, confirming the ability of these cells to fuse. Human nuclei located in sMyHC⁺ myotubes accounted for 33.4%-42.3% and 22.6%-32.0% of all nuclei in D7 co-cultures with hMuStem cells^{HS} and hMuStem cells^{hPL}, respectively. Moreover, cells cultured with hPL displayed reduced fusion ability compared with those cultured with HS (1.3-1.5 fold change), even though they fused more efficiently when co-cultured with the D7 cell line than when cultured alone in DM (FI: 22.6%-32.0% versus 2.3%-4.9%). Taken together, these results suggest that hMuStem cells^{hPL} are less capable of spontaneously differentiating into myogenic cells than hMuStem cells^{HS}, which showed a differentiation potential similar to that of hMuStem cells^{FBS} [56]. Nonetheless, hMuStem cells^{hPL} were capable of efficiently fusing and generating myotubes when co-cultured with the D7 cell line.

hMuStem cells^{FBS} have been previously described as oligopotent cells based on their ability to differentiate into osteogenic and adipogenic lineages as well as the myogenic lineage [56]. Given the aforementioned differences observed in the myogenic commitment capabilities of hMuStem cells^{HS} and hMuStem cells^{hPL}, we next investigated their ability to differentiate into osteogenic and adipogenic lineages. After 14 days in adipogenic induction medium, fluorescent Nile Red staining revealed the presence of cytoplasmic accumulations of small lipid vesicles in cells from all batches, regardless of isolation and culture conditions (Fig. 6A). Relative quantification of Nile Red staining revealed no significant differences between culture conditions. Alizarin Red S staining revealed the formation of calcium deposits in all cultures after 21 days in osteogenic induction medium (Fig. 6B). Relative quantification revealed that the numbers of calcium deposits in hMuStem cells^{hPL} were comparable to or less than those observed in hMuStem cells^{HS} cultures (Fig. 6B). These results suggest that both hMuStem cells^{HS} and hMuStem cells^{hPL} maintain their ability to differentiate into adipogenic and osteogenic lineages, even though hPL may have a partial suppressive effect on osteogenic differentiation, as also observed for myogenic differentiation.

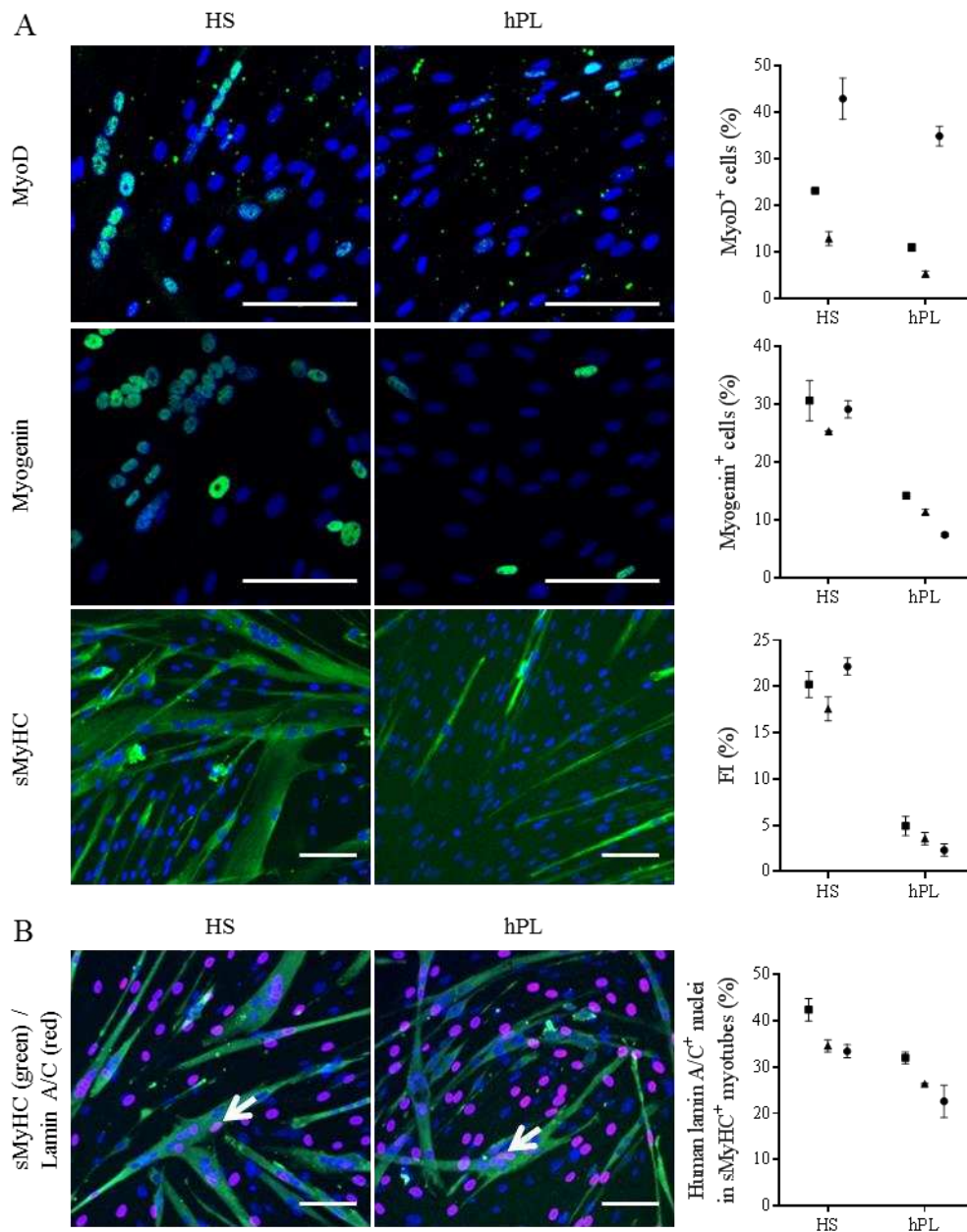


Figure 5. Myogenic differentiation potential of hMuStem cells^{HS} and hMuStem cells^{hPL}. (A) The myogenic differentiation potential of hMuStem cells isolated and expanded either with HS (hMuStem cells^{HS}) or hPL (hMuStem cells^{hPL}) was determined at P4 (n=3, donors #4 to #6). Cells expressing the myogenic markers MyoD and myogenin were counted and the fusion index (FI) calculated as the percentage of nuclei identified in sarcomeric myosin heavy chain-positive (sMyHC⁺) myotubes. (B) The contribution of hMuStem cells to myogenesis was also evaluated in co-culture experiments with mouse D7 cells. The number of human laminin A/C⁺ nuclei (arrow) within hybrid sMyHC⁺ myotubes was counted. Nuclei were counterstained with DAPI or DRAQ5 (blue). Donors #4, #5, and #6 are represented by squares, triangles, and circles, respectively. Data are presented as the mean \pm SD for each donor. Scale bar, 100 μ m.

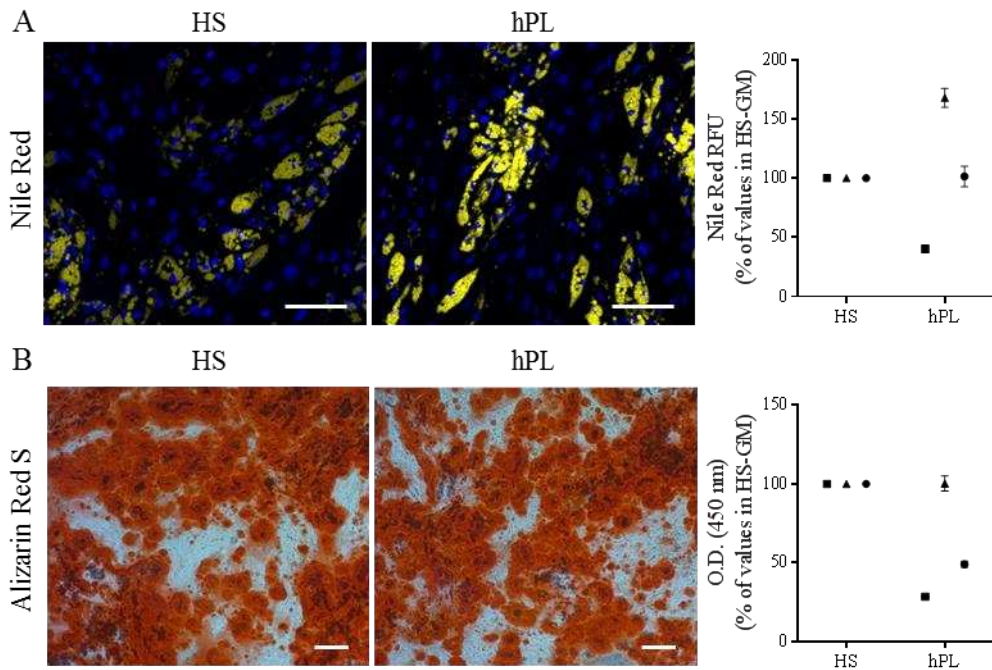


Figure 6. Adipogenic and osteogenic differentiation potential of hMuStem cells^{HS} and hMuStem cells^{hPL}. The adipogenic (A) and osteogenic (B) differentiation potential of hMuStem cells isolated and expanded with either HS or hPL (n=3, donors #4 to #6) was evaluated at P4. (A) Intracytoplasmic lipid vesicles, visualized by Nile Red staining, were quantified after 14 days in adipogenic induction medium. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Staining was quantified using the AdipoRedTM assay. (B) After 21 days in specific induction medium, osteogenesis was evaluated by Alizarin Red S staining (ARS) of calcium deposits. Staining was quantified by optical density (O.D.) measurement after ARS dissolution. Scale bar, 100 μ m. Donors #4, #5, and #6 are represented by squares, triangles, and circles, respectively. Data are presented as the mean \pm SD for each donor.

Effect of hPL on the oligopotency of hMuStem cells^{HS}

The results described above, based on MuStem cells obtained from only 3 donors, suggest that culture of hMuStem cells with hPL reduces the myogenic commitment capability of these cells, as well as their ability to differentiate into myogenic and osteogenic lineages. We hypothesized that the differences observed were due to the type of nutritive substitute used during *in vitro* expansion rather than intrinsic properties of MuStem cells^{HS} and MuStem cells^{hPL}. To confirm this hypothesis, 6 additional batches of hMuStem cells^{HS} (P4) were cultured for 2 passages in either HS-GM or hPL-GM. The experiments described above for hMuStem cells^{HS} and hMuStem cells^{hPL} were repeated for each of these batches (hereafter referred to as hMuStem cells^{HS/HS} and hMuStem cells^{HS/hPL}, respectively) (Table 1).

As shown in Figure 7A, mRNA expression levels of *MYF5*, *MYOD1*, and *DES* were 1.5-, 1.9- and 1.7-fold lower, respectively, in hMuStem cells^{HS/hPL} versus hMuStem cells^{HS/HS} (p<0.05). At the protein level, 40.6% \pm 3.2%, 20.7% \pm 2.9%, and 92.1% \pm 2.3% of hMuStem cells^{HS/HS}

were positive for Myf5, MyoD, and desmin, respectively, compared with only $30.7\% \pm 4.5\%$, $9.1\% \pm 1.2\%$, and $74.0\% \pm 4.0\%$ of hMuStem cells^{HS/hPL} (Fig. 7B, $p < 0.05$). After 4 days in DM, MyoD and myogenin were expressed in $23.5\% \pm 3.2\%$ and $18.3\% \pm 1.8\%$ of hMuStem cells^{HS/HS}, respectively, whereas only $11.6\% \pm 1.7\%$ and $5.2\% \pm 0.5\%$ of hMuStem cells^{HS/hPL} expressed these proteins (Fig. 7C, D, $p < 0.05$). In line with our observations in hMuStem cells^{HS} and hMuStem cells^{hPL}, the FI values recorded for hMuStem cells^{HS/HS} and hMuStem cells^{HS/hPL} were $18.2\% \pm 3.3\%$ and $2.1\% \pm 0.8\%$, respectively (Fig. 7E, $p < 0.05$). In D7 co-culture experiments performed with hMuStem cells^{HS/HS} and hMuStem cells^{HS/hPL}, we detected $34.3\% \pm 2.3\%$ and $14.8\% \pm 2.2\%$, respectively, of human nuclei in sMyHC⁺ myotubes (*i.e.*, a lower percentage in cells cultured in hPL versus HS) (Fig. 7F, $p < 0.05$). Analysis of adipogenic differentiation potential revealed no significant differences in lipid vesicle staining or *PPAR* γ mRNA expression between culture conditions, confirming the maintenance of adipogenic potential in both hMuStem cells^{HS/HS} and hMuStem cells^{HS/hPL} (Fig. 8A, B). Alizarin Red S staining revealed reduced mineralization in hMuStem cells^{HS/hPL} versus hMuStem cells^{HS/HS} (Fig. 8C), confirming the impact of hPL on the osteogenic potential of hMuStem cells, whether included before hMuStem cell isolation or added afterwards. However, we observed no significant differences between hMuStem cells^{HS/hPL} and hMuStem cells^{HS/HS} in mRNA expression of the *IBSP* gene, a classical marker of osteogenic differentiation (Fig. 8D), suggesting a moderate effect of hPL. Overall, these results corroborate the reduced myogenic commitment capability previously observed in hMuStem cells isolated and cultured with hPL, but indicate no major effect of culture condition on adipogenic and osteogenic differentiation potential.

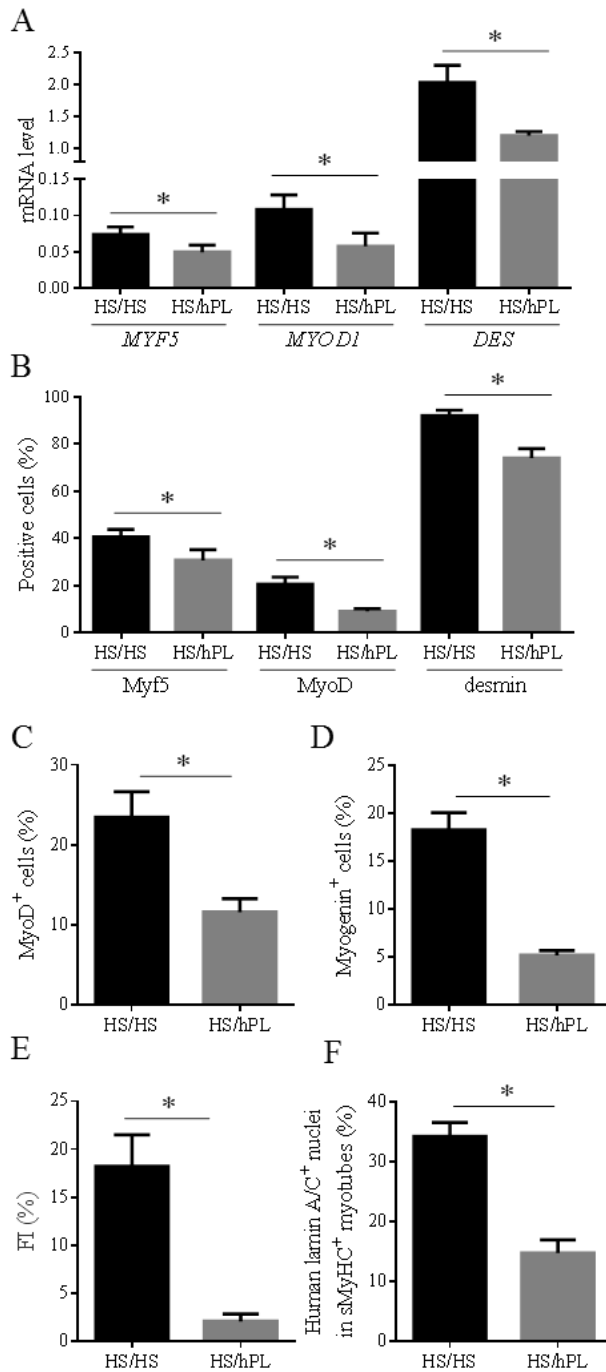


Figure 7. Influence of hPL on the myogenic differentiation potential of hMuStem cells^{HS}. hMuStem cells^{HS} (n=6, donors #7 to #12) at P3–4 were cultured for 2 passages with HS (hMuStem cells^{HS/HS}) or with hPL (hMuStem cells^{HS/hPL}) and the resulting myogenic pattern evaluated. Myogenic commitment was assessed by determining mRNA expression levels of the MRFs *MYF5*, *MYO1*, and *DES* (A), as well as the proportion of cells positive for each of these markers (B). Myogenic differentiation potential was assessed by quantification of cells expressing MyoD (C) and myogenin (D), and by determining the fusion index (FI), defined as the percentage of nuclei identified in sarcomeric myosin heavy chain-positive (sMyHC⁺) myotubes (E). The influence of hPL on contribution of hMuStem cells to myogenesis was evaluated in co-culture experiments with mouse D7 cells by quantification of human lamin A/C⁺ nuclei within hybrid sMyHC⁺ myotubes (F). Data are presented as the mean ± SEM (*p<0.05, Wilcoxon matched-pairs signed rank test).

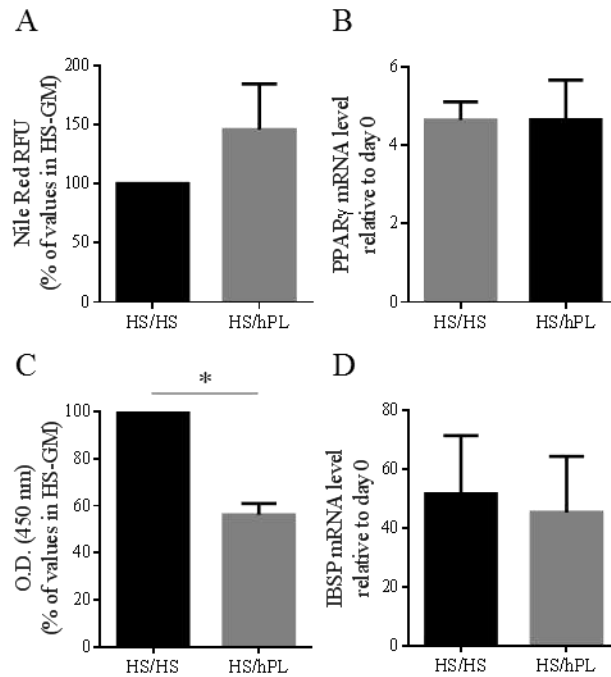


Figure 8. Influence of hPL on the adipogenic and osteogenic differentiation potential of hMuStem cells^{HS}. hMuStem cells^{HS} (n=6, donors #7 to #12) at P3–4 were cultured for 2 passages with HS (hMuStem cells^{HS/HS}) or with hPL (hMuStem cells^{HS/hPL}) and their potential to differentiate to adipogenic and osteogenic lineages in specific induction media was evaluated. The presence of intracytoplasmic lipid vesicles, visualized by Nile Red staining, was assessed after 14 days in adipogenic induction medium. Staining was quantified using the AdipoRedTM assay (A) and mRNA levels of PPAR γ were quantified (B). After 21 days in specific induction medium, osteogenesis was evaluated by Alizarin Red S staining (ARS) of calcium deposits. Staining was quantified by optical density (O.D.) measurement after ARS dissolution (C) and mRNA levels of IBSP were quantified (D). Data are presented as the mean \pm SEM (*p<0.05, Wilcoxon matched-pairs signed rank test).

Heparin and fibrinogen exert inhibitory effects on myogenic differentiation

In terms of content, one major difference between the 2 human nutritive substitutes used in the present study is the presence in hPL of plasma fibrinogen and of heparin, which is required to avoid gelation of the medium. In light of previous studies suggesting that heparin concentration may affect stem cell proliferation and/or differentiation [70,71], we investigated the effects of heparin on myogenic commitment in MuStem cells. hMuStem cells^{HS} were cultured in the presence of increasing doses of heparin (0.5-5 IU/mL), with the highest dose corresponding to that found in hPL-GM. Culture for 6 days in GM in the presence of heparin gave rise to fewer and smaller myotubes, even at the lowest dose, as illustrated in Figure 9A for the 0.5 IU/mL dose. The FI of hMuStem cells^{HS} was 22.9% \pm 1.4%, and ranged from 13.2% \pm 1.0% to 16.2% \pm 1.9% in the presence of heparin, revealing a negative, dose-independent effect of heparin on the fusion ability of hMuStem cells^{HS} (Fig. 9B).

Interestingly, in a parallel experiment in which hMuStem cells^{HS} were cultured for 6 days in hPL containing the same range of doses of heparin, the drastically reduced FI value observed in cells cultured with the same dose of heparin as found in hPL-GM (5 IU/mL, 2.3% ± 0.4%) did not differ significantly from that observed for the lowest dose (0.5 IU/mL, 5.6% ± 0.4%) (Fig. 9A, B). We also found that the addition of heparin to HS-GM did not repress myogenic differentiation to the same extent as when added to hPL. Thus, FI values for heparin-containing HS-GM were significantly higher than those recorded for hPL-GM, independent of heparin dose.

We next investigated the myogenic differentiation potential of hMuStem cells in heparin-free hPL-GM. hMuStem cells^{HS} were plated on CELLstart™ substrate-coated plates and covered with nutritive gel (hPL^{gel} condition). In this condition, we recorded an FI of 14.9% ± 1.6%, as compared with 5.6% ± 0.4% in presence of 0.5 IU/mL heparin, indicating a significant inhibitory effect of heparin on myogenic differentiation ($p < 0.001$) (Fig. 9A, C). Nonetheless, these FI values were significantly lower than those obtained with HS-GM (22.9% ± 1.4%, $p < 0.001$), suggesting that the reduction in myogenic differentiation may not be entirely attributable to heparin. We next investigated the effects of culture in fibrinogen-depleted hPL-GM (hPL^{fd}), produced by the addition of a calcification step to the hPL production process, circumventing the need for heparin supplementation. Myogenic differentiation potential was evaluated after one passage of 6 days in either HS-GM, hPL-GM, or hPL^{fd}-GM (Fig. 9A, C). Compared with hMuStem cells^{HS} (FI = 22.9% ± 1.4%), the fusion capacity of hMuStem cells^{HS/hPL} remained low (FI = 2.3% ± 0.4%), while that of hMuStem cells^{HS/hPL^{fd}} was significantly higher (FI = 16.5 ± 1.9%, $p < 0.001$) but still significantly lower than that of hMuStem cells cultured in HS-GM ($p < 0.01$). These results indicate that myogenic differentiation potential is maintained in heparin-free hPL, but is lower than that observed in cells cultured in HS. These findings confirm the role of heparin in the suppressive effect of hPL on myogenic differentiation of hMuStem cells, but do not rule out the potential contribution of other factors.

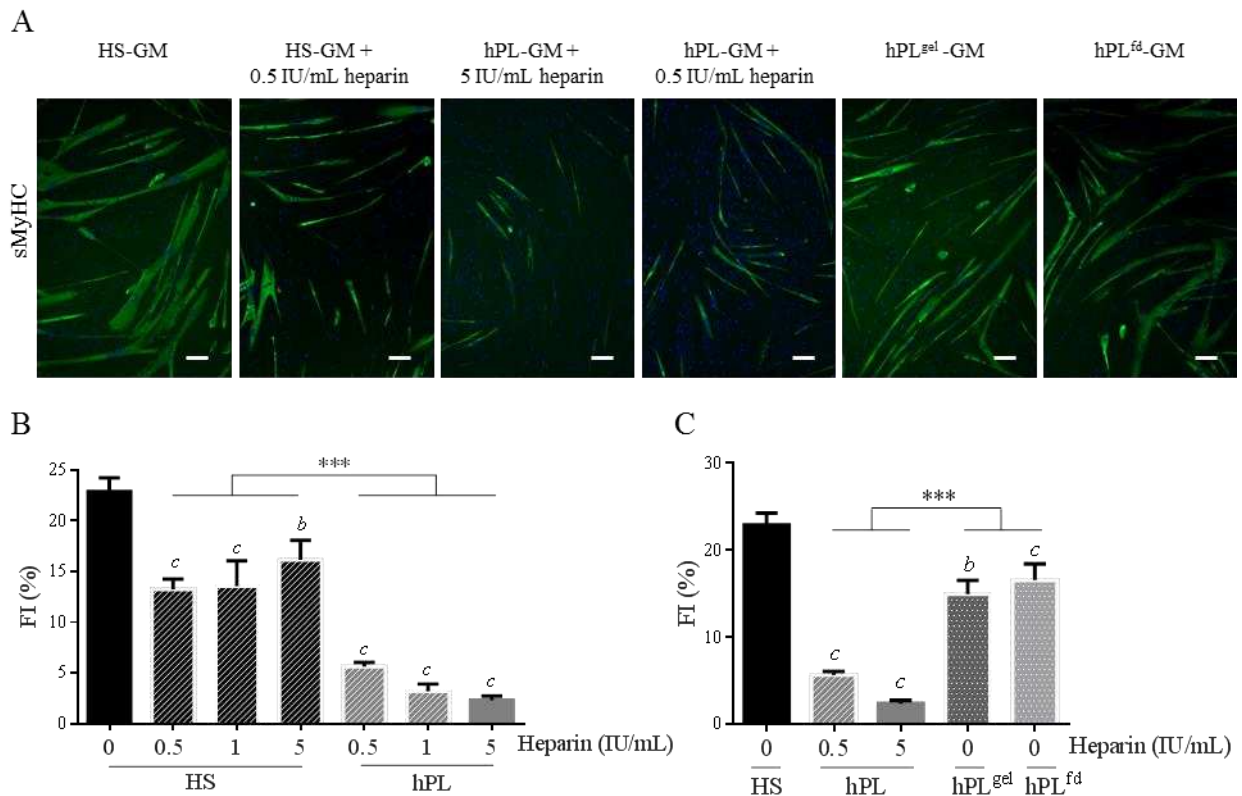


Figure 9. Influence of heparin and heparin-free hPL-supplemented media on the myogenic potential of hMuStem cells. hMuStem cells^{HS} were cultured for 6 days in HS-GM or hPL-GM in the absence or presence of increasing doses of heparin (0.5-5 IU/mL), or in heparin-free hPL alternatives, and then seeded for evaluation using the myogenic differentiation assay. (A) Immunolabelling of sMyHC was performed after 4 days in myogenic differentiation medium. Nuclei were counterstained with DRAQ5 (blue). Scale bar, 100 μ m. FI was determined in 3 independent cell batches cultured with HS or hPL in the presence of increasing doses of heparin (B) or in heparin-free hPL alternatives; heparin-free hPL that was allowed to form a nutritive gel over the cell layer (hPL^{gel}), or heparin-free fibrinogen-depleted hPL (hPL^{fd}) (C). Data are presented as the mean \pm SEM (^b $p < 0.01$, ^c $p < 0.001$ vs HS-GM; ^{***} $p < 0.001$; LME model followed by Tukey's post-hoc test).

The suppressive effect of hPL on the myogenic differentiation potential of hMuStem cells is reversible

To complete our characterization of the suppressive effect of hPL on the myogenic potential of hMuStem cells, hMuStem cells^{hPL} (P3) were cultured for the 4th passage (5 or 6 days) with either hPL, HS, or heparin-free hPL (hPL^{fd} or hPL^{gel}). Myogenic differentiation was assessed at the end of P4 (Fig. 10). As described above, hMuStem cells^{hPL} displayed a significantly lower fusion capacity than hMuStem cells^{HS} (FI, $3.1 \pm 1.3\%$ vs $25.4\% \pm 1.3\%$). Interestingly, FI values recorded for hMuStem cells^{hPL} cultured in HS-GM and hPL^{fd}-GM ($18.7\% \pm 2.3\%$ and $17.2\% \pm 3.1\%$, respectively) were higher than those of cells cultured with hPL ($p < 0.001$). This indicates that the suppressive effect of hPL on the myogenic potential of hMuStem

cells^{hPL} is reversible. Interestingly, no significant differences in FI values were observed between hMuStem cells^{HS} and hMuStem cells^{hPL/HS}. However, the FI for hMuStem cells^{hPL} cultured in hPL^{gel} did not differ significantly from that observed in the initial hPL-GM. Together, these results suggest that the impairment of myogenic commitment in hMuStem cells^{hPL} can be reversed by passage in HS-GM or in hPL^{fd}-GM.

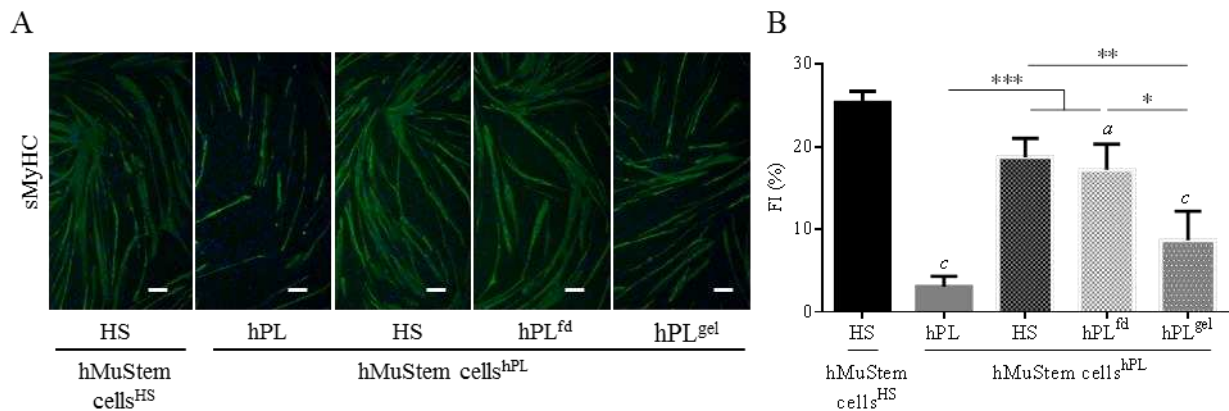


Figure 10. Reversal of the suppressive effect of hPL on the myogenic potential of hMuStem cells. hMuStem cells^{hPL} were cultured up to P3 in the appropriate GM and then passaged to HS-GM or heparin-free hPL-GM (hPL^{fd} or hPL^{gel}), after which myogenic differentiation was assessed. (A) sMyHC immunolabeling of was performed after 4 days of culture in fusion-promoting low-serum medium. Nuclei were counterstained with DRAQ5 (blue). Scale bar, 100 μ m. (C) Determination of FI in 6 independent cell batches. Data are presented as the mean \pm SEM (^a $p < 0.05$, ^c $p < 0.001$ vs HS; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; LME model followed by Tukey's post-hoc test).

Discussion

Over the past 6 years, several studies have demonstrated the clinical efficacy of MuStem cell treatment to repair muscle tissue, highlighting the potential of this muscle-derived stem cell population in cell-based therapies [52–55]. Characterization of this cell agent as a potential therapeutic product requires analysis of its biological features following preparation in clinically compatible culture conditions. hMuStem cells have been previously isolated, expanded, and characterized using FBS-supplemented growth culture media [56], and FBS is still used in the manufacture of cell products tested in clinical trials. However, the identification of suitable alternatives for the production of hMuStem cell batches has become a key research focus, given the inherent risks associated with the use of a xenogeneic serum source and likely future shortages with increasing demand [21,72,73].

Potential FBS substitutes evaluated to date include HS and platelet derivatives such as PRP and hPL, which efficiently support and generally promote *in vitro* proliferation of MSCs

derived from bone marrow [26,31,45,74,71], adipose tissue [28], and other tissue sources [34]. The few studies that have evaluated the viability of HS and platelet derivatives in myogenic cell cultures have reported conflicting results [48–51,75]. Here, we demonstrate for the first time that supplementation of human MuStem cells in primary cultures with either 10% HS or 10% hPL results in a proliferation rate comparable to that obtained with 10% FBS supplementation. Moreover, the clonogenic potential of MuStem cells cultured in our experimental conditions was greater than that described in FBS-supplemented cultures [56], corroborating the pro-proliferative effects of these 2 nutritive supplements. Owing to the GF content of HS and hPL, the use of these supplements allowed for a reduction in the concentration of EGF in GM, and of the removal of bFGF in the case of hPL-supplemented media, with no negative impact on proliferation. Given the interest in limiting the number of products required for cell batch preparation, HS and hPL show significant promise for the production of hMuStem cell products. Furthermore, the use of human blood derivatives like hPL, which can be standardized by pooling numerous platelet concentrates, could drastically reduce the high batch-to-batch variability associated with FBS supplementation, precluding the need for batch screening before use [74].

While the expression of classical myogenic (CD56), mesenchymal (CD29, CD44, CD73, CD90, CD105) [66,67], and pericyte (CD140b, CD146) cell markers was maintained in our hMuStem cells^{HS} and hMuStem cells^{hPL}, the latter contained a lower proportion of cells expressing the myogenic regulatory factors Myf5 and MyoD, and intermediate filament desmin. These observations suggest reduced myogenic commitment capabilities in the presence of hPL, and are supported by the lower fusion index recorded for hMuStem cells^{hPL}, indicating a reduced ability to differentiate *in vitro* (when cultured in a myogenesis-promoting medium) into the myogenic cell lineage. By contrast, the rate of differentiation of hMuStem cells^{HS} was comparable to that previously described for hMuStem cells^{FBS} [56]. Nonetheless, hMuStem cells^{hPL} were able to fuse efficiently (albeit to a lesser extent than hMuStem cells^{HS}) when co-cultured with the D7 dystrophic cell line, evoking that hMuStem cells^{hPL} may participate in *in vivo* muscle regeneration via regeneration signals generated by other cells in a pathological context. Mitogen-activated protein 4 kinase 4 (Map4k4) has been recently shown to negatively regulate skeletal muscle differentiation of C2C12 cells in a Myf5-dependent manner [76]. Using DGE RNA-sequencing technology and RT-qPCR analysis, we found that *MAP4K4* and *MYF5* genes were upregulated and downregulated, respectively, in hMuStem

cells^{hPL} versus hMuStem cells^{HS}, suggesting that the Map4k4-related signaling pathway may contribute to the suppressive effect of hPL on myogenic differentiation of hMuStem cells.

A key difference between HS and hPL is the presence of plasma coagulation factors such as fibrinogen and other platelet-derived factors [26,40] in hPL, which necessitates the addition of anti-coagulants to prevent coagulation and clot formation when used to supplement calcium-containing culture media. Heparin, which is widely used in transfusion medicine and is available as an authorized drug suitable for injection, is also currently used in the expansion of hPL-supplemented hMSCs in clinical trials [77]. Clinical-grade production of purified fractionated heparin, an animal-derived biological product, is highly regulated (monographs in the European Pharmacopoeia and good manufacturing practice [GMP]). Nonetheless, the concentration and quality of heparin used in cell culture is critical to maintain the optimal proliferative and *ex vivo* differentiation abilities of MSCs [70,71]. These reports support the finding of the present study, in which the addition of heparin reduced the myogenic commitment and differentiation capabilities of cultured hMuStem cells^{HS}, even at the lowest concentration of heparin used to prevent gelation of the medium. The use of fibrin gel as a 3D-nutritive matrix for MSC expansion has been proposed to preclude the need for heparin supplementation [78,79]. However, in our experimental conditions, expansion of hMuStem cells^{HS} in fibrin gel resulted in a drastic reduction in proliferation rate. Another alternative method we tested was to culture hMuStem cells^{HS} beneath a nutritive fibrin matrix. This produced cells with the spindle-shape morphology typical of hMuStem cells, albeit with a slightly reduced proliferation rate and an intermediate myogenic potential, confirming a suppressive effect of heparin supplementation on myogenic potential. Another strategy to circumvent the need for heparin supplementation is to generate serum-converted hPL by depleting fibrinogen, either by adding CaCl₂ or activating thrombin [40,80], or by mechanical depletion [81]. When fibrinogen content was reduced by the addition of CaCl₂ (hPL^{fd}), hMuStem cells^{HS/hPLfd} displayed an intermediate myogenic potential, highly suggesting that heparin in hPL contributes to the observed reduction in the myogenic potential of hMuStem cells. Interestingly, passage of hMuStem cells^{hPL} in HS-supplemented medium resulted in a rate of differentiation comparable to that observed in hMuStem cells^{HS}, indicating that the reduction in myogenic commitment capabilities caused by heparin-containing hPL is reversible. Passage of hMuStem cells^{hPL} in hPL^{fd}-GM produced similar results, but only partially restored myogenic potential. The hPL^{gel} condition was the least effective in restoring the myogenic potential of hMuStem cells^{hPL}. Taken together, our results describe an effective

2-step alternative for hMuStem cells^{hPL} expansion that produces cells with a myogenic potential comparable to that of hMuStem cells^{HS}. One possible application of this method is carry out the isolation procedure and the initial stages of *in vitro* expansion using hPL-GM, thereby maintaining MuStem cells in their proliferative state, and subsequently switching to heparin-free hPL-GM (hPL^{fd}) for the final stages of production to increase myogenic potential. The absence of spontaneous fusion of hMuStem cells during *in vitro* expansion could be advantageous in the context of clinical applications, providing greater intra-batch homogeneity in terms of cell phenotype, commitment capabilities, and morphology. Morphology is of particular interest, given that the presence of enlarged differentiated cells may impair biodistribution and tissue dissemination and provoke clotting during *in vivo* injection [9]. Further studies will be required to assess the *in vivo* regenerative potential of hMuStem cells after expansion in different culture conditions. Also, the presence of other factors in hPL or HS media that may have an additional inhibiting or promoting effect on myogenesis could be considered, as recently suggested [48,75]. Among the main growth factors released by platelets, bFGF and TGF- β 1 are for instance potential modulators of myogenic differentiation [50,82–86].

Key considerations when choosing a culture supplement include its effect on cell features, its compatibility with the large-scale production processes required for clinical applications, and availability. The production of hPL requires more steps than that of HS, including successive freezing/thawing steps, the elimination of debris by centrifugation and/or filtration, and the addition of reagents such as CaCl₂, thrombin, or heparin. This increases the likelihood of variability between laboratories and means a greater level of control is required to ensure adherence to GMP [28]. Standardization of the amplification of cell therapy products is also crucial to achieve the necessary level of reproducibility in the manufacturing process. In our study, we used standardized, characterized, clinical-grade hPL obtained from 70 donors and manufactured in 10-L batches. The established reproducibility of the production process ensured markedly less batch-to-batch variability than that associated with FBS production. Moreover, the reproducibility of cytokine content and cell proliferation efficacy have been tested in human MSCs cultured in hPL and documented by the manufacturer. The HS used in this study was produced in batches of 3 L using a standardized process including viral inactivation, and obtained from 15 to 20 donors selected according to standard blood donation requirements. Each sample is biologically classified as a blood donation and new serologies are realized at least in 60 days for every donor to secure donation.

Conclusion

The present findings indicate that HS and hPL are suitable alternatives to FBS for the isolation and expansion of hMuStem cells for use in clinical applications. Moreover, the use of these nutritive supplements could avoid future shortages in FBS supply with growing demand, an issue that has been highlighted by regulatory agencies. Our findings represent an important step forward in the development of a clinically-compliant process for the production of hMuStem cells, and their subsequent testing in future clinical trials.

Abbreviations

ALPL: alkaline phosphatase; ARS: Alizarin red S; bFGF: basic fibroblast growth factor; cDNA: complementary deoxyribonucleic acid; CFU: colony forming unit; CHU: Centre Hospitalier Universitaire; CPD: cumulative population doubling; DAPI: 4',6-diamidino-2-phénylindole; DGE: digital gene expression; DM: differentiation medium; EGF: epidermal growth factor; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; EV: extracellular vesicles; FABP4: fatty acid binding protein 4; FBS: fetal bovine serum; FI: fusion index; GF: growth factor; GM: growth medium; hMDPC: human muscle-derived progenitor cell; hPL: human platelet lysate; hPL^{df}: fibrinogen-depleted hPL; HS: human serum; MDC: muscle-derived cells; MGG: May-Grünwald Giemsa; MRF: myogenic regulatory factor; MSC: mesenchymal stromal cell; MyHC: myosin heavy chain; OPG: osteoprotegerin; PBS: phosphate buffered saline; PCR: polymerase chain reaction; PD: population doubling; PDGF: platelet-derived growth factor; PE: phycoerythrin; PFA: Paraformaldehyde; PPAR γ : peroxisome proliferator activated receptor-gamma; PRP: platelet-rich plasma; PSF: penicillin/streptomycin/amphotericin B; RNA: ribonucleic acid; RPS18: ribosomal protein S18; RT: room temperature; TGF- β 1: transforming-growth factor beta-1; UMI: unique molecular identifiers.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

hMuStem cells were isolated from skeletal muscle biopsies from patients aged 13 to 19 years who were free of known muscular disease. All patients underwent surgery for acute scoliosis at the Department of Pediatric Surgery of the Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de

Nantes (France), and provided written informed consent. All protocols were approved by the Clinical Research Department of the CHU (Nantes, France), according to the rules of the French Regulatory Health Authorities. Biological sample banking was compliant with national guidelines for the use of human tissue for research (Permit numbers: MESR/DC-2010-1199; CPP/29/10).

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and material

The datasets supporting the conclusions of this article are included in the article and in the corresponding additional file. Sequencing-derived data have been deposited in the Gene Expression Omnibus [60] and are available at GEO accession number GSE99085: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE99085>

Competing interests

ChS, SV, and BD are employees of Macopharma. AL, IL, CS, BL, LG, LD, and KR have neither competing financial interests to declare, nor any financial or personal relationships with other persons or organizations that could inappropriately influence their work.

Funding

This study was supported by a grant from the FEDER (Fond Européen de Développement Régional; N°38436 and N° PL0003686). It was conducted under the framework of the IHU-Cesti project, which received French government financial support via the National Research Agency's Investment for the Future program (ANR-10-IBHU-005). The IHU-Cesti project is also supported by Nantes Metropole and the Pays de la Loire region (N° 2012-13464).

Author contributions

ChS, SV, BD, LG, and KR conceived and designed the experiments. IL and CS isolated the cell batches. ChS participated in cell production, and performed and analyzed all other experiments. ChS, AL, and KR contributed significantly to the writing of the manuscript. BL

performed the flow cytometry experiments and analyzed the resulting data. LD performed the DGE RNA-sequencing protocol. AL performed the transcriptomic data analysis. SV, BD, AL, and BL contributed reagents/materials/analytical tools. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors would like to thank Sophie Derenne and Alix Duquesne from EFS Pays de La Loire (Nantes, France) for helpful advice and discussions to improve the experimental design. We are grateful to Christopher Desjardins (Broad Institute, Cambridge, USA) for his help with the DGE RNA-sequencing data analysis and to Olivier Collin at GenOuest's bioinformatics core facility (IRISA/INRIA, Rennes, France). Sequencing was performed by the Genomics Core facility, Nantes (France). We also thank Chantal Thorin (Laboratoire de Physiopathologie Animale et Pharmacologie fonctionnelle, Oniris, Nantes, France) for assisting us with our statistical analysis.

Additional files

Additional file 4: Table S4. The UMI counts for each gene in each sample were normalized by dividing by the sum of UMI counts across all genes in the same sample. Normalized UMI counts were then expressed in UPM (UMI counts for one gene per million UMI counts for all genes). (.xls)

References

1. Benchaouir R, Meregalli M, Farini A, D'Antona G, Belicchi M, Goyenvalle A, et al. Restoration of human dystrophin following transplantation of exon-skipping-engineered DMD patient stem cells into dystrophic mice. *Cell Stem Cell*. 2007;1:646–57.
2. Chirieleison SM, Feduska JM, Schugar RC, Askew Y, Deasy BM. Human muscle-derived cell populations isolated by differential adhesion rates: phenotype and contribution to skeletal muscle regeneration in Mdx/SCID mice. *Tissue Eng. Part A*. 2012;18:232–41.
3. Mitchell KJ, Pannérec A, Cadot B, Parlakian A, Besson V, Gomes ER, et al. Identification and characterization of a non-satellite cell muscle resident progenitor during postnatal development. *Nat. Cell Biol*. 2010;12:257–66.
4. Negroni E, Riederer I, Chaouch S, Belicchi M, Razini P, Di Santo J, et al. In vivo myogenic potential of human CD133+ muscle-derived stem cells: a quantitative study. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther*. 2009;17:1771–8.

5. Rodriguez A-M, Pisani D, Dechesne CA, Turc-Carel C, Kurzenne J-Y, Wdziekonski B, et al. Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J. Exp. Med.* 2005;201:1397–405.
6. Sampaolesi M, Torrente Y, Innocenzi A, Tonlorenzi R, D’Antona G, Pellegrino MA, et al. Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. *Science.* 2003;301:487–92.
7. Sampaolesi M, Blot S, D’Antona G, Granger N, Tonlorenzi R, Innocenzi A, et al. Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature.* 2006;444:574–9.
8. Vieira NM, Valadares M, Zucconi E, Secco M, Bueno CR, Brandalise V, et al. Human adipose-derived mesenchymal stromal cells injected systemically into GRMD dogs without immunosuppression are able to reach the host muscle and express human dystrophin. *Cell Transplant.* 2012;21:1407–17.
9. Cossu G, Previtali SC, Napolitano S, Cicalese MP, Tedesco FS, Nicastro F, et al. Intra-arterial transplantation of HLA-matched donor mesoangioblasts in Duchenne muscular dystrophy. *EMBO Mol. Med.* 2015;7:1513–28.
10. Torrente Y, Belicchi M, Marchesi C, D’Antona G, Cogiamanian F, Pisati F, et al. Autologous transplantation of muscle-derived CD133+ stem cells in Duchenne muscle patients. *Cell Transplant.* 2007;16:563–77.
11. Commission directive 2003/94/EC. *Off. J. Eur. Union.* 2003;L262/22.
12. Sheu J, Klassen H, Bauer G. Cellular manufacturing for clinical applications. *Dev. Ophthalmol.* 2014;53:178–88.
13. Barnes D, Sato G. Serum-free cell culture: a unifying approach. *Cell.* 1980;22:649–55.
14. Jin X, Xu Q, Champion K, Kruth HS. Endotoxin contamination of apolipoprotein A-I: effect on macrophage proliferation--a cautionary tale. *Atherosclerosis.* 2015;240:121–4.
15. Kuznetsov SA, Mankani MH, Robey PG. Effect of serum on human bone marrow stromal cells: ex vivo expansion and in vivo bone formation. *Transplantation.* 2000;70:1780–7.
16. Tekkotte C, Gunasingh GP, Cherian KM, Sankaranarayanan K. “Humanized” stem cell culture techniques: the animal serum controversy. *Stem Cells Int.* 2011;2011:504723.
17. van der Valk J, Mellor D, Brands R, Fischer R, Gruber F, Gstraunthaler G, et al. The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. *Toxicol. Vitro. an Int. J. Publ. Assoc. with BIBRA.* 2004;18:1–12.

18. Spees JL, Gregory CA, Singh H, Tucker HA, Peister A, Lynch PJ, et al. Internalized antigens must be removed to prepare hypoinmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 2004;9:747–56.
19. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WKK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002;99:8932–7.
20. Zheng X, Baker H, Hancock WS, Fawaz F, McCaman M, Pungor E. Proteomic analysis for the assessment of different lots of fetal bovine serum as a raw material for cell culture. Part IV. Application of proteomics to the manufacture of biological drugs. *Biotechnol. Prog.* 2006;22:1294–300.
21. Karnieli O, Friedner OM, Allickson JG, Zhang N, Jung S, Fiorentini D, et al. A consensus introduction to serum replacements and serum-free media for cellular therapies. *Cytotherapy.* 2017;19:155–69.
22. Jochems CEA, van der Valk JBF, Stafleu FR, Baumans V. The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? *Altern. to Lab. Anim. ATLA.* 2002;30:219–27.
23. Chase LG, Lakshmipathy U, Solchaga LA, Rao MS, Vemuri MC. A novel serum-free medium for the expansion of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* 2010;1:8.
24. Jung S, Sen A, Rosenberg L, Behie LA. Identification of growth and attachment factors for the serum-free isolation and expansion of human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.* 2010;12:637–57.
25. Mannello F, Tonti GA. Concise review: no breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum replacement nonconditioned medium, o. *Stem Cells.* 2007;25:1603–9.
26. Bieback K, Hecker A, Kocaömer A, Lannert H, Schallmoser K, Strunk D, et al. Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem Cells.* 2009;27:2331–41.
27. Kobayashi T, Watanabe H, Yanagawa T, Tsutsumi S, Kayakabe M, Shinozaki T, et al. Motility and growth of human bone-marrow mesenchymal stem cells during ex vivo expansion in autologous serum. *J. Bone Joint Surg. Br.* 2005;87:1426–33.
28. Kocaoemer A, Kern S, Klüter H, Bieback K. Human AB serum and thrombin-activated platelet-rich plasma are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Stem Cells.* 2007;25:1270–8.

29. Kyllönen L, Haimi S, Mannerström B, Huhtala H, Rajala KM, Skottman H, et al. Effects of different serum conditions on osteogenic differentiation of human adipose stem cells in vitro. *Stem Cell Res. Ther.* 2013;4:17.
30. Patrikoski M, Juntunen M, Boucher S, Campbell A, Vemuri MC, Mannerström B, et al. Development of fully defined xeno-free culture system for the preparation and propagation of cell therapy-compliant human adipose stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* 2013;4:27.
31. Shahdadfar A, Frønsdal K, Haug T, Reinholt FP, Brinchmann JE. In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. *Stem Cells.* 2005;23:1357–66.
32. Stute N, Holtz K, Bubenheim M, Lange C, Blake F, Zander AR. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. *Exp. Hematol.* 2004;32:1212–25.
33. Yamaguchi M, Hirayama F, Wakamoto S, Fujihara M, Murahashi H, Sato N, et al. Bone marrow stromal cells prepared using AB serum and bFGF for hematopoietic stem cells expansion. *Transfusion.* 2002;42:921–7.
34. Poloni A, Maurizi G, Serrani F, Mancini S, Discepoli G, Tranquilli AL, et al. Human AB serum for generation of mesenchymal stem cells from human chorionic villi: comparison with other source and other media including platelet lysate. *Cell Prolif.* 2012;45:66–75.
35. Dessels C, Potgieter M, Pepper MS. Making the Switch: Alternatives to Fetal Bovine Serum for Adipose-Derived Stromal Cell Expansion. *Front. Cell Dev. Biol.* 2016;4:115.
36. Dohan Ehrenfest DM, Andia I, Zumstein MA, Zhang C-Q, Pinto NR, Bielecki T. Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives. *Muscles. Ligaments Tendons J.* 2014;4:3–9.
37. Lei H, Gui L, Xiao R. The effect of anticoagulants on the quality and biological efficacy of platelet-rich plasma. *Clin. Biochem.* 2009;42:1452–60.
38. Weibrich G, Kleis WKG, Hafner G, Hitzler WE. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J. Cranio-Maxillo-Facial Surg. Off. Publ. Eur. Assoc. Cranio-Maxillo-Facial Surg.* 2002;30:97–102.
39. Horn P, Bokermann G, Cholewa D, Bork S, Walenda T, Koch C, et al. Impact of individual platelet lysates on isolation and growth of human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.* 2010;12:888–98.
40. Burnouf T, Strunk D, Koh MBC, Schallmoser K. Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials.* 2016;76:371–87.

41. Doucet C, Ernou I, Zhang Y, Llense J-R, Begot L, Holy X, et al. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J. Cell. Physiol.* 2005;205:228–36.
42. Lohmann M, Walenda G, Hemedda H, Joussen S, Drescher W, Jockenhoevel S, et al. Donor age of human platelet lysate affects proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells. *PLoS One.* 2012;7:e37839.
43. Shih DT-B, Burnouf T. Preparation, quality criteria, and properties of human blood platelet lysate supplements for ex vivo stem cell expansion. *N. Biotechnol.* 2015;32:199–211.
44. Bernardo ME, Avanzini MA, Perotti C, Cometa AM, Moretta A, Lenta E, et al. Optimization of in vitro expansion of human multipotent mesenchymal stromal cells for cell-therapy approaches: further insights in the search for a fetal calf serum substitute. *J. Cell. Physiol.* 2007;211:121–30.
45. Lucarelli E, Beccheroni A, Donati D, Sangiorgi L, Cenacchi A, Del Vento AM, et al. Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. *Biomaterials.* 2003;24:3095–100.
46. Fekete N, Gadelorge M, Fürst D, Maurer C, Dausend J, Fleury-Cappellesso S, et al. Platelet lysate from whole blood-derived pooled platelet concentrates and apheresis-derived platelet concentrates for the isolation and expansion of human bone marrow mesenchymal stromal cells: production process, content and identification of active comp. *Cytotherapy.* 2012;14:540–54.
47. Chevallier N, Anagnostou F, Zilber S, Bodivit G, Maurin S, Barrault A, et al. Osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells with platelet lysate. *Biomaterials.* 2010;31:270–8.
48. Krämer DK, Bouzakri K, Holmqvist O, Al-Khalili L, Krook A. Effect of serum replacement with platelet lysate on cell growth and metabolism in primary cultures of human skeletal muscle. *Cytotechnology.* 2005;48:89–95.
49. Li H, Usas A, Poddar M, Chen C-W, Thompson S, Ahani B, et al. Platelet-rich plasma promotes the proliferation of human muscle derived progenitor cells and maintains their stemness. *PLoS One.* 2013;8:e64923.
50. Kelc R, Trapecar M, Gradisnik L, Rupnik MS, Vogrin M. Platelet-rich plasma, especially when combined with a TGF- β inhibitor promotes proliferation, viability and myogenic differentiation of myoblasts in vitro. *PLoS One.* 2015;10:e0117302.
51. McClure MJ, Garg K, Simpson DG, Ryan JJ, Sell SA, Bowlin GL, et al. The influence of platelet-rich plasma on myogenic differentiation. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2013;

52. Lardenois A, Jagot S, Lagarrigue M, Guével B, Ledevin M, Larcher T, 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*. 2016;16:2028–42.
53. Robriquet F, Lardenois A, Babarit C, Larcher T, Dubreil L, Leroux I, et al. Differential Gene Expression Profiling of Dystrophic Dog Muscle after MuStem Cell Transplantation. Asakura A, editor. *PLoS One*. 2015;10:e0123336.
54. Rouger K, Larcher T, Dubreil L, Deschamps J-Y, Le Guiner C, Jouvion G, et al. Systemic delivery of allogenic muscle stem cells induces long-term muscle repair and clinical efficacy in duchenne muscular dystrophy dogs. *Am. J. Pathol.* 2011;179:2501–18.
55. Robriquet F, Babarit C, Larcher T, Dubreil L, Ledevin M, Goubin H, et al. Identification in GRMD dog muscle of critical miRNAs involved in pathophysiology and effects associated with MuStem cell transplantation. *BMC Musculoskelet. Disord.* 2016;17:209.
56. Lorant J, Saury C, Schleder C, Robriquet F, Lieubeau B, Negroni E, et al. Skeletal muscle regenerative potential of human MuStem cells following transplantation into injured mice muscle. *Mol. Ther.* 2017; (in press) doi: 10.1016/j.ymthe.2017.10.013.
57. Blasco MA, Lee HW, Hande MP, Samper E, Lansdorp PM, DePinho RA, et al. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell*. 1997;91:25–34.
58. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods*. 2012;9:676–82.
59. Cacchiarelli D, Trapnell C, Ziller MJ, Soumillon M, Cesana M, Karnik R, et al. Integrative Analyses of Human Reprogramming Reveal Dynamic Nature of Induced Pluripotency. *Cell*. 2015;162:412–24.
60. Edgar R, Domrachev M, Lash AE. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res.* 2002;30:207–10.
61. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15:550.
62. Delorme B, Charbord P. Culture and characterization of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Methods Mol. Med.* 2007;140:67–81.
63. Wolbank S, Stadler G, Peterbauer A, Gillich A, Karbiener M, Streubel B, et al. Telomerase immortalized human amnion- and adipose-derived mesenchymal stem cells: maintenance of differentiation and immunomodulatory characteristics. *Tissue Eng. Part A*. 2009;15:1843–54.

64. Pinheiro JC, Bates D. *Mixed-Effects Models in S and S-PLUS*. Springer Science & Business Media; 2009.
65. Chow S-C, Wang H, Shao J. *Sample Size Calculations in Clinical Research*. CRC Press; 2003.
66. Delorme B, Ringe J, Gallay N, Le Vern Y, Kerboeuf D, Jorgensen C, et al. Specific plasma membrane protein phenotype of culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells. *Blood*. 2008;111:2631–5.
67. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8:315–7.
68. Gunes A, Iscan E, Topel H, Avci ST, Gumustekin M, Erdal E, et al. Heparin treatment increases thioredoxin interacting protein expression in hepatocellular carcinoma cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2015;65:169–81.
69. Yamaguchi H, Yamashita H, Mori H, Okazaki I, Nomizu M, Beck K, et al. High and low affinity heparin-binding sites in the G domain of the mouse laminin alpha 4 chain. *J. Biol. Chem*. 2000;275:29458–65.
70. Hemeda H, Kalz J, Walenda G, Lohmann M, Wagner W. Heparin concentration is critical for cell culture with human platelet lysate. *Cytotherapy*. 2013;15:1174–81.
71. Viau S, Chabrand L, Eap S, Lorant J, Rouger K, Goudaliez F, et al. Pathogen reduction through additive-free short-wave UV light irradiation retains the optimal efficacy of human platelet lysate for the expansion of human bone marrow mesenchymal stem cells. *PLoS One*. 2017;12:e0181406.
72. EMA/410/01rev3, 2011/C 73. Note for guidance on minimising the risk of transmitting animal spongiform encephalopathy agents via human and veterinary medicinal products. 2011.
73. EMA/CHMP/BWP/457920/2012rev1 Committee, for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Guideline on the use of bovine serum in the manufacture of human biological medicinal products. 2013.
74. Viau S, Chabrand L, Eap S, Bouilliez J, Bertholet P, Bouckenooghe T. A standardized and characterized clinical grade human platelet lysate for efficient expansion of human bone marrow mesenchymal stem cells. *ISCT Annu. Meet. Cytotherapy*. 2017. p. 195(5 supplement):S279.
75. Miroshnychenko O, Chang W-T, Dragoo JL. The Use of Platelet-Rich and Platelet-Poor Plasma to Enhance Differentiation of Skeletal Myoblasts. *Am. J. Sports Med*. 2016;363546516677547.

76. Wang M, Amano SU, Flach RJR, Chawla A, Aouadi M, Czech MP. Identification of Map4k4 as a novel suppressor of skeletal muscle differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 2013;33:678–87.
77. Te Boome LCJ, Mansilla C, van der Wagen LE, Lindemans CA, Petersen EJ, Spierings E, et al. Biomarker profiling of steroid-resistant acute GVHD in patients after infusion of mesenchymal stromal cells. *Leukemia.* 2015;29:1839–46.
78. Walenda G, Hameda H, Schneider RK, Merkel R, Hoffmann B, Wagner W. Human platelet lysate gel provides a novel three dimensional-matrix for enhanced culture expansion of mesenchymal stromal cells. *Tissue Eng. Part C. Methods.* 2012;18:924–34.
79. Bouckenooghe T, Bertholet P, Chabrand L, Viau S, Delorme B. Standardized and clinical grade human platelet lysate hydrogel (HPLG) for the optimization of large-scale expansion of human mesenchymal stem cells. 21st ISCT Annu. Meet. *Cytherapy.* 2016. p. 17(6 supplement):S69.
80. Mojica-Henshaw MP, Jacobson P, Morris J, Kelley L, Pierce J, Boyer M, et al. Serum-converted platelet lysate can substitute for fetal bovine serum in human mesenchymal stromal cell cultures. *Cytherapy.* 2013;15:1458–68.
81. Laner-Plamberger S, Lener T, Schmid D, Streif DA, Salzer T, Öller M, et al. Mechanical fibrinogen-depletion supports heparin-free mesenchymal stem cell propagation in human platelet lysate. *J. Transl. Med.* 2015;13.
82. Li Y, Foster W, Deasy BM, Chan Y, Prisk V, Tang 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.* 2004;164:1007–19.
83. Vaidya TB, Rhodes SJ, Taparowsky EJ, Konieczny SF. Fibroblast growth factor and transforming growth factor beta repress transcription of the myogenic regulatory gene MyoD1. *Mol. Cell. Biol.* 1989;9:3576–9.
84. Clegg CH, Linkhart TA, Olwin BB, Hauschka SD. Growth factor control of skeletal muscle differentiation: commitment to terminal differentiation occurs in G1 phase and is repressed by fibroblast growth factor. *J. Cell Biol.* 1987;105:949–56.
85. Brunetti A, Goldfine ID. Role of myogenin in myoblast differentiation and its regulation by fibroblast growth factor. *J. Biol. Chem.* 1990;265:5960–3.
86. Massagué J, Cheifetz S, Endo T, Nadal-Ginard B. Type beta transforming growth factor is an inhibitor of myogenic differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1986;83:8206–10.

Chapitre 3. Impact de l'amplification *in vitro* sur les caractéristiques de la population hMuStem

I. Positionnement général

La marginalité des CSs au sein des tissus, associée à la taille relativement faible des prélèvements biologiques, entraîne des rendements à l'issue de l'isolement généralement limités au regard des besoins évoqués pour les applications cliniques. Une étape d'amplification *ex vivo* est ainsi dans la majorité des cas nécessaire pour obtenir les quantités de cellules souhaitées pour l'application thérapeutique ciblée. Comme évoqué dans la partie introductive (Chapitre 2 – paragraphe I.2.3.5), différentes études ont néanmoins révélé que le potentiel thérapeutique de ces CSs pouvait être amoindri par l'étape d'expansion *ex vivo* (Banfi et al., 2000; Liu et al., 2016; Tarte et al., 2010). En ce qui concerne les progéniteurs musculaires, Montarras *et al.* ont démontré que la transplantation de SCs fraîchement isolées permettait d'obtenir une meilleure efficacité de régénération illustrée par un nombre plus important de fibres dystrophine⁺, en regard de ce qui est obtenu avec des cellules ayant passé du temps en culture. En effet, une dose dix fois plus importante est nécessaire pour induire une efficacité comparable aux cellules fraîchement isolées, démontrant que l'efficacité thérapeutique n'est pas seulement liée à la dose mais également au temps passé *ex vivo* (Montarras et al., 2005). Des observations similaires ont également été rapportées pour les cellules CD133⁺ dont le potentiel de régénération musculaire *in vivo* est limité par des temps d'expansion plus importants (Meng et al., 2014). Cette diminution du potentiel thérapeutique peut être attribuée à des conditions de culture inadaptées mais également à l'apparition de cellules sénescents.

Contrairement aux cellules pluripotentes et au même titre que d'autres populations de CSAs telles que les MSCs, les cellules hMuStem ne bénéficient pas d'une capacité de prolifération illimitée. Les études de prolifération sur le long terme évoquées dans les chapitres précédents ont en effet démontré que le nombre de CPDs des cellules hMuStem atteignait après une cinquantaine de jours un plateau reflétant un arrêt définitif de la croissance. À ce jour, toutes les études de caractérisation de la population hMuStem ont été réalisées à des passages fixes et l'impact du temps d'expansion sur les caractéristiques cellulaires n'a pas été pris en compte. Après avoir défini des conditions de culture

transférables en clinique (Chapitres 1 et 2), une étude longitudinale a été mise en place afin d'étudier l'évolution de la population cellulaire hMuStem au cours du temps. Un plan d'étude élargi a alors été mis en place à quatre temps de cinétique, comprenant un passage précoce proche de l'isolement (P2, correspondant à 4 et 5 CPDs après P1) et les passages intermédiaires P4 et P6, correspondant respectivement à 13-15 et 22-24 CPDs. Alors que la quantité de cellules générée en P2 est relativement faible, celles obtenues aux passages intermédiaires sont plus conséquentes et en adéquation avec les doses moyennes appliquées en clinique. Finalement, un temps tardif (P12 à P15) comprenant une majorité de cellules non prolifératives a également été ajouté en guise de contrôle.

L'objectif principal de cette étude est d'optimiser la préparation des lots de cellules hMuStem et d'évaluer la durée d'expansion optimale comme un équilibre entre le nombre de cellules amplifiées et les propriétés biologiques du produit cellulaire, en termes d'efficacité mais également de sécurité (Figure 35). L'objectif secondaire de cette étude est d'identifier des paramètres cellulaires morphologiques, fonctionnels et phénotypiques pouvant être utilisés comme critères libérateurs d'inclusion ou d'exclusion pour la libération des lots cliniques.

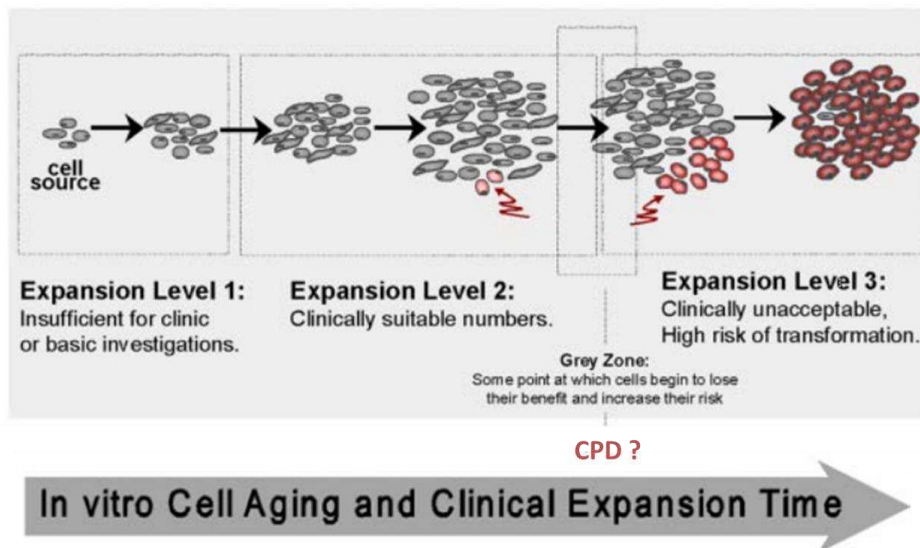


Figure 35. Expansion clinique *in vitro* des cellules souches : équilibre entre le nombre de cellules et la sécurité. Il est nécessaire de déterminer la limite d'expansion à ne pas dépasser (Grey zone) pour des raisons d'efficacité et de sécurité (D'après Deasy et al., 2005)

II. Démarche expérimentale

Le détail du matériel et méthodes utilisés étant décrit dans l'article joint ci-après, seul un résumé des principaux points méthodologiques sera présenté ici.

Six lots de cellules hMuStem ont été isolés à partir de prélèvements de muscles posturaux de jeunes sujets ne présentant pas de pathologie musculaire dans les conditions de culture précédemment définies (HS, TrypLE, CELLstartTM CTSTM, 2 500 cellules/cm²...) et amplifiés sur le long terme jusqu'à arrêt total de la prolifération. Afin d'évaluer l'impact du temps de culture sur la signature globale de la population hMuStem, une analyse transcriptomique haut-débit a été réalisée selon la technique de DGE-Seq préalablement utilisée dans le cadre de l'étude comparée entre le HS et le hPL. L'analyse bioinformatique des données a été réalisée par Aurélie Lardenois. Les mêmes analyses phénotypiques (immunocytochimie, cytométrie en flux) et fonctionnelles (potentiel clonogénique, FI) réalisées dans le chapitre précédent ont été renouvelées dans cette étude aux différents temps de cinétique décrits précédemment. Enfin, une collaboration avec Rémy Le Guevel, responsable de la plate-forme de microscopie ImPACcell (Rennes), a permis de réaliser une analyse microscopique haut-débit (HSC pour *high content screening*) nous permettant de documenter un certain nombre de paramètres morphologiques requis par les instances réglementaires. En plus de l'identité et des potentialités de la population hMuStem, différents paramètres associés à la sécurité du produit cellulaire ont été évalués, parmi lesquels l'activité de la SA-βGal ou l'expression de la télomérase.

III. Résultats

Dans cette étude, nous comparons les caractéristiques de la population hMuStem à différents temps d'expansion *ex vivo*. Dans un 1^{er} temps, l'étude de prolifération sur le long terme confirme un fort potentiel de prolifération dans les 1^{ères} phases d'amplification, mais également un épuisement progressif qui aboutit à un arrêt total de la prolifération pour des passages tardifs (P12 à P15). Le passage P6 semble correspondre au début de l'inflexion du potentiel prolifératif, avec une augmentation légère mais significative du temps de génération et une importante dégradation du potentiel clonogénique. Sur le plan phénotypique, le temps de culture ne semble pas influencer significativement l'expression des marqueurs myogéniques, périvasculaires et mésenchymateux utilisés précédemment pour caractériser la population hMuStem. Néanmoins, ces 1^{ers} résultats sont corroborés par une signature

transcriptomique à P6 qui commence à dévier vers celle obtenue pour la population aux temps tardifs, alors que les passages précoces restent relativement proches et ce jusqu'à P5. La stratégie de classification mise en place pour l'analyse DGE-Seq a en effet séparé l'ensemble des passages précoces (P2 à P5) du passage intermédiaire P6 et de ceux tardifs. Après enrichissement en termes de *gene ontology* (GO), quatre clusters de gènes ont été identifiés. Alors que les gènes plus exprimés dans les passages précoces sont principalement impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et la différenciation myogénique, les gènes ayant un profil opposé (et dont l'expression augmente au cours du temps) sont plutôt impliqués dans la mort cellulaire, la sénescence et la réponse au stress. Fortement altéré pour les temps tardifs, l'engagement myogénique attesté par l'expression des marqueurs myogéniques Myf5 et MyoD mais également par l'index de fusion, diminue légèrement mais significativement au cours des 1^{ères} phases d'amplification (P2-P6). À l'issue de cette étude, le pourcentage de cellules Ki67⁺, le temps de doublement, les pourcentages de cellules CD56⁺ et Myf5⁺ ainsi que l'index de fusion et l'ensemble de gènes *SFRP4*, *TNFRSF1B*, *C3*, *ALDH1A3*, *COL8A1*, *LRRC32*, *PAPPA*, *DMBT1*, *NINJ2* apparaissent pertinents pour initier la définition de critères discriminants potentiellement utilisables comme critère libérateur.

En conclusion, cette étude originale combine des données transcriptomiques à haut débit et des validations biologiques qui renseignent sur les caractéristiques idéales de la population hMuStem à utiliser pour un EC. Ainsi, il est actuellement possible de produire une quantité suffisante de cellules hMuStem (aux passages P4 et P5), dans des conditions d'efficacité et de sécurité adéquates, pour une proposition d'EC.

IV. Article

Ces résultats font l'objet d'une publication en préparation pour Journal of Molecular Cell Biology.

**Changing phenotypic and behavioral characteristics of human MuStem cells during the
in vitro expansion phase**

Charlotte Saury^{1,2*}, Aurélie Lardenois^{2*}, Cindy Schleder², Isabelle Leroux², Blandine Lieubeau³, Rémy Le Guevel⁴, Laurent David^{5,6}, Yann Péréon⁷, Sabrina Viau¹, Bruno Delorme¹, Laetitia Guével^{2,8}, Karl Rouger²

¹ Macopharma, Biotherapy division, Mouvaux, F-59420, France

² PAnTher, INRA, École Nationale Vétérinaire, Agro-alimentaire et de l'alimentation Nantes-Atlantique (Oniris), Université Bretagne Loire (UBL), Nantes, F-44307, France

³ IECM, INRA, Oniris, UBL, Nantes, F-44307, France

⁴ Plate-forme ImPACcell, Structure Fédérative de Recherche BIOSIT, Université de Rennes 1, Rennes, F-35043, France

⁵ Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie UMR1064, INSERM, UBL, Nantes, F-44093, France.

⁶ Institut de Transplantation Urologie Néphrologie (ITUN), CHU Nantes, Nantes, F-44093, France

⁷ Centre de Référence des maladies neuromusculaires Nantes-Angers, Service des Explorations Fonctionnelles, CHU, Nantes, F-44093, France

⁸ Université de Nantes, UBL, Nantes, F-44000, France

* These authors contributed equally to this work

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

Abstract

Preclinical demonstrations of regenerative potential have been attributed for some adult stem cell populations, leading to the implementation of long-term *in vitro* expansion protocols after isolation to generate large number of cells required for transplantation purpose in human. However, their impact on the global biological features of expanded cells was rarely investigated except the cell viability and recent studies have described deleterious effects of extensive *in vitro* passaging. To deepen our knowledge, we isolated the human muscle-derived stem cell population named MuStem from healthy donors and investigated the changes associated with the expansion time (passage 2/P2 to P15) by studying the morphology, the growth kinetic, the cell cycle distribution, the senescence associated β -galactosidase, the myogenic differentiation as well as the phenotype at molecular and protein levels. Our results showed that morphological features of small spindle-shaped cells were stable between P2 to P6 but appeared much more heterogeneous in P12-P15 evoking a senescent status. Proliferation rate gradually declined from P6 up to P12-P15 where cells stopped to divide, mostly being in G₀/G₁ phase. In parallel, clonogenic potential started to decrease at P6. Phenotypically, expansion protocol did not alter the signature of early myogenic cells with perivascular/mesenchymal origin, except at late times where a loss of myogenic lineage was noted. Finally, Digital gene expression sequencing analysis evidenced that the pathways of myogenesis and cell cycle control were gradually down-regulated during the *in vitro* culture and conversely those of senescence, response to stress and cell death were up-regulated. Global transcriptome clearly identified P6 as critical in the preservation of the original phenotype. Together, our results inform about the set of relevant selection criteria to qualify hMuStem cell batches prior to their use *in vivo*.

Keywords: Regenerative medicine, Cell-based therapy, Adult stem cell, hMuStem cell, Long-term culture, gene expression profile

Introduction

Deepening understanding of the adult stem cells led to the development of the regenerative medicine during the last decade with new proposals of cell candidates for a wide number of diseases among which those neuromuscular of genetic origin. In the field of muscular dystrophies, several preclinical studies reported encouraging muscle regenerative potential for distinct tissue-resident stem/progenitor cell populations [1–13], leading to the set-up of clinical trial for some of them [14,15]. Because of their relative low abundance in the postnatal tissues, *in vitro* expansion protocols have been developed after tissue isolation for these marginal cell fractions in order to achieve relevant cell numbers for transplantation purpose in preclinical study or clinical trial. If the cell viability and functionality were classically followed during these extensive protocols, the global biological state of the cultured cells was in return rarely considered and recent works revealed that extended culture periods could have in fact deleterious impacts on cell features.

Prolonged *in vitro* propagation on human bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) was reported to induce a loss of proliferation rate and osteogenic/adipogenic differentiation potential [16–18] as well as the occurrence of genomic abnormalities that were however associated with any growth advantage [18–20]. Chromosomal instability was also described during human myoblast culture but was not associated with transformation [21]. Importantly, satellite cells freshly isolated from wild-type mice muscle was shown to contribute *in vivo* more efficiently to muscle repair following injection into immunodeficient dystrophic mice muscle than cultured myoblasts, pointing out that culturing procedures alter their capacity to reconstitute tissue [22]. Following prolonged passaging, human BM-MSCs and adipose-derived stem cells (ADSCs) were characterized by a significant gradual down-regulation of genes involved in DNA repair and damage response pathways such as *KU80*, *BRCA1* and *RAD51*, concomitantly with a down-regulation of the tumor suppressor gene *TP53* encoding *p53* and the proto-oncogene *c-MYC* [23]. An increase in the number of mitochondrial genomes, the intracellular ATP and the membrane potential, which are characteristic of a differentiation state or senescence, were also noted. Consistently, human ADSCs in long-term culture (P15 and P20) were also defined by markedly increased senescence associated β -galactosidase activity, decrease in percentage of cells in S and G₂/M phase and profound alteration in the senescence-associated gene expression levels in *MMP1*, *CDKN1A/p21*, *RBI/pRB* and *CCND1* [18,24]. Marked alterations in the morphology with appearance of large and flatten features were also described. The profiling of dental pulp stem cells at early

and late passages revealed major instabilities of immune genes representing pathogen recognition, immune signaling, pro-inflammatory, anti-inflammatory and immune-related growth but also an expression of many cytotoxic genes [25]. At the gene transcript level, the most prominently up-regulated transcripts in cultured ADSCs were keratin 7 and some other transcripts associated with the cytoskeleton, suggesting that the long-term adherence causes changes in the composition of the cytoskeleton [26]. So, within the framework of a thorough characterization of cell agent for therapeutic application, study of the *in vitro* expansion phase is a major element to be considered as far as it is going to determine the bioengineering but also possibly to influence the biological properties of the cell agent.

The last years, we described from healthy dog muscle a marginal progenitor cell population we called MuStem cells and produced the proof of concept of its vascular delivery into the dystrophic dogs representing the clinically relevant model for Duchenne Muscular Dystrophy [27–29]. The recent identification of the human counterpart and demonstration of its participation to muscle repair [30] reinforced the positioning of the MuStem cell population as attractive candidate for therapeutic application into dystrophic contexts. However, our results have been generated considering MuStem cell population at only one *in vitro* expansion time, highly limiting our knowledge on its phenotype, efficacy as well as the safety of its potential use.

In this work, we report an extensive characterization of six hMuStem cell populations concerning the impact of *in vitro* expansion time on morphology feature, growth kinetic, cell cycle distribution, myogenic and cell-lineage markers, myogenic differentiation potential and β -galactosidase activity. Furthermore, we used Digital Gene Expression-Sequencing (DGE-Seq) analysis to identify the differences in gene expression profile between hMuStem cells submitted to distinct expansion time. By this approach, our results determined at which expansion time the cultured expanded hMuStem cell population is still safe and provide essential preclinical data that need to be taken into account prior to the use of cultured hMuStem cells in clinical settings.

Material and methods

Human skeletal muscle tissue

hMuStem cells were isolated from 6 *Paravertebralis* muscle biopsies of 13- to 19-year-old patients free of known muscular disease (Table S1) and operated for acute scoliosis at the Department of Pediatric Surgery of the Centre Hospitalier Universitaire (CHU), Nantes (France). All patients provided written informed consent. All protocols were approved by the Clinical Research Department of the CHU (Nantes, France), in accordance with the rules of the French Regulatory Health Authorities. Biological sample banking was compliance with the national guidelines regarding the use of human tissue for research (Permit numbers: MESR/DC-2010-1199; CPP/29/10).

Table S1. Age and gender of donors

Donor	#1	#2	#3	#4	#5	#6
Age	18	15	17	13	15	19
Gender	M	F	F	F	F	M

Isolation and culture of human MuStem cells

Muscle-derived cells (MDCs) were isolated using an adaptation of the research grade protocol previously described [30], to be in accordance with Good Manufacturing Practices. Briefly, freshly obtained muscle biopsies were stored up to 3 days in organ preservation solution (Macopharma, Mouvaux, France) supplemented with 2% UI/mL penicillin / 0.1 mg streptomycin / 0.25 µg/mL amphotericin B (PSF; Sigma-Aldrich, St Louis, USA). Muscle tissues were finely minced using a forceps and scalpel and enzymatically digested (15 min, 37°C) with collagenase (20 PZ/g of tissue; Coger, Paris, France). After centrifugation (100 x g, 5 min), the supernatant was neutralized with F12 HAM medium (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) containing 5% human serum (HS; EFS, Nantes, France), while the pellet was digested (30 min, 37°C) with neutral protease (1.5 PZ/g of tissue, Coger). Digested tissue was then centrifuged (100 x g, 5 min) and the supernatant was pooled with that obtained following the first enzymatic digestion step and centrifuged for an additional 15 min at 300 x g. MDCs were obtained after sequential filtering through 100-, 70- and 40-µm pore-diameter nylon meshes (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) and resuspended in F12 HAM

medium containing 10% HS to assess cell number and viability using Trypan blue exclusion (VWR, Strasbourg, France). hMuStem cells were isolated after 6 days using a modified version of a previously described preplating technique [27,30]. They were cultured under standard conditions (37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂) in growth medium (GM, Macopharma) supplemented with 10% HS / 1% PSF / 10 ng/mL human recombinant basic fibroblast growth factor (bFGF; Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany) / 2 ng/mL human recombinant epidermal growth factor (EGF; Miltenyi). Cells were seeded on CELLstart™ substrate (Invitrogen) at 2.5x10³ cells/cm² and GM was renewed twice a week.

Long-term in vitro proliferation analysis

Long-term proliferative behavior of hMuStem cells was evaluated until cells ceased to grow. Cells were seeded in triplicate at 2.5 x 10³ cells/cm² on CELLstart™ substrate-coated 6-well plates. When the cell layer reached confluence, cells were dissociated with TrypLE™ (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA) and centrifuged (410 x g, 10 min). Cells were resuspended in GM and viable cell number was determined using Trypan blue staining. The number of population doublings (PDs) and the doubling time (DT) were calculated at each passage using the following formula, respectively: $\Delta PD = \log(n_f/n_0)/\log(2)$ and $DT = (\log_2 x T)/\log(n_f/n_0)$, where n₀, n_f and T are the number of cells initially plated, the number of cells harvested at the end of the passage and the duration of the passage in days, respectively [31]. The cumulative PD (CPD) was calculated as the sum of the PDs of the passage and those of the previous passages.

Telomerase expression analysis

The expression of telomerase catalytic subunit (hTERT for human telomerase reverse transcriptase) was determined by PCR using cDNAs obtained as described above. hTERT specific oligonucleotide primers (forward, 5'-ACAACGAACGCCGCTTCCTCA-3'; reverse, 5'-TTCCCGATGCTGCCTGA CCT-3') were designed using Oligo Primer Analysis Software v.7 (Molecular Biology Insights Inc., Colorado Springs, CO, USA) and synthesized by MWG Operon (Eurofins, Ebersberg, Germany). PCR amplifications were performed on 1 µL of cDNA with the following program: initial denaturation (12 min, 95°C) followed by 35 cycles (30 s, 94°C; 30 s, 63°C; 30 s, 72°C) and a final extension (10 min, 72°C). The PCR products were migrated and visualized on a 2% agarose gel with GelRed staining.

Colony-forming unit assay

To evaluate the clonogenic potential of hMuStem cells, colony forming unit (CFU)-assays were performed by plating 100 hMuStem cells at different passages (P2, P4, P6 and P12-P15) in triplicate in 21 cm²-gelatin coated dishes (Corning, New York, USA), in GM that was replaced after 4 days. After 8 days, cell layers were washed with phosphate buffered saline (PBS; PAA, Les Rumeaux, France), fixed with 4% paraformaldehyde (PFA; Sigma-Aldrich) for 10 min and washed twice with PBS. Colonies were stained with May-Grünwald stain (Sigma-Aldrich) for 5 min at room temperature (RT), washed with distilled water and counterstained with Giemsa (1:20 in PBS; Sigma-Aldrich). The frequency of CFUs was determined as the mean number of cell clusters containing at least 50 cells divided by the number of cells initially seeded and expressed as a percentage.

Immunocytochemistry analysis

hMuStem cells at different passages (P2, P4, P6 and P12-P15) were seeded in triplicates at 6×10^3 cells/cm² on CELLstartTM-coated 96-well black plates (NuncTM MicrowellTM, Thermo ScientificTM-Cellomics, Pittsburgh, PA) and cultured in GM for 48 hours. Cell layers were fixed, permeabilized, incubated in blocking buffer and incubated with the primary Ab (Table S3). Cells were then incubated with appropriate secondary antibody (Goat anti-mouse DyLight 488 or Goat anti-rabbit DyLight 550; InvitrogenTM) and nuclei were counterstained with Hoechst33342 (1:5000; Sigma-Aldrich).

Table S3. List of antibodies used for hMuStem cell characterization by immunocytochemistry analysis

Primary antibody	Compagny and reference	Fixation	Permeabilization	Blocking	Dilution	Incubation time and temperature
Ki67	Abcam, Ab15580	4% PFA, 15 min, RT	5% goat serum/1% BSA/ 0.2% Triton X-100 PBS, 30 min, RT		1:200	Over night, 4°C
Myf5	Abcam, Ab125078	4% PFA, 10 min, RT	PBS 0.3% Triton X-100, 20 min, 4°C	5% goat serum/PBS, 60 min, RT	1:200	60 min, 37°C
MyoD	Dako, M3512				1:10	60 min, 37°C
Myogenin	DSHB, F5D				1:10	60 min, 37°C
Desmin	Dako, M0706	Ethanol 100%, 10 min, RT		2% FBS/PBS, 30 min, RT	1:50	60 min, RT

Morphological analysis

The morphology of vital hMuStem cells was visualized during cultivation using inverted phase contrast microscope. To evaluate cell size distribution in suspension, hMuStem cells (n=6, independent donors) were seeded on CELLstart™ substrate-coated 6-well plates and cultured in GM for 48 hours. Nuclei of viable cell layers were counterstained with Hoechst33342 (1:5000; 30 min at 37°C) and then incubated with CellMask™ Orange Plasma membrane stain (1:1000; Invitrogen™) for 10 min at 37°C. Cell layers were gently washed with PBS and dissociated with TrypLE™. Suspended cells were allowed to sediment by the addition of culture medium and High-Content-Screening (HCS) imaging was performed before cell adhesion. Cell diameters were calculated and expressed in micrometers. For other morphological analysis, hMuStem cells were seeded in triplicates at 6×10^3 cells/cm² on CELLstart™-coated 96-well black plates (Nunc™ Microwell™, Thermo Scientific™-Cellomics®) and cultured in GM for 48h. Proportion of binucleated cells that do not express myogenin was determined using association of Whole Cell Stain Green stain (WCS; Thermo Fisher Scientific™-Cellomics®) and myogenin labeling as described above and expressed as a percentage.

Apoptosis/necrosis analysis

To evaluate the proportion of apoptotic and necrotic cells in hMuStem cell populations, cells at P2, P4, P6 and P12-15 (n=6, independent donors) were seeded in triplicates at 6×10^3 cells/cm² on CELLstart™-coated 96-well black plates (Nunc™ Microwell™, Thermo Scientific™-Cellomics®) and cultured in GM for 48h. Apoptotic and necrotic cells were detected respectively using CellEvent Caspase-3/7 Green Detection Reagent and YO-PRO®-1 Iodide staining (Invitrogen™) and Propidium Iodide staining, following the manufacturer's instructions. Percentage of cells was determined by HCS analysis of fluorescence labeling.

High-Content Screening imaging and analysis

The assay plate was imaged and analyzed using the Cell Health Profiling, Spot detector and Morphology BioApplications (HCS Studio Cellomics software) on the ArrayScan® VTI HCS Reader (Thermo Fisher Scientific™-Cellomics®) using the 20X objective (Zeiss, LD Plan Neofluar 20x/0.4 korr). Images were acquired with the Photometrics X1 CCD camera boasts a 14-bit dynamic range; 1104x1104 pixel array; 0.454 micron pixel size. The BGRFR_386_23-Hoechst, BGRFR_485_20-FITC, and BGRFR_549-15-TRITC filter/dichroic combinations were used to image Hoechst, WCS and CellMask™ Orange Plasma membrane stain, respectively, as well as other antigen-specific immunolabeling reported in Table S3. The assay protocols (BioApplications) were configured to acquire and analyze 25 images per well in order to measure specific immunolabeling, nuclear morphology, cell spreading and morphology. All measures are expressed in micrometer. The protocols were optimized for each biological test (background removing, objects segmentation and detection). Data analysis and visualization were performed using Tableau v10.3 Desktop (Tableau Software, Seattle, USA).

Flow cytometry analysis

Immunophenotype analyses were performed at P2, P4 and P6. hMuStem cells (6 batches) were incubated (30 min at 4°C, in darkness) with antibodies (Ab) against the appropriate cell-surface markers (Table S2) and washed 3 times with 2% HS/PBS. Isotype-matched Ab and fluorescence minus control samples were used as negative controls for gating and analyses. Seven-amino-actinomycin D (7-AAD, BD Biosciences) was added to assess cell viability. Labeled cells were acquired using a FACS Aria flow cytometer (BD Biosciences). Data were

analyzed using FlowJo software (FlowJo, Ashland, Oregon, USA). At least 3×10^4 viable cells were considered for each labeling protocol.

Table S2. List of antibodies used for hMuStem cell characterization by flow cytometry analysis

Primary antibody	Compagny and reference	Corresponding isotype
CD13-PE	BD Biosciences, 555392	Mouse IgG1-PE
CD29-PE	BD Biosciences, 555443	Mouse IgG1-PE
CD31-PE	BD Biosciences, 555446	Mouse IgG1-PE
CD34-PE	BD Biosciences, 345802	Mouse IgG1-PE
CD44-PE	BD Biosciences, 555479	Mouse IgG2b-PE
CD45-PE	BD Biosciences, 555483	Mouse IgG1-PE
CD56-AF647	BD Biosciences, 562413	Mouse IgG1-AF647
CD73-PE	BD Biosciences, 550257	Mouse IgG1-PE
CD82-PE	BioLegend, BLE342101	Mouse IgG1-PE
CD90-PE	BD Biosciences, 555596	Mouse IgG1-PE
CD105-PE	BD Biosciences, 560839	Mouse IgG1-PE
CD140b-PE	BD Biosciences, 558821	Mouse IgG2a-PE
CD144-PE	BD Biosciences, 560410	Mouse IgG1-PE
CD146-PE-Cy7	BD Biosciences, 562135	Mouse IgG1-PE-Cy7
CD201-PE	BioLegend, BLE351904	Rat IgG1-PE
CD318-PECy7	BioLegend, BLE324016	Mouse IgG2b-PECy7
Mouse IgG1 control-PE	BD Biosciences, 555749	N/A
Mouse IgG2b control-PE	BD Biosciences, 555743	N/A
Mouse IgG1 control-PE	BD Biosciences, 557714	N/A
Mouse IgG1 control-PE-Cy7	BD Biosciences, 557872	N/A
Mouse IgG2a control-PE	R&D Systems, IC003P	N/A
Mouse IgG2b control-PECy7	BioLegend, BLE400325	N/A
Rat IgG1 control-PE	BD Biosciences, 557078	N/A

RNA extraction, quantification and reverse transcription

Total mRNA was extracted using the RNeasy mini or micro kit following the manufacturer's instructions (Qiagen, Santa Clara, CA, USA), quantified using a NanoDrop spectrophotometer (Labtech, Wilmington, DE, USA) following DNase treatment (Ambion, Austin, TX, USA) and converted to cDNA by reverse transcription as previously described [30].

Digital gene expression sequencing

RNA integrity from the six batches of hMuStem cells at P2, P4, P5, P6 and P12-P15, as described above, was determined using the Agilent Eukaryote Total RNA Nano kit with the 2100 Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA, USA). A high throughput 3' digital gene expression (3'DGE) RNA-sequencing protocol was performed as previously described [32]. Briefly, the libraries were prepared from 10 ng of total RNA. The mRNA poly(A) tail was tagged with universal adapters, well-specific barcodes and unique molecular identifiers (UMIs) during template-switching reverse transcription. Barcoded cDNAs from multiple samples were then pooled, amplified, and tagmented using a transposon-fragmentation approach that enriches for 3' ends of cDNA. A library of 350-800 bp was run on an Illumina HiSeq 2500 using a TruSeq Rapid SBS kit (Illumina, San Diego, CA, USA). Sequencing-derived data are available through GEO accession (on going). Read pairs used for analysis fulfilled the following criteria: all 16 bases of the first read must have quality scores of at least 10 and the first 6 bases must correspond exactly to a designed well-specific barcode. The second reads were aligned to RefSeq human mRNA sequences (hg19, obtained from the UCSC Genome Browser) using bwa version 0.7.4 4 with non-default parameter "-l 24". Reads mapping to several positions in the genome were filtered out from the analysis. Digital gene expression (DGE) profiles were generated by counting the number of unique UMIs associated with each RefSeq genes for each sample.

Biological samples classification

The UMI counts for each gene in each sample were normalized by dividing by the sum of UMI counts across all genes in the same sample and then expressed in UPM (UMI counts for one gene per million UMI counts for all genes). Rlog function (DESeq2 Bioconductor package) was applied on normalized expression to fit a logarithmic scale. A Principal

Components Analysis (PCA) was performed on genes with a standard deviation higher or equal to 3 among all the samples, using the FactoMineR package. The first 11 Principal components explaining more than 80% of the information variance were retained. A k-means method (with k=3) based on the selected components was used to classify the biological samples.

Differential gene expression and classification

Differential expression analysis was performed using the DESeq2 Bioconductor package version 1.14.1 [33]. The UMI counts were analyzed using a multi-factor design including the paired samples information to take into account the differences between patients while estimating the effect attributable to the time of culture. Significantly differentially expressed genes between expansion times were identified using a fold-change threshold ≥ 4 and a BH adjusted p value < 0.01 . The sum of the differentially expressed genes between all possible pairwise comparison was classified in groups of co-expressed genes using the k-means method (k=4).

Senescence-associated β Galactosidase analysis

hMuStem cells (n=6, independent donors) were seeded in triplicates on CellStart-coated 24-well plates at 6000 cells/cm² and cultured in GM for 2 days. SA- β Gal activity was evaluated with Senescence β -Galactosidase staining kit (#9860, Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA) following the manufacturer's instructions. Total number of cells and blue-stained cells were counted. At least 150 cells were considered for each replicate well. Results are referred as percentage of SA- β Galactosidase⁺ cells.

In vitro myogenic differentiation

For myogenic differentiation, hMuStem cells were seeded at 3×10^4 cells/cm² in GM on 24-well plates and cultured for 24 hours after which 10% HS was replaced with 1% FBS. After 4 days, cultures were fixed in 4% PFA and incubated with 5% Triton X-100 (30 min, 4°C), 20% goat serum in PBS (20 min, RT) and finally with anti-human sarcomeric myosin heavy chain isoform (sMyHC) Ab (1:500; Developmental Studies Hybridoma Bank/DSHB, Iowa City, IA, USA) for 60 min at 37°C. Specific Ab binding was then visualized using AlexaFluor® 488-coupled secondary Ab (1:500; Invitrogen) and nuclei were counterstained

with DRAQ5 (1:1000; Biostatus, Loughborough, UK). The fusion index (FI) was determined as the ratio of nuclei within sMyHC⁺ myotubes (≥ 2 nuclei) to the total number of nuclei. Two random fields in each of 3 replicate wells were analyzed and between 234 and 2659 nuclei per well were considered.

Statistical analysis

Results are presented as the mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using R software (3.3.2 version). Data were tested for normality and independence before analysis, as previously described [34]. Statistical differences were calculated using a linear mixed effect (LME) model considering the donor as the random term, followed by Tukey's multiple comparison post-hoc test [35]. The enrichments of Gene Ontology (GO) annotation terms within a group of genes were calculated with the Fisher exact probability using a Gaussian Hypergeometric test using the AMEN suite of tools [36]. A biological process term is considered to be significantly enriched when the number of genes bearing this annotation is ≥ 20 and when the associated FDR-corrected p-value is <0.01 .

Results

hMuStem cells display an interesting *in vitro* proliferation potential before becoming gradually senescent

To characterize the impact of *in vitro* expansion time on hMuStem cell features, six batches were isolated from independent donors, using an adaptation of the previously described preplating protocol [30]. First, the proliferation behavior of the hMuStem cell populations was investigated by culturing until they ceased to divide, as it represents an essential feature to suit clinical needs especially when whole body treatment is considered. The resulting proliferation curve could be fractionated in three parts (Figure 1, A). During the first 18 ± 1 days (corresponding from passage 1/P1 to P5), cell batches were homogeneously able to reach 18.1 ± 0.5 cumulative population doublings (CPDs), which corresponds to a global doubling time (DT) of 1.0 ± 0.1 days. When calculated for each passage, DT ranged from 0.93 ± 0.17 to 1.0 ± 0.19 days for P2 to P5 (Figure 1, B). Between 18 ± 1 to 50.2 ± 0.8 days of culture (P5 to P10-P12 depending on cell batch), hMuStem cells proliferated more slowly as illustrated by the slightly higher DT at P6 (1.17 ± 0.13 days; $p < 0.001$, $p < 0.05$ and $p < 0.01$ when compared to P2, P4 and P5, respectively). hMuStem cell populations presented more heterogeneous

proliferation rates, reaching 32.9 to 51.6 CPDs. This could be related to the donor history and the initial expansion stage occurring between the seeding and the 1st passage (P1) that cannot be evaluated. From 50.2 ± 0.8 days, hMuStem cell populations were characterized by a flat curve, revealing either a very limited proliferation rate or a growth arrest after having realized 46.7 ± 3.8 CPDs in 74.7 ± 5.4 days. Consistent with the proliferation profile of the hMuStem cell populations, hTERT subunit expression was not detected in any of the cell batch and independently of the considered passages (Figure 1, C). The proportion of proliferative cells on the hMuStem cell cultures at the different passages was determined through the expression of Ki67 antigen (Figure 1, D). The percentage of Ki67⁺ cells were of 93 ± 1 %, 90 ± 1 % and 83 ± 3 % for P2, P4 and P6 cells, respectively, revealing a slight but significant decrease from P4 to P6 ($p < 0.001$ and $p < 0.05$ compared to P2 and P4, respectively) that could reflect the slight increase of DT observed at P6. For P12-P15 (depending on the cell batch based on the occurrence of growth arrest), Ki67⁺ cells were of 31 ± 9 %, showing a strong reduction of the proliferative cell number. Concomitantly, immunocytochemistry analysis of Hoechst33342 DNA stain intensity allowed us to show that hMuStem cells positioned in G₀-G₁ phases represented 59 ± 2 % and 65 ± 2 % of all cells at P2 and P4 respectively compared to 75 ± 2 % at P6 ($p < 0.001$ and $p < 0.01$ compared to P2 and P4, respectively; Figure 1, E). The proportion of cells in G₀-G₁ phases is yet more important for P12-P15 cells corresponding to 91 ± 3 % of cells. To go further, the ability of expanded hMuStem cells to proliferate at very low density was evaluated by determining their clonogenic potential (Figure 1, F). CFU numbers were of 38 ± 3 %, 29 ± 4 % and 14 ± 3 % for P2, P4 and P6, respectively, revealing a significant decrease in clonogenicity starting at P6 ($p < 0.001$ and $p < 0.01$ compared to P2 and P4, respectively). No colony was observed for P12-P15 cells, which confirmed the lack of proliferative abilities for these cells. Overall, these results revealed a significant impact of the *in vitro* expansion time on hMuStem cell proliferation potential starting at P6 with cells that after 23 ± 2 CPDs display a lesser active mitotically status. We thus did not investigate hMuStem cell properties beyond this expansion limit. For the rest of the paper, it is noteworthy that we chose to use passage numbers instead of the more relevant CPD numbers, as the last ones were relatively homogeneous between the six studied populations. However, CPD numbers at each studied time points are referred in Table S4.

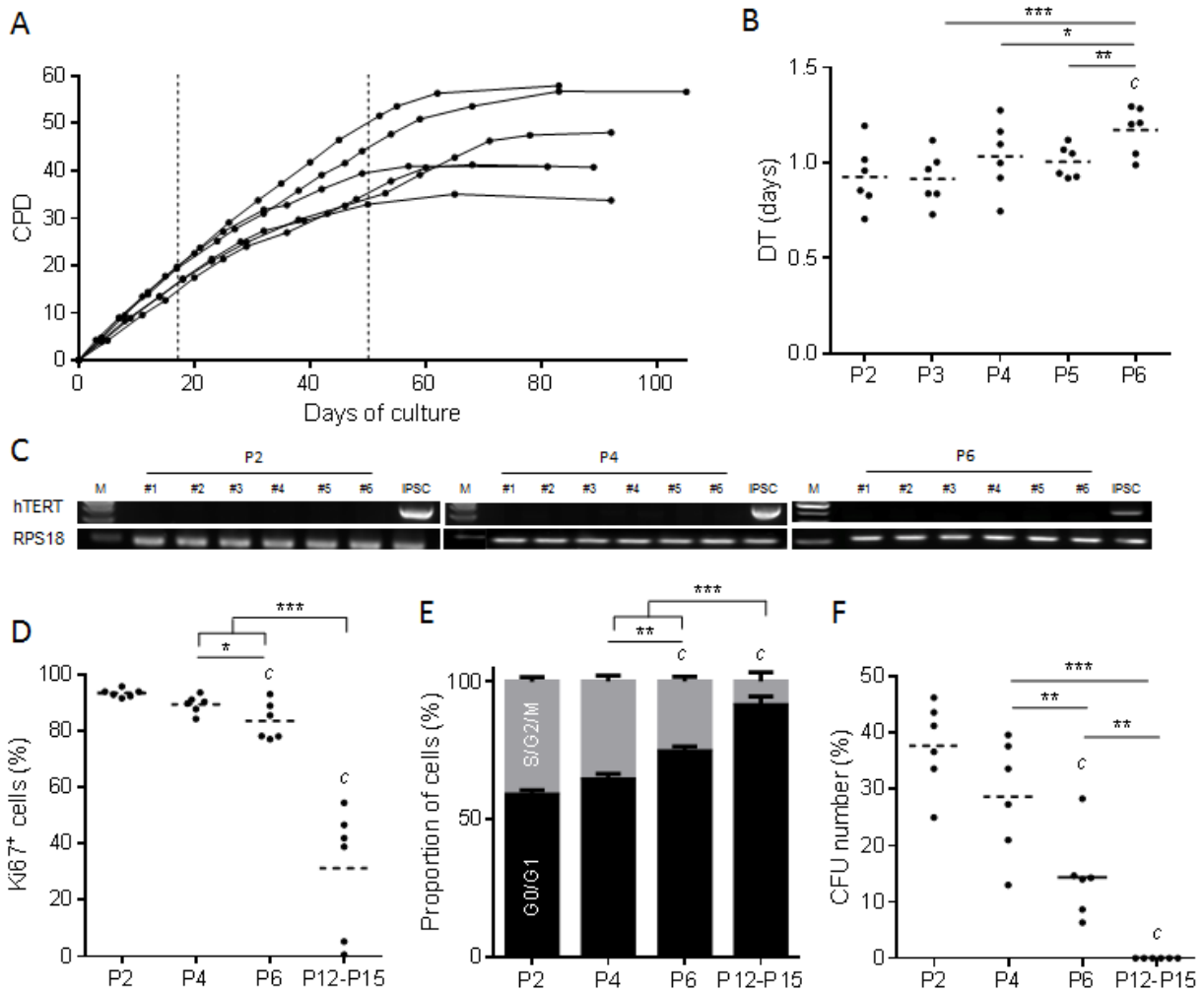


Figure 1: Proliferative status of hMuStem cells during *in vitro* expansion stage. hMuStem cells (n=6 from independent donors) were cultured until growth arrest. (A) Cumulative population doublings (CPDs) before growth arrest. (B) Doubling time (DT) from passage 2 (P2) to P6. (C) RT-PCR analysis of telomerase reverse transcriptase (TERT) gene expression in hMuStem cell preparations at P2, P4 and P6. (D) Proportion of hMuStem cells expressing Ki67 antigen. (E) Distribution of cultured hMuStem cells in G₀/G₁ and S/G₂/M phases of the cell cycle. (F) Clonogenic potential was assessed for hMuStem cells at P2, P4, P6 and P12-P15 and represented as percentage of colony-forming unit (CFU) containing more than 50 cells on initial number of seeded cells. LME model followed by Tukey post-hoc test, ^cp<0.001 compared to P2, *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001

Table S4. Cumulative population doublings (CPDs) associated with passages

Donor	CPD			
	P2	P4	P6	P12-P15
#1	4.2	13.5	21.4	33.8
#2	3.9	13.5	20.9	46.3
#3	4.2	12.7	21.4	40.7
#4	4.2	14.4	23.8	58.0
#5	4.7	13.5	22.6	40.9
#6	4.8	13.9	25.2	47.7

hMuStem cell population display stable morphological features up to 22 population doublings

To analyze whether the morphological features of the hMuStem cell populations could be impacted by the *in vitro* expansion time, we performed a qualitative and quantitative longitudinal study. Phase contrast observations before each passage comprised between P2 to P6 allowed us to describe for all cell batches primary cultures composed of a majority of spindle-shaped cells that tend to line up and few poorly adherent round cells (Figure 2, A). At P12-P15, all the primary cultures displayed a majority of enlarged cells, which appeared poorly refractile and vacuolated. In parallel, fluorescence analysis of the cell diameter after enzymatic detachment from the coated matrix demonstrated an homogeneous cell size distribution for hMuStem cell populations at P2, P4 and P6, $93 \pm 1 \%$, $95 \pm 1 \%$ and $93 \pm 1 \%$ of them being found between 9 to 15 μm , respectively (Figure 2, C). Moreover, cells with a size between 10 and 12 represented $42 \pm 2 \%$, $57 \pm 2 \%$ and $51 \pm 1 \%$ at P2, P4 and P6, respectively. In contrast, hMuStem cell populations at P12-P15 are much more heterogeneous, $39 \pm 7 \%$, $50 \pm 7 \%$ and $12 \pm 2 \%$ of cells exhibiting a size between 5 to 9 μm (possibly corresponding to cell debris), 9 to 15 μm and 15 to 21 μm , respectively. Cells from 10 to 12 μm represented $15 \pm 2 \%$. To deepen the morphological characterization, the nucleocytoplasmic (N/C) ratio of hMuStem cells was determined at the different passages. hMuStem cells were characterized by a N/C ratio mainly between 0.25 and 0.50, those representing $82 \pm$

1 %, 79 ± 2 % and 70 ± 1 % of all cells at P2, P4 and P6 (Figure 2, D). The decrease observed at P6 was correlated to an increase of cells with a N/C ratio from 0-0.25 ($p < 0.001$ compared to P4 and P2). In return, 46 ± 7 %, 39 ± 3 % and 10 ± 4 % of hMuStem cells at P12-P15 displayed a N/C ratio from 0-0.25, 0.25-0.50 and 0.50-0.75 respectively that revealed an increase of the smaller N/C ratio ($p < 0.001$ compared to P2, P4 and P6). Collectively, these results indicated that the N/C ratio was conversely correlated to the increase of cell size (Figure S1, B). Finally, the presence of undifferentiated binucleated cells was determined in the hMuStem cell primary cultures. Only rare binucleated cells negative for myogenin were detected in the first phases of expansion (< 0.2 % for P2, P4 and P6). Overall, a conservation of the morphological properties of hMuStem cells was observed until the P6, whereas senescent cells define themselves by a dispersal of their size and their N/C ratio were observed on hMuStem cell populations at P12-P15.

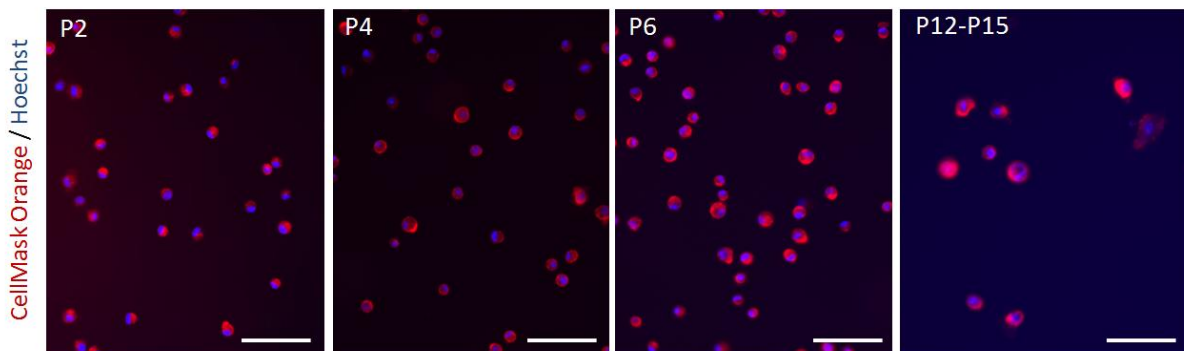


Figure S1: Morphological criteria of hMuStem cells over the *in vitro* expansion time. hMuStem cells ($n=6$ from independent donors) were cultured up to P2, P4, P6 and P12-P15 and then submitted CellMask Orange staining in order to determine the cell diameter and nucleo-cytoplasmic ratio in suspension. *Scale bar: 100 μ m*

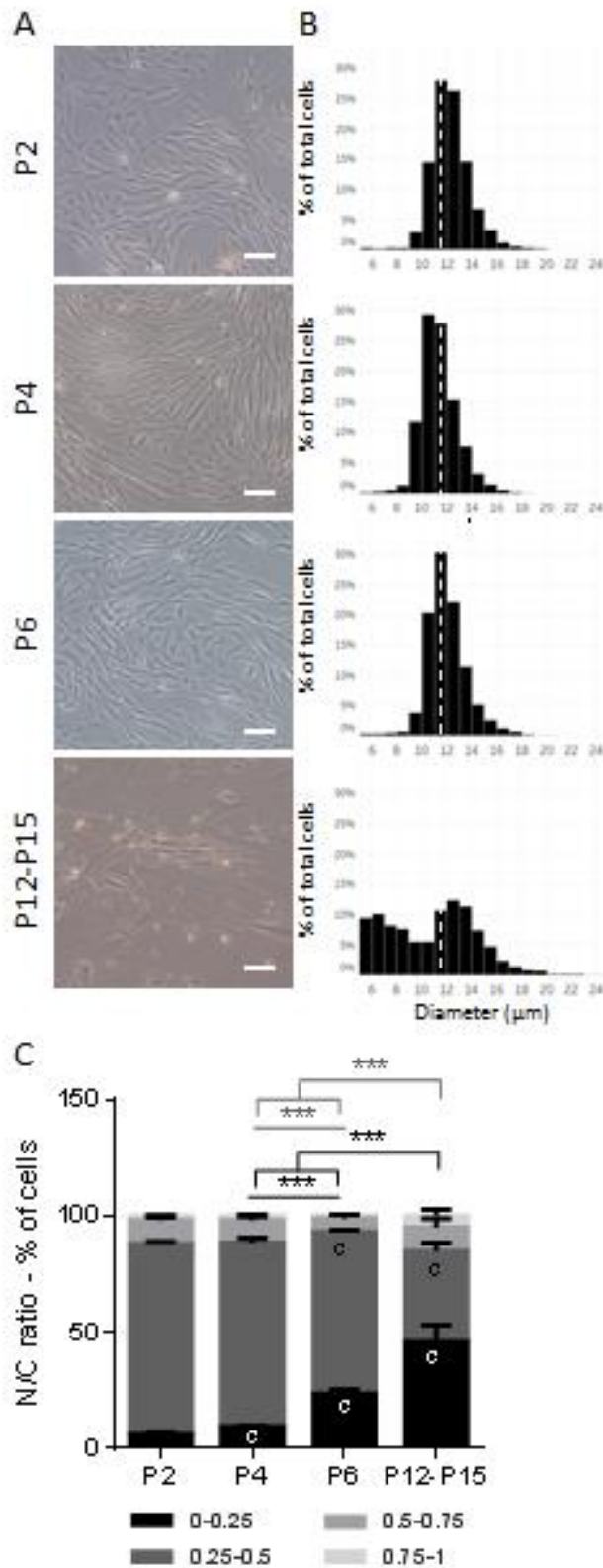


Figure 2: Morphological features of *in vitro* expanded hMuSem cells. hMuStem cells (n=6 from independent donors) were cultured until growth arrest. (A) Phase contrast microscopy of primary cultures at different passages. (B) Cell diameter distribution in suspension. (C) Distribution of cells according to their nucleocytoplasmic (N/C) ratio presented in four ranges. LME model followed by Tukey post-hoc test, ^cp<0.001 compared to P2 and ***p<0.001. Scale bar: 100 μm

Stable phenotype of perivascular/mesenchymal compartment-derived cells positioned at the early stage of the myogenic lineage for the hMuStem cell population

hMuStem cell population was previously described as early myogenic-committed progenitor cells with a perivascular/mesenchymal signature [30]. We next investigated whether this phenotypic profile was maintained during the *in vitro* expansion period. First, flow cytometry analysis showed that 5 out of 6 cell batches homogeneously contained 92% to 98% of cells positive for the satellite cell (SC) and myoblast marker CD56 (NCAM) between P2 to P6, while the remaining cell batch (donor #6) was defined by a progressive decreased expression over the passage, reaching 38% of CD56⁺ cells at P6 (Figure 3, A). Interestingly, this cell batch was characterized by initial lower content of CD56⁺ cells (85%) than the others. Cell surface phenotype of CD56⁺ and CD56⁻ sub-populations was performed for this particular donor and flow cytometry images were reported in Figure S2. Independently of the expansion time, homogeneous expression profiles were obtained for the other SC markers CD29, CD82 and CD318. Eighty-four \pm 2%, 73 \pm 2 % and 66 \pm 4 % of cells were positive for the myogenic regulatory factor (MRFs) Myf5 at P2, P4 and P6, respectively (Figure 3, A), indicating a slight but significant decrease correlated through expansion ($p < 0.05$ and $p < 0.001$ compared to P2). Regarding MyoD expression, 14 \pm 2 %, 8 \pm 2 % and 10 \pm 2 % of hMuStem cells were found positive at P2, P4 and P6, respectively (Figure 3, A), revealing the same significant decrease in expression ($p < 0.01$ compared to P2). Also, 79 to 85 % of cells expressed the muscle-specific marker desmin, with no significant difference until P6. In contrast, only 14 \pm 3 %, less than 1 % and 16 \pm 8 % of hMuStem cells at P12-P15 remained positive for these respective markers, indicating significant decreases compared to previous cultured populations ($p < 0.001$). Late differentiation marker myogenin was poorly expressed by hMuStem cells (< 3 %), independently of the *in vitro* expansion period. Furthermore, hMuStem cells stably expressed the well-described perivascular cell markers CD140b and CD146 from P2 to P6 (from 52 to 100 % and 90 to 100%, respectively) with no change correlated to expansion time (Figure 3, B). They were highly positive ($>99\%$) for the classical mesenchymal stem cell markers CD44, CD73, CD90, CD105 and CD201, independently of the culture duration. Likewise, they were uniformly negative for the expression of the typical hematopoietic (CD34 and CD45) and endothelial (CD31 and CD144) cell markers and no change was observed through passages (Figure 3, C). Overall, we showed that the *in vitro* expansion time did not modify the perivascular/mesenchymal signature of hMuStem cells and

resulted in loss of the phenotype of early-committed myogenic progenitor only at the late times.

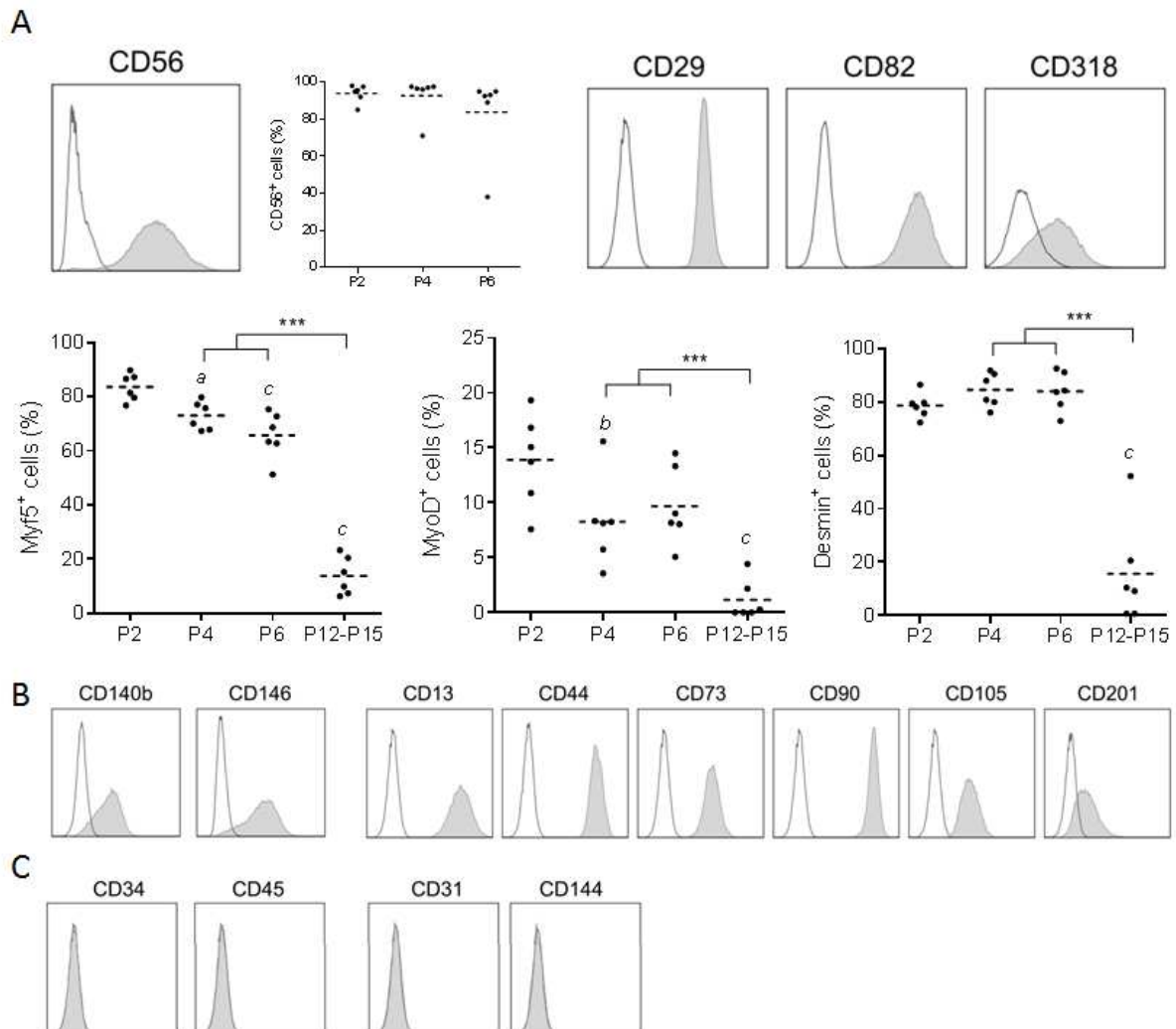


Figure 3: Cell lineage-specific phenotype of hMuStem cell population over *in vitro* expansion period. (A) Immunolabellings against CD56, CD29, CD82, CD318, Myf5, MyoD and desmin were performed on hMuStem cells (n=6 from independent donors) at P2, P4 and P6 (flow cytometry) or at P2, P4, P6 and P12-P15 (culture chamber slides). Flow cytometry images of a representative cell batch at P4. Isotype control and specific signals are in white and grey, respectively. LME model followed by Tukey post-hoc test, ^ap<0.05, ^bp<0.01 and ^cp<0.001 compared to P2 and ***p<0.001. (B) Representative flow cytometry images revealing the expression of perivascular (CD140b, CD146) and mesenchymal (CD13, CD44, CD73, CD90, CD105 and CD201) cell markers. (C) Representative flow cytometry profiles revealing the homogeneous lack of expression for the hematopoietic (CD34, CD45) and endothelial (CD144, CD31) cell markers.

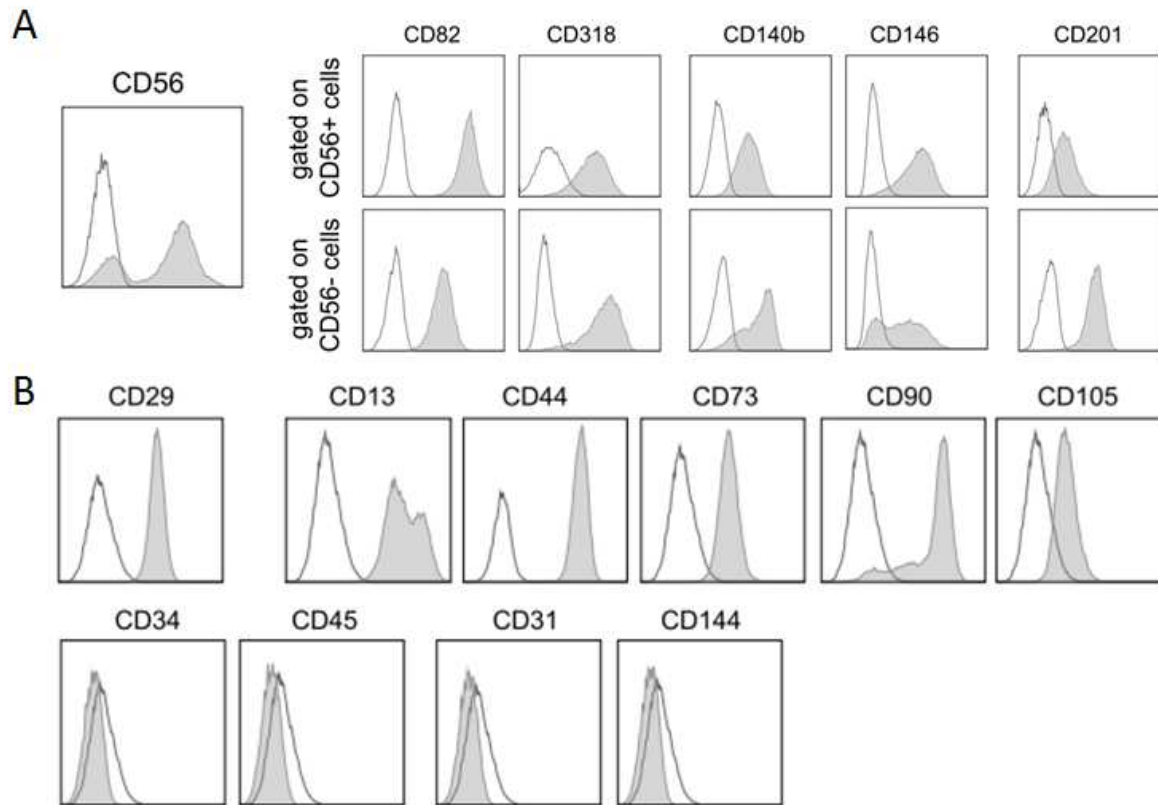


Figure S2: Impact of expansion time on phenotypic profile of hMuStem cell isolated from donor #6. (A) Flow cytometry images of cell batch at P4 revealing the heterogeneous expression of the satellite cell and muscle marker CD56 as well as the expression of the myogenic (CD82, CD318), perivascular (CD140b, CD146) and mesenchymal markers (CD201) separately represented for CD56+ and CD56- sub-populations. (B) Flow cytometry images revealing the expression of myogenic CD29, mesenchymal (CD13, CD44, CD73, CD90 and CD105) markers as well as the lack of expression for the hematopoietic (CD34, CD45) and endothelial (CD31, CD144) markers.

Global transcriptome analysis of the MuStem cell population identified the passage 6 as critical in the preservation of the original phenotype

To deepen this phenotypic characterization, we further evaluated how the *in vitro* expansion time could impact on the global gene expression program of the hMuStem cell populations, using the undedicated 3' digital gene expression RNA-Sequencing (DGE-Seq) technology. Primary cultures collected at the different passages previously investigated were considered while an additional time-point corresponding to P5 was considered. The Principal Components Analysis combined with a classification approach allowed to distinguish three main cell sets (Figure 4). The first set, reported in green in Figure 4, contained all the cell batches obtained at P2 and P4, 5 out of 6 of the cell batches collected at P5 as well as 1 out of

6 of those prepared at P6. The second set (orange) gathered 5 out of 6 cell batches at P6, the remaining cell batch at P5 and 1 out of 6 of those collected at P13. The last set (red) was exclusively composed of cell batches collected between P12 to P15. These results, revealing a specific molecular signature between cell batches depending on their *in vitro* expansion time, allowed us to classify the cultured hMuStem cell populations on three panels named early, intermediate and late populations mainly corresponding to P2-P5, P6 and P12-P15, respectively. Differential gene expression analysis revealed 65 differentially expressed genes between early and intermediate populations (reported as volcano plot in Figure S3), including 39 down-regulated genes and 26 up-regulated ones. Differences increased with culture as assessed by 175 down-regulated and 259 up-regulated genes between intermediate and late populations.

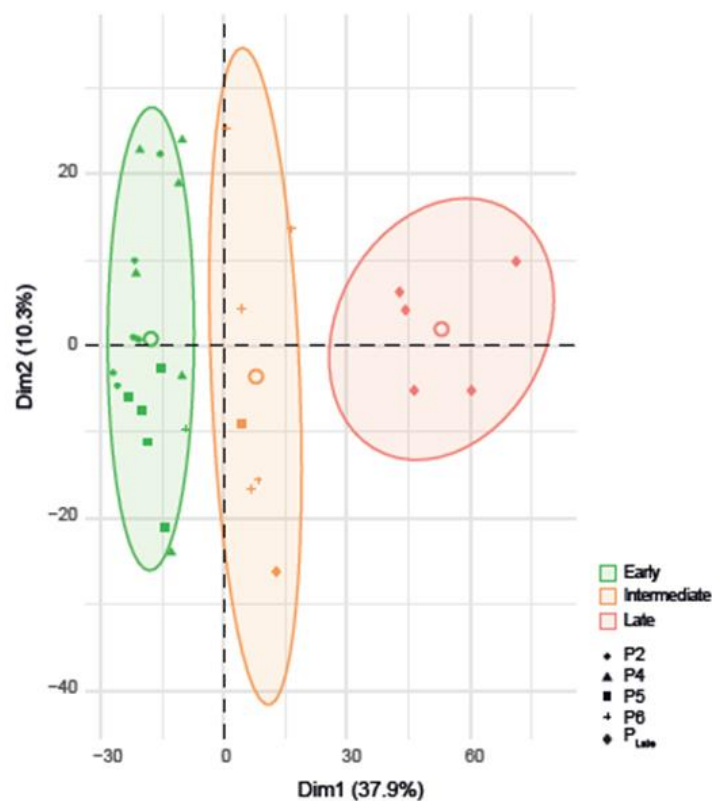


Figure 4: Impact of *in vitro* expansion time on global transcriptome of hMuStem cells. Principal component analysis of the gene expression program of hMuStem cells (n=6 from independent donors) at P2 (dots), P4 (triangles), P5 (squares), P6 (crosses) and P_{Late} (diamonds). Early, Intermediate and Late populations determined by subsequent classification of the biological samples are represented by green, orange and red ellipses, respectively. Barycentres are represented by appropriate coloured circles.

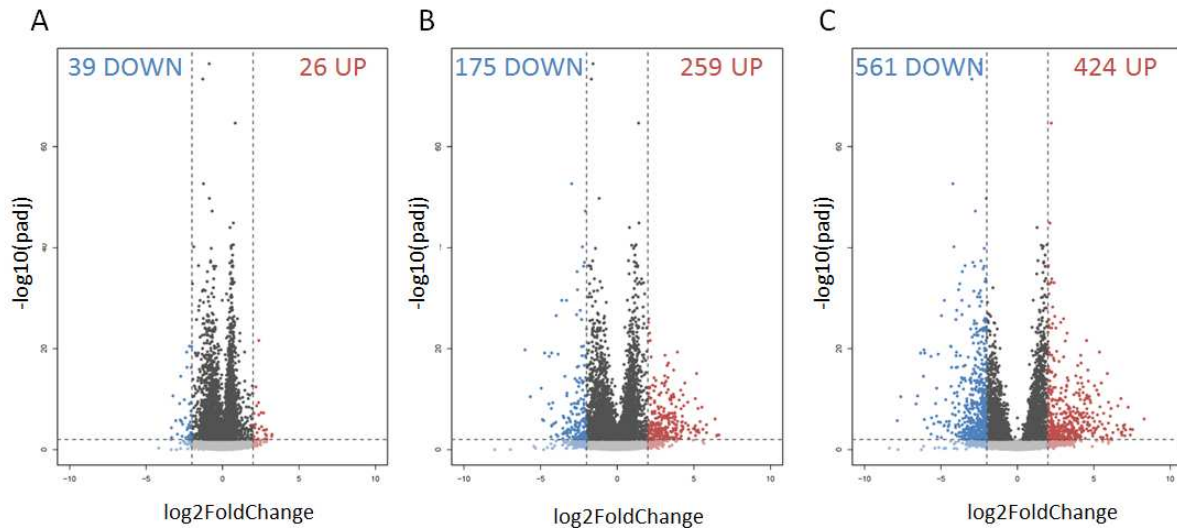


Figure S3: Differential gene expression between cultured hMuStem cell populations determined by DGE-Sequencing. Volcano plots illustrating differential gene expression between Early and Intermediate populations (A), Intermediate and Late populations (B) and Early and Late populations (C). The 17,643 expressed genes are represented by dots. The vertical dashed lines indicate the fold-change cutoffs. Blue and red dots illustrate down-regulated ($\log_2(\text{fold-change}) \leq -2$) and up-regulated ($\log_2(\text{fold-change}) \geq 2$) genes, respectively. The horizontal dashed line represents the adjusted p-value cutoff. Genes having an adjusted p-value < 0.01 are presented above this line. Number of differentially expressed genes between populations are specified.

From the 17,643 genes detected in at least one of the 30 cell samples, 997 differentially expressed unique genes were identified, according to a statistically significant differential expression assessed using a 4-fold change and an adjusted p-value < 0.01 . The 997 unique genes identified as differentially expressed among the three populations were classified in four groups of co-expressed genes illustrated in Figure 5. First, we observed a quite homogenous transcription profile for P2 to P5 cells, confirming the previous classification as early cells determined with proliferation assays. Late populations also display a relatively homogenous transcriptomic signature, whereas intermediate populations reflect a more transitory state between early and late signature. The first two clusters, gathering genes more expressed during early expansion phases, are highly enriched in genes involved in muscle development and proliferative cell cycle. These genes are progressively down-regulated during expansion. The two other clusters represent genes involved in regulation of cell death, response to stress and inflammatory response. Conversely, these genes are mainly influenced by late cells expression profiles, but their onset was observed for the intermediate population.

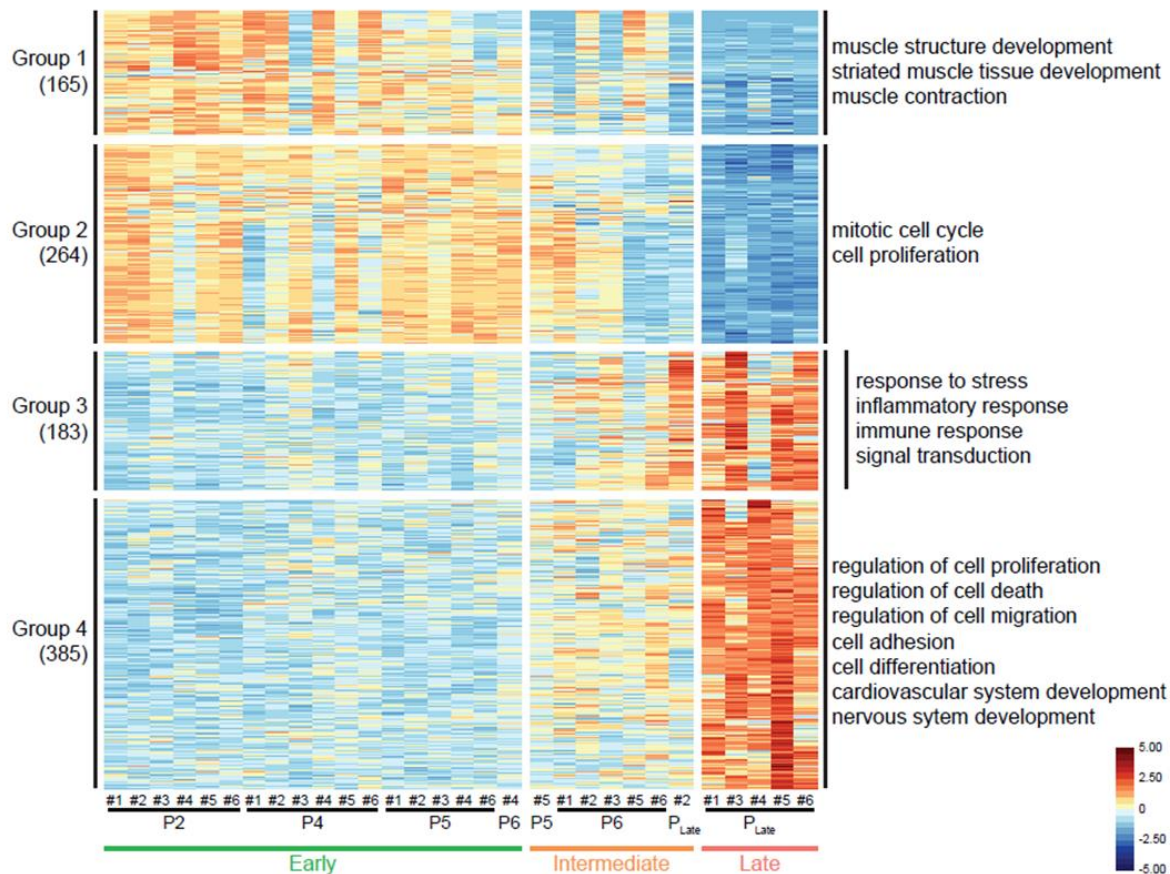


Figure 5: Genes differentially expressed over *in vitro* expansion. False-color heatmap illustrating the 997 unique significantly differentially expressed genes between Early, Intermediate and Late populations, classified in 4 groups of co-expression. Each line and column correspond to a gene and an individual cell sample, respectively. The standardized rlog-transformed intensities are plotted with a color scale ranging from -5.00 (blue) to 5.00 (red) incremented by 0.50. A selection of Gene Ontology (GO) terms significantly enriched in the groups of co-expressed genes is indicated at the right of the heatmap.

To go further in analyzing each of these biological processes, expression profile of currently well-known cell lineage markers was searched to confirm and supplement the previous cytometry and immunocytochemistry analysis. Regarding the genes commonly used to qualify myogenic cells, we confirmed that hMuStem cell populations were characterized by an expression of *NCAMI/CD56* concomitantly to an expression of *ITGB1/CD29* and *CD82* that remained stable until late passages (Figure S4, A). Interestingly, *CDCP1/CD318* gene was found up-regulated in late populations compared to early populations. Importantly, *MYOD1*, *MYOG* and *DES* genes were found significantly reduced in late populations compared to early and intermediate ones, while no significant differences were noted between the early and the intermediate populations (Figure S4, A). *MYF5* displayed a decreased

expression in the late population but was not identified as significantly differentially expressed. These results were consistent with previous analysis at the protein level. *PAX3* and *PAX7* genes were not detected, confirming previous hMuStem cell description, whereas *MYF6/MRF4* display the same decreasing pattern than other MRF genes (Figure 6, A). We additionally identified the transcription factor *MEF2C* and numerous genes involved in muscle structure and development among which myosin, troponin and actin isoforms (*MYL1*, *MYL2*, *MYL4*, *MYL5*, *MYH3*, *TNNT1*, *TNNT2*, *ACTN2*) that also have a decreasing expression profile from early to late populations. Among these genes, *MYL5*, *CHRNA1*, *TNNT1*, *KLHL31* and *DNAL1* could be interesting candidates to qualify the status of cultured hMuStem cell populations as they present highly homogeneous expression profiles (Figure 6, A). Concerning the other cell-lineage markers, we confirmed the stable expression during the *in vitro* expansion time of the perivascular (*PDGFRB/CD140b*, *MCAM/CD146*) (Figure S4, B) and the mesenchymal (*ANEP/CD13*, *CD44*, *NT5E/CD73*, *THY1/CD90*, *PROCR/CD201*) cell markers (Figure S4, C). Only *ENG/CD105* gene had an expression profile impacted, as it was found up-regulated in late populations compared to early ones (Figure S4, C). Finally, we determined a lack of expression for the pluripotency markers *NANOG*, *POU5F1/Oct-4*, *SOX2* and *FUT4/SSEA-1*, *PODXL/TRA-1-60/81* and a weak expression of *KLF4*, independently of the *in vitro* expansion time (Figure 6, C). Associated to our results on the proliferation kinetic, the hTERT expression profile and the CFU potential, these results clearly positioned the hMuStem cells as progenitor cells rather than strictly stem cells, as we have already presented them.

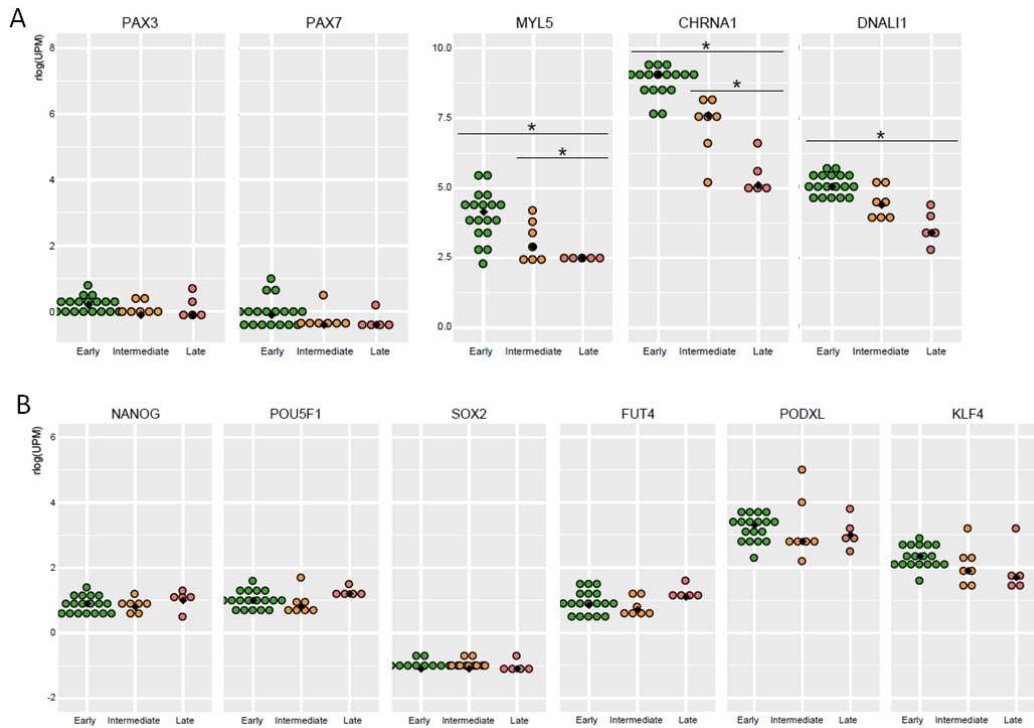


Figure 6: Impact of expansion time on expression profiles of myogenic- and pluripotency-related genes. DGE-seq expression profiles of genes related to muscle commitment (A) and pluripotency (B) for Early (green dots), Intermediate (orange dots) and Late (red dots) populations. Expression values are reported after a regularized logarithmic (rlog) transformation. Median values are represented by black diamonds. Significant differential expression are indicated as * (BH adjusted p-value<0.01).

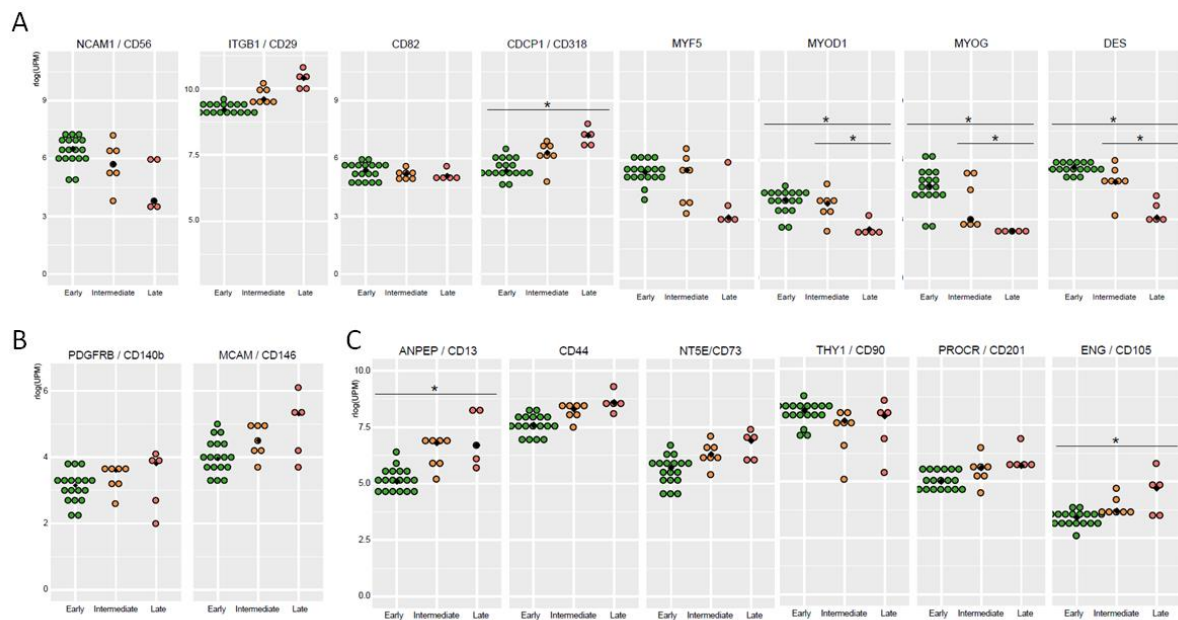


Figure S4: Validation of cell lineage-specific phenotype of hMuStem cell population over *in vitro* expansion period. DGE-seq expression profiles of myogenic (A), perivascular (B) and mesenchymal (C) markers for Early (green dots), Intermediate (orange dots) and Late (red dots) populations. Expression values are reported after a regularized logarithmic (rlog) transformation. Median values are represented by black diamonds. Significant differential expression are indicated as * (BH adjusted p-value<0.01).

hMuStem cell populations at early stage are composed of mitotically active cells not expressing cell death or stress response signals

Despite their high proliferative potential, hMuStem cell populations gradually divided less for finally reach a state of growth arrest after about 60 days of culture, as we showed in Figure 1. DGE-Seq analysis revealed numerous genes and gene families involved in cell cycle regulation, particularly positioned in the 2nd panel of the Figure 8, A. Several cell division control proteins (*CDC45*, *CDC20*, *CDC6*), cyclin (*CCNA1*, *CCNA2*, *CCNB1*, *CCNB2*, *CCNE2*) and cyclin-dependent kinase (*CDK1*, *CDK2*) were up-regulated in the early and intermediate populations. Concomitantly, negative regulators including well-known *CDKN1A* and *CDKN2A* genes as well as the Growth Arrest Specific 6 (*GAS6*) gene were down-regulated, revealing a mitotic active state. As an exception, cyclin D1 (*CCND1*), whose first role is the progression through the cell cycle, was found highly up-regulated in late populations. These results are consistent with the high proportion of cells in S/G₂/M phases we previously observed in the early and intermediate populations. Furthermore, several genes encoding proteins involved in different phases of mitosis, including centromere and kinetochore-associated proteins (*SPC25*, *NDC80*, *NUF2* and *ZWILCH*) or kinesins (*KIF23*, *KIF2C*, *KIF20A*) were significantly down-regulated through *in vitro* expansion period (Figure 7, A). In addition, DGE-Seq analysis suggested a global change in the secretory phenotype of “late” hMuStem cell populations with the up-regulation of senescence-associated genes related to senescence-associated secretory phenotype (SASP), among which genes encoding interleukin 1 (*IL1B*), and 8 (*CXCL8*) as well as insulin growth factor binding protein-7 (*IGFBP7*), *CSF3* gene encoding for granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) and *HMG2A* (Figure 7, A). Altogether, these results strongly suggested a replicative senescence state for the late populations, which was reinforced by the detection of 53 ± 11 % of cells on late populations that were reactive for the senescence-associated β-galactosidase (SA-βGal) whereas the enzymatic activity was observed in less than 1 % and 2 ± 1 % of cells through P4 and P6, respectively (Figure 7, B). Regarding cell death, less than 2% of apoptotic cells were detected among cell populations, independently of culture time. Necrotic cells detected by PI integration were also found in low proportion (less than 1%) at P2 and P4, whereas a significant increase in necrotic cell proportion was observed at P6 (p<0.001 and p<0.01 compared to P2 and P4, respectively), although remaining inferior to 3% (Figure 7, C). Heterogeneous PI integration was also noticed for P12-P15 cells, while the differences did not pass the statistical analysis. In parallel, DGE-Seq analysis identified a large set of genes

known to be involved in cell death (142 genes) and stress response (61 genes), which homogeneously displayed a weak expression level in early populations. In return, the expression level of most of these genes became more heterogeneous in intermediate populations and clearly increased in late ones. Among them, *SFRP4*, *LIMK1* and *IGFBP4*, *TNFRSF1B* can be cited for cell death and stress response, respectively (Figure 7, D). Regarding the genes regularly mentioned to be bounded to the inflammatory response, a similar increasing profile than those described for cell death/stress response-associated genes was found for *FNI*, *SDCI* and *C3* (Figure 7, D), well pointing on the transitory state of the intermediate populations. Finally, as “intermediate” hMuStem cell populations were defined by a transitory expression profile between early and late populations with the appearance of genes related to senescence, cell death or stress revealing that they could not be considered for *in vivo* applications, we further investigated the 65 differentially expressed genes between early and intermediate populations. By this, we aimed at identifying selection of markers useful to determine easily and especially prematurely until which time of the *in vitro* expansion process hMuStem cell batch acquire characteristics not wished in quality term. Among the 39 down-regulated genes and 26 up-regulated ones, a stringent binary comparison of the differential criteria allowed us to point out on a set of 9 genes corresponding to 4 (*ALDH1A3*, *COL8A1*, *LRRC32*, *PAPPA*) and 5 (*DMBT1*, *SOX8*, *NINJ2*, *MSTN*, *TPPP3*) genes up-regulated and down-regulated for intermediate populations, respectively (Figure 8).

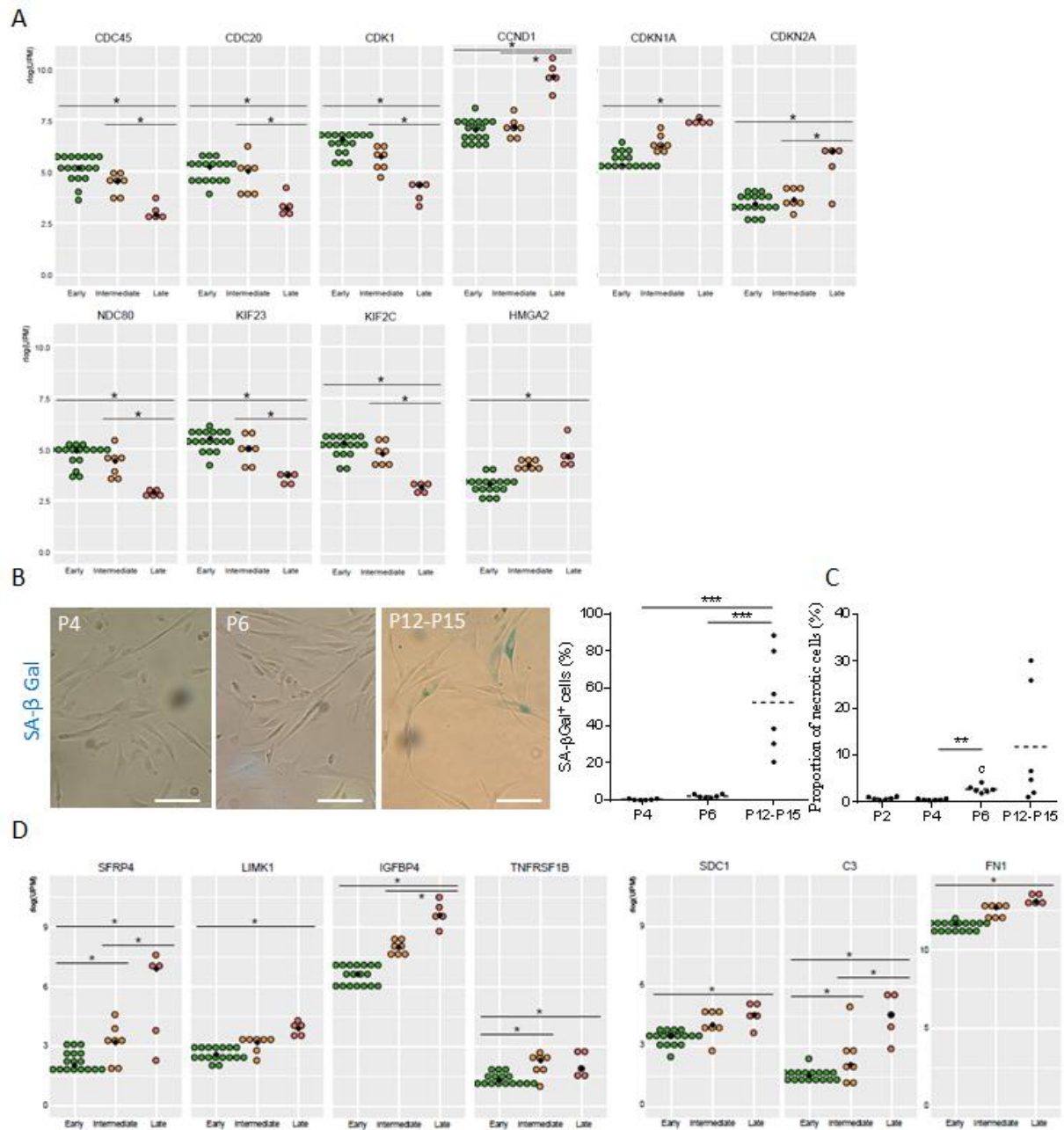


Figure 7: Mitotic clock, senescence and stress response-related parameters over *in vitro* expansion of hMuStem cells. (A) DGE-seq expression profiles of positive (CDC45, CDC20, CDK1, CCND1) and negative (CDKN1A, CDKN2A) regulators of cell cycle and genes associated with mitosis (KIF2C, KIF23, NDC80) and senescence (HMG2). Expression values for Early (green dots), Intermediate (orange dots) and Late (red dots) populations are reported after a regularized logarithmic (rlog) transformation. Median values are represented by black diamonds. Significant differential expression are indicated as * (BH adjusted p-value<0.01). (B) Activity of senescence-associated βGalactosidase (SA-βGal) was evaluated at P4, P6 and P12-15. Proportion of positive-blue stained cells is reported in percentages. (C) Presence of necrotic cells was investigated by Propidium Iodide (PI) staining at P2, P4, P6 and P12-P15 and was reported as percentage. LME model followed by Tukey post-hoc test, ***p<0.001. (D) Expression of genes associated with cell death (SFRP4, LIMK1), stress response (IGFBP4, TNFRSF1B) and inflammatory response (SDC1, C3, FN1) are represented as described above.

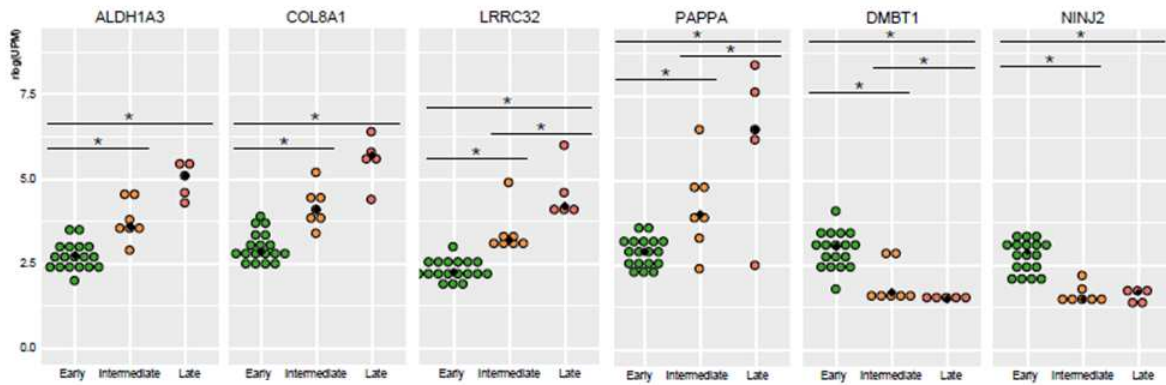


Figure 8: Set of significantly differentially expressed genes between Early and Intermediate hMuStem cell populations. Selection of genes among the 65 significantly differentially expressed genes between Early and Intermediate populations. ALDH1A3, COL8A1, LRRC32 and PAPP genes are up-regulated over *in vitro* expansion, whereas DMBT1 and NINJ2 genes displayed a decrease in their expression over *in vitro* expansion. Expression values are reported after a regularized logarithmic (rlog) transformation. Median values are represented by black diamonds. Significant differential expression are indicated as * (BH adjusted p-value<0.01).

hMuStem cell population exhibits spontaneous myogenic differentiation potential that gradually decreases during *in vitro* expansion time

hMuStem cells were previously characterized by a high spontaneous myogenic differentiation potential [30]. We thus aimed to evaluate how this ability to fuse evolves with *in vitro* expansion time. After 4 days in myogenic differentiation medium, the fusion index (FI), corresponding to the percentage of nuclei inside multinucleated cells expressing sarcomeric myosin heavy chain (sMyHC, green) (Figure 9, A), were of $32 \pm 2 \%$, $25 \pm 1 \%$ and $23 \pm 1 \%$ for hMuStem cell populations at P2, P4 and P6, respectively (Figure 9, B). Additionally, we did not detect any myotube in cell populations at P12-P15 (late). Overall, these results indicated that hMuStem cell population maintains ability to give rise myotubes *in vitro* up to P6 with only a slight decrease of myogenic potential between P2 and P4 ($p < 0.001$) with no additional loss through P6 but loses it in late times.

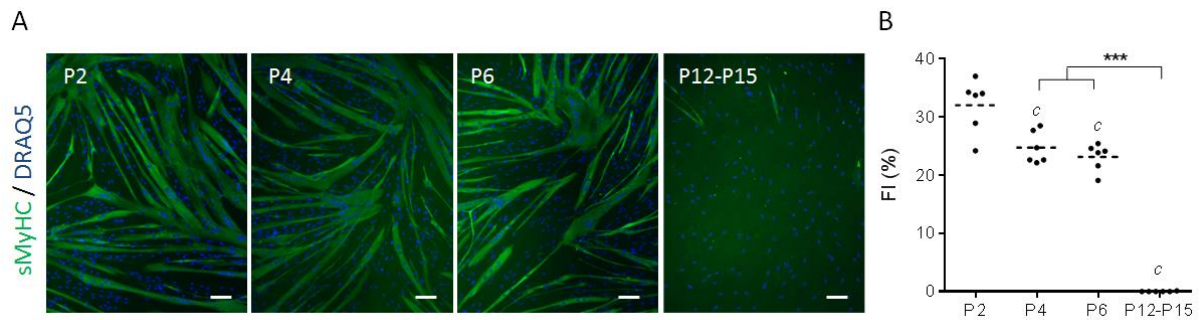


Figure 9: Impact of *in vitro* expansion time on ability of hMuStem cells to give rise multinucleated myotubes. (A) Cultured hMuStem cells at different passages were grown in low-serum medium for 4 days, then fixed and submitted to sarcomeric myosin heavy chain (sMyHC, green) immunolabelling to reveal multinuclei myotubes. hMuStem cells placed on growth medium were used as negative control. Fusion index (FI) was calculated on sMyHC⁺ myotubes. Nuclei were counterstained with DRAQ5 (Blue). Scale bar 100 μ m. LME model followed by Tukey's post-hoc test, ^cp<0.001 compared to P2, ***p<0.001.

Discussion

Over the last years, MuStem cells were presented as potential candidate for cell-based therapy of the most common orphan muscle disease corresponding to Duchenne Muscular Dystrophy (DMD). Several studies demonstrated indeed clinical and tissue benefits of allogeneic MuStem cells transplantation in the relevant large animal model of DMD [27–29,37]. In addition, recent work isolated, characterized and produced the human counterpart using a clinically-compatible culture conditions [30, and unpublished data]. Nevertheless, this skeletal muscle-derived cell population was until now characterized at a unique time of expansion corresponding to 10 to 12 CPDs after the first amplification step. hMuStem cell state at the end of the isolation process as well as their long-term safety and efficacy have not been investigated yet. Likewise, due to the relative scarcity of stem cells in adult tissues, most preclinical experiments used progenitors or stem cells after a phase of amplification in culture while growing evidences tend to indicate that long-term *ex vivo* manipulation can impact cell fate and thus therapeutic potential and safety of cell-based therapies [16–18].

First, we demonstrated in a reproducible manner that hMuStem cells can be isolated and expanded in clinically compliant culture conditions, with homogeneous amplification rates suitable for whole body treatment intention. Numbers of cells generated *in vitro* were in the same extent than those previously reported clinical trial for DMD [15]. hMuStem cells reached a permanent growth arrest after an average of 44 CPDs in 61 days after the initial

amplification step (P1), that was attributed to the occurrence of a senescence state as confirmed by the onset of SA- β Gal activity detection. These findings are consistent with those previously reported for cMuStem and hMuStem cells in research grade culture conditions [27,30] as well as for other myogenic populations such as human myosphere-derived progenitor cells (MDPCs) and freshly isolated muscle AC133⁺ [38,39]. Additionally, telomerase hTERT subunit expression was not detected whatever the cell batch and the time of amplification, which positions hMuStem cells rather as progenitor cells rather than strictly stem cells like we have already mentioned and supports the safety of the cell product as regard to regulatory agencies requirement. These characteristics also reinforced the distinction of our population with other stem cell populations including murine MDSCs and mice or human ADSCs that were presented with a more extended replicative life span even if contradictory results have been presented [9,40,41]. For the first time, we investigated the behavioral and molecular changes occurring in hMuStem cell population after long-term cultivation. The deeper analysis of its proliferative behavior revealed a persistent enrichment during the first expansion steps in proliferative cells expressing Ki67 antigen, among which one third was positioned in S/G₂/M phases of the cell cycle. This contributed to explain the maintenance of a stable DT around 24 hours through P5. In return, late populations were characterized by a drastically reduced proportion of Ki67⁺ cells associated with an accumulation of cells with a G₀/G₁ DNA content. These results were correlated to a significantly reduced expression of a myriad of genes involved in cell cycle and mitotic process, as well as with an increase of cell cycle negative regulators *CDKN1A/p21* and *CDKN2A/p16*, well-known effectors of senescence occurrence following different signals including telomere shortening [42–44]. As an exception, cyclin D1 (*CCND1*), whose first role is the progression through the cell cycle, was surprisingly found highly up-regulated in late populations, as previously shown for human fibroblasts and vascular smooth muscle cells [45–47]. It has been proposed that high level of cyclin D1 in association with that of p21 may reduce the inhibitory activity of cyclinD1-Cdk complexes on retina blastoma protein (pRB), resulting in cell cycle arrest [47,48]. These results are consistent with the accumulation of our cells with a G₀/G₁ DNA content in late populations. The onset of DT increase was positioned at P6, corresponding to an average of 22.6 CPD, and was correlated with a slight decreased number of proliferative Ki67⁺ cells. No significant changes in the previously cited genes were however observed between early and intermediate populations. At this step of amplification, SA- β Gal activity was evidenced in less than 3% of the cell population. Further experiments

would be required to determine the cell state of the remaining 5-15% of Ki67⁺ cells, as they could be differentiated or quiescent cells.

hMuStem cells were previously defined as early myogenic-committed progenitor cells with a perivascular/mesenchymal signature [30]. Here, we noticed a stable expression profile for the sets of specific cell lineage markers through P6. In addition, undedicated analysis of global expression signatures revealed a significant homogeneity and proximity of transcript expression profile of cells expanded through P5, whereas an increased heterogeneity was noticed for cells from P6. Changes in expression of myogenic markers, particularly the MRFs *MYF5*, *MYOD*, occurred concomitantly with the slight decrease of fusion ability after P2, evoking that hMuStem cells that were cultured for just one passage after the first expansion step might be more efficient for muscle fiber formation. Interestingly, Montarras et al. (2005) demonstrated that a phase of amplification in culture of myoblasts before engraftment markedly reduced their regenerative capacity, suggesting that *in vitro* expansion is disadvantageous [22]. Then, grafting of this muscle precursor cells cultured only for a few days required for instance a 10-fold higher dose than uncultured cells to obtain the same regenerative potential. First advanced hypothesis was that the culture-induced modifications may affect survival or engraftment capacity of the cells. Second, it was evoked that the activated state of the transplanted cells may decrease their regenerative potential as freshly isolated cells are not activated at the time of transplantation. Even if the hMuStem cells do not show modified survival rate over the *in vitro* expansion time and correspond to early myogenic committed cells, it would be of major interest to compare their grafting behavior with or without culture expansion in order to determine whether the situation to be favored would not be finally to use limited number of hMuStem cells not or little subjected to the cell culture. It is important to note that hMuStem cells expanded for 4 and 6 passages displayed however an ability to differentiate that remained consequent as illustrated by a fusion index (FI) of about 25% that is comparable to those obtained for other muscle-derived stem cell population positioned for cell-based therapy approach [11]. As FI may be an easy potency test for the qualification of the hMuStem cell batches, it would be highly informative to further explore the ability of hMuStem cell submitted to different expansion time to fuse with myoblasts in a co-culture context. Regarding the phenotype of cultured hMuStem cells, a higher homogeneity in NCAM/CD56 expression was determined compared to those previously reported for research grade conditions [30]. Moreover, its expression appeared persistent during expansion by contrast to other observations on myogenic cells [11,21]. As

we previously reported a direct correlation between the muscle regenerative efficiency and the percentage of CD56⁺ cells in the hMuStem cell population, we can hypothesize that the improved homogeneity of the newly prepared hMuStem cell population could have a beneficial impact on its regenerative potential, higher than those obtained with research grade cells [30]. As an exception, hMuStem cells isolated from donor #6 displayed a progressive loss of CD56 expression that occurred concomitantly with a decrease in the percentage of cells undergoing *in vitro* myogenic differentiation. Interestingly, this donor was defined by an initial lower CD56 expression. Further experiments will be required to confirm the correlation between the initial proportion of CD56⁺ and the loss of this marker over *in vitro* expansion. By contrast to human myoblasts that are still able to fuse although at a lower extent than younger myoblasts [49], we demonstrated the lack of myogenic differentiation potential of late hMuStem cell populations.

In addition to the loss of cell potencies limiting the therapeutic potential of stem cell products, different studies pointed the evidence of abnormalities occurrence and cell transformation through culture. Among them, DNA damages and genetic abnormalities likely increase the risk of cell transformation [50,51]. In contrast to pluripotent stem cells expressing pluripotency markers and exhibiting telomerase activity, somatic stem cells that undergo senescence are less prone to transformations. Although accumulations of DNA damages and cytogenetic abnormalities have been reported for protracted cultures of MSCs or myoblasts clinical batches, these changes were not associated with tumor transformation [19,21,52,53]. Spontaneous transformation was indeed defined as a rare event and no case of tumorigenicity has been reported despite the high number of clinical trials involving MSCs [54,55]. To go further in the definition of the safety status of our cell candidate, cytogenetic status of hMuStem will be explored to evaluate the occurrence of genetic abnormalities through *in vitro* expansion, although we now have evidences that hMuStem cell population undergo senescence and do not express telomerase, limiting the risk of malignant transformation. The first evidences of cell transformation are morphological changes [41], mainly cell spreading that might limit the distribution, the migration and the integration of grafted cells. As vascular route is considered for the hMuSem cell delivery protocol, limited cell size appears to be a critical parameter for effective dispersion and to avoid capillary clog. Here, we presented for the first time the size criteria of the hMuStem cell population and showed that it is homogeneously comprised between 9 and 15 μm for the majority of cells in suspension until P6 and even for late populations in which rare cells taller than 20 μm were detected probably

due to cell fragmentation at harvesting. This highly limits the risk of complication following potential large cell injection. Furthermore, the injection of senescent cells might have a deleterious effect on neighboring cells, due to the drastic change of secretory phenotype, namely the occurrence of the senescence-associated secretory phenotype (SASP) [56–58]. Few genes associated with this particular secretory phenotype were indeed found altered over *in vitro* expansion. Our results also suggest that hMuStem cells are more prone to enter a senescent state rather than undergo apoptosis programmed cell death, as rare apoptotic cells were detected even for late populations and although a few differentially expressed genes were identified as up-regulated through expansion. This particular senescence signature, even described only at the transcript level, imply significant changes in hMuStem cells submitted to senescence. The setting up of efficient detection of senescent cells thus appears as a crucial parameter to ensure the safety of cell-based treatment. SA- β gal assay, although widely used as quality control for the release of most clinical cell products, cannot be the only assay used to attest senescence, as we noticed a substantial heterogeneity in cell batches while all late populations shared a significantly altered expression signature. Furthermore, less than 3% of cells were reactive for SA- β gal while signature profile determined by DGE-Seq raised concerns regarding the onset of genes associated with stress response, inflammatory response and cell death. Relevant specific markers able to characterize the changes that occur during culture are currently lacking. Such undedicated method allowed the identification of a myriad of changes at the transcript level that might be useful for the setting up of quality controls. We proposed a selection of genes that might allow us to exclude intermediate population with the onset of an expression profile for a panel of genes that are differentially expressed between early and late populations. From now on, the qualitative and quantitative correlation at the protein level will be the main focus in order to set quality controls up for the release of hMuStem cell batches. Finally, the integrated analysis of the various biological parameters followed in this study leads us to do not consider hMuStem cell preparations after *in vitro* expansion time corresponding to P5 as regard to the onset of genes shared with senescent cells. This corresponds to a limit of amplification around 22-24 CPD, which is in accordance with previous reports for MSCs [19,59].

Conclusion

The present findings indicated that prolonged *in vitro* expansion of hMuStem cell population results in significant changes of proliferation behavior and myogenic commitment. Passage 6

was identified as a transitory state between early and senescent populations with the appearance of genes related to undesired features, although their hypothetical implication in hMuStem cell therapeutic potential limitation remain to be demonstrated. Undedicated strategy that we applied is of particular importance for a further understanding of cell fate during culture and unambiguously defining a set of markers useful to control safety and efficacy of cell batch for clinical settings.

References

1. Torrente Y, Belicchi M, Sampaolesi M, Pisati F, Meregalli M, et al. (2004) Human circulating AC133(+) stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle. *J Clin Invest* 114: 182–195. doi:10.1172/JCI20325.
2. Benchaouir R, Meregalli M, Farini A, D'Antona G, Belicchi M, et al. (2007) Restoration of human dystrophin following transplantation of exon-skipping-engineered DMD patient stem cells into dystrophic mice. *Cell Stem Cell* 1: 646–657. doi:10.1016/j.stem.2007.09.016.
3. Sampaolesi M, Torrente Y, Innocenzi A, Tonlorenzi R, D'Antona G, et al. (2003) Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. *Science* 301: 487–492. doi:10.1126/science.1082254.
4. Sampaolesi M, Blot S, D'Antona G, Granger N, Tonlorenzi R, et al. (2006) Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature* 444: 574–579. doi:10.1038/nature05282.
5. Dellavalle A, Sampaolesi M, Tonlorenzi R, Tagliafico E, Sacchetti B, et al. (2007) Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat Cell Biol* 9: 255–267. doi:10.1038/ncb1542.
6. Qu-Petersen Z, Deasy B, Jankowski R, Ikezawa M, Cummins J, et al. (2002) Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *J Cell Biol* 157: 851–864. doi:10.1083/jcb.200108150.
7. Chirieleison SM, Feduska JM, Schugar RC, Askew Y, Deasy BM (2012) Human muscle-derived cell populations isolated by differential adhesion rates: phenotype and contribution to skeletal muscle regeneration in Mdx/SCID mice. *Tissue Eng Part A* 18: 232–241. doi:10.1089/ten.TEA.2010.0553.
8. Liu Y, Yan X, Sun Z, Chen B, Han Q, et al. (2007) Flk-1+ adipose-derived mesenchymal stem cells differentiate into skeletal muscle satellite cells and ameliorate muscular dystrophy in mdx mice. *Stem Cells Dev* 16: 695–706. doi:10.1089/scd.2006.0118.
9. Rodriguez A-M, Pisani D, Dechesne CA, Turc-Carel C, Kurzenne J-Y, et al. (2005) Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces

dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J Exp Med* 201: 1397–1405. doi:10.1084/jem.20042224.

10. Li H, Usas A, Poddar M, Chen C-W, Thompson S, et al. (2013) Platelet-rich plasma promotes the proliferation of human muscle derived progenitor cells and maintains their stemness. *PLoS One* 8: e64923. doi:10.1371/journal.pone.0064923.

11. Meng J, Adkin CF, Xu S, Muntoni F, Morgan JE (2011) Contribution of human muscle-derived cells to skeletal muscle regeneration in dystrophic host mice. *PLoS One* 6: e17454. doi:10.1371/journal.pone.0017454.

12. Dellavalle A, Maroli G, Covarello D, Azzoni E, Innocenzi A, et al. (2011) Pericytes resident in postnatal skeletal muscle differentiate into muscle fibres and generate satellite cells. *Nat Commun* 2: 499. doi:10.1038/ncomms1508.

13. Vieira NM, Valadares M, Zucconi E, Secco M, Bueno CR, et al. (2012) Human adipose-derived mesenchymal stromal cells injected systemically into GRMD dogs without immunosuppression are able to reach the host muscle and express human dystrophin. *Cell Transplant* 21: 1407–1417. doi:10.3727/096368911X.

14. Torrente Y, Belicchi M, Marchesi C, D'Antona G, Cogliamariani F, et al. (2007) Autologous transplantation of muscle-derived CD133+ stem cells in Duchenne muscle patients. *Cell Transplant* 16: 563–577.

15. Cossu G, Previtali SC, Napolitano S, Cicalese MP, Tedesco FS, et al. (2015) Intra-arterial transplantation of HLA-matched donor mesoangioblasts in Duchenne muscular dystrophy. *EMBO Mol Med* 7: 1513–1528. doi:10.15252/emmm.201505636.

16. Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, et al. (2006) Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biol* 7: 14. doi:10.1186/1471-2121-7-14.

17. Wan Safwani WKZ, Makpol S, Sathapan S, Chua KH (2011) The changes of stemness biomarkers expression in human adipose-derived stem cells during long-term manipulation. *Biotechnol Appl Biochem* 58: 261–270. doi:10.1002/bab.38.

18. Izadpanah R, Kaushal D, Kriedt C, Tsien F, Patel B, et al. (2008) Long-term in vitro expansion alters the biology of adult mesenchymal stem cells. *Cancer Res* 68: 4229–4238. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5272.

19. Tarte K, Gaillard J, Lataillade J-J, Fouillard L, Becker M, et al. (2010) Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. *Blood* 115: 1549–1553. doi:10.1182/blood-2009-05-219907.

20. Wang Y, Zhang Z, Chi Y, Zhang Q, Xu F, et al. (2013) Long-term cultured mesenchymal stem cells frequently develop genomic mutations but do not undergo malignant transformation. *Cell Death Dis* 4: e950. doi:10.1038/cddis.2013.480.

21. Bisson A, Le Corre S, Joly-Helas G, Chambon P, Demoulins L, et al. (2014) Chromosomal instability but lack of transformation in human myoblast preparations. *Cell Transplant* 23: 1475–1487. doi:10.3727/096368913X670192.
22. Montarras D, Morgan J, Collins C, Relaix F, Zaffran S, et al. (2005) Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration. *Science* 309: 2064–2067. doi:10.1126/science.1114758.
23. Oliveira PH, Boura JS, Abecasis MM, Gimble JM, da Silva CL, et al. (2012) Impact of hypoxia and long-term cultivation on the genomic stability and mitochondrial performance of ex vivo expanded human stem/stromal cells. *Stem Cell Res* 9: 225–236. doi:10.1016/j.scr.2012.07.001.
24. Safwani WKZW, Makpol S, Sathapan S, Chua KH (2012) The impact of long-term in vitro expansion on the senescence-associated markers of human adipose-derived stem cells. *Appl Biochem Biotechnol* 166: 2101–2113. doi:10.1007/s12010-012-9637-4.
25. Jayaraman P, Govindasamy V, Gnanasegaran N, Kunasekaran W, Vasanthan P, et al. (2016) Expression patterns of immune genes in long-term cultured dental stem cells. *Clin Oral Investig* 20: 109–116. doi:10.1007/s00784-015-1497-1.
26. Boquest AC, Shahdadfar A, Frønsdal K, Sigurjonsson O, Tunheim SH, et al. (2005) Isolation and transcription profiling of purified uncultured human stromal stem cells: alteration of gene expression after in vitro cell culture. *Mol Biol Cell* 16: 1131–1141. doi:10.1091/mbc.E04-10-0949.
27. Rouger K, Larcher T, Dubreil L, Deschamps J-Y, Le Guiner C, et al. (2011) Systemic delivery of allogenic muscle stem cells induces long-term muscle repair and clinical efficacy in duchenne muscular dystrophy dogs. *Am J Pathol* 179: 2501–2518. doi:10.1016/j.ajpath.2011.07.022.
28. Robriquet F, Lardenois A, Babarit C, Larcher T, Dubreil L, et al. (2015) Differential Gene Expression Profiling of Dystrophic Dog Muscle after MuStem Cell Transplantation. *PLoS One* 10: e0123336. doi:10.1371/journal.pone.0123336.
29. Lardenois A, Jagot S, Lagarrigue M, Guével B, Ledevin M, et al. (2016) Quantitative proteome profiling of dystrophic dog skeletal muscle reveals a stabilized muscular architecture and protection against oxidative stress after systemic delivery of MuStem cells. *Proteomics* 16: 2028–2042. doi:10.1002/pmic.201600002.
30. Lorant J, Saury C, Schleder C, Robriquet F, Lieubeau B, et al. (2017) Skeletal muscle regenerative potential of human MuStem cells following transplantation into injured mice muscle. *Mol Ther*. In press
31. Blasco MA, Lee HW, Hande MP, Samper E, Lansdorp PM, et al. (1997) Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* 91: 25–34.

32. Cacchiarelli D, Trapnell C, Ziller MJ, Soumillon M, Cesana M, et al. (2015) Integrative Analyses of Human Reprogramming Reveal Dynamic Nature of Induced Pluripotency. *Cell* 162: 412–424. doi:10.1016/j.cell.2015.06.016.
33. Love MI, Huber W, Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15: 550. doi:10.1186/s13059-014-0550-8.
34. Pinheiro JC, Bates D (2009) *Mixed-Effects Models in S and S-PLUS*. Springer Science & Business Media. 538 p.
35. Chow S-C, Wang H, Shao J (2003) *Sample Size Calculations in Clinical Research*. CRC Press. 376 p.
36. Chalmel F, Primig M (2008) The Annotation, Mapping, Expression and Network (AMEN) suite of tools for molecular systems biology. *BMC Bioinformatics* 9: 86. doi:10.1186/1471-2105-9-86.
37. Robriquet F, Babarit C, Larcher T, Dubreil L, Ledevin M, et al. (2016) Identification in GRMD dog muscle of critical miRNAs involved in pathophysiology and effects associated with MuStem cell transplantation. *BMC Musculoskelet Disord* 17: 209. doi:10.1186/s12891-016-1060-5.
38. Wei Y, Li Y, Chen C, Stoelzel K, Kaufmann AM, et al. (2011) Human skeletal muscle-derived stem cells retain stem cell properties after expansion in myosphere culture. *Exp Cell Res* 317: 1016–1027. doi:10.1016/j.yexcr.2011.01.019.
39. Negroni E, Riederer I, Chaouch S, Belicchi M, Razini P, et al. (2009) In vivo myogenic potential of human CD133+ muscle-derived stem cells: a quantitative study. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther* 17: 1771–1778. doi:10.1038/mt.2009.167.
40. Deasy BM, Gharaibeh BM, Pollett JB, Jones MM, Lucas MA, et al. (2005) Long-term self-renewal of postnatal muscle-derived stem cells. *Mol Biol Cell* 16: 3323–3333. doi:10.1091/mbc.E05-02-0169.
41. Danisovic L, Oravcova L, Krajciová L, Varchulova Novakova Z, Bohac M, et al. (2017) Effect of long-term culture on the biological and morphological characteristics of human adipose tissue-derived stem Cells. *J Physiol Pharmacol An Off J Polish Physiol Soc* 68: 149–158.
42. Campisi J, d’Adda di Fagagna F (2007) Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 729–740. doi:10.1038/nrm2233.
43. Itahana K, Campisi J, Dimri GP (2004) Mechanisms of cellular senescence in human and mouse cells. *Biogerontology* 5: 1–10.
44. Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS (2010) The essence of senescence. *Genes Dev* 24: 2463–2479. doi:10.1101/gad.1971610.

45. Fukami J, Anno K, Ueda K, Takahashi T, Ide T (1995) Enhanced expression of cyclin D1 in senescent human fibroblasts. *Mech Ageing Dev* 81: 139–157.
46. Burton DGA, Sheerin AN, Ostler EL, Smith K, Giles PJ, et al. (2007) Cyclin D1 overexpression permits the reproducible detection of senescent human vascular smooth muscle cells. *Ann N Y Acad Sci* 1119: 20–31. doi:10.1196/annals.1404.026.
47. Atadja P, Wong H, Veillette C, Riabowol K (1995) Overexpression of cyclin D1 blocks proliferation of normal diploid fibroblasts. *Exp Cell Res* 217: 205–216. doi:10.1006/excr.1995.1080.
48. Dulić V, Drullinger LF, Lees E, Reed SI, Stein GH (1993) Altered regulation of G1 cyclins in senescent human diploid fibroblasts: accumulation of inactive cyclin E-Cdk2 and cyclin D1-Cdk2 complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 11034–11038.
49. Bigot A, Jacquemin V, Debacq-Chainiaux F, Butler-Browne GS, Toussaint O, et al. (2008) Replicative aging down-regulates the myogenic regulatory factors in human myoblasts. *Biol Cell* 100: 189–199. doi:10.1042/BC20070085.
50. Herberts CA, Kwa MSG, Hermsen HPH (2011) Risk factors in the development of stem cell therapy. *J Transl Med* 9: 29. doi:10.1186/1479-5876-9-29.
51. Sverdlov ED, Mineev K (2013) Mutation rate in stem cells: an underestimated barrier on the way to therapy. *Trends Mol Med* 19: 273–280. doi:10.1016/j.molmed.2013.01.004.
52. Bernardo ME, Zaffaroni N, Novara F, Cometa AM, Avanzini MA, et al. (2007) Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Res* 67: 9142–9149. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4690.
53. Wang Y, Cheng L, Gerecht S (2014) Efficient and scalable expansion of human pluripotent stem cells under clinically compliant settings: a view in 2013. *Ann Biomed Eng* 42: 1357–1372. doi:10.1007/s10439-013-0921-4.
54. Achille V, Mantelli M, Arrigo G, Novara F, Avanzini MA, et al. (2011) Cell-cycle phases and genetic profile of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells expanded in vitro from healthy donors. *J Cell Biochem* 112: 1817–1821. doi:10.1002/jcb.23100.
55. Wang Y, Huso DL, Harrington J, Kellner J, Jeong DK, et al. (2005) Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture. *Cytotherapy* 7: 509–519. doi:10.1080/14653240500363216.
56. Rodier F, Coppé J-P, Patil CK, Hoeijmakers WAM, Muñoz DP, et al. (2009) Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol* 11: 973–979. doi:10.1038/ncb1909.

57. Severino V, Alessio N, Farina A, Sandomenico A, Cipollaro M, et al. (2013) Insulin-like growth factor binding proteins 4 and 7 released by senescent cells promote premature senescence in mesenchymal stem cells. *Cell Death Dis* 4: e911. doi:10.1038/cddis.2013.445.
58. Coppé J-P, Rodier F, Patil CK, Freund A, Desprez P-Y, et al. (2011) Tumor suppressor and aging biomarker p16(INK4a) induces cellular senescence without the associated inflammatory secretory phenotype. *J Biol Chem* 286: 36396–36403. doi:10.1074/jbc.M111.257071.
59. Banfi A, Muraglia A, Dozin B, Mastrogiacomo M, Cancedda R, et al. (2000) Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy. *Exp Hematol* 28: 707–715.

Discussion générale

Les thérapies cellulaires représentent une alternative prometteuse pour un large ensemble de maladies et en particulier les maladies orphelines. En effet, les propriétés intrinsèques de l'agent cellulaire lui permettent d'interagir avec son environnement et de générer une réponse biologique complexe en fonction du contexte tissulaire au sein duquel il se retrouve. C'est le cas du tissu dystrophique, et de la DMD, forme la plus fréquente et la plus sévère des dystrophies musculaires, pour laquelle seuls des traitements palliatifs permettent actuellement d'améliorer la qualité de vie des patients qui décèdent entre 20 et 30 ans. Plusieurs populations de CSs d'origines variées ont été proposées ces dernières années pour le traitement des atteintes musculaires, bénéficiant d'avantages et d'inconvénients propres. Parmi elles, différentes populations isolées à partir de tissus adultes ont démontré des propriétés intéressantes notamment en termes d'engagement myogénique, laissant supposer un impact bénéfique sur la régénération. Néanmoins, bien que des démonstrations précliniques se soient avérées prometteuses, les 1^{ers} ECs mis en place avec les myoblastes, les MABs ou encore les cellules AC133⁺ n'ont malheureusement pas encore démontré de pertinence clinique suffisante (Cossu et al., 2015; Gussoni et al., 1992; Mendell et al., 1995; Skuk et al., 2004, 2006, 2007; Torrente et al., 2007). Plusieurs hypothèses ont été formulées pour expliquer ces différences d'efficacité observées entre les études précliniques et les ECs. Les conditions de production sont généralement très différentes en raison de l'exigence de définition d'un protocole de production respectant les normes GMPs. Ces différences peuvent également être accentuées par des variations au niveau du temps d'expansion *ex vivo* en raison des doses nécessaires beaucoup plus importantes chez l'Homme que pour les études précliniques. De plus, la production de cellules inclus une quantité non négligeable de cellules nécessaire aux contrôles qualité de libération des lots cliniques. Finalement, les études cliniques diffèrent également au niveau du contexte de transplantation, en termes de physiopathologie, d'état d'avancement de la maladie mais également de contraintes immunologiques.

Ces résultats illustrent bien l'exigence de définition d'un protocole de production robuste, reproductible, respectant les normes GMPs et transférable à large échelle dès les études précliniques qui doivent être très proches des protocoles prévus pour les ECs. L'UMR 703 PAnTher a isolé en 2011 une population de CSs dérivées du muscle squelettique (dénommée MuStem) présentant un ensemble de propriétés intéressantes en termes d'application clinique dans le domaine des pathologies musculaires. Nos travaux ont démontré une forte capacité de prolifération, un potentiel de différenciation myogénique

spontané et un effet bénéfique après administration systémique des cellules cMuStem sur l'état clinique général du chien dystrophique GRMD, modèle gros animal pertinent de la DMD (Lardenois et al., 2016; Robriquet et al., 2015, 2016; Rouger et al., 2011). Plus récemment, une population de cellules possédant des propriétés comparables a été isolée à partir de biopsies musculaires humaines et définie notamment par un potentiel de régénération après administration dans un tissu musculaire lésé (Lorant, Saury et al., 2017), confortant le statut de candidat thérapeutique pour la population MuStem. Néanmoins, cette définition initiale de la population humaine ayant été réalisée dans des conditions de recherche non transférables en clinique, l'objectif de ma thèse a été d'initier l'optimisation de la préparation des lots cellulaires en vue d'un transfert clinique.

I. Définition de conditions de culture compatibles avec la clinique

Au cours mon travail expérimental, des études comparées ont successivement permis de remplacer différents éléments du protocole non conformes avec les attentes des instances règlementaires par des composés produits selon les GMPs. En effet, des enzymes de dissociation tissulaire produites selon les GMPs, le substrat matriciel défini CELLstart™ CTS™, la solution de cryoconservation Synth-a-Freeze® CTS™ ou encore l'apport nutritif HS ont été ajoutés en remplacement respectivement du cocktail d'enzymes de dissociation tissulaire de grade recherche, de la gélatine porcine, de la solution de conservation constituée de FBS et de DMSO et du FBS dans le milieu de culture. En raison de la difficulté à obtenir des biopsies de taille suffisante pour séparer en deux, certaines de ces études ont été limitées en nombre d'échantillons. Néanmoins, ces nouveaux produits n'ont pas engendré d'impact majeur sur la morphologie des cellules et des taux de prolifération comparables voire supérieurs ont été observés. D'autres éléments du protocole, indispensables aux nouvelles conditions de production, n'ont pas fait l'objet d'études comparatives, comme l'enzyme de dissociation TrypLE pour remplacer la Trypsine ou l'Accutase d'origine animale, les GFs EGF et bFGF, le milieu HAMF12 et le tampon PBS de base. Les versions conformes aux GMPs de ces produits ont été incluses en considérant que l'impact sur les propriétés des cellules hMuStem serait mineur. Un paramètre qui n'a cependant pas été pris en compte est l'utilisation des antibiotiques et antifongiques. L'utilisation de certains antibiotiques pourrait en effet masquer de faibles taux de contaminations bactériennes, présenter un potentiel allergénique mais également influencer le devenir des cellules en culture. Il est donc conseillé

de s'en affranchir grâce au strict respect des principes d'asepsie (Llobet et al., 2015; Pytlik et al., 2011).

Ces 1^{ers} résultats se sont néanmoins principalement basés sur l'évaluation de la viabilité et des taux de prolifération. Dans un 2nd temps, et dans le cadre de la comparaison des deux apports nutritifs HS et hPL, nous avons réalisé une étude plus avancée des caractéristiques de la population hMuStem dans les conditions de culture précédemment définies. Dans l'ensemble, nous avons confirmé que l'intégralité de ces conditions permettait d'obtenir des lots de cellules présentant des caractéristiques comparables avec celles précédemment décrites (Lorant, Saury et al., 2017). D'une part, les cellules hMuStem isolées et amplifiées dans ces conditions bénéficient d'un pouvoir prolifératif comparable voire supérieur aux anciennes conditions de même que des taux de clonogénicité très supérieurs à ceux décrits pour les cellules hMuStem originales. Elles conservent d'autre part un phénotype de progéniteur myogénique précoce d'origine périvasculaire/mésenchymateuse. Elles expriment en effet fortement le CD56, la desmine, Myf5 et dans une moindre mesure MyoD et également l'ensemble des marqueurs mésenchymateux CD44, CD73, CD90 et CD105. Ces cellules restent de plus négatives pour les marqueurs hématopoïétiques CD34 et CD45 et endothélial CD144. Au même titre que la population originale, les fractions cellulaires exprimant les marqueurs périvasculaires CD140b et CD146 sont plus modérées. Les cellules hMuStem conservent également une oligopotence, avec la capacité à se différencier vers les voies adipogénique, ostéogénique et myogénique. L'engagement myogénique, conservé dans des conditions de milieu contenant du HS, est néanmoins fortement diminué en présence de hPL. En effet, tandis que les FI en milieu contenant du HS sont d'environ 20%, ils s'avèrent être à moins de 5% quand les cellules sont en présence de hPL. De façon intéressante, cette configuration de milieu permettrait de maintenir les cellules dans un état indifférencié, d'autant plus que cet effet limitant, que nous avons pu attribuer à l'utilisation d'anticoagulant, est réversible par ajout d'une dernière étape de culture dans un milieu contenant du HS ou du hPL défibrinogéné. Finalement, en plus de valider l'ensemble des conditions de culture, nous avons démontré la faisabilité de l'utilisation du HS et de différentes préparations de hPL pour l'isolement et l'amplification de la population hMuStem. Par ailleurs, du hPL ayant subi une étape d'inactivation virale est en cours de développement, ce qui donnerait un avantage important au hPL en comparaison au HS, et ajouterait un niveau de sécurité supplémentaire (Viau et al., 2017a).

Afin de compléter cette étude et d'optimiser le procédé de production, il serait intéressant de tester des milieux définis, qui semblent de plus en plus performants et adaptés à la culture notamment des MSCs et même si ceux-ci ne sont encore que très peu utilisés en clinique et que la démonstration de leur efficacité reste à être clairement établie. Le HS et le hPL restent en effet des composés non définis qui peuvent contribuer à ajouter des variabilités dans le protocole de production. La démonstration récente de la standardisation des lots de production industriels de hPL de Macopharma permet toutefois d'envisager une très faible variabilité du protocole de production liée à l'utilisation d'un tel produit. C'est notamment le cas du milieu StemPro® MSC SFM XF, produit dans le respect des GMPs, qui apparaît comme une alternative plus définie et moins coûteuse que le milieu M2Stem complet actuel (Agata et al., 2009; Riis et al., 2016; Wuchter et al., 2016). Le milieu MegaCell™ DMEM (Sigma), actuellement utilisé pour la préparation de lots cliniques de MABs pourra également être testé dans l'optique de diminuer la concentration en HS et hPL (Tonlorenzi et al., 2007, 2017). Cultivées sur support plastique dont la rigidité est beaucoup plus élevée que celle rencontrée dans les tissus, il serait également intéressant d'évaluer le comportement des cellules hMuStem sur des supports moins rigides. Plusieurs équipes ont en effet démontré qu'une meilleure efficacité de différenciation était obtenue à partir de MSCs, de myoblastes ou encore de MABs sur des substrats beaucoup plus souples (Engler et al., 2004, 2006; Romanazzo et al., 2012; Tonlorenzi et al., 2017; Xu et al., 2017). Il conviendra de plus de s'assurer de la disponibilité de l'ensemble des réactifs. À l'instar du HS et hPL, et comme nous l'avons évoqué dans la partie introductive, il est en effet fortement suggéré d'intégrer des redondances dans la définition du protocole afin de pouvoir pallier rapidement à un potentiel défaut d'approvisionnement et assurer la continuité de la production (Ratcliffe et al., 2011). Avec le développement constant de nouveaux produits, l'optimisation du procédé doit être un processus continu au cours duquel doivent être maîtrisées les conséquences sur les propriétés du produit cellulaire. Pour poursuivre l'optimisation du procédé de production, il serait également intéressant d'évaluer l'impact d'une concentration en O₂ plus physiologique sur les caractéristiques de la population hMuStem, de nombreuses études ayant mis en évidence un impact bénéfique pouvant être illustré par un retard de l'entrée en sénescence, le maintien dans un état indifférencié ou encore une augmentation du potentiel de différenciation de MSCs (Choi et al., 2017; Fehrer et al., 2007; Jin et al., 2010; Kim et al., 2016; Tsai et al., 2011). Comme nous l'avons évoqué précédemment, un prétraitement hypoxique de 48h à 1% d'O₂ a par exemple eu un effet bénéfique sur la régénération musculaire de myoblastes après injection dans le modèle *mdx* (Liu et al., 2012). En termes de transfert clinique, les MABs

sont par exemple aujourd'hui cultivés entre 3 et 5% d'O₂ en raison d'une meilleure efficacité d'isolement et de prolifération qu'à la concentration atmosphérique en particulier pour une expansion clonale (Cossu et al., 2015; Tonlorenzi et al., 2007). Enfin, ces études devront être poursuivies avec des études d'administration *in vivo* afin d'évaluer le potentiel de régénération des cellules isolées et amplifiées dans les nouvelles conditions.

La faisabilité de production à large échelle est un élément important qu'il faudra développer. En effet, pour de simples questions économiques, l'ensemble de ces études de prolifération a été réalisé sur des supports de surface limitée correspondant au mieux à des flasques T75. Or, dans le contexte de transplantation allogénique qui sera réalisé dans un 1^{er} temps avec un donneur (parent proche compatible HLA) et pour lequel un seul lot cellulaire sera produit, la quantité de cellules nécessaire sera potentiellement comprise entre 1 et 4.10⁹ cellules, contrôles qualité compris. L'utilisation de petites surfaces est envisagée pour les 1^{ères} phases d'amplification compte tenu de la taille des biopsies musculaires et des faibles quantités de cellules hMuStem extraites de celles-ci. Cependant, les dernières phases d'amplification nécessiteront l'utilisation de systèmes de culture plus adaptés. Dans un 1^{er} temps, des supports de culture à multi-étages pourront être testés, comme le CellFactory Systems (Nunc) ou les CellSTACK® (Corning). Dans un 2nd temps, les bioréacteurs à plaques parallèles Xpansion System (Pall Life Sciences) et le bioréacteur à fibres creuses pourront être des alternatives plus performantes (maîtrise de l'environnement physico-chimique et de l'apport nutritif) mais également plus coûteuses et pas forcément adapté au schéma un donneur-un receveur (Roh et al., 2016). Le temps de culture nécessaire à l'obtention d'une quantité suffisante de cellules devra alors être réévalué en fonction des taux de prolifération observés dans les nouvelles conditions de culture. En effet, le transfert sur ce type de supports à étages multiples peut avoir un impact négatif sur les taux de prolifération en raison d'une moins bonne uniformité de l'apport en nutriments, des échanges gazeux ou encore de la T° pouvant introduire une hétérogénéité au sein de la population en termes de croissance, de phénotypes ou de degré de différenciation (Campbell et al., 2015; Sheu et al., 2014). Finalement, les conditions adhérentes semblent les plus adaptées pour la culture des cellules hMuStem. Dans les conditions non adhérentes testées, les cellules hMuStem forment en effet des myosphères comme précédemment observé pour les cellules canines (Rouger et al., 2011). L'étude préliminaire réalisée dans ces conditions a démontré des rendements de production drastiquement inférieurs suggérant une absence totale de prolifération, bien que les observations morphologiques suggèrent le contraire. Ce résultat pourrait toutefois refléter une

forte perte cellulaire lors de la récupération et la dissociation des myosphères. En raison de l'avantage certain de la culture en bioréacteurs en suspension, il serait intéressant de renouveler cette étude dans les conditions de milieu nouvellement définies, et d'évaluer la faisabilité de la culture sur microporteurs.

II. Impact du temps d'expansion *ex vivo*

Dans le même objectif d'optimisation de la préparation du produit cellulaire hMuStem, nous nous sommes attachés à identifier la fenêtre d'expansion *in vitro* optimale. Comme nous l'avons évoqué dans la partie introductive, ce paramètre peut avoir une influence sur le potentiel thérapeutique des cellules tant en termes d'efficacité que de sécurité. En ce qui concerne les cellules non pluripotentes qui ne bénéficient pas d'un potentiel de prolifération illimité, une expansion trop importante peut en effet introduire un risque d'injection de cellules anormales ou sénescents. Nos résultats ont démontré dans un 1^{er} temps que les cellules hMuStem atteignent un état de sénescence cellulaire entre 35 et 55 CPDs, qui s'accompagne entre autre d'une perte totale du potentiel de différenciation myogénique, contrairement à ce qui a été observé pour des myoblastes qui conserveraient leur capacité de différenciation mais dans une moindre mesure (Bigot et al., 2008). Dans un 2nd temps, l'étude longitudinale mise en place nous a permis de suggérer une limite à ne pas dépasser lors de l'expansion, qui correspondrait à un nombre de PDs compris entre 22 et 24. Ces résultats concordent avec ce qui a pu être conseillé pour l'expansion des MSCs (Banfi et al., 2000; Tarte et al., 2010). En effet, bien que les cellules hMuStem à ce passage intermédiaire P6 conservent encore un potentiel de différenciation *in vitro* conséquent et comparable avec celui observé sur des passages plus précoces (P4), bien qu'inférieur aux cellules ayant passé peu de temps en culture (P2), leur capacité de prolifération à faible densité est fortement réduite ce qui pourrait limiter leur potentiel thérapeutique *in vivo*. De plus, de nombreux gènes fortement exprimés dans les cellules sénescents commencent à apparaître à ce stade. Dans le cadre de la thèse d'une autre étudiante de l'UMR, une étude longitudinale *in vivo* va prochainement être initiée à ces mêmes temps d'expansion dans un modèle murin dystrophique afin de compléter cette étude. Elle permettra potentiellement de conforter l'avantage des cellules très précoces (P2) sur les cellules ayant passé plus de temps en culture (P4-P6) en termes d'engagement myogénique et de participation à la régénération musculaire. Les résultats générés permettront d'apporter des informations en termes d'efficacité sur le produit cellulaire isolé dans les conditions de culture nouvellement définies

et impacteront l'ensemble du protocole de production en termes de méthodes (âge du donneur, taille du prélèvement initial, nombre de passages, conditionnement...) et de coûts.

Nous avons également pu documenter un certain nombre de paramètres requis par les instances réglementaires ANSM et EMA pour le dossier de conception d'EC. Comme nous l'avons décrit précédemment, les cellules hMuStem ne bénéficient pas d'un potentiel de prolifération illimité, comme attesté par l'entrée en sénescence répllicative et l'absence d'expression de la sous-unité hTERT de la télomérase. De plus, les cellules hMuStem n'expriment pas les marqueurs de pluripotence *OCT4*, *NANOG* ou encore *SOX2*. Une analyse du caryotype a par ailleurs été initiée afin d'évaluer les potentielles altérations de l'intégrité génétique des cellules hMuStem au cours de la culture, comme cela a été démontré pour différents types cellulaires (Bisson et al., 2014; Tarte et al., 2010; Wang et al., 2013b). L'ensemble de ces paramètres sont des indicateurs permettant de formuler que le risque de tumorigénicité est limité. Ce risque devra néanmoins être évalué par des études *in vivo* dans un modèle pertinent.

Finalement, l'étude transcriptomique non dédiée décrite dans cette étude longitudinale ouvre des perspectives en termes de définition de la carte d'identité de la population hMuStem. Alors que la population hMuStem est aujourd'hui phénotypiquement caractérisée par l'expression de marqueurs communs avec les SCs et les myoblastes (CD56, CD29, CD82, CD318 ou encore la desmine et Myf5) mais également de marqueurs mésenchymateux (CD44, CD73, CD90 et CD105) et périvasculaires (CD140b et CD146), cette étude pourrait permettre de mettre en évidence un profil d'expression particulier pour celle-ci et d'évaluer sa versatilité au cours de l'expansion *ex vivo*. La validation à l'échelle protéique de marqueurs ainsi identifiés rendra plus aisée leur utilisation comme potentiels marqueurs identitaires d'inclusion et d'exclusion pour la libération des lots cliniques. En effet, comme nous l'avons évoqué dans la partie introductive, des tests d'identité, de sécurité et de potentialités robustes et si possible quantifiables doivent être mis en place. Cette étude nous permettra de déterminer des marqueurs dont l'expression, facilement quantifiable, serait corrélée à l'identité et l'activité biologique de la population hMuStem.

III. Poursuite de la définition du produit cellulaire

En conclusion, ces travaux de thèse ont permis de progresser sur notre degré de connaissance de la population MuStem et de nous rapprocher d'une possible utilisation en

clinique afin de proposer la population hMuStem comme produit thérapeutique. En effet, les études de biodistribution, de tumorigénicité et d'efficacité devront être réalisées dans des modèles animaux pertinents. En complément, une meilleure compréhension des modalités d'action de la population hMuStem permettra d'appuyer son positionnement en tant que candidat thérapeutique. Une étude en cours dans l'UMR porte par exemple sur l'activité paracrine de la population hMuStem, à laquelle le comportement immunomodulateur a déjà été relié. Les observations histologiques réalisées chez les chiens GRMD transplantés ont permis de mettre en évidence une régénération efficace et prolongée du tissu musculaire associée à une restauration limitée de la dystrophine, révélant l'existence de modalités d'action plurielles comme cela a été par la suite confirmé par des études « omiques » (Lardenois et al., 2016; Robriquet et al., 2015). Au regard de ces résultats, une analyse des exosomes de la population hMuStem a été initiée dans le but de déterminer si une partie de son effet thérapeutique *in vivo* ne pourrait pas être liée à son sécrétome, de plus en plus d'études attribuant en effet à ces vésicules extracellulaires un potentiel régénératif important au niveau musculaire (Balbi et al., 2017; Choi et al., 2016; Nakamura et al., 2015). L'étude transcriptomique ouvre également des perspectives quant au positionnement de la population hMuStem par rapport à d'autres populations cellulaires. En effet, une étude comparative entre la population hMuStem, les myoblastes correspondants et des populations de MSCs extraites du tissu adipeux et de la moelle osseuse a été réalisée parallèlement à l'étude longitudinale. L'identification de gènes différentiellement exprimés entre ces populations permettra d'identifier des marqueurs plus spécifiques de la population hMuStem. Pour aller plus loin dans la compréhension de la composition fine de la population hMuStem, une étude en cellule unique a également été initiée et permettra de décrire plus finement les sous-types présents au sein de la population hMuStem.

Annexes

Annexe 1. Produits de thérapie cellulaire ayant obtenu une AMM en Europe.

Seuls six produits de TC ont obtenu une AMM en Europe depuis 2009.

– Chondroselect, développé par TiGenix NV, est une suspension de chondrocytes autologues implantée dans des cas de dommages au niveau du cartilage du genou. Approuvé en octobre 2009, plus de 1000 implants ont été posés jusqu'à 2014. Néanmoins, l'AMM a été suspendue en 2016 sur la demande de l'entreprise pour des raisons commerciales. Ce traitement avait entre-temps reçu un avis défavorable de la part de la haute autorité de santé (HAS) à la prise en charge à l'hôpital en raison d'un intérêt clinique insuffisant. Seuls l'Espagne, la Belgique et les Pays-Bas ont accepté le remboursement, ne favorisant pas une situation viable pour l'entreprise.

– MACI est un implant constitué de chondrocytes autologues appliqués sur une matrice utilisé pour réparer les lésions cartilagineuses aux extrémités des os de l'articulation du genou. Autorisé par l'EMA en juin 2013, il a finalement été suspendu par le CMPH après le retrait par les autorités danoises de la licence de fabrication du site de production du produit.

– Provenge, commercialisé par la société Dendreon, est constitué de cellules mononuclées autologues du sang périphérique activées par PAP GM-CSF (sipuleucel-T) et est préconisé comme anticancéreux pour des cas de cancers de la prostate métastatique. L'AMM a été obtenu en UE en septembre 2013. Malheureusement, une forte concurrence, des erreurs marketing et des coûts non avantageux ont provoqué la faillite de Dendreon et le retrait du marché européen.

– Holoclar, qui utilise des CSs épithéliales de la cornée dans le but de réparer la cornée, endommagée notamment dans des cas de brûlures, a été approuvé en février 2015. Ce traitement autologue est considéré comme « médicament orphelin ».

– Strimvelis, « médicament orphelin » autorisé en mai 2016 consiste en une fraction cellulaire autologue enrichie en cellules CD34⁺ transduites avec un vecteur rétroviral codant la séquence d'ADNc du gène ADA humain. Il est utilisé pour le traitement de patients atteints de déficit immunitaire combiné sévère dû à un déficit en adénosine désaminase (DICS-ADA), qui ne peuvent pas bénéficier de greffe de moelle osseuse, faute de donneur compatible parmi les membres de la famille.

– Zalmoxis, approuvé en septembre 2016, utilise des LTs allogéniques génétiquement modifiés avec un vecteur rétroviral et est préconisé comme traitement adjuvant chez les adultes ayant reçu une greffe de HSCs provenant d'un donneur dont les tissus correspondent partiellement aux tissus du patient (greffe «haplo-identique»). Zalmoxis est utilisé chez les patients ayant reçu ce type de greffe car ils souffrent de cancers du sang graves, comme certaines leucémies et certains lymphomes. Avant la greffe de HSCs, le patient a reçu un traitement visant à supprimer les cellules existantes de la moelle osseuse, y compris les cellules cancéreuses et les cellules immunitaires. Zalmoxis est administré pour reconstituer le système immunitaire du patient après la greffe. Une autorisation conditionnelle a été délivrée, dans l'attente de preuves supplémentaires.

– Cx601 de TiGenix peut également être cité. Ce traitement à base de CSs allogéniques dérivées de tissu adipeux (ASCs pour *Adipose stem cells*) est développé pour le traitement des fistules péri-anales chez les patients atteints de la maladie de Crohn. Il a fait l'objet d'une demande d'AMM en 2016.

**Annexe 2. Description initiale de la population de
cellules MuStem humaines (hMuStem)**

Skeletal Muscle Regenerative Potential of Human MuStem Cells following Transplantation into Injured Mice Muscle

Judith Lorant,^{1,9} Charlotte Saury,^{1,2,9} Cindy Schleder,¹ Florence Robriquet,^{1,3} Blandine Lieubeau,⁴ Elisa Négroni,⁵ Isabelle Leroux,¹ Lucie Chabrand,² Sabrina Viau,² Candice Babarit,¹ Mireille Ledevin,¹ Laurence Dubreil,¹ Antoine Hamel,⁶ Armelle Magot,⁷ Chantal Thorin,⁸ Laëtitia Guevel,^{1,3} Bruno Delorme,² Yann Péréon,⁷ Gillian Butler-Browne,⁵ Vincent Mouly,⁵ and Karl Rouger¹

¹PAnTher, INRA, École Nationale Vétérinaire, Agro-alimentaire et de l'alimentation Nantes-Atlantique (Oniris), Université Bretagne Loire (UBL), Nantes 44307, France;

²Macopharma, Biotherapy Division, Mouvaux, 59420, France; ³Université de Nantes, UBL, Nantes, France; ⁴IECM, INRA, Oniris, Université de Nantes, UBL, Nantes 44307,

France; ⁵Institut de Myologie, Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, INSERM, CNRS, Paris 75013, France; ⁶Service de Chirurgie Infantile, Centre Hospitalier

Universitaire (CHU), Nantes 44093, France; ⁷Centre de Référence des maladies neuromusculaires Nantes-Angers, Service des Explorations Fonctionnelles, CHU, Nantes

44093, France; ⁸Laboratoire de Physiopathologie Animale et Pharmacologie fonctionnelle, Oniris, Nantes 44307, France

After intra-arterial delivery in the dystrophic dog, allogeneic muscle-derived stem cells, termed MuStem cells, contribute to long-term stabilization of the clinical status and preservation of the muscle regenerative process. However, it remains unknown whether the human counterpart could be identified, considering recent demonstrations of divergent features between species for several somatic stem cells. Here, we report that MuStem cells reside in human skeletal muscle and display a long-term ability to proliferate, allowing generation of a clinically relevant amount of cells. Cultured human MuStem (hMuStem) cells do not express hematopoietic, endothelial, or myo-endothelial cell markers and reproducibly correspond to a population of early myogenic-committed progenitors with a perivascular/mesenchymal phenotypic signature, revealing a blood vessel wall origin. Importantly, they exhibit both myogenesis *in vitro* and skeletal muscle regeneration after intramuscular delivery into immunodeficient host mice. Together, our findings provide new insights supporting the notion that hMuStem cells could represent an interesting therapeutic candidate for dystrophic patients.

INTRODUCTION

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is an X-linked recessive muscle disorder that represents the most common form of muscular dystrophy, affecting about one in 3,500–5,500 male births.^{1,2} It is caused by mutations in the dystrophin gene, which give rise to the protein lack, resulting in myofiber degeneration, followed by severe fibrosis.³ This leads to progressive muscle weakness and premature death near 30 years of age.^{4,5} Currently, there is no effective treatment, despite the development of pharmacological strategies, molecular-based ones (such as viral-based transfer of short form of dystrophin or oligonucleotide-induced exon-skipping), and cell therapy.⁶

Concerning the last one, intramuscular (IM) injections of murine^{7,8} or human^{9,10} myoblasts generated encouraging results, with demonstration of cell fusion and dystrophin restoration in the murine DMD model, i.e., the *mdx* mice. The first clinical studies, however, produced very limited successes, failing to deliver significant levels of dystrophin and to demonstrate clinical benefit.^{11,12} Later, specific conditions of cell delivery and immunosuppression, corresponding to a “high-density injection” protocol and the use of tacrolimus, were defined in suitable animal models¹³ to adequately take into account the acute immune rejection,¹⁴ poor survival,^{15,16} and low migration¹⁷ of injected cells advanced to explain the disappointing initial results. Phase IA clinical trials designed with these appropriate conditions in DMD patients unequivocally demonstrated a significant increase of the engraftment efficiency, with up to 34.5% myofibers expressing donor-derived dystrophin at the injection sites for a long period.^{18–21} Although myoblast transplantation could be an elective treatment for small and accessible muscles, it seemed quite inappropriate to treat numerous large ones, considering the migration of myoblasts and the potential invasiveness of the injection protocol, which prompted the search for alternative cell types.

Over the past 15 years, several cell types distinct from satellite cells (SCs) have been described as exhibiting myogenic fate after engraftment into damaged or diseased muscle (Table S1).^{22–99} After IM or intra-arterial (IA) injection in *scid/mdx* mice, blood- and muscle-derived CD133⁺ cells were able to participate in muscle regeneration

Received 21 June 2017; accepted 18 October 2017;
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.10.013>.

⁹These authors contributed equally to this work.

Correspondence: Karl Rouger, INRA, UMR 703, École Nationale Vétérinaire, Agro-alimentaire et de l'alimentation Nantes-Atlantique (Oniris), Route de Gachet, CS. 40706, 44307 Nantes, France.

E-mail: karl.rouger@inra.fr

and colonize the SC niche.^{30,32} Such cells were even more effective than myoblasts when injected intramuscularly in Rag^{-/-}/γC^{-/-}/C5^{-/-} mice.³⁵ Successively, intravenous (i.v.) delivery in lethally irradiated *mdx* mice of total bone marrow cells or a Hoeschst 33342-stained subpopulation of bone marrow cells called side population cells resulted in cell integration into skeletal muscle and formation of up to 4% dystrophin⁺ myofibers.^{39,40} Human mesoangioblasts (Mabs)/pericyte-derived cells crossed the vessel barrier following IA injection in *scid/mdx* mice and colonized host muscle, where they generated numerous dystrophin⁺ myofibers and replenished the SC pool.⁵⁷ In addition, IA delivery of wild-type canine Mabs resulted in muscle homing, dystrophin expression recovery, and improvement of muscle function as well motility in Golden Retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs that represent the clinically relevant DMD model.⁵⁶ Following IM or IA injections in *mdx* mice, murine muscle-derived stem cells (MDSCs) (preplated cells that adhered between 96 and 168 hr) exhibited an improved ability to restore dystrophin expression compared to myoblasts.⁶⁷ Similarly, human adipose-derived stem cells (ADSCs) reached skeletal muscle, engrafted, and expressed dystrophin after local or systemic delivery in *mdx* mice or GRMD dogs.^{81,86} IM injection of myogenic endothelial cells in *scid/mdx* mice was shown to give rise to efficient myofiber regeneration and dystrophin restoration.⁹¹ Finally, PW1⁺ interstitial cells (PICs) were shown to generate new myofibers, SCs, and PICs following engraftment into damaged muscle.¹⁰⁰ Together, these compelling results have opened up novel therapeutic opportunities for muscular dystrophies to face the limited efficacy of myoblast transplantation.

However, several major obstacles have hindered the development of analogous approaches in clinically relevant models or clinical trials. Analysis of muscle biopsies from a DMD patient who received bone marrow transplantation 13 years before for X-linked severe combined immune deficiency revealed a very limited ability of donor cells to integrate myofibers and produce dystrophin.⁴² Also, wild-type bone marrow cell transplantation did not restore dystrophin expression or improve muscle function in GRMD dogs.⁴⁴ Following umbilical cord blood cell transplantation done in a DMD patient to treat chronic granulomatous disease, neither donor cell engraftment nor dystrophin expression was observed.⁴⁷ A modest regenerative index was observed after IM injection of human MDSCs (preplated cells that adhered between 48 and 120 hr) in *scid/mdx* mice.⁷⁰ In addition, a lack of demonstration of effective integration into myofibers was determined after IM injection of muscle-derived CD133⁺ cells in DMD patients, which nevertheless can largely be due to the fact that the graft was autologous, making the location of cells and poor number of injected cells difficult.³³ Importantly, a phase I/IIa clinical trial consisting of multiple IA infusions of human leukocyte antigen (HLA)-matched donor Mabs/pericytes into immunosuppressed DMD patients pointed on a very low level of donor cell engraftment, with no or only a few dystrophin⁺ myofibers as well as a lack of any functional improvement.⁶³

In 2011, we isolated MDSCs as preplated cells that adhered between 120 and 192 hr (we named them cMuStem cells) from healthy dogs

and established that their systemic delivery into immunosuppressed GRMD dogs was associated with a striking and persistent clinical stabilization.⁹⁶ Concomitantly, a positive histological impact was determined with long-term and diffuse dystrophin expression, increased regeneration activity characterized by a persistent presence of developmental myosin⁺ myofibers, and reduced endomysial space. In parallel to modifications in both lipid homeostasis and energy metabolism processes, an enhancement of the ubiquitin-dependent protein degradation pathway, the structural interactions between myofibers and the extracellular matrix, and the oxidative stress response was also shown through transcriptomic and proteomic studies.^{97–99} These preclinical data positioned MuStem cells as a possible attractive therapeutic avenue for DMD patients. Here, we report for the first time the isolation of human MuStem cells (hMuStem cells) based on an adaptation of the protocol initially developed for canine muscle. In addition, we provide an extensive analysis of their phenotype as well as *in vitro/in vivo* behavior. Overall, we demonstrate *in vitro* myogenesis and a muscle regenerative potential of hMuStem cells, reinforcing the fact that they could be presented as a therapeutic option in view of clinical application.

RESULTS

hMuStem Cells Reside in Adult Skeletal Muscle and Exhibit a High Proliferation Rate

MuStem cells were initially isolated from a pool of posterior limb and postural muscles of 2.5-month-old healthy dogs.⁹⁶ To analyze whether a similar muscle-resident cell subset could be identified in humans, we performed experiments using a modified version of our original protocol, as shown in Figure S1. We isolated hMuStem cells from small biopsies of postural (pP; *Longissimus dorsi*) muscle or locomotor (pL; *Gastrocnemius*, *Fascia lata tensor*, and *Vastus lateralis*) muscles (n = 3 each) collected from 15- to 51-year-old male (n = 4) or female (n = 2) subjects free from a known muscle disease. 5 days after the first plating, floating cells, corresponding to 0.9×10^5 to 1.8×10^5 cells per gram of muscle, were seeded on new gelatin-coated plastic to finally obtain a marginal fraction of poorly adherent cells, corresponding to hMuStem cells 3 days later. These cells remained as small round cells for the following 7 days independently of the source of the tissue samples from which they were collected. After that, they started to proliferate as pseudo-clonal cultures composed of poorly adherent cells (Figure 1A), some of which clearly remaining in the supernatant as refractile round cells (Figure 1A, arrows). Although most of the thin fusiform cells divided to generate spindle-shaped cells, pairs of round cells were regularly observed during the first step of proliferation (Figure 1A, inset with arrowhead), revealing their ability to divide as floating cells. In contrast, myoblasts that adhered between 24 and 96 hr after the initial plating rapidly formed lengthened and large spindle-shaped cells, for which cell outlines were sometimes difficult to define (Figure 1B). After two passages, hMuStem-cell-derived primary cultures were composed of some refractile round cells (Figure 1C, arrows) and a majority of thin spindle-shaped ones (Figure 1C, arrowhead). No spontaneous fusion event was observed despite high confluence of cultures and the presence of

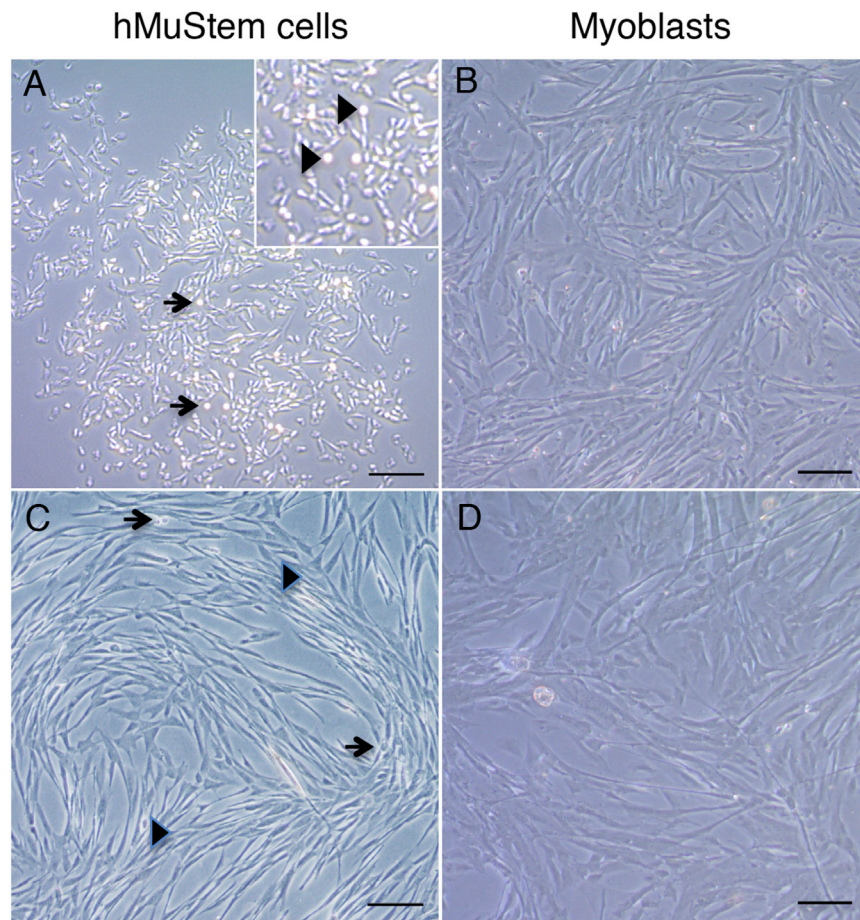


Figure 1. Morphological Features of hMuStem Cells and Myoblasts

(A) 7 days after the end of the isolation protocol, phase contrast microscopy revealed that hMuStem cells formed a colony unit composed of round and thin cells (arrow) as well as short spindle-shaped cells. A part of the cells remained in the supernatant as floating cells, corresponding to small and highly refractile cells positioned above adherent cells (arrowhead in insert). (B) Typical lengthened and large spindle-shaped cells were observed in myoblast-derived primary culture. (C) hMuStem-cell-derived primary culture was characterized by a large majority of thin elongated cells aligned in networks (arrowhead) and a permanent presence of some refractile round cells (arrow). (D) Monolayer of spindle-shaped cells and thick multinucleated cells characterized the myoblast-derived primary cultures. Scale bars, 100 μ m.

hMuStem Cells Mainly Correspond to Early Myogenic-Committed Cells of Perivascular Origin

To characterize the hMuStem cell population, a large panel of lineage-specific markers was investigated using RT-PCR, flow cytometry, and immunocytochemistry analysis on cells at passage 5 (P5). First, 2 out of 4 cell batches contained more than 99% of cells positive for the SC and myoblast marker CD56 (NCAM) (CD56⁺ cell batch; representative profiles are shown in Figure 2A, top), whereas 69% and 73% of CD56⁺ cells were determined in the other cell batches (CD56^{+/-} cell batch; Figure 2A,

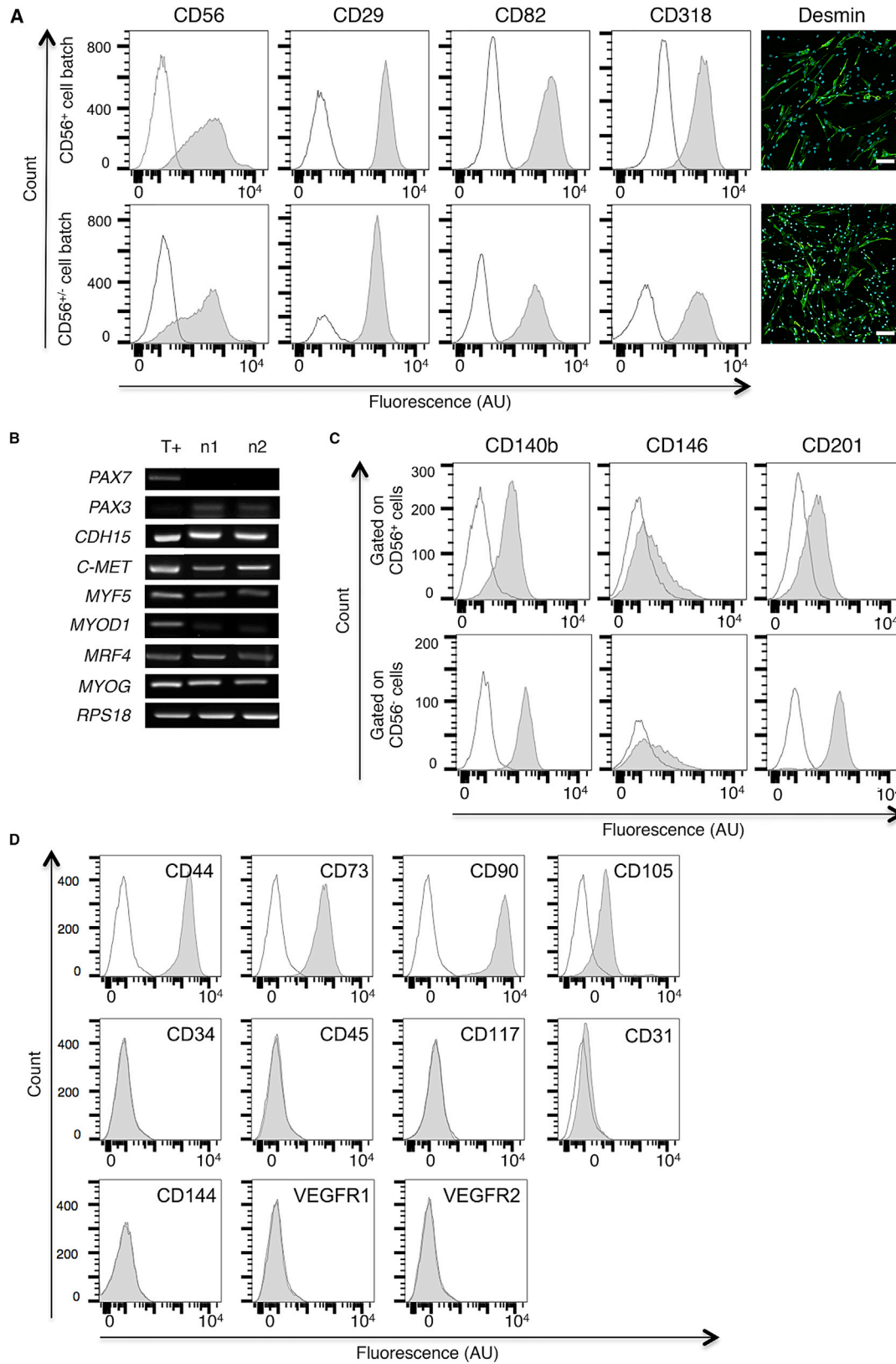
cell multilayers as well as alignments even after 1 month of culture (Figure 1C). In contrast, myoblasts generated cell monolayers composed of much larger and elongated cells as soon as they reached confluence (Figure 1D).

The *in vitro* expansion potential is an essential cell feature, especially when a therapeutic application based on whole body treatment is considered. hMuStem cells were able to generate a mean cumulative number of population doubling of 25.5 ± 3.5 over a period of 38 days, corresponding to a doubling time of 1.5 ± 0.2 days ($n = 4$; Figure S2). Interestingly, the rate of expansion was quite homogeneous, despite a distinct origin of the muscle, age, or gender of the donors. Also, it is in agreement with those previously described for cMuStem cells and other muscle-derived progenitor cells (see Discussion).

A clonogenic potential was also demonstrated *in vitro* for the four cell batches we tested, although it was limited because we obtained 1–14 clones (25–731 cells per clone) after 30 days from 300 initially seeded cells. Importantly, the presence of both spindle-shaped cells and round ones was detected in colonies, as described for the original primary cultures, which demonstrated atypical division modalities for the hMuStem cells.

In contrast, CD29 (β 1-integrin), recently shown to be expressed by human muscle stem cells/SCs,^{101,102} was homogeneously detected in all hMuStem cell batches. The same homogeneous expression profiles were obtained for CD82, another newly identified marker of SCs¹⁰³ and myogenic cells displaying high proliferation and differentiation rates¹⁰⁴, and for CD318, also reported to be present in SCs.¹⁰³ 45%–93% of the cells were positive for the muscle-specific marker desmin. RT-PCR analysis showed a lack of the paired box transcription factor *PAX7* mRNA in all hMuStem cell batches, whereas *PAX3*, M-cadherin (*CDH15*), and *C-MET* transcripts, corresponding to classical markers of SCs and myogenic cells, were systematically detected (Figure 2B). In addition, hMuStem cells expressed the myogenic regulatory factors (MRFs) *MYF5*, *MYOD1*, *MRF4*, and myogenin (*MYOG*) at the RNA level, which was implemented at the protein level by the detection of MYF5⁺ cells (range: 14%–40%), MYOD⁺ cells (less than 14%), and few myogenin⁺ ones (less than 5%).

Multi-labelings with CD56 and well-described perivascular cell markers evidenced that CD56⁺ cells contained at least 86% of CD140b⁺, whereas CD56⁻ cells were all CD140b⁺ (Figure 2C). Both cell types exhibited similar CD146 expression patterns, with around



(legend on next page)

25% of CD146⁺ cells, and interestingly expressed the mesenchymal progenitor marker CD201, but with a higher intensity in the CD56⁺ cells. In return, the other typical mesenchymal stem cell (MSC) markers CD44, CD73, CD90, and CD105 were homogeneously observed in all hMuStem cells (Figure 2D). Lastly, hMuStem cells did not express the classical hematopoietic markers CD34, CD45, and CD117 and were consistently defined by a lin⁻ phenotype based on the expression of CD4, CD8, CD19, CD33, and CD38 antigens (Figure S3A). In addition, they were uniformly negative for the expression of the endothelial markers CD31, CD144, vascular endothelial growth factor receptor 1 (VEGFR1), and VEGFR2 (Figure 2D). Interestingly, the same profiles were observed for CD15, CD133, and CD338, which are commonly used to identify myo-adipogenic cells, AC133⁺ cells, and side population ones (Figure S3B). Overall, we showed that the hMuStem cell population mainly corresponded to early myogenic-committed progenitors, with expression of several typical SC markers and a signature of perivascular mesenchymal cells evoking a pericyte origin.

hMuStem Cells Display an Oligopotent Status

We next investigated the degree of plasticity of the hMuStem cells. First, the *in vitro* differentiation potential into mesodermal lineages of cells at P5 was examined. After 7 days in low serum “fusion promoting” medium, all hMuStem cell batches formed multinucleated myotubes expressing sarcomeric myosin heavy chain isoform (sarcoMyHC) and displayed a fusion index (FI) of 28% ± 3.0%, revealing their ability to differentiate into the myogenic lineage (Figure 3A). Their differentiation into adipocytes was revealed with the cytoplasmic accumulation of small lipid vesicles in all hMuStem-cell-derived cultures 2 weeks after their switch in adipogenic induction media using oil red O staining (Figure 3B). Also, adiponectin and lipoprotein lipase (*LPL*) mRNAs were detected by RT-PCR (Figure 3C). Alizarin red staining indicated the formation of calcium deposits in all cultures when cultivated for 3 weeks in osteogenic induction media, revealing the ability of hMuStem cells to differentiate into osteogenic lineage (Figure 3B). In addition, expression of the osteogenic-specific gene, osteoprotegerin (*OPG*), was detected by RT-qPCR (mean cycle threshold [CT] of 26.4 ± 1.8). Finally, we showed that hMuStem cell populations cultivated in endothelial-specific medium and plated on Matrigel aligned and formed capillary-like structures (Figure 3D). In return, they did not express the endothelial markers CD31, CD144, and von Willebrand factor (VWF), demonstrating that they failed to commit into endothelial lineage (Figure S4).

Finally, we addressed the expression profile of the pluripotent stem cell markers. All hMuStem cell batches expressed *KLF4* and *NANOG* mRNAs (respective mean CT values of 26.9 ± 1.3 and 30.9 ± 1.0), whereas *OCT-4A* transcripts were not detected (Figure 3E). Also, *SOX2* transcript was only detected in a single cell batch upon 4. At the protein level, *KLF4* and *NANOG* were respectively expressed by 95% ± 3% and 83% ± 10% of hMuStem cells (Figure 3F). Taken together, our results indicated that hMuStem cells correspond to oligopotent cells and not to pluripotent ones.

CD56⁺ Subset in hMuStem Cell Population Exhibits a Higher Myogenic Commitment *In Vitro*

To deepen the characterization of the hMuStem cell population, CD56⁻ cells that could be detected in some cell batches as a minority fraction were investigated. For that, CD56⁺ and CD56⁻ cells (n = 4) were separated by magnetic microbeads and analyzed on the basis of their expression for MRFs and desmin as well their ability to fuse *in vitro* (Table 1). The MYF5⁺ cells represented 4.6%–27.0% of the cells among CD56⁺ cells and only 1.9%–3.5% in CD56⁻ cells (Mann-Whitney; p < 0.03). In addition, less than 1% MYOD⁺ cells and a lack of myogenin⁺ cells were detected in both cell fractions. Desmin was expressed by 49.0%–98.0% of CD56⁺ cells compared to 8.0%–35% desmin⁺ cells among the CD56⁻ ones (Mann-Whitney; p < 0.03). When switched into myogenic differentiation medium, sorted CD56⁺ cells gave rise to multinucleated myotubes after 7 days, which was illustrated by FI ranging from 5% to 23% (Table 1). In contrast, sorted CD56⁻ cells only formed thin myotubes, with a lower number of nuclei, as revealed by a FI < 3.5% (Mann-Whitney; p < 0.03). Overall, these results showed that CD56⁺ and CD56⁻ hMuStem cells differed *in vitro* in their myogenic capacities, the CD56⁻ cells displaying a lower capacity to give rise to myogenic cells, and differentiate into myotubes compared to CD56⁺ cells, which correspond to more committed myogenic cells.

hMuStem Cells Participate in Regeneration of Injured Muscles

The *in vivo* behavior of hMuStem cells was investigated, especially in terms of contribution to muscle regenerative capacity. Two CD56⁺ cell batches (corresponding to n1 and n3 generated from pP and pL muscle, respectively) were considered and compared to 2 CD56^{+/-} cell batches (n2 and n4 from pP and pL muscle, respectively) to determine if the presence of these CD56⁻ cells, defined by a lesser *in vitro* myogenesis, may affect the global myogenic capacity

Figure 2. Cell Lineage-Specific Phenotype of hMuStem Cells

(A) Immunolabelings against CD56, CD29, CD82, CD318, and desmin were performed on hMuStem cells (P5) cultivated in growth medium. The upper line shows the profile of a representative cell batch (n1) made exclusively of CD56⁺ cells, whereas the lower line depicts a representative cell batch (n2) containing CD56^{+/-} cells. Isotype control and specific signal are in white and gray, respectively. For labelings done on culture chamber slides, nuclei were counterstained with 10 µg/mL DAPI (blue). Scale bars, 100 µm. (B) Detection of transcripts specific to SC and myogenic cell markers on the two representative CD56⁺ (n1) and CD56^{+/-} (n2) cell batches (P5). Myoblasts and RPS18 were used as positive control (T+) and housekeeping gene, respectively. (C) Representative flow cytometry images revealing the expression of perivascular (CD140b and CD146) and mesenchymal (CD201) markers in gated CD56⁺ and CD56⁻ cells. Isotype control and specific signal are in white and gray, respectively. (D) Representative flow cytometry profiles revealing the homogeneous expression of MSC markers CD44, CD73, CD90, and CD105 by hMuStem cells and the lack of expression for the hematopoietic (CD34, CD45, and CD117) and endothelial (CD31, CD144, VEGFR1, and VEGFR2) markers. Control- and specific antibody-stained cells are shown in white and gray profiles, respectively.

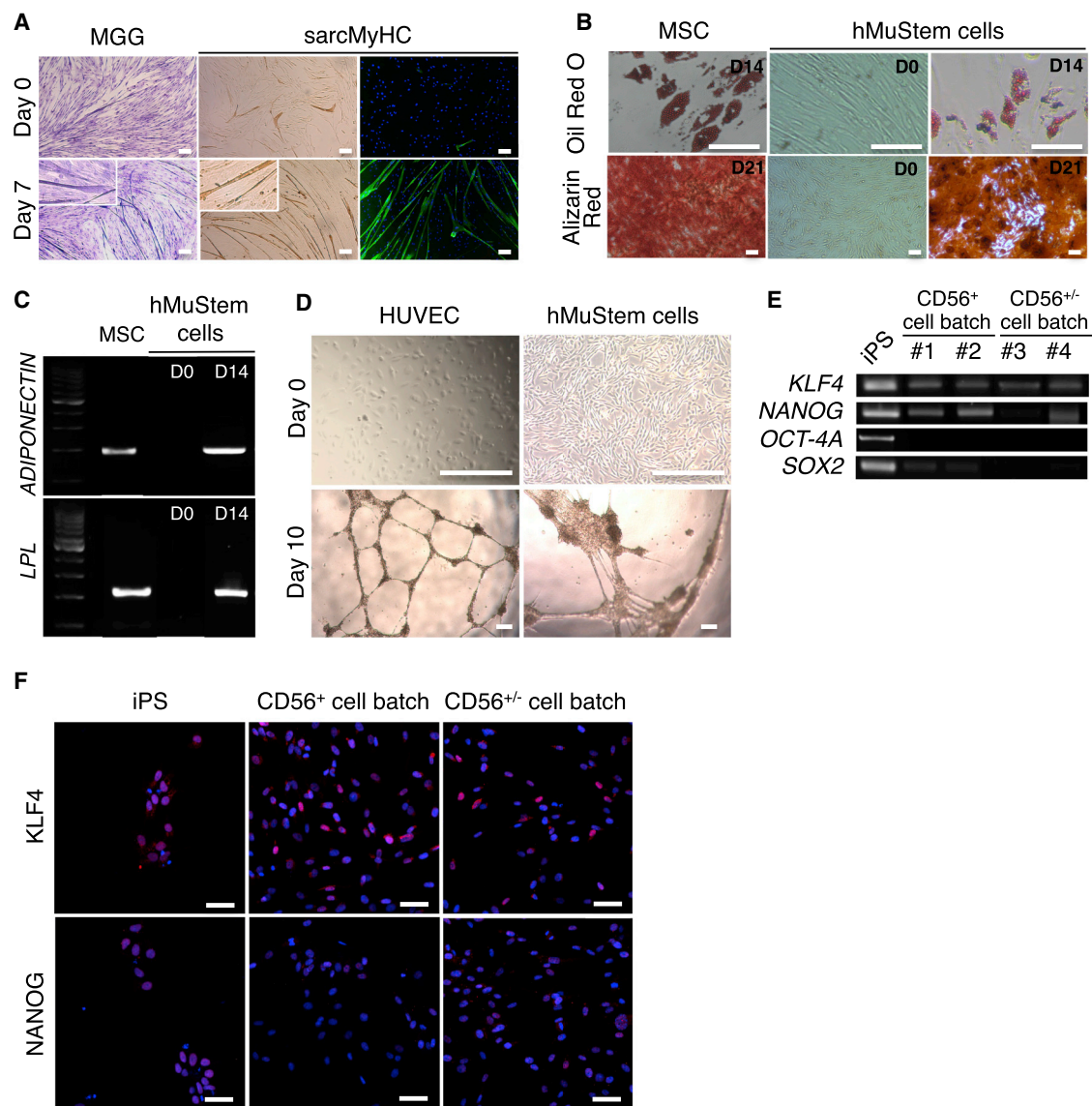


Figure 3. Multilineage Potential and Pluripotent Phenotype of Long-Term Cultured hMuStem Cells

(A) Cultured hMuStem cells were grown in low-serum medium for 7 days, then fixed and submitted to May-Grünwald Giemsa (MGG) staining and sarcMyHC immunolabeling to reveal multinuclei myotubes. hMuStem cells placed on growth medium were used as negative control. Fusion index was calculated on sarcMyHC⁺ myotubes. Nuclei were counterstained with 10 µg/mL DAPI (blue). Scale bars, 100 µm. (B) Top: after 14 days in adipogenic induction medium, the differentiation of hMuStem cells was assessed by detection of lipid vesicles through oil red O staining. Bottom: at 80% of confluency, hMuStem cells were placed in osteogenic differentiation medium for 21 days. Alizarin red staining revealed the formation of calcium deposits. Scale bars, 100 µm. (C) RT-PCR revealed the presence of adiponectin and LPL RNA in hMuStem cells only after the adipogenic induction. (D) hMuStem cells were cultivated in endothelial medium for 7 days before being plated with a Matrigel coating for a further 3 days. Phase contrast microscopy revealed the formation of capillary-like structures. Scale bars, 300 µm. (E) Expression of classical pluripotent marker mRNA. (F) Immunofluorescences against KLF4 and NANOG were performed on hMuStem cells (P5) cultivated in growth medium. Nuclei were counterstained with 10 µg/mL DAPI (blue). Scale bars, 50 µm. MSCs, human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and iPSCs were used as positive controls for (B)–(D) and (E) and (F), respectively.

in vivo of the hMuStem cell populations. Two hundred and fifty thousand hMuStem cells were injected into cryodamaged TA muscles of Rag2^{-/-}IL2rβ^{-/-} mice (n = 3 per cell batch). 3 weeks later, hematoxylin-eosin-saffron (HES)-stained sections from each injected muscle displayed numerous centronucleated myofibers (insets, [Figures 4A and 4B](#)) and large foci rich in mononucleated cells ([Figures](#)

[4A and 4B](#)). Rare fibroblasts, macrophages, and lymphocytes were also noted. The amount of endomysial tissue enriched in a lightly basophilic matrix and mixed with some collagen fibers (stained in yellow by saffron) was mildly increased. Specific human lamin A/C immunolabeling showed the presence of a similar number of donor nuclei in the different muscles injected with the four cell

Table 1. Phenotypic Analysis of Sorted CD56 Cells Present in hMuStem Cell Population

	Sorted CD56 ⁺ Cells	Sorted CD56 ⁻ Cells
MYF5	4.6%–27%	1.9%–3.5%
MYOD	0%–1%	ND
Desmin	49%–98%	8.0%–35%
Fusion index	5%–23%	0%–3.5%

Percentage of MYF5, MYOD, and desmin-positive cells was determined in sorted CD56 cells (n = 4 per fraction). Eight randomly selected fields were used to analyze at least 300 cells and determine the proportion of cells positive for each of the myogenic markers. Fusion index was determined after 7 days of myogenic differentiation by determining the percentage of nuclei within sarcMyHC⁺ myotubes (>2 nuclei) in two random fields per well in three replicate wells. At least 1,199 nuclei per well were considered. ND, not detected.

batches, revealing the ability of both CD56⁺ and CD56^{+/-} hMuStem cells to integrate into the host injured tissue (Figures 4C and 4D). The percent of donor nuclei displaying a cytoplasmic location was 48.5% ± 9.18% and 80.1% ± 6.30% in muscles injected with cell batches made of exclusive CD56⁺ cells, whereas it was 20.2% ± 3.35% and 13.8% ± 6.19% for those receiving cell batches in which CD56⁻ cells were found (Table 2; Figure S5). Interestingly, this distribution analysis of human lamin A/C⁺ nuclei revealed that CD56⁺ hMuStem cell batches contributed significantly more to myofiber formation than those exhibiting CD56⁻ cell fraction (Kruskal-Wallis; p < 0.001). Human-specific MYF5, MYOD1, MYOG, and CDH15 mRNAs were detected in all injected muscles, revealing the ability of the hMuStem cells to differentiate *in vivo* into myogenic cells (Figure S6). Furthermore, the presence of cytoplasmic donor nuclei was associated with expression of the human spectrin protein and dystrophin one, although less frequently due to their late maturation (Figures 4E–4H, inset). Thus, the mean number of human spectrin⁺ myofibers per section was 97.7 ± 51.7 and 149 ± 36.8 in muscles injected with CD56⁺ cell batches compared to 58.3 ± 16.1 and 48.4 ± 19.2 for those injected with CD56^{+/-} cell batches. For human dystrophin, the mean number of positive myofibers per section represented 29.7 ± 26.8 and 40.4 ± 26.8 for CD56⁺ cell batches. In comparison, it was 9.40 ± 7.04 and 5.00 ± 6.24 for CD56^{+/-} cell batches (Table 2; Figure S5). Interestingly, the numbers of human spectrin⁺ and dystrophin⁺ myofibers per section were systematically higher in the muscles injected with exclusive CD56⁺ hMuStem cells, revealing a better myogenic commitment for them. In addition, confocal microscopy analysis indicated that hMuStem cell nuclei were rarely observed in the SC location, with less than 2.50% of human lamin A/C⁺ nuclei being found in this position in all injected muscles (Figures 4I–4L; Table 2; Figure S5). Finally, hMuStem cells with an interstitial location never expressed the endothelial marker CD31 (data not shown).

Taken together, these results gave evidence that the incorporation of hMuStem cell nuclei into host myofibers is effective and associated with both expression of human muscle-specific genes and production of structural proteins expressed in differentiated myofibers. hMuStem

cells exhibit an *in vivo* muscle regenerative capacity whose intensity is directly associated with their content in CD56⁺ cells.

DISCUSSION

Over the last few years, several adult stem cell populations were presented experimentally as having a myogenic potential in the muscular dystrophy context, suggesting that their clinical use could allow surmounting of the major limitations of the myoblast transplantation. However, when protocols were developed with these cells of human origin^{60,70,80} using a clinically relevant animal model^{78,86} or in a clinical trial⁶³, the initially described regenerative potential was unfortunately not confirmed. These works pointed out the difficulties of translating from preclinical studies to clinical trials and the need to carefully define standardized experimental protocols.

hMuStem Cells Could Be Isolated from Skeletal Muscle Tissue of a Different Source

Canine MuStem cells have been previously obtained from large samples of young healthy dog limb muscles.⁹⁶ Based on an adaptation of this protocol, we report here that human MuStem cells could be successfully isolated from small biopsies of postural or locomotor muscles of 15- to 51-year-old women and men donors. Like cMuStem cells, all hMuStem cell batches generated a polyclonal population morphologically composed of predominantly spindle-shaped flat cells and some round cells. hMuStem cell-derived primary cultures were able to produce more than 20 population doublings in 38 days, revealing their extended proliferation capacity *in vitro*. This result is in agreement with those previously presented for cMuStem cells as well as for human myosphere-derived progenitor cells (MDPCs) and freshly isolated muscle AC133⁺ cells that could undergo more than 40 population doublings before the onset of senescence¹⁰⁵ and 25 population doublings in 50 days of culture,³⁵ respectively. Whether the age and the gender of donors influence the morphological and behavioral features of hMuStem cells still needs to be addressed by considering a higher number of cell batch because these parameters were previously shown to affect the features of other adult-derived stem cells, such as MDSCs,¹⁰⁶ ADSCs, and MSCs.^{107,108}

hMuStem Cells Predominantly Correspond to Early Myogenic-Committed Progenitors with a Perivascular Origin

Based on a panel of SC and muscle-specific markers, we established that cultured hMuStem cells are mainly early myogenic-committed progenitors, as previously shown for canine cells.⁹⁶ Consistently, hMDSCs defined as preplated cells adhering between 48 and 120 hr⁷⁰ or after 96 hr⁷¹ were characterized as being CD56⁺ and expressing MYF5, MYOD1, or MYOG at the RNA level. In the last few years, Peault's group^{58,109} proposed that adult stem cells identified in multiple human organs could be related to a common ancestor, corresponding to perivascular cells expressing MSC markers. Like long-term cultured human perivascular cells, we determined that *in vitro* expanded hMuStem cells express the pericyte markers CD146 and CD140b, the recognized MSC markers, but not the markers of hematopoietic and endothelial cells. These results evoke

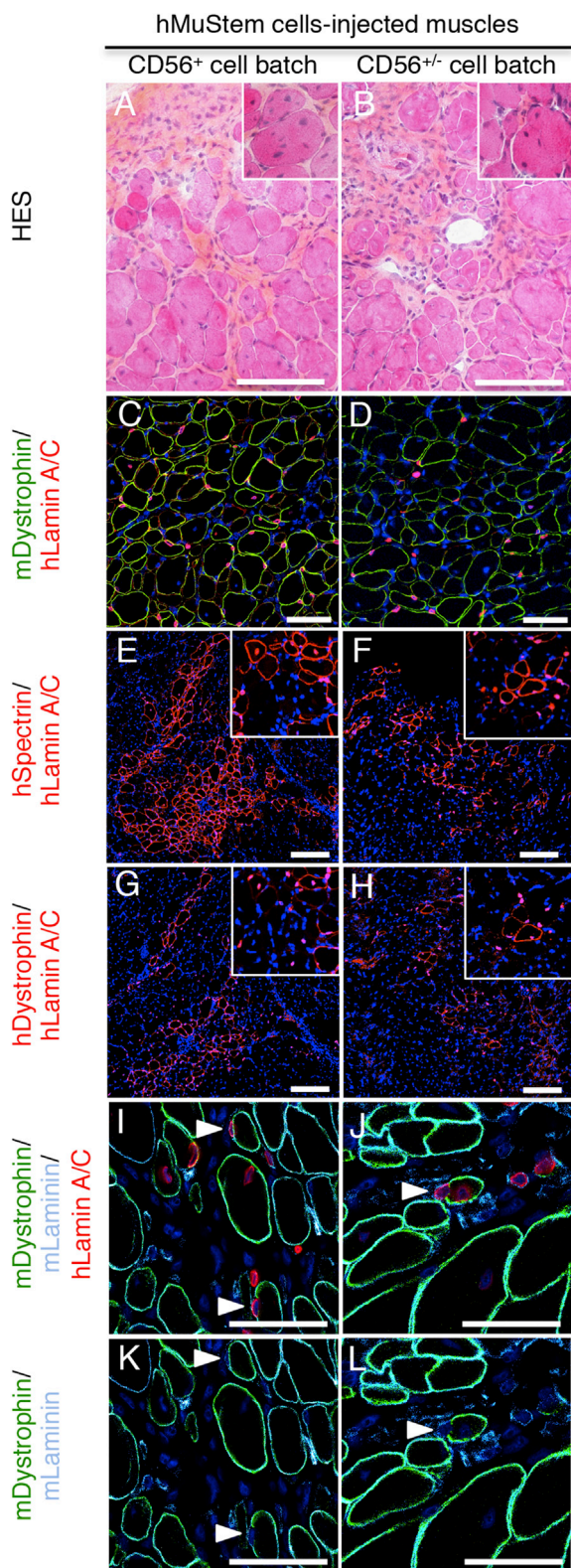


Figure 4. Contribution of Both Long-Term Cultured CD56⁺ and CD56^{+/-} hMuStem Cells to Myofiber Regeneration

hMuStem cell batches (P5) made exclusively of CD56⁺ cells (left) or containing a CD56⁻ cell fraction (right) were injected into cryodamaged TA muscle of Rag2⁻IL2rβ⁻ mice. (A–L) 3 weeks later, frozen sections of recipient muscle were submitted to HES staining (A and B) and co-labeled with specific Abs against human laminin A/C (red; C–J), murine dystrophin (green; C and D and I–L), murine laminin (light blue, I–L), human spectrin (red; E and F), and human dystrophin (red; G and H). (C–L) All nuclei were counterstained using DAPI (dark blue). Foci of regeneration composed of numerous centronucleated fibers (inset, A and B) and scattered mononucleated cells were observed. A large number of human nuclei were found in muscle tissue (C and D). Also, numerous human spectrin⁺ and dystrophin⁺ fibers were detected. Insets (E–H) show the presence of myofibers characterized by both detection of cytoplasmic donor nuclei and human spectrin or dystrophin expression. In return, hMuStem cells were rarely found in a satellite cell location (arrowhead, I–L). Scale bars, 100 μm (A–D), 150 μm (E–H), and 50 μm (I–L).

a possible blood vessel wall origin for the hMuStem cells. The high expression we observed for the MSC markers is consistent with the description done for hMDPCs and hMDSCs isolated by a similar preplating technique from muscle biopsies of subjects with no known muscle disease.^{70,71} Based on their broad expression of endothelial markers, it was hypothesized that hMDPC subsets may originate from blood vessels¹¹⁰ and correspond to myo-endothelial cells.⁹² Our present results clearly indicate that it is not the case for the hMuStem cells. Also, a major difference between hMuStem cells and human pericytes concerns their myogenic expression pattern. Although freshly isolated or long-term cultured muscle-derived perivascular cells neither expressed the CD56 protein nor the *PAX7*, *MYF5*, *MYOG*, and *M-CDH15* transcripts,^{57,58} cultured hMuStem cells were defined by their expression of several muscle-specific markers. Interestingly, human muscle-derived cell (MDC) preparations obtained as previously described for pericytes were defined as containing a CD56⁺ cell subpopulation (ranged from 1.5% to 47%) and expressing *PAX3*, *MYF5*, and *MYOD1* mRNAs.⁶⁰ Only few preparations expressed *PAX7*. In agreement with these data, we detected *PAX3*, *MYF5*, and *MYOD1* mRNAs in all hMuStem cell batches, whereas we did not observe *PAX7* expression. In return, the fraction of CD56⁺ cells is lower in the MDCs and much more heterogeneous than the one obtained for the hMuStem cell populations (69%–99%). Similarly, 76% of CD56⁺ cells were detected in the hMDPCs.⁷¹ Considering the concomitant high expression of several robust markers of human SCs, such as CD56 and CD29,¹⁰² we determined for the hMuStem cells, it is quite intriguing to note a lack of the canonical SC transcription factor *PAX7*. It is noteworthy that the expression of Pax7 like Myf5 and MyoD was shown to decrease with time in culture in MDC preparation.⁶⁰ Also, in myogenic cell cultures derived from human fetal muscle, *PAX7* expression was shown to be low or undetectable at the proliferative myoblast stage.¹¹¹ Thus, the lack of Pax7 expression might be related to the high proliferative status of hMuStem cells. Interestingly, the existence of a small fraction of *PAX7*⁻ SCs was previously described, revealing that *PAX7* is not absolutely expressed in all human SCs.^{104,111} A hypothesis might be that the hMuStem cells correspond to these marginal SCs that would have a distant perivascular affiliation.

Table 2. Histological Analysis of Cryodamaged TA Muscles of Rag2^{fl}L2r^{fl} Mice following Intramuscular Injection of hMuStem Cells

Cell Batch	Cell Batch Number	Mice Number	hLamin A/C ⁺ Nuclei			hSpectrin ⁺ Myofibers with hLamin A/C ⁺ Nuclei	hDystrophin ⁺ Myofibers with hLamin A/C ⁺ Nuclei	
			hLamin A/C ⁺ Nuclei No. per Muscle	Tissue Distribution (%)				
				Cytoplasmic Location	Satellite Cell Location			Interstitial Location
CD56 ⁺	n1	1	9,891	51.3	3.90	44.9	89.6	37.0
		2	4,181	38.2	0.70	61.1	50.5	nd
		3	2,164	55.9	nd	44.2	153	52.0
		mean ± SD	5,412 ± 4,008	48.5 ± 9.18	1.50 ± 2.08	50.1 ± 9.56	97.7 ± 51.7	29.7 ± 26.8
	n3	4	30,601	73.7	6.10	20.2	191	62.3
		5	17,180	86.3	0.80	13.0	124	48.3
		6	10,152	80.3	0.60	19.1	131	10.5
		mean ± SD	15,821 ± 10,986	80.1 ± 6.30	2.50 ± 3.12	17.4 ± 3.88	149 ± 36.8	40.4 ± 26.8
CD56 ^{+/-}	n2	7	12,169	23.5	1.50	75.0	70.4	6.00
		8	50,498	20.2	0.40	79.4	64.5	17.5
		9	21,312	16.8	nd	83.2	40.0	4.70
		mean ± SD	27,993 ± 20,019	20.2 ± 3.35	0.60 ± 0.78	79.2 ± 4.10	58.3 ± 16.1	9.40 ± 7.04
	n4	10	7,142	20.9	2.70	76.5	62.8	3.00
		11	6,849	9.40	0.50	90.2	26.6	nd
		12	21,686	11.2	0.30	88.5	55.8	12.0
		mean ± SD	11,892 ± 8,483	13.8 ± 6.19	1.20 ± 1.33	85.1 ± 7.47	48.4 ± 19.2	5.00 ± 6.24
p value (CD56 ⁺ versus CD56 ^{+/-} cells)			>0.05	<0.001*	>0.05	<0.001*	>0.05	>0.05

Four hMuStem cell batches were considered: two with exclusive CD56⁺ cells (n1 and n3) and two that contain CD56⁻ ones (n2 and n4). Human lamin A/C⁺ nuclei were counted per section, and total number of human cells in the muscles was determined based on a linear density by considering the size of the hMuStem cell nuclei and the thickness of the section, as previously described.³⁵ The cytoplasmic, satellite, and interstitial distribution was expressed as a percentage, whereas human spectrin⁺ and dystrophin⁺ myofibers were expressed as the number of counted myofibers per section. The p value was determined with a Kruskal-Wallis test. * indicates a significant result.

Based on the lack of CD15/SSEA-1 antigen expression, we additionally found that hMuStem cells do not correspond to the adipogenic CD56⁻/CD15⁺ cells, which are progeny of the myo-adipogenic CD56⁺/CD15⁺ progenitors.¹¹² *In vitro*, the proliferation of these bipotent cells gave rise to CD56⁺/CD15⁻ progenitors that express MYF5, but not the SC marker PAX7, as we determined here for the hMuStem cells. Intriguingly, RT-PCR analysis showed that CD56⁺/CD15⁻ cells express *PW1/PEG3*, which was also detected in all hMuStem cell preparations. Considering that CD56⁺/CD15⁻ cells, which were found in the interstitial compartment of human muscle,⁹⁴ were defined as positive for the MSC markers CD44, CD49, CD90, and CD146 and negative for the lineage markers CD45, CD106, CD117, and CD133, we cannot exclude that hMuStem cells could belong to the CD56⁺/CD15⁻ cell fraction.

hMuStem Cells Contribute to Muscle Regeneration

In agreement with our previous results obtained with cMuStem cells after IM injection in GRMD dogs,⁹⁶ we showed that hMuStem cells can engraft into host tissue, where they efficiently participate in myofiber regeneration. Indeed, many hundreds of hMuStem cell nuclei fused with host myofibers were detected, which were associated with production of human proteins. These data distinguished

hMuStem cells from hMDSCs that were characterized by a modest regenerative index after transplantation in *scid/mdx* mice muscles.⁷⁰ One possible element to explain the difference between these two cell types may be that the hMDSCs corresponded to cells adhering between 48 and 120 hr, whereas the hMuStem cells were defined as cells adhering after 120 hr. Human muscle-derived AC133⁺ cells also contributed to extensive muscle regeneration after grafting into irradiated and cryodamaged TA muscles of Rag2^{-/-}/γ chain^x/C5 mice.^{35,37} These cells efficiently participated in SC formation, with 25% of human nuclei corresponding to SCs, which contrasts with the modest contribution we determined for the hMuStem cells. Meng et al.³⁷ demonstrated that AC133⁺ cells that had undergone greater *in vitro* expansion contributed less efficiently to muscle regeneration *in vivo*. How this parameter might influence hMuStem cell features will have to be addressed in conditions compliant with cell therapy. We also found that hMuStem cells adopt an interstitial location, with a higher rate than cMuStem cells. We can postulate that the lower ability of hMuStem cells to fuse with host myofibers compared to cMuStem cells is related not to their intrinsic properties but to the type of damaged muscle they were injected in. hMuStem cells were injected in a mouse muscle that was exposed to a single experimental injury and still contained a normal SC pool. In contrast, cMuStem

cells were placed in a GRMD dog muscle characterized by continuous cycles of degeneration/regeneration and architectural alterations with inflammation, fibrosis, and deposition of non-myogenic material,^{113,114} which could contribute to numerical and/or functional loss of SCs, as has been described in DMD patients,^{115–117} *mdx* mice models,^{118–120} and GRMD dogs.¹²¹ To investigate whether the grafted hMuStem cells with interstitial location are able to generate new human myofibers and so display a myogenic potential, it could be informative to perform on transplanted mice a second injury protocol a few weeks following initial cell transplantation, as previously assessed.¹⁰² Intriguingly, a similar ability to give rise to interstitial cells had been described for the PICs that exhibited a broad range of gene expression common to MSCs,¹²² did not express PAX7, displayed myogenic potential *in vitro*, and formed myofibers after engraftment in damaged mice muscle,¹⁰⁰ as we describe here for the hMuStem cells. Considering that all hMuStem cell batches tested express *PWI* mRNA, further experiments may be developed to determine in what manner they share other biological properties with these populations.

Concerning the hMuStem cell behavior after IM injection, it is noteworthy that the higher percentages of fused donor nuclei and human spectrin⁺ myofibers were found in muscles injected with the hMuStem cell batches containing homogeneous CD56 expression, revealing that the muscle regenerative potential mainly relies on CD56⁺ cells. These data, generated on four healthy donor MDC batches, are in agreement with those obtained for CD56⁺ and CD56⁻ MDCs isolated as previously described for pericytes from a DMD patient.⁶⁰ One difference found between these CD56⁺ and CD56⁻ MDCs was their expression of desmin and MHC, which suggests a more differentiated status of CD56⁺ MDCs. Concerning hMuStem cells, a similar difference was observed in the percentage of desmin⁺ cells between CD56⁺ and CD56⁻ cell fractions, corroborating the notion of a more pronounced myogenic commitment for the CD56⁺ cells.

We are currently isolating clinical grade hMuStem cells. Depending on the pattern of CD56 expression, we will generate an extended analysis of fractions if required and analyze their ability of muscle homing after the vascular route. Then, we will measure their contribution to muscle repair, which is of major interest because disappointing results were reported after systemic delivery of promising human AC133⁺ cells and MDCs isolated as previously described for pericytes in immunodeficient injured mice models.^{37,60}

In conclusion, our results demonstrate that hMuStem cells resemble cMuStem cells and provide the proof of concept that they display myogenic features after transplantation *in vivo*. Thus, hMuStem cells may represent a promising agent for clinical application in the DMD context.

MATERIALS AND METHODS

Human Skeletal Muscle Tissue

Samples were obtained from pP muscle corresponding to *Longissimus dorsi* of two females (20 and 22 year old) and one 15-year-old male

patient. pL muscles corresponding to *Gastrocnemius*, *Fascia lata tensor*, and *Vastus lateralis* of 38-, 45-, and 51-year-old male patients were also sampled. These muscles were chosen to determine if MuStem cells could be isolated from different tissue origins. Patients were free of known muscular disease and operated at the Department of Pediatric Surgery of the Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Nantes (France). All patients gave written informed consent. All protocols were approved by the Clinical Research Department of the CHU (Nantes, France) according to the rules of the French Regulatory Health Authorities (permit number: MESR/DC-2010-1199). The biological sample bank was constituted in compliance with the national guidelines regarding the use of human tissue for research (permit number: CPP/29/10).

Animals

Immunodeficient Rag2⁻IL2rβ⁻ mice^{123,124} were housed in the specific pathogen-free animal facilities at the Faculty of Medicine of the University Pierre and Marie Curie (UPMC, Paris, France). Mice were fed *ad libitum* and allowed continuous access to tap water. Twelve 5- to 6-month-old mice were used as recipients for human cell implantation. All experiments were carried out in accordance with the guidelines from the French National Research Council for the Care and Use of Laboratory Animals (Referenced number: 2016071316136141).

Isolation of Human MuStem Cells

Freshly surgically taken muscle tissues were placed in cold PBS (PAA, Les Rumeaux, France) supplemented with 2% UI/mL penicillin, 0.1 mg streptomycin, and 0.25 mg/mL amphotericin B (PSF) (Sigma-Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, France) and transferred to the laboratory. They were weighed, washed several times in PBS/2% PSF, carefully minced into 1-mm³ pieces using forceps and scalpel and enzymatically digested (15 min, 37°C) by a mix of collagenase type VIII (2,000 U/g of tissue, Sigma-Aldrich) and 0.2% hyaluronidase type 1S (Sigma-Aldrich). The pre-digested tissue was centrifuged (100 × g, 5 min) and the supernatant was collected and neutralized with 20% (v/v) fetal calf serum (FCS) (Sigma-Aldrich) while the pellet was digested (30 min, 37°C) with 0.125% Pronase E (Sigma-Aldrich). After centrifugation (100 × g, 5 min), the supernatant was collected, pooled with those obtain after the first enzymatic digestion, and submitted to successive centrifugation (300 × g, 15 min) and sequential filtering through 100, 70, and 40 μm pore-diameter nylon mesh (BD Biosciences; Franklin Lakes, NJ, USA). Muscle-derived cells (MDCs) were resuspended in PBS (PAA) supplemented with 2% FCS (Sigma-Aldrich) and 1% PSF (Sigma-Aldrich), and viability was assessed using 0.1% trypan blue staining (VWR, Strasbourg, France). hMuStem cells were isolated using a modified version of the preplating technique previously described.⁹⁶ A flow chart is shown in Figure S1. Briefly, skeletal MDCs were seeded at 1 × 10⁵ cells/cm² on uncoated tissue culture plastic flasks, whereas gelatin-coated ones (Sigma-Aldrich) have been used in the previous protocol. After 1 hr, non-adherent cells were placed at 5 × 10⁴ cells/cm² on gelatin-coated flasks under standard conditions (37°C in 95% humidified air and 5% CO₂) for

1 day. Then, non-adherent cells were collected and transferred on other coated flasks for 3 days, whereas the procedure has been repeated daily for 3 days in the previous protocol. After that, floating cells were placed at 2×10^4 cells/cm² in freshly coated flasks for 1 day again. Finally, non-adherent cells were seeded at the same density and maintained for 3 days to isolate hMuStem cells as poorly adhering cells between 5 and 8 days post-plating. They were amplified in growth medium (Macopharma, Mouvaux, France) containing 10% FCS, 1% PSF, 10 ng/mL human recombinant basic fibroblast growth factor, and 25 ng/mL human recombinant epidermal growth factor (PromoCell, Heidelberg, Germany). Growth medium was replaced every 4 days. At confluence, cell layers were dissociated with trypsin-EDTA at 0.25% v/v (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). hMuStem cells were then resuspended in growth medium and seeded at 1×10^4 cells/cm² (passage 1 [P1]). Experiments were performed with the six cell samples obtained from pP and pL muscles. Myoblasts, corresponding to a pool of cells that adhered between 24 and 96 hr after the initial plating, were plated at 2×10^4 viable cells/cm² to gelatin-coated plastic flasks and grown in HAM F12 (Invitrogen) supplemented with 15% FCS and 1% PSF.

In Vitro Proliferation Analysis

hMuStem cell-derived primary cultures ($n = 4$) were plated in a gelatin-coated flask at a density of 1×10^4 cells/cm² in growth medium and placed under standard conditions. Cell population growth was monitored over a period of 38 days. The population doubling level and the doubling time were calculated at each passage performed when cultures reach 80% confluence, as previously described.¹²⁵

Clonogenicity Assay

From a seeding density of 1×10^2 cells/gelatin-coated Petri dish, the colony-forming unit of the hMuStem cells ($n = 4$; P5) was evaluated over a period of 30 days. The colonies were submitted to May-Grünwald Giemsa staining and counted, and the colony-forming efficiency was expressed as the number of colonies for plated cells.

Flow Cytometry

Cultured hMuStem cell samples ($n = 4$; P5 corresponding to 10.4–12.7 population doublings) were resuspended in cold PBS/2% human serum and 1×10^5 cells were incubated (30 min, 4°C) in the dark with fluorochrome-conjugated antibodies (Abs) at saturating concentration (Table S2). Isotype-matched Ab and fluorescence minus control samples were used as negative controls for gating and analyses. When applicable, 7-amino-actinomycin D (7-AAD; BD Biosciences) was added to evaluate cell viability. Samples were acquired using a FACS Aria flow cytometer (BD Biosciences) and data were analyzed using FlowJo software (FlowJo, Ashland, OR, USA). For simple labeling, at least 15×10^3 viable cells were considered, whereas 3×10^4 cells were acquired for multicolor labeling.

Cell Sorting

Cultured hMuStem cell samples with a CD56⁻ cell fraction ($n = 4$; P5) were sorted using CD56 MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Glad-

bach, Germany) according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were resuspended in wash buffer and incubated (15 min, 4°C, in the dark) with microbead-conjugated CD56 Abs at a saturating concentration. After washing and centrifugation, the supernatant was discarded, the cells were resuspended in buffer, and magnetic separation was done using the MS MACS Column device (Miltenyi Biotec).

Gene Expression

Total RNA was extracted from either dry pellets of 2×10^6 cells or muscle tissue samples using RNeasy mini kit and RNeasy Fibrous kit (QIAGEN, Santa Clara, CA, USA), respectively, following the manufacturer's instructions. Total RNA was treated with DNase (Ambion, Austin, TX, USA), quantified using a NanoDrop spectrophotometer (Labtech, Wilmington, DE, USA), and processed for reverse transcriptase using the standard protocol. Briefly, RT reactions were carried out on 0.5 µg total RNA using the GoScript reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA). Gene-specific oligonucleotide primers were designed using Oligo Primer Analysis Software v.7 (Molecular Biology Insights, Colorado Springs, CO, USA) and synthesized by MWG Operon (Eurofins, Ebersberg, Germany). PCR amplifications were performed on 0.5 µL cDNA with the following program: initial denaturation (12 min, 95°C), followed by 35 cycles (30 s, 94°C; 30 s, 60°C; and 30 s, 72°C), and a final extension (10 min, 72°C). The PCR products were migrated and visualized on a 2% agarose gel with GelRed staining. For RT-qPCR, all cDNA amplifications were performed in triplicate using 1/20th of the reverse transcription products with the MESA BLUE qPCR kit (Eurogentec, Seraing, Belgium). qPCR was run on the Thermocycler CFX96 (Biorad, Hercules, CA, USA) with the following parameters: initial denaturation step (5 min, 95°C) and a total of 40 cycles (15 s, 95°C; 1 min, 60°C per cycle). RPS18 was selected as an endogenous control, and the relative expression levels were calculated by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. The primer's sequences are supplied in Table S3.

Immunofluorescence Analysis

hMuStem cells (whole population or CD56-sorted fractions) and myoblasts (P5) were plated on gelatin-coated Lab-Tek culture chamber slides (Nalge-Nunc, Rochester, NY, USA) at 2×10^4 cells/cm² in growth medium during 3 days. Induced pluripotent stem cells (iPSCs) were used as a positive control for pluripotent stem cell marker labeling. Cells were fixed in 2% paraformaldehyde (PFA) in PBS (10 min, 4°C or at room temperature [RT]), permeabilized with 0.3%–0.5% Triton X-100 (4°C, 20–30 min), and incubated (60 min, RT) in blocking buffer (5% goat serum in PBS). Cells were then incubated with the Abs listed in Table S4. Cells were finally counterstained (15 min, 37°C) with DAPI fluorescent-cell-permeable DNA probe (Life Technologies, Paisley, UK). More than 300 cells were counted per sample by using Fiji image analysis software v.2.¹²⁶ Data were presented as mean ± SD.

In Vitro Differentiation Potential Assay

For myogenic differentiation, hMuStem cells (P5; whole population or CD56 cell-sorted fractions) were plated at 3×10^4 cells/cm² and maintained in growth medium for 1 day, and then 10% FCS was

replaced by 2% horse serum. After 7 days, differentiation was assessed based on cell morphology and expression of the sarcomeric myosin heavy chain isoform (sarcMyHC). Cultures were fixed in 4% PFA, treated with 0.5% Triton X-100/20% (w/v) goat serum in PBS, and incubated (1 hr, 37°C) with anti-human sarcMyHC Abs (1:500, Developmental Studies Hybridoma Bank [DSHB], Iowa City, IA, USA). Specific Ab binding was revealed using either AlexaFluor 488-coupled (1:500, Invitrogen) or biotinylated secondary goat-anti-mouse Abs (1:300, Dako), followed by peroxidase-coupled streptavidin (1:300, Dako). The nuclei were finally counterstained with DRAQ5 (Biostatus). FI was determined by determining the percentage of nuclei within sarcMyHC⁺ myotubes (>2 nuclei) in two random fields per well in three replicate wells. At least 1,199 nuclei per well were considered. For adipogenic and osteogenic differentiations, hMuStem cells (P5) were plated at 1×10^4 cells/cm², maintained in growth medium until 80% confluence, and then incubated in specific cell-type differentiation media, as previously described.¹²⁷ For endothelial differentiation, hMuStem cells were amplified in EGM-2 medium (Lonza, Basel, Swiss) for 7 days. Then, the cell layer was dissociated with trypsin and cells were seeded on Matrigel coating (3 g/mL, BD Biosciences) in EGM-2 medium. Differentiation was assessed 3 days later based on capillary-like formation. RT-PCR analysis of lineage-specific genes was performed using primers listed in [Table S3](#).

In Vivo Experiment and Histological Analysis

Rag2⁻IL2rβ⁻ mice were anesthetized with an intra-peritoneal injection (0.1 mL per 20 g body weight) of a solution containing 100 mg/mL ketamine (Merial, Lyon, France) and 20 mg/mL Rompun 2% (Bayer, Puteaux, France) in PBS. As post-operative analgesia, mice received a subcutaneous injection of 0.3 mg/mL buprenorphine (50 µg/kg body weight; Axience, Pantin, France). Prior to cell implantation, cryolesion of *Tibialis anterior* (TA) muscle was induced to stimulate the implanted cells to fuse and form new myofibers. After skin incision and muscle exposition, TA muscle was subjected to three freeze cycles of 15 s each by applying a liquid nitrogen cooled metallic rod, as previously described.¹²⁸ Cell layers of hMuStem-cell-derived primary cultures (P5, n = 4) were then dissociated, cells were pelleted and resuspended (2.5×10^5 cells in 15 µL PBS), and each was injected in a single site in the left cryodamaged TA muscle of the host (n = 3 mice per cell batch) using a 50-µL syringe with a 22G needle. The skin was then closed with fine sutures. 3 weeks later, TA muscles were removed, frozen in isopentane cooled in liquid nitrogen, and entirely cut into 10-µm sections. For every 350 µm along the complete length of the muscle, 8 transverse sections corresponding to an 80-µm length were used for quantitative analysis. Histological analysis was done on HES-stained sections of cryodamaged muscle receiving exclusive CD56⁺ hMuStem cells or CD56^{+/-} ones, with non-injected muscle being used as the control. The number of human nuclei or human spectrin⁺/dystrophin⁺ myofibers in each section examined was counted, and the total values were determined for each TA muscle investigated, as previously described.³⁵

To quantify cytoplasmic and interstitial hMuStem cell nuclei, a triple labeling was performed. Sections were treated with Triton X-100 0.3%

detergent (10 min, RT) and blocking buffer (10% goat serum in PBS; 30 min, RT) before being incubated (60 min, 37°C) with a solution of mouse anti-human lamin A/C primary Abs (1:50, Leica Biosystems, Nussloch, Germany), followed by Alexa 555 rabbit anti-mouse secondary Abs (1:300, Invitrogen) in a humid chamber (60 min, RT). The sections were then treated with goat blocking serum (30 min, RT) before incubation with a solution containing both rabbit anti-mouse dystrophin Abs (1:50, Chemicon, Rolling Meadows, IL, USA) and rat anti-mouse laminin Abs (1:100, Sigma-Aldrich; 60 min, 37°C). Secondary Abs corresponding to a mixture of Alexa 488 goat anti-rabbit Abs (1:300, Invitrogen) and Alexa 555 goat anti-rat Abs (1:300, Invitrogen) were finally added (60 min, RT). Nuclei were then counterstained by DRAQ5 (1:1,000, Invitrogen; 15 min, RT). Finally, sections were mounted in Mowiol Medium (Calbiochem EMD Biosciences). To visualize human dystrophin⁺ and spectrin⁺ myofibers, double labeling against human proteins and human lamin A/C were realized by the same protocol using monoclonal mouse anti-human Ab NCL-Dys3 and NCL-Spect1 (1:20; Leica Biosystems; 60 min, 37°C), respectively. The number of hMuStem cells and human protein⁺ myofibers in the injected muscles were determined on the images acquired with the laser confocal scanning microscope LSM780 Zeiss (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany) at x20 magnification and by using Fiji image analysis software v.2. Non-injected mice muscle and human muscle were used as negative and positive controls, respectively ([Figure S7](#)).

Statistical Analysis

Data are reported as mean ± SD. Statistical analysis was performed in GraphPad Prism software v6.0f using the Mann-Whitney test for the MRF expression, FI, and myogenic differentiation of the sorted CD56⁺ and CD56⁻ cell fractions. Kruskal-Wallis test was used for the *in vivo* analysis.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes seven figures and four tables and can be found with this article online at <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.10.013>.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.L., C. Saury, and B.L. performed the experiments, collection and/or assembly of data, data analysis, interpretation, manuscript writing, and final approval of the manuscript; C. Schleder, F.R., and E.N. performed the experiments, data analysis, and interpretation; I.L., L.C., S.V., M.L., C.B., and L.D. performed the experiments; A.H. and A.M. performed provision of study material and the experiments; L.G., B.D., Y.P., G.B.-B., and V.M. performed conception and design; K.R. performed conception and design, provision of study material, collection and/or assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing, and final approval of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by funds from the “Association Française contre les Myopathies” (AFM No. 15990) and the FEDER (Fonds Européens de Développement Régional) (37085 and 38436).

It was carried out in the context of the IHU-Cesti project, which received French government financial support managed by the National Research Agency via investment for the future programme ANR-10-IBHU-005. The IHU-Cesti project is also supported by Nantes Metropole and the Pays de la Loire Region. The recipient of all these grants was K.R. We thank Christian Pinset (I-Stem, Evry, France) and Laurent David (iPSC platform, IRS, Nantes, France) for the supply of iPSCs. We also thank Thibaut Larcher (INRA UMR 703 PANter, Oniris, Nantes, France) for the HE analysis.

REFERENCES

- Emery, A.E.H. (1991). Population frequencies of inherited neuromuscular diseases—a world survey. *Neuromuscul. Disord.* *1*, 19–29.
- Moat, S.J., Bradley, D.M., Salmon, R., Clarke, A., and Hartley, L. (2013). Newborn bloodspot screening for Duchenne muscular dystrophy: 21 years experience in Wales (UK). *Eur. J. Hum. Genet.* *21*, 1049–1053.
- Hoffman, E.P., Brown, R.H., Jr., and Kunkel, L.M. (1987). Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* *51*, 919–928.
- Eagle, M., Bourke, J., Bullock, R., Gibson, M., Mehta, J., Giddings, D., Straub, V., and Bushby, K. (2007). Managing Duchenne muscular dystrophy—the additive effect of spinal surgery and home nocturnal ventilation in improving survival. *Neuromuscul. Disord.* *17*, 470–475.
- Kohler, M., Clarenbach, C.F., Bahler, C., Brack, T., Russi, E.W., and Bloch, K.E. (2009). Disability and survival in Duchenne muscular dystrophy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* *80*, 320–325.
- Berardi, E., Annibaldi, D., Cassano, M., Crippa, S., and Sampaolesi, M. (2014). Molecular and cell-based therapies for muscle degenerations: a road under construction. *Front. Physiol.* *5*, 119.
- Partridge, T.A., Morgan, J.E., Coulton, G.R., Hoffman, E.P., and Kunkel, L.M. (1989). Conversion of mdx myofibers from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts. *Nature* *337*, 176–179.
- Kinoshita, I., Vilquin, J.T., Guérette, B., Asselin, I., Roy, R., and Tremblay, J.P. (1994). Very efficient myoblast allotransplantation in mice under FK506 immunosuppression. *Muscle Nerve* *17*, 1407–1415.
- Huard, J., Tremblay, G., Verreault, S., Labrecque, C., and Tremblay, J.P. (1993). Utilization of an antibody specific for human dystrophin to follow myoblast transplantation in nude mice. *Cell Transplant.* *2*, 113–118.
- Huard, J., Verreault, S., Roy, R., Tremblay, M., and Tremblay, J.P. (1994). High efficiency of muscle regeneration after human myoblast clone transplantation in SCID mice. *J. Clin. Invest.* *93*, 586–599.
- Gussoni, E., Pavlath, G.K., Lanctot, A.M., Sharma, K.R., Miller, R.G., Steinman, L., and Blau, H.M. (1992). Normal dystrophin transcripts detected in Duchenne muscular dystrophy patients after myoblast transplantation. *Nature* *356*, 435–438.
- Mendell, J.R., Kissel, J.T., Amato, A.A., King, W., Signore, L., Prior, T.W., Sahenk, Z., Benson, S., McAndrew, P.E., Rice, R., et al. (1995). Myoblast transfer in the treatment of Duchenne's muscular dystrophy. *N. Engl. J. Med.* *333*, 832–838.
- Skuk, D., Goulet, M., Roy, B., and Tremblay, J.P. (2002). Efficacy of myoblast transplantation in nonhuman primates following simple intramuscular cell injections: toward defining strategies applicable to humans. *Exp. Neurol.* *175*, 112–126.
- Guérette, B., Asselin, I., Vilquin, J.T., Roy, R., and Tremblay, J.P. (1994). Lymphocyte infiltration following allo- and xenomyoblast transplantation in mice. *Transplant. Proc.* *26*, 3461–3462.
- Guérette, B., Asselin, I., Skuk, D., Entman, M., and Tremblay, J.P. (1997). Control of inflammatory damage by anti-LFA-1: increase success of myoblast transplantation. *Cell Transplant.* *6*, 101–107.
- Fan, Y., Maley, M., Beilharz, M., and Grounds, M. (1996). Rapid death of injected myoblasts in myoblast transfer therapy. *Muscle Nerve* *19*, 853–860.
- Skuk, D., Roy, B., Goulet, M., and Tremblay, J.P. (1999). Successful myoblast transplantation in primates depends on appropriate cell delivery and induction of regeneration in the host muscle. *Exp. Neurol.* *155*, 22–30.
- Skuk, D., Roy, B., Goulet, M., Chapdelaine, P., Bouchard, J.P., Roy, R., Dugré, F.J., Lachance, J.G., Deschênes, L., Hélène, S., et al. (2004). Dystrophin expression in myofibers of Duchenne muscular dystrophy patients following intramuscular injections of normal myogenic cells. *Mol. Ther.* *9*, 475–482.
- Skuk, D., Goulet, M., Roy, B., Chapdelaine, P., Bouchard, J.P., Roy, R., Dugré, F.J., Sylvain, M., Lachance, J.G., Deschênes, L., et al. (2006). Dystrophin expression in muscles of Duchenne muscular dystrophy patients after high-density injections of normal myogenic cells. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *65*, 371–386.
- Skuk, D., Goulet, M., Roy, B., Piette, V., Côté, C.H., Chapdelaine, P., Hogrel, J.Y., Paradis, M., Bouchard, J.P., Sylvain, M., et al. (2007). First test of a “high-density injection” protocol for myogenic cell transplantation throughout large volumes of muscles in a Duchenne muscular dystrophy patient: eighteen months follow-up. *Neuromuscul. Disord.* *17*, 38–46.
- Skuk, D., and Tremblay, J.P. (2016). Confirmation of donor-derived dystrophin in a Duchenne muscular dystrophy patient allotransplanted with normal myoblasts. *Muscle Nerve* *54*, 979–981.
- Beauchamp, J.R., Morgan, J.E., Pagel, C.N., and Partridge, T.A. (1999). Dynamics of myoblast transplantation reveal a discrete minority of precursors with stem cell-like properties as the myogenic source. *J. Cell Biol.* *144*, 1113–1122.
- Hawke, T.J., and Garry, D.J. (2001). Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J. Appl. Physiol.* *91*, 534–551.
- Zammit, P.S., Golding, J.P., Nagata, Y., Hudon, V., Partridge, T.A., and Beauchamp, J.R. (2004). Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? *J. Cell Biol.* *166*, 347–357.
- Zammit, P.S., Relaix, F., Nagata, Y., Ruiz, A.P., Collins, C.A., Partridge, T.A., and Beauchamp, J.R. (2006). Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells. *J. Cell Sci.* *119*, 1824–1832.
- Skuk, D., Goulet, M., and Tremblay, J.P. (2011). Transplanted myoblasts can migrate several millimeters to fuse with damaged myofibers in nonhuman primate skeletal muscle. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *70*, 770–778.
- Skuk, D., and Tremblay, J.P. (2014). First study of intra-arterial delivery of myogenic mononuclear cells to skeletal muscles in primates. *Cell Transplant.* *23* (Suppl 1), S141–S150.
- Negrone, E., Gidaro, T., Bigot, A., Butler-Browne, G.S., Mouly, V., and Trollet, C. (2015). Invited review: stem cells and muscle diseases: advances in cell therapy strategies. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* *41*, 270–287.
- Skuk, D., and Tremblay, J.P. (2017). Cell therapy in myology: dynamics of muscle precursor cell death after intramuscular administration in non-human primates. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* *5*, 232–240.
- Torrente, Y., Belicchi, M., Sampaolesi, M., Pisati, F., Meregalli, M., D'Antona, G., Tonlorenzi, R., Porretti, L., Gavina, M., Mamchaoui, K., et al. (2004). Human circulating AC133(+) stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle. *J. Clin. Invest.* *114*, 182–195.
- Gavina, M., Belicchi, M., Rossi, B., Ottoboni, L., Colombo, F., Meregalli, M., Battistelli, M., Forzenigo, L., Biondetti, P., Pisati, F., et al. (2006). VCAM-1 expression on dystrophic muscle vessels has a critical role in the recruitment of human blood-derived CD133+ stem cells after intra-arterial transplantation. *Blood* *108*, 2857–2866.
- Benchaouir, R., Meregalli, M., Farini, A., D'Antona, G., Belicchi, M., Goyenvalle, A., Battistelli, M., Bresolin, N., Bottinelli, R., Garcia, L., et al. (2007). Restoration of human dystrophin following transplantation of exon-skipping-engineered DMD patient stem cells into dystrophic mice. *Cell Stem Cell* *1*, 646–657.
- Torrente, Y., Belicchi, M., Marchesi, C., D'Antona, G., Cogiamanian, F., Pisati, F., Gavina, M., Giordano, R., Tonlorenzi, R., Fagioli, G., et al. (2007). Autologous transplantation of muscle-derived CD133+ stem cells in Duchenne muscle patients. *Cell Transplant.* *16*, 563–577.
- Marchesi, C., Belicchi, M., Meregalli, M., Farini, A., Cattaneo, A., Parolini, D., Gavina, M., Porretti, L., D'Angelo, M.G., Bresolin, N., et al. (2008). Correlation of circulating CD133+ progenitor subclasses with a mild phenotype in Duchenne muscular dystrophy patients. *PLoS One* *3*, e2218.
- Negrone, E., Riederer, I., Chaouch, S., Belicchi, M., Razini, P., Di Santo, J., Torrente, Y., Butler-Browne, G.S., and Mouly, V. (2009). In vivo myogenic potential of human CD133+ muscle-derived stem cells: a quantitative study. *Mol. Ther.* *17*, 1771–1778.

36. Belicchi, M., Erratico, S., Razini, P., Meregalli, M., Cattaneo, A., Jacchetti, E., Farini, A., Villa, C., Bresolin, N., Porretti, L., et al. (2010). Ex vivo expansion of human circulating myogenic progenitors on cluster-assembled nanostructured TiO₂. *Biomaterials* 31, 5385–5396.
37. Meng, J., Chun, S., Asfahani, R., Lochmüller, H., Muntoni, F., and Morgan, J. (2014). Human skeletal muscle-derived CD133(+) cells form functional satellite cells after intramuscular transplantation in immunodeficient host mice. *Mol. Ther.* 22, 1008–1017.
38. Meng, J., Bencze, M., Asfahani, R., Muntoni, F., and Morgan, J.E. (2015). The effect of the muscle environment on the regenerative capacity of human skeletal muscle stem cells. *Skelet. Muscle* 5, 11.
39. Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G., and Mavilio, F. (1998). Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279, 1528–1530.
40. Gussoni, E., Soneoka, Y., Strickland, C.D., Buzney, E.A., Khan, M.K., Flint, A.F., Kunkel, L.M., and Mulligan, R.C. (1999). Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401, 390–394.
41. Ferrari, G., Stornaiuolo, A., and Mavilio, F. (2001). Failure to correct murine muscular dystrophy. *Nature* 411, 1014–1015.
42. Gussoni, E., Bennett, R.R., Muskiewicz, K.R., Meyerrose, T., Nolte, J.A., Gilgoff, I., Stein, J., Chan, Y.M., Lidov, H.G., Bönnemann, C.G., et al. (2002). Long-term persistence of donor nuclei in a Duchenne muscular dystrophy patient receiving bone marrow transplantation. *J. Clin. Invest.* 110, 807–814.
43. LaBarge, M.A., and Blau, H.M. (2002). Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell* 111, 589–601.
44. Dell’Agnola, C., Wang, Z., Storb, R., Tapscott, S.J., Kuhr, C.S., Hauschka, S.D., Lee, R.S., Sale, G.E., Zellmer, E., Gisburne, S., et al. (2004). Hematopoietic stem cell transplantation does not restore dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy dogs. *Blood* 104, 4311–4318.
45. Lapidos, K.A., Chen, Y.E., Earley, J.U., Heydemann, A., Huber, J.M., Chien, M., Ma, A., and McNally, E.M. (2004). Transplanted hematopoietic stem cells demonstrate impaired sarcoglycan expression after engraftment into cardiac and skeletal muscle. *J. Clin. Invest.* 114, 1577–1585.
46. Kuhr, C.S., Lupu, M., and Storb, R. (2007). Hematopoietic cell transplantation directly into dystrophic muscle fails to reconstitute satellite cells and myofibers. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 13, 886–888.
47. Kang, P.B., Lidov, H.G., White, A.J., Mitchell, M., Balasubramanian, A., Estrella, E., Bennett, R.R., Darras, B.T., Shapiro, F.D., Bambach, B.J., et al. (2010). Inefficient dystrophin expression after cord blood transplantation in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 41, 746–750.
48. Asakura, A., Seale, P., Girgis-Gabardo, A., and Rudnicki, M.A. (2002). Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 159, 123–134.
49. Bachrach, E., Li, S., Perez, A.L., Schienda, J., Liadaki, K., Volinski, J., Flint, A., Chamberlain, J., and Kunkel, L.M. (2004). Systemic delivery of human microdystrophin to regenerating mouse dystrophic muscle by muscle progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 3581–3586.
50. Bachrach, E., Perez, A.L., Choi, Y.H., Illigens, B.M., Jun, S.J., del Nido, P., McGowan, F.X., Li, S., Flint, A., Chamberlain, J., et al. (2006). Muscle engraftment of myogenic progenitor cells following intraarterial transplantation. *Muscle Nerve* 34, 44–52.
51. Frank, N.Y., Kho, A.T., Schatton, T., Murphy, G.F., Molloy, M.J., Zhan, Q., Ramoni, M.F., Frank, M.H., Kohane, I.S., and Gussoni, E. (2006). Regulation of myogenic progenitor proliferation in human fetal skeletal muscle by BMP4 and its antagonist Gremlin. *J. Cell Biol.* 175, 99–110.
52. Uezumi, A., Ojima, K., Fukada, S., Ikemoto, M., Masuda, S., Miyagoe-Suzuki, Y., and Takeda, S. (2006). Functional heterogeneity of side population cells in skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 341, 864–873.
53. Motohashi, N., Uezumi, A., Yada, E., Fukada, S., Fukushima, K., Imaizumi, K., Miyagoe-Suzuki, Y., and Takeda, S. (2008). Muscle CD31(-) CD45(-) side population cells promote muscle regeneration by stimulating proliferation and migration of myoblasts. *Am. J. Pathol.* 173, 781–791.
54. Cossu, G., and Bianco, P. (2003). Mesoangioblasts—vascular progenitors for extra-vascular mesodermal tissues. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13, 537–542.
55. Sampaolesi, M., Torrente, Y., Innocenzi, A., Tonlorenzi, R., D’Antona, G., Pellegrino, M.A., Barresi, R., Bresolin, N., De Angelis, M.G., Campbell, K.P., et al. (2003). Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. *Science* 301, 487–492.
56. Sampaolesi, M., Blot, S., D’Antona, G., Granger, N., Tonlorenzi, R., Innocenzi, A., Mogno, P., Thibaud, J.L., Galvez, B.G., Barthélémy, I., et al. (2006). Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature* 444, 574–579.
57. Dellavalle, A., Sampaolesi, M., Tonlorenzi, R., Tagliafico, E., Sacchetti, B., Perani, L., Innocenzi, A., Galvez, B.G., Messina, G., Morosetti, R., et al. (2007). Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat. Cell Biol.* 9, 255–267.
58. Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C.W., Corselli, M., Park, T.S., Andriolo, G., Sun, B., Zheng, B., Zhang, L., et al. (2008). A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 3, 301–313.
59. Tedesco, F.S., Hoshiya, H., D’Antona, G., Gerli, M.F., Messina, G., Antonini, S., Tonlorenzi, R., Benedetti, S., Berghella, L., Torrente, Y., et al. (2011). Stem cell-mediated transfer of a human artificial chromosome ameliorates muscular dystrophy. *Sci. Transl. Med.* 3, 96ra78.
60. Meng, J., Adkin, C.F., Xu, S.W., Muntoni, F., and Morgan, J.E. (2011). Contribution of human muscle-derived cells to skeletal muscle regeneration in dystrophic host mice. *PLoS One* 6, e17454.
61. Dellavalle, A., Maroli, G., Covarello, D., Azzoni, E., Innocenzi, A., Perani, L., Antonini, S., Sambasivan, R., Brunelli, S., Tajbakhsh, S., et al. (2011). Pericytes resident in postnatal skeletal muscle differentiate into muscle fibres and generate satellite cells. *Nat. Commun.* 2, 499.
62. Corselli, M., Crisan, M., Murray, I.R., West, C.C., Scholes, J., Codrea, F., Khan, N., and Péault, B. (2013). Identification of perivascular mesenchymal stromal/stem cells by flow cytometry. *Cytometry A* 83, 714–720.
63. Cossu, G., Previtali, S.C., Napolitano, S., Cicalese, M.P., Tedesco, F.S., Nicastro, F., Noviello, M., Roostalu, U., Natali Sora, M.G., Scarlato, M., et al. (2015). Intra-arterial transplantation of HLA-matched donor mesoangioblasts in Duchenne muscular dystrophy. *EMBO Mol. Med.* 7, 1513–1528.
64. Qu, Z., Balkir, L., van Deutekom, J.C., Robbins, P.D., Pruchnic, R., and Huard, J. (1998). Development of approaches to improve cell survival in myoblast transfer therapy. *J. Cell Biol.* 142, 1257–1267.
65. Jankowski, R.J., Haluszczak, C., Trucco, M., and Huard, J. (2001). Flow cytometric characterization of myogenic cell populations obtained via the preplate technique: potential for rapid isolation of muscle-derived stem cells. *Hum. Gene Ther.* 12, 619–628.
66. Torrente, Y., Tremblay, J.P., Pisati, F., Belicchi, M., Rossi, B., Sironi, M., Fortunato, F., El Fahime, M., D’Angelo, M.G., Caron, N.J., et al. (2001). Intraarterial injection of muscle-derived CD34(+)Sca-1(+) stem cells restores dystrophin in mdx mice. *J. Cell Biol.* 152, 335–348.
67. Qu-Petersen, Z., Deasy, B., Jankowski, R., Ikezawa, M., Cummins, J., Pruchnic, R., Mytinger, J., Cao, B., Gates, C., Wernig, A., et al. (2002). Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *J. Cell Biol.* 157, 851–864.
68. Deasy, B.M., Gharaibeh, B.M., Pollett, J.B., Jones, M.M., Lucas, M.A., Kanda, Y., and Huard, J. (2005). Long-term self-renewal of postnatal muscle-derived stem cells. *Mol. Biol. Cell* 16, 3323–3333.
69. Urish, K.L., Vella, J.B., Okada, M., Deasy, B.M., Tobita, K., Keller, B.B., Cao, B., Piganelli, J.D., and Huard, J. (2009). Antioxidant levels represent a major determinant in the regenerative capacity of muscle stem cells. *Mol. Biol. Cell* 20, 509–520.
70. Chirieleison, S.M., Feduska, J.M., Schugar, R.C., Askew, Y., and Deasy, B.M. (2012). Human muscle-derived cell populations isolated by differential adhesion rates: phenotype and contribution to skeletal muscle regeneration in Mdx/SCID mice. *Tissue Eng. Part A* 18, 232–241.
71. Li, H., Usas, A., Poddar, M., Chen, C.W., Thompson, S., Ahani, B., Cummins, J., Lavasani, M., and Huard, J. (2013). Platelet-rich plasma promotes the proliferation

- of human muscle derived progenitor cells and maintains their stemness. *PLoS One* 8, e64923.
72. Simmons, P.J., and Torok-Storb, B. (1991). Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 78, 55–62.
 73. Yoon, Y.S., Wecker, A., Heyd, L., Park, J.S., Tkebuchava, T., Kusano, K., Hanley, A., Scadova, H., Qin, G., Cha, D.H., et al. (2005). Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. *J. Clin. Invest.* 115, 326–338.
 74. Gonçalves, M.A., de Vries, A.A., Holkers, M., van de Watering, M.J., van der Velde, L., van Nierop, G.P., Valerio, D., and Knaäin-Shanzer, S. (2006). Human mesenchymal stem cells ectopically expressing full-length dystrophin can complement Duchenne muscular dystrophy myotubes by cell fusion. *Hum. Mol. Genet.* 15, 213–221.
 75. Rider, D.A., Nalathamby, T., Nurcombe, V., and Cool, S.M. (2007). Selection using the alpha-1 integrin (CD49a) enhances the multipotentiality of the mesenchymal stem cell population from heterogeneous bone marrow stromal cells. *J. Mol. Histol.* 38, 449–458.
 76. Gang, E.J., Bosnakovski, D., Figueiredo, C.A., Visser, J.W., and Perlingeiro, R.C. (2007). SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood* 109, 1743–1751.
 77. da Silva Meirelles, L., Caplan, A.I., and Nardi, N.B. (2008). In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 26, 2287–2299.
 78. Nitahara-Kasahara, Y., Hayashita-Kinoh, H., Ohshima-Hosoyama, S., Okada, H., Wada-Maeda, M., Nakamura, A., Okada, T., and Takeda, S. (2012). Long-term engraftment of multipotent mesenchymal stromal cells that differentiate to form myogenic cells in dogs with Duchenne muscular dystrophy. *Mol. Ther.* 20, 168–177.
 79. Zucconi, E., Vieira, N.M., Bueno, C.R., Jr., Secco, M., Jazedje, T., Costa Valadares, M., Fussae Suzuki, M., Bartolini, P., Vainzof, M., et al. (2011). Preclinical studies with umbilical cord mesenchymal stromal cells in different animal models for muscular dystrophy. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, 715251.
 80. Shang, Y.C., Wang, S.H., Xiong, F., Peng, F.N., Liu, Z.S., Geng, J., and Zhang, C. (2016). Activation of Wnt3a signaling promotes myogenic differentiation of mesenchymal stem cells in mdx mice. *Acta Pharmacol. Sin.* 37, 873–881.
 81. Rodriguez, A.M., Pisani, D., Dechesne, C.A., Turc-Carel, C., Kurzenne, J.Y., Wdziekonski, B., Villageois, A., Bagnis, C., Breittmayer, J.P., Groux, H., et al. (2005). Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J. Exp. Med.* 201, 1397–1405.
 82. Liu, Y., Yan, X., Sun, Z., Chen, B., Han, Q., Li, J., and Zhao, R.C. (2007). Flk-1+ adipose-derived mesenchymal stem cells differentiate into skeletal muscle satellite cells and ameliorate muscular dystrophy in mdx mice. *Stem Cells Dev.* 16, 695–706.
 83. Zannettino, A.C., Paton, S., Arthur, A., Khor, F., Itescu, S., Gimble, J.M., and Gronthos, S. (2008). Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype in vitro and in vivo. *J. Cell. Physiol.* 214, 413–421.
 84. Vieira, N.M., Bueno, C.R., Jr., Brandalise, V., Moraes, L.V., Zucconi, E., Secco, M., Suzuki, M.F., Camargo, M.M., Bartolini, P., Brum, P.C., et al. (2008). SJL dystrophic mice express a significant amount of human muscle proteins following systemic delivery of human adipose-derived stromal cells without immunosuppression. *Stem Cells* 26, 2391–2398.
 85. Goudenege, S., Pisani, D.F., Wdziekonski, B., Di Santo, J.P., Bagnis, C., Dani, C., and Dechesne, C.A. (2009). Enhancement of myogenic and muscle repair capacities of human adipose-derived stem cells with forced expression of MyoD. *Mol. Ther.* 17, 1064–1072.
 86. Vieira, N.M., Valadares, M., Zucconi, E., Secco, M., Bueno, C.R., Jr., Brandalise, V., Assoni, A., Gomes, J., Landini, V., Andrade, T., et al. (2012). Human adipose-derived mesenchymal stromal cells injected systemically into GRMD dogs without immunosuppression are able to reach the host muscle and express human dystrophin. *Cell Transplant.* 21, 1407–1417.
 87. Pelatti, M.V., Gomes, J.P., Vieira, N.M., Cangussu, E., Landini, V., Andrade, T., Sartori, M., Petrus, L., and Zatz, M. (2016). Transplantation of human adipose mesenchymal stem cells in non-immunosuppressed GRMD dogs is a safe procedure. *Stem Cell Rev.* 12, 448–453.
 88. Tamaki, T., Akatsuka, A., Ando, K., Nakamura, Y., Matsuzawa, H., Hotta, T., Roy, R.R., and Edgerton, V.R. (2002). Identification of myogenic-endothelial progenitor cells in the interstitial spaces of skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 157, 571–577.
 89. Tamaki, T., Akatsuka, A., Okada, Y., Matsuzaki, Y., Okano, H., and Kimura, M. (2003). Growth and differentiation potential of main- and side-population cells derived from murine skeletal muscle. *Exp. Cell Res.* 291, 83–90.
 90. Tamaki, T., Okada, Y., Uchiyama, Y., Tono, K., Masuda, M., Wada, M., Hoshi, A., and Akatsuka, A. (2007). Synchronized reconstitution of muscle fibers, peripheral nerves and blood vessels by murine skeletal muscle-derived CD34(-)/45 (-) cells. *Histochem. Cell Biol.* 128, 349–360.
 91. Zheng, B., Cao, B., Crisan, M., Sun, B., Li, G., Logar, A., Yap, S., Pollett, J.B., Drowley, L., Cassino, T., et al. (2007). Prospective identification of myogenic endothelial cells in human skeletal muscle. *Nat. Biotechnol.* 25, 1025–1034.
 92. Chen, C.W., Corselli, M., Péault, B., and Huard, J. (2012). Human blood-vessel-derived stem cells for tissue repair and regeneration. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012, 597439.
 93. Chen, W.C., Park, T.S., Murray, I.R., Zimmerlin, L., Lazzari, L., Huard, J., and Péault, B. (2013). Cellular kinetics of perivascular MSC precursors. *Stem Cells Int.* 2013, 983059.
 94. Vauchez, K., Marolleau, J.P., Schmid, M., Khattar, P., Chapel, A., Cotelain, C., Lecourt, S., Larghéro, J., Fiszman, M., and Vilquin, J.T. (2009). Aldehyde dehydrogenase activity identifies a population of human skeletal muscle cells with high myogenic capacities. *Mol. Ther.* 17, 1948–1958.
 95. Rouger, K., Fornasari, B., Armengol, V., Jouvion, G., Leroux, I., Dubreil, L., Féron, M., Guevel, L., and Cherel, Y. (2007). Progenitor cell isolation from muscle-derived cells based on adhesion properties. *J. Histochem. Cytochem.* 55, 607–618.
 96. Rouger, K., Larcher, T., Dubreil, L., Deschamps, J.Y., Le Guiner, C., Jouvion, G., Delorme, B., Lieubeau, B., Carlus, M., Fornasari, B., et al. (2011). Systemic delivery of allogenic muscle stem cells induces long-term muscle repair and clinical efficacy in duchenne muscular dystrophy dogs. *Am. J. Pathol.* 179, 2501–2518.
 97. Robriquet, F., Lardenois, A., Babarit, C., Larcher, T., Dubreil, L., Leroux, I., Zuber, C., Ledevin, M., Deschamps, J.Y., Fromes, Y., et al. (2015). Differential gene expression profiling of dystrophic dog muscle after MuStem cell transplantation. *PLoS One* 10, e0123336.
 98. Robriquet, F., Babarit, C., Larcher, T., Dubreil, L., Ledevin, M., Goubin, H., Rouger, K., and Guével, L. (2016). Identification in GRMD dog muscle of critical miRNAs involved in pathophysiology and effects associated with MuStem cell transplantation. *BMC Musculoskelet. Disord.* 17, 209.
 99. Lardenois, A., Jagot, S., Lagarrigue, M., Guével, B., Ledevin, M., Larcher, T., Dubreil, L., Pineau, C., Rouger, K., and Guével, L. (2016). Quantitative proteome profiling of dystrophic dog skeletal muscle reveals a stabilized muscular architecture and protection against oxidative stress after systemic delivery of MuStem cells. *Proteomics* 16, 2028–2042.
 100. Mitchell, K.J., Pannérec, A., Cadot, B., Parlakian, A., Besson, V., Gomes, E.R., Marazzi, G., and Sassoon, D.A. (2010). Identification and characterization of a non-satellite cell muscle resident progenitor during postnatal development. *Nat. Cell Biol.* 12, 257–266.
 101. Charville, G.W., Cheung, T.H., Yoo, B., Santos, P.J., Lee, G.K., Shrager, J.B., and Rando, T.A. (2015). Ex vivo expansion and in vivo self-renewal of human muscle stem cells. *Stem Cell Reports* 5, 621–632.
 102. Xu, X., Wilschut, K.J., Kouklis, G., Tian, H., Hesse, R., Garland, C., Sbitany, H., Hansen, S., Seth, R., Knott, P.D., et al. (2015). Human satellite cell transplantation and regeneration from diverse skeletal muscles. *Stem Cell Reports* 5, 419–434.
 103. Uezumi, A., Nakatani, M., Ikemoto-Uezumi, M., Yamamoto, N., Morita, M., Yamaguchi, A., Yamada, H., Kasai, T., Masuda, S., Narita, A., et al. (2016). Cell-surface protein profiling identifies distinctive markers of progenitor cells in human skeletal muscle. *Stem Cell Reports* 7, 263–278.
 104. Alexander, M.S., Rozkalne, A., Colletta, A., Spinazzola, J.M., Johnson, S., Rahimov, F., Meng, H., Lawlor, M.W., Estrella, E., Kunkel, L.M., et al. (2016). CD82 is a marker for prospective isolation of human muscle satellite cells and is linked to muscular dystrophies. *Cell Stem Cell* 19, 800–807.

105. Wei, Y., Li, Y., Chen, C., Stoelzel, K., Kaufmann, A.M., and Albers, A.E. (2011). Human skeletal muscle-derived stem cells retain stem cell properties after expansion in myosphere culture. *Exp. Cell Res.* *317*, 1016–1027.
106. Deasy, B.M., Lu, A., Tebbets, J.C., Feduska, J.M., Schugar, R.C., Pollett, J.B., Sun, B., Urish, K.L., Gharaibeh, B.M., Cao, B., et al. (2007). A role for cell sex in stem cell-mediated skeletal muscle regeneration: female cells have higher muscle regeneration efficiency. *J. Cell Biol.* *177*, 73–86.
107. Beane, O.S., Fonseca, V.C., Cooper, L.L., Koren, G., and Darling, E.M. (2014). Impact of aging on the regenerative properties of bone marrow-, muscle-, and adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells. *PLoS One* *9*, e115963.
108. Shu, W., Shu, Y.T., Dai, C.Y., and Zhen, Q.Z. (2012). Comparing the biological characteristics of adipose tissue-derived stem cells of different persons. *J. Cell. Biochem.* *113*, 2020–2026.
109. Park, T.S., Gavina, M., Chen, C.W., Sun, B., Teng, P.N., Huard, J., Deasy, B.M., Zimmerlin, L., and Péault, B. (2011). Placental perivascular cells for human muscle regeneration. *Stem Cells Dev.* *20*, 451–463.
110. Péault, B., Rudnicki, M., Torrente, Y., Cossu, G., Tremblay, J.P., Partridge, T., Gussoni, E., Kunkel, L.M., and Huard, J. (2007). Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy. *Mol. Ther.* *15*, 867–877.
111. Reimann, J., Brimah, K., Schröder, R., Wernig, A., Beauchamp, J.R., and Partridge, T.A. (2004). Pax7 distribution in human skeletal muscle biopsies and myogenic tissue cultures. *Cell Tissue Res.* *315*, 233–242.
112. Pisani, D.F., Clement, N., Loubat, A., Plaisant, M., Sacconi, S., Kurzenne, J.Y., Desnuelle, C., Dani, C., and Dechesne, C.A. (2010). Hierarchization of myogenic and adipogenic progenitors within human skeletal muscle. *Stem Cells* *28*, 2182–2194.
113. Valentine, B.A., Cooper, B.J., Cummings, J.F., and de Lahunta, A. (1990). Canine X-linked muscular dystrophy: morphologic lesions. *J. Neurol. Sci.* *97*, 1–23.
114. Collins, C.A., and Morgan, J.E. (2003). Duchenne’s muscular dystrophy: animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. *Int. J. Exp. Pathol.* *84*, 165–172.
115. Blau, H.M., Webster, C., Pavlath, G.K., and Chiu, C.P. (1985). Evidence for defective myoblasts in Duchenne muscular dystrophy. *Adv. Exp. Med. Biol.* *182*, 85–110.
116. Decary, S., Hamida, C.B., Mouly, V., Barbet, J.P., Hentati, F., and Butler-Browne, G.S. (2000). Shorter telomeres in dystrophic muscle consistent with extensive regeneration in young children. *Neuromuscul. Disord.* *10*, 113–120.
117. Mouly, V., Aamiri, A., Bigot, A., Cooper, R.N., Di Donna, S., Furling, D., Gidaro, T., Jacquemin, V., Mamchaoui, K., Negroni, E., et al. (2005). The mitotic clock in skeletal muscle regeneration, disease and cell mediated gene therapy. *Acta Physiol. Scand.* *184*, 3–15.
118. Sacco, A., Mourkioti, F., Tran, R., Choi, J., Llewellyn, M., Kraft, P., Shkreli, M., Delp, S., Pomerantz, J.H., Artandi, S.E., et al. (2010). Short telomeres and stem cell exhaustion model Duchenne muscular dystrophy in mdx/mTR mice. *Cell* *143*, 1059–1071.
119. Villalta, S.A., Nguyen, H.X., Deng, B., Gotoh, T., and Tidball, J.G. (2009). Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* *18*, 482–496.
120. Villalta, S.A., Rinaldi, C., Deng, B., Liu, G., Fedor, B., and Tidball, J.G. (2011). Interleukin-10 reduces the pathology of mdx muscular dystrophy by deactivating M1 macrophages and modulating macrophage phenotype. *Hum. Mol. Genet.* *20*, 790–805.
121. La Rovere, R.M., Quattrocchi, M., Pietrangelo, T., Di Filippo, E.S., Maccatrozzo, L., Cassano, M., Mascarello, F., Barthélémy, I., Blot, S., Sampaoli, M., et al. (2014). Myogenic potential of canine craniofacial satellite cells. *Front. Aging Neurosci.* *6*, 90.
122. Pannérec, A., Formicola, L., Besson, V., Marazzi, G., and Sassoon, D.A. (2013). Defining skeletal muscle resident progenitors and their cell fate potentials. *Development* *140*, 2879–2891.
123. Kuwajima, S., Sato, T., Ishida, K., Tada, H., Tezuka, H., and Ohteki, T. (2006). Interleukin 15-dependent crosstalk between conventional and plasmacytoid dendritic cells is essential for CpG-induced immune activation. *Nat. Immunol.* *7*, 740–746.
124. Vosshenrich, C.A., Ranson, T., Samson, S.I., Corcuff, E., Colucci, F., Rosmaraki, E.E., and Di Santo, J.P. (2005). Roles for common cytokine receptor gamma-chain-dependent cytokines in the generation, differentiation, and maturation of NK cell precursors and peripheral NK cells in vivo. *J. Immunol.* *174*, 1213–1221.
125. Blasco, M.A., Lee, H.W., Hande, M.P., Samper, E., Lansdorf, P.M., DePinho, R.A., and Greider, C.W. (1997). Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* *91*, 25–34.
126. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* *9*, 676–682.
127. Delorme, B., and Charbord, P. (2007). Culture and characterization of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Methods Mol. Med.* *140*, 67–81.
128. Riederer, I., Negroni, E., Bigot, A., Bencze, M., Di Santo, J., Aamiri, A., Butler-Browne, G., and Mouly, V. (2008). Heat shock treatment increases engraftment of transplanted human myoblasts into immunodeficient mice. *Transplant. Proc.* *40*, 624–630.

Supplemental Information

Skeletal Muscle Regenerative Potential of Human

MuStem Cells following Transplantation

into Injured Mice Muscle

Judith Lorant, Charlotte Saury, Cindy Schleder, Florence Robriquet, Blandine Lieubeau, Elisa Négroni, Isabelle Leroux, Lucie Chabrand, Sabrina Viau, Candice Babarit, Mireille Ledevin, Laurence Dubreil, Antoine Hamel, Armelle Magot, Chantal Thorin, Laëtítia Guevel, Bruno Delorme, Yann Péréon, Gillian Butler-Browne, Vincent Mouly, and Karl Rouger

SUPPLEMENTAL DATA ITEMS

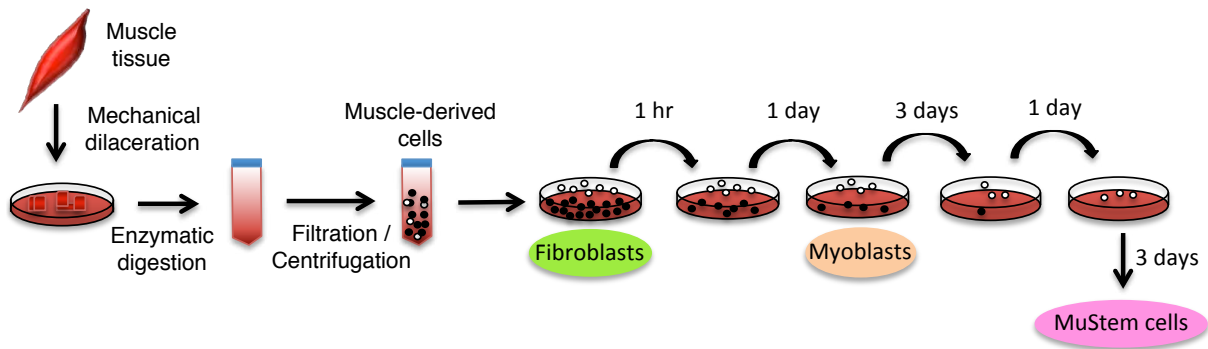


Figure S1. Isolation protocol for the hMuStem cells

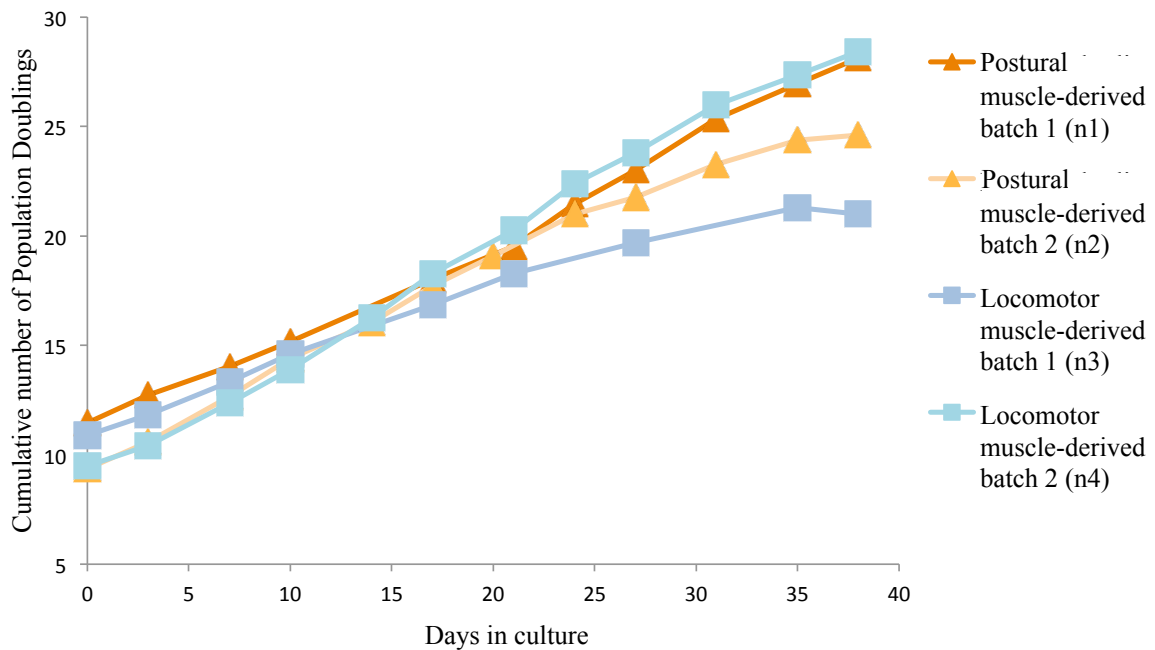


Figure S2. Proliferation analysis of long-term cultured hMuStem cells

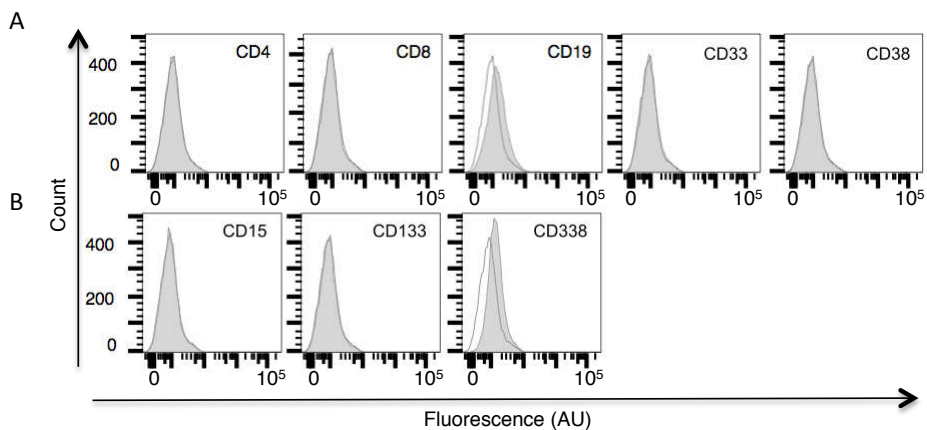


Figure S3. Expression of lin and cell type-specific markers in cultured hMuStem cells
Flow cytometry analyses showed a lack of expression for lin (A) and cell type-specific (B) markers.

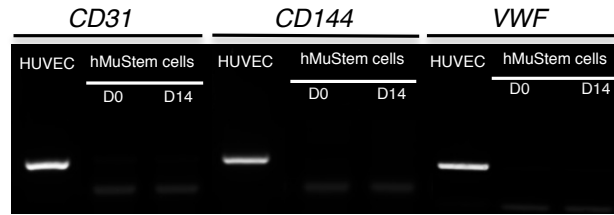


Figure S4. Expression of endothelial markers in hMuStem cells placed in endothelial induction media
RT-PCR analysis revealed the lack of *CD31*, *CD144* and von Willebrand Factor (*VWF*) transcript on hMuStem cells fourteen days after the induction of endothelial differentiation. HUVECs were used as positive control.

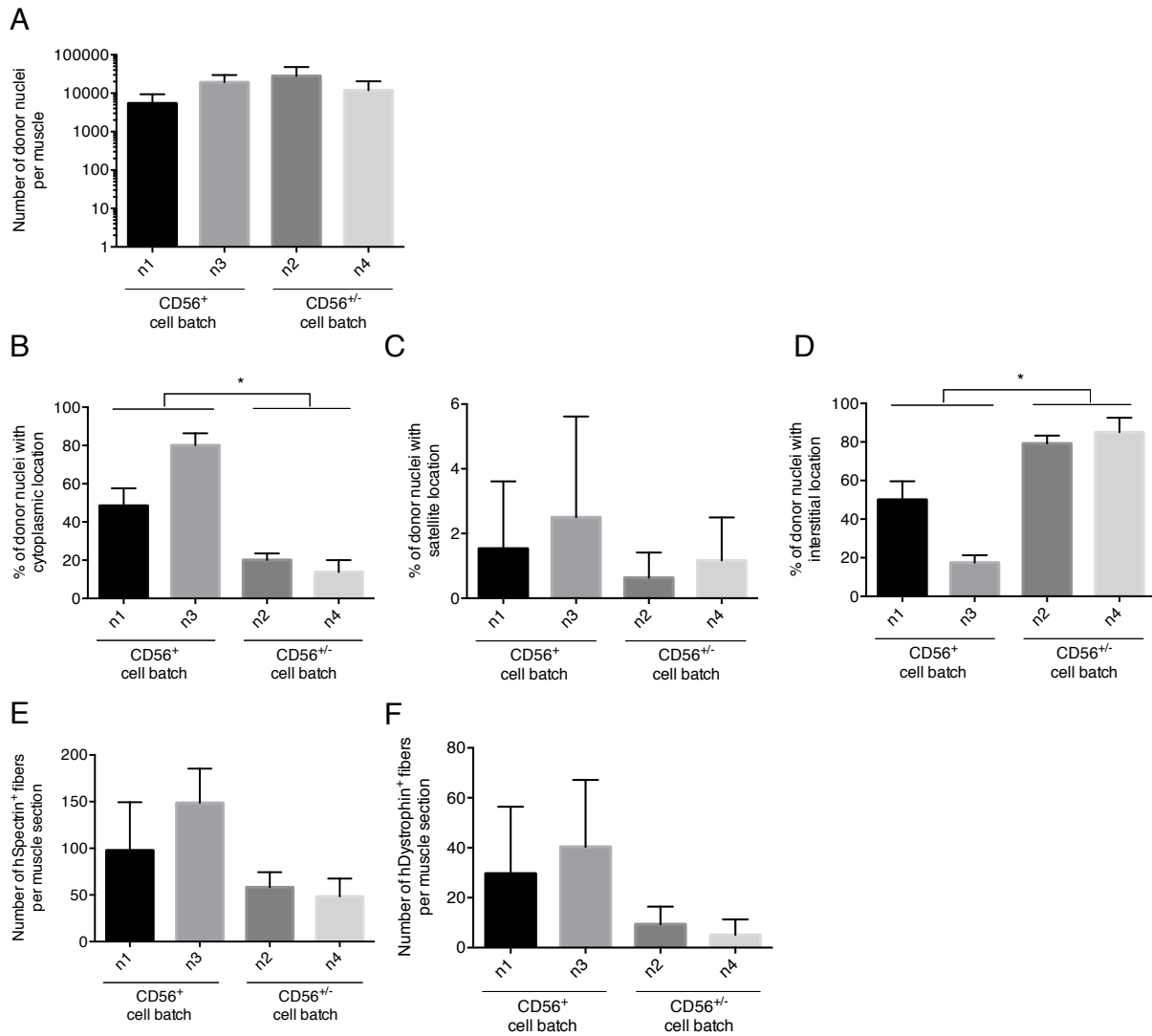


Figure S5. Tissue integration and contribution to muscle regenerative process of hMuStem cells following injection into injured muscle of Rag2⁻ IL2rb⁻ mouse

Human lamin A/C⁺ nuclei were counted per transverse section and total number of donor cells in the muscles was determined based on a linear density by considering the size of the hMuStem cell nuclei and the thickness of the section, as previously described [35]. The cytoplasmic, satellite and interstitial distribution is expressed as percentage while human spectrin⁺ and dystrophin⁺ myofibers are expressed as the number of counted positive myofibers per muscle section. Error bars represent SD from 3 different mice injected with the same cell batch. The p-value was determined with a Kruskal-Wallis test. * indicates a significant result.

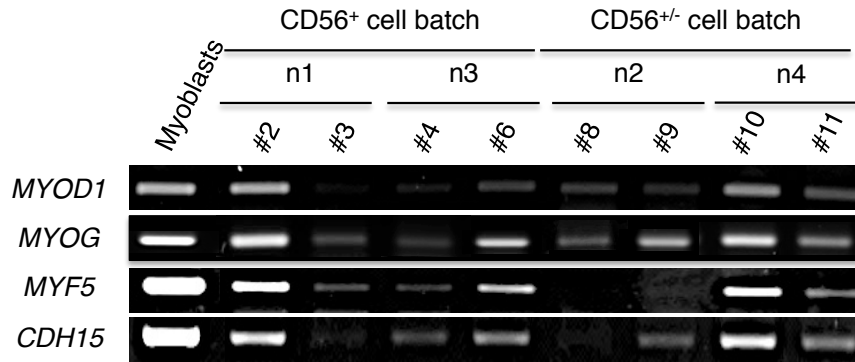


Figure S6. Detection of human myogenic markers in Rag2⁻ IL2rb⁻ mouse muscles following hMuStem cell injection

RT-PCR analysis revealed the presence of the *MYOD1*, *MYOG*, *MYF5* and *CDH15* mRNAs in the *Tibialis anterior* (TA) muscle of the immunodeficient mice three weeks after intramuscular injection of hMuStem cells. Cultured myoblasts were used as positive control.

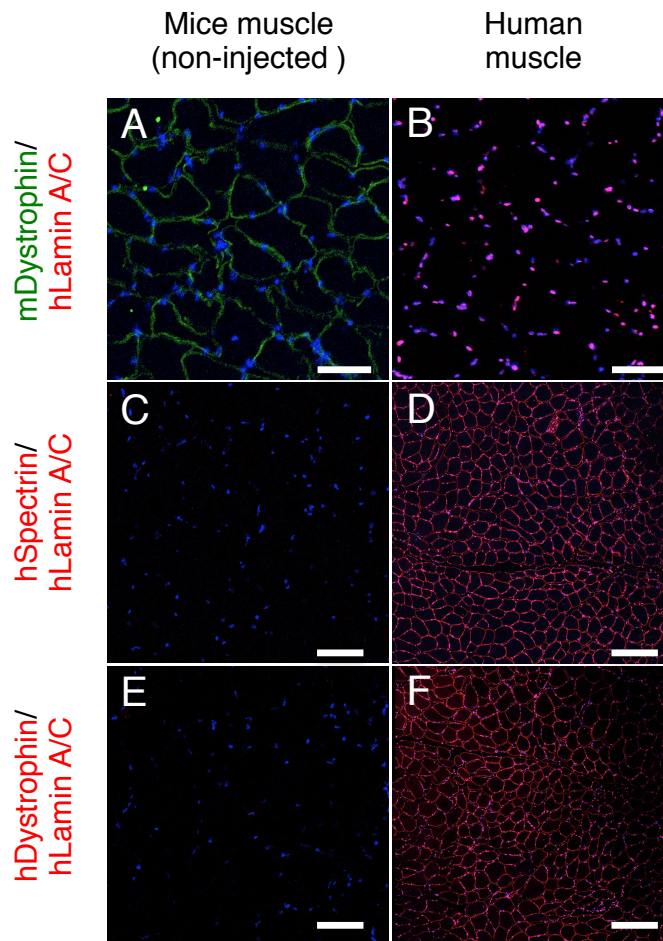


Figure S7. Negative and positive controls of immunolabellings used for the *in vivo* investigation

Cryolesion of *Tibialis anterior* (TA) muscle of Rag2⁻IL2rb⁻ mice was made without any injection of hMuStem cells. Three weeks later, transverse cryosections of both non-injected mice muscle and human muscle were co-labelled with specific Ab against murine dystrophin (green; A-B), human lamin A/C (red; A-B), human spectrin (red; C-D) and human dystrophin (red; E-F). All nuclei were counterstained using DAPI (dark blue; A-F). Scale bar: 100 μm (A-B) and 150 μm (C-F)

Table S1. Main features of adult stem cells exhibiting potential to treat DMD

Cell type	Source	Anatomic localization	Molecular markers of human cells	Advantages	Limitations	Main references
Myoblasts	Skeletal muscle	Progeny of SCs; located between the plasma membrane and the basal lamina	CD56 ⁺ , M-cadherin ⁺ , C-met ⁺ , MyoD ⁺ , Myf5 ⁺ , desmin ⁺ , Syndecan 3 ⁺ , Syndecan 4 ⁺	High proliferation, Spontaneous myogenic differentiation, Participation to muscle regeneration, Formation of SC, Migration up to 1 cm in depth of the muscle, Long-term donor-derived dystrophin expression after intramuscular implantation of normal myoblasts in clinical trial	No muscle homing through bloodstream	[7, 10, 11, 18-29]
AC133 ⁺ cells	Peripheral blood	Unknown	CD19 ⁻ , CD33 ⁻ , CD34 ⁺ , CD38 ⁻ , CD44 ⁺ , CD45 ⁺ , CD90 ⁺ , CD133 ⁺ , CXCR4 ^{+/-}	Participation to muscle regeneration, Formation of SC, Muscle homing through bloodstream, Clinical benefit in animal model	Low proliferation, No spontaneous myogenic differentiation (induced by co-culture with C2C12 cells)	[30-34]
	Skeletal muscle	Interstitial tissue	CD31 ⁻ , CD34 ^{+/-} , CD44 ⁺ , CD45 ^{low} , CD56 ^{+/-} , CD90 ^{+/-} , CD133 ⁺ , CD140b ^{low} , CD146 ^{low} , CXCR4 ^{+/-} , STRO-1 ⁺	Participation to muscle regeneration, Formation of SC, Good integration and dispersion into muscle tissue, Muscle homing through bloodstream, Clinical benefit in animal model	Fragile cells, Difficulty to isolate pure population, Difficulty of <i>in vitro</i> expansion, Limited spontaneous myogenic differentiation, Divergent results concerning their contribution to muscle regeneration from systemic delivery	[30, 35-38]
HSCs	Bone marrow	Unknown	CD34 ⁺ , CD38 ^{+/-} , CD43 ⁺ , CD45 ⁺ , CD59 ⁺ , CD90 ⁺ , Lin ⁻	Reproducible isolation, Well characterization, Muscle homing through bloodstream	Low cell integration into muscle tissue after delivery, Very limited contribution to muscle regeneration, Formation of non-functional SC, No clinical benefit	[39-47]
Side Population cells	Skeletal muscle	Interstitial tissue	BMP4 ⁺ , CD34 ^{+/-} , CD45 ⁻ , CD117 ⁻	Participation to muscle regeneration, Formation of SC, Muscle homing through bloodstream, Improvement of migration and fusion of myoblasts	No spontaneous myogenic differentiation, Limited fusion with endogenous myofibers, Low cell integration into	[40, 48-53]

						muscle tissue, No clinical benefit demonstrated
Perivascular cells (Pericytes and Mabs)	Skeletal muscle, pancreas, adipose tissue, placenta	Periphery of capillaries and microvessels	CD13 ⁺ , CD31 ⁻ , CD34 ⁻ , CD44 ⁺ , CD45 ⁻ , CD49b ⁺ , CD56 ⁻ , CD90 ^{+/-} , CD105 ^{+/-} , CD106 ⁻ , CD133 ⁻ , CD140b ⁺ , CD144 ⁻ , CD146 ⁺ , NG2 ⁺ , ALP ⁺ , α -sma ^{+/-}	High proliferation, Spontaneous myogenic differentiation, Participation to muscle regeneration, Formation of SC, Muscle homing through bloodstream, Clinical benefits in animal models	No demonstration of clinical benefit after Phase I/IIA trial	[54-63]
MDSCs	Skeletal muscle	Unknown	CD34 ⁻ , CD44 ⁺ , CD45 ⁻ , CD56 ^{+/-} , CD73 ⁺ , CD90 ⁺ , CD105 ⁺ , CD146 ⁺	High proliferation, Stable phenotype and karyotype, Spontaneous myogenic differentiation, Participation to muscle regeneration, Muscle homing through bloodstream, Resistance to oxidative stress	Unknown origin, No demonstration of SC formation, No clinical benefit demonstrated	[64-71]
MSCs	Bone marrow	Unknown	CD29 ⁺ , CD34 ⁻ , CD44 ⁺ , CD45 ⁻ , CD49b ⁺ , CD73 ⁺ , CD90 ⁺ , CD105 ⁺ , CD106 ⁺ , CD140 ⁺ , CD144 ⁻ , CD146 ⁺	Reproducible isolation, Well characterization	No spontaneous myogenic differentiation, Very limited contribution to muscle regeneration, No clinical benefit	[72-80]
	Adipose tissue	Unknown	CD13 ⁺ , CD29 ⁺ , CD31 ⁻ , CD34 ⁻ , CD44 ⁺ , CD45 ⁻ , CD49b ⁺ , CD73 ⁺ , CD90 ⁺ , CD105 ⁺	High proliferation, Stable phenotype, Muscle homing through bloodstream, Participation to muscle regeneration (with variable intensity)	No myotube formation, No clinical benefit	[81-87]
Myo-endothelial cells	Skeletal muscle	Interstitial tissue	CD29 ⁺ , CD31 ⁻ , CD34 ⁻ , CD44 ⁺ , CD45 ⁻ , CD56 ⁺ , CD90 ⁺ , CD105 ⁺ , CD144 ⁺ , CD146 ⁺	High proliferation, Spontaneous myogenic differentiation, Participation to muscle regeneration, Increase muscle mass and contraction	Systemic delivery not tested	[88-93]
SMALD (Aldh ⁺ /CD34 ⁻)	Skeletal muscle	Unknown	Aldh ^{br} , CD31 ⁻ , CD34 ⁻ , CD44 ^{low} ,	High proliferation, Spontaneous myogenic differentiation,	Systemic delivery not tested	[94]

cells)			CD45 ⁻ , CD56 ⁺ , CD90 ^{low} , CD133 ⁻	Participation to muscle regeneration, Formation of SC		
MuStem cells	Skeletal muscle	Unknown	Not yet defined	High proliferation, Spontaneous myogenic differentiation, Participation to muscle regeneration, Formation of SC, Muscle homing through bloodstream Clinical and tissue benefit in animal model	Unknown origin, Rare cells	[95-99]

HSCs: hematopoietic stem cells, Mabs: mesoangioblasts; MDPCs: muscle-derived progenitor cells; MDSCs: muscle-derived stem cells; MSCs: mesenchymal stem cells; SC: Satellite cells

Table S2. List of antibodies used for cell characterization by FACS analysis

Primary antibody	Compagny and catalogue number	Corresponding isotype
CD4-PE	Beckman-Coulter, A07751	Mouse IgG1-PE
CD8-PE	Beckman-Coulter, A07757	Mouse IgG1-PE
CD15-PE	BD Biosciences, 555402	Mouse IgM-PE
CD19-PE	BD Biosciences, 555413	Mouse IgG1-PE
CD29-PE	BD Biosciences, 555443	Mouse IgG1-PE
CD31-PE	BD Biosciences, 555446	Mouse IgG1-PE
CD33-PE	BD Biosciences, 555450	Mouse IgG1-PE
CD34-PE	BD Biosciences, 345802	Mouse IgG1-PE
CD38-PE	BD Biosciences, 555460	Mouse IgG1-PE
CD44-PE	BD Biosciences, 555479	Mouse IgG2b-PE
CD45-PE	BD Biosciences, 555483	Mouse IgG1-PE
CD56-AF647	BD Biosciences, 562413	Mouse IgG1-AF647
CD56-PE	BD Biosciences, 555516	Mouse IgG1-PE
CD73-PE	BD Biosciences, 550257	Mouse IgG1-PE
CD82-PE	Biologend, 342103	Mouse IgG1-PE
CD90-PE	BD Biosciences, 555596	Mouse IgG1-PE
CD105-PE	BD Biosciences, 560839	Mouse IgG1-PE
CD117-PE	BD Biosciences, 555714	Mouse IgG1-PE
CD133-PE	R&D Systems, 130-080-801	Mouse IgG1-PE
CD140b-PE	BD Biosciences, 558821	Mouse IgG2a-PE
CD144-PerCPCy5.5	BD Biosciences, 561566	Mouse IgG1-PerCPCy5.5
CD146-PE-Cy7	BD Biosciences, 562135	Mouse IgG1-PE-Cy7
CD201-PE	Biologend, 351903	Rat IgG1-PE
CD318-PE/Cy7	Biologend, 324015	Mouse Ig2b-PE/Cy7
CD338-PE	BD Biosciences, 561180	Mouse IgG2b-PE
VEGFR1-PE	R&D Systems, FAB321P	Mouse IgG1-PE
VEGFR2-PE	R&D Systems, FAB357P	Mouse IgG1-PE
Mouse IgG1 control:AF647	BD Biosciences, 557714	N/A
Mouse IgG1 control:PE	BD Biosciences, 555749	N/A
Rat IgG1 control:PE	BD Biosciences, 559318	N/A
Mouse IgG1 control:PE-Cy7	BD Biosciences, 557872	N/A
Mouse IgG1 control:PerCPCy5.5	BD Biosciences, 550795	N/A
Mouse IgG2a control:PE	R&D Systems, IC003P	N/A
Mouse IgG2b control:PE	BD Biosciences, 555743	N/A
Mouse IgG2b control:PE/Cy7	BD Biosciences, 560542	N/A
Mouse IgM control:PE	BD Biosciences, 555584	N/A

Table S3. Summary of primers used for RT-PCR analysis

Name	Type		Sequence	Product (bp)	Accession number
<i>RPS18</i>	Housekeeping gene	For	5'-ACCAAGAGGGCGGGAGAA-3'	85	Database: NM_022551.2
		Rev	5'-CTGGGATCTTGTACTGGCGTC-3'		
<i>PAX3</i>		For	5'-GAGTTCATCAGCCGCATCC-3'	105	Database: NM_181457.3
		Rev	5'-TGTTTGGCCTTCTTCTCGCTT-3'		
<i>PAX7</i>		For	5'-CAAGATTCTTTGCCGCTACC-3'	390	Database: NM_002584.2
		Rev	5'-TTCAGTGGGAGGTCAGGTTTC-3'		
<i>MYF5</i>		For	5'-CCACGACCAACCCCAACCA-3'	122	Database: NM_005593.2
		Rev	5'-TCCCGGCAGGCTATAGTAGT-3'		
<i>MYOD1</i>	Myogenic markers	For	5'-CAAGCGCAAGACCACCAAC-3'	123	Database: NM_002478.4
		Rev	5'-TGGTTTGGATTGCTCGACGTG-3'		
<i>MYOG</i>		For	5'-CCCTACAGATGCCACAACC-3'	126	Database: NM_002479.4
		Rev	5'-GATGCCCGGCTTGGAAAGAC-3'		
<i>MRF4</i>		For	5'-GAAAATCTGCCCCACTGACC-3'	330	Database: NM_002469.2
		Rev	5'-GCCCCCTGGAATGATCGGAAA-3'		
<i>CDH15</i>		For	5'-ACAGATGCCGACGACCCGAG-3'	134	Database: NM_004933.2
		Rev	5'-TCGCGGTCCAGCCCCTT-3'		
<i>C-MET</i>		For	5'-AGCCAATTTATCAGGAGGTGT-3'	202	Database: NM_001127500.1
		Rev	5'-CTGGCTGGGCTTCTATCTG-3'		
<i>ADIPONECTIN</i>	Adipogenic markers	For	5'-ACTGCAACATTCCTGGGCT-3'	212	Database: NM_001177800.1
		Rev	5'-ACGCTCTCCTTCCCATACAC-3'		
<i>LPL</i>		For	5'-GAGTATGCAGAAGCCCCGAG-3'	214	Database: NM_000237.2
		Rev	5'-CCACATCTCCAAGTCTCTCTC-3'		
<i>OPG</i>	Osteogenic marker	For	5'-TGCTGCGCGCTCGTGTTCCTG-3'	386	Database: NM_002546.3
		Rev	5'-CCAGCTTGCACTCCAAATCC-3'		
<i>CD31</i>		For	5'-ACAACAGACATGGCAACAAGG-3'	130	Database: NM_000442.4
		Rev	5'-AGTTCGTATGTTGACCACGA-3'		
<i>VWF</i>	Endothelial markers	For	5'-CCGAAGCACCATCTACCCTG-3'	150	Database: NM_000552.3
		Rev	5'-TAAGTGAAGCCCGACCGACA-3'		
<i>CD144</i>		For	5'-TTCCAGCAGCCTTCTACCAC-3'	144	Database: NM_001795.4
		Rev	5'-GAAGAACTGGCCCTTGTCACT-3'		
<i>KLF4</i>		For	5'-AGAGGAGCCCAAGCCAAAGA-3'	181	Database: NM_004235.4
		Rev	5'-TTTCATCCACAGCCGTCCCAG-3'		
<i>NANOG</i>	Pluripotent markers	For	5'-AGAAGAGTGTGCAAAAAGGAAG-3'	261	Database: NM_024865.2
		Rev	5'-TCTGCGTCACACATTGCTATT-3'		
<i>OCT-4A</i>		For	5'-CAGCGACTATGCACAACGAGA-3'	151	Database: NM_002701.4
		Rev	5'-GAAAGGGACCGAGGAGTACAG-3'		
<i>SOX2</i>		For	5'-ATGCACCGCTACGACGTGA-3'	150	Database: NM_003106.3
		Rev	5'-GGACTTGACCACCGAACCCAT-3'		

Table S4. List of antibodies used for cell characterization by immunocytochemistry

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

KLF4	Cell Signaling Technology, 4038P	1:100	ON, 4°C	Biotinylated Ab + Streptavidin Alexa 555
------	-------------------------------------	-------	---------	---

Annexe 3. Valorisation scientifique

I. Publications

1) Judith Lorant*, Charlotte Saury*, Cindy Schleder, Florence Robriquet, Blandine Lieubeau, Elisa Négroni, Isabelle Leroux, Lucie Chabrand, Sabrina Viau, Candice Babarit, Mireille Ledevin, Laurence Dubreil, Antoine Hamel, Armelle Magot, Chantal Thorin, Laëtitia Guevel, Bruno Delorme, Yann Péréon, Gillian Butler-Browne, Vincent Mouly and Karl Rouger. Skeletal muscle regenerative potential of human MuStem cells following transplantation into injured muscle. *Molecular Therapy* (2017, in press)

2) Charlotte Saury, Aurélie Lardenois, Cindy Schleder, Isabelle Leroux, Blandine Lieubeau, Laurent David, Laëtitia Guevel, Sabrina Viau, Bruno Delorme and Karl Rouger. Human serum and platelet lysate are appropriate xeno-free alternatives for clinical grade production of human MuStem cell batches. (En preparation pour *Stem Cell Research and Therapy*)

3) Charlotte Saury, Aurélie Lardenois, Cindy Schleder, Isabelle Leroux, Blandine Lieubeau, Rémy Le Guevel, Laurent David, Sabrina Viau, Bruno Delorme, Laëtitia Guével, Karl Rouger. Phenotypic and behavioral characterization of hMuStem cells during the *in vitro* expansion phase. (En preparation pour *J Mol Cell Biol*)

II. Communication affichée

Charlotte Saury, Sabrina Viau, Isabelle Leroux, Cindy Schleder, Lucie Chabrand, Yann Péréon, Armelle Magot, Antoine Hamel, Laëtitia Guevel, Bruno Delorme and Karl Rouger. Human MuStem cell, a cell therapy candidate for Duchenne Muscular Dystrophy (DMD): from research to clinical-grade production. Myology Congress, Mars 2016, Lyon France

Bibliographie

Aartsma-Rus, A., Van Deutekom, J.C.T., Fokkema, I.F., Van Ommen, G.-J.B., and Den Dunnen, J.T. (2006). Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. *Muscle Nerve* 34, 135–144.

Accomasso, L., Gallina, C., Turinetto, V., and Giachino, C. (2016). Stem Cell Tracking with Nanoparticles for Regenerative Medicine Purposes: An Overview. *Stem Cells Int.* 2016, 1–23.

Achille, V., Mantelli, M., Arrigo, G., Novara, F., Avanzini, M.A., Bernardo, M.E., Zuffardi, O., Barosi, G., Zecca, M., and Maccario, R. (2011). Cell-cycle phases and genetic profile of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells expanded in vitro from healthy donors. *J. Cell. Biochem.* 112, 1817–1821.

Adesida, A.B., Mulet-Sierra, A., and Jomha, N.M. (2012). Hypoxia mediated isolation and expansion enhances the chondrogenic capacity of bone marrow mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res. Ther.* 3, 9.

Agata, H., Watanabe, N., Ishii, Y., Kubo, N., Ohshima, S., Yamazaki, M., Tojo, A., and Kagami, H. (2009). Feasibility and efficacy of bone tissue engineering using human bone marrow stromal cells cultivated in serum-free conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 382, 353–358.

Aggarwal, S., and Pittenger, M.F. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105, 1815–1822.

Aguado, B.A., Mulyasmita, W., Su, J., Lampe, K.J., and Heilshorn, S.C. (2012). Improving viability of stem cells during syringe needle flow through the design of hydrogel cell carriers. *Tissue Eng. Part A* 18, 806–815.

Aird, K.M., and Zhang, R. (2013). Detection of senescence-associated heterochromatin foci (SAHF). *Methods Mol. Biol.* 965, 185–196.

Alessandri, G., Pagano, S., Bez, A., Benetti, A., Pozzi, S., Iannolo, G., Baronio, M., Invernici, G., Caruso, A., Muneretto, C., et al. (2004). Isolation and culture of human muscle-derived stem cells able to differentiate into myogenic and neurogenic cell lineages. *Lancet (London, England)* 364, 1872–1883.

Allen, D.G., and Whitehead, N.P. (2011). Duchenne muscular dystrophy – What causes the increased membrane permeability in skeletal muscle? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 290–294.

Allen, D.G., Gervasio, O.L., Yeung, E.W., and Whitehead, N.P. (2010). Calcium and the damage pathways in muscular dystrophy. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 88, 83–91.

Allsopp, R.C., Chang, E., Kashefi-Aazam, M., Rogaev, E.I., Piatyszek, M.A., Shay, J.W., and Harley, C.B. (1995). Telomere shortening is associated with cell division in vitro and in vivo. *Exp. Cell Res.* 220, 194–200.

Almeida, C.F., Fernandes, S.A., Ribeiro Junior, A.F., Keith Okamoto, O., and Vainzof, M. (2016). Muscle Satellite Cells: Exploring the Basic Biology to Rule Them. *Stem Cells Int.* 2016, 1078686.

Anasiz, Y., Ozgul, R.K., and Uckan-Cetinkaya, D. (2017). A New Chapter for Mesenchymal Stem Cells: Decellularized Extracellular Matrices. *Stem Cell Rev. Reports*.

Appelbaum, F.R. (2007). Hematopoietic-cell transplantation at 50. *N. Engl. J. Med.* *357*, 1472–1475.

Arsic, N., Mamaeva, D., Lamb, N.J., and Fernandez, A. (2008). Muscle-derived stem cells isolated as non-adherent population give rise to cardiac, skeletal muscle and neural lineages. *Exp. Cell Res.* *314*, 1266–1280.

Asakura, A., Seale, P., Girgis-Gabardo, A., and Rudnicki, M.A. (2002). Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J. Cell Biol.* *159*, 123–134.

Asghar, W., El Assal, R., Shafiee, H., Anchan, R.M., and Demirci, U. (2014). Preserving human cells for regenerative, reproductive, and transfusion medicine. *Biotechnol. J.* *9*, 895–903.

Atala, A., Kasper, F.K., and Mikos, A.G. (2012). Engineering complex tissues. *Sci. Transl. Med.* *4*, 160rv12.

Awaya, T., Kato, T., Mizuno, Y., Chang, H., Niwa, A., Umeda, K., Nakahata, T., and Heike, T. (2012). Selective development of myogenic mesenchymal cells from human embryonic and induced pluripotent stem cells. *PLoS One* *7*, e51638.

Bachrach, E., Li, S., Perez, A.L., Schienda, J., Liadaki, K., Volinski, J., Flint, A., Chamberlain, J., and Kunkel, L.M. (2004). Systemic delivery of human microdystrophin to regenerating mouse dystrophic muscle by muscle progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 3581–3586.

Bachrach, E., Perez, A.L., Choi, Y.-H., Illigens, B.M.W., Jun, S.J., del Nido, P., McGowan, F.X., Li, S., Flint, A., Chamberlain, J., et al. (2006). Muscle engraftment of myogenic progenitor cells following intraarterial transplantation. *Muscle Nerve* *34*, 44–52.

Baker, J.F.M., and Assaf, B.T. (2015). Preclinical Study Design for Evaluation of Stem Cell-derived Cellular Therapy Products: A Pathologist's Perspective. *Toxicol. Pathol.* *43*, 126–131.

Balbi, C., Piccoli, M., Barile, L., Papait, A., Armirotti, A., Principi, E., Reverberi, D., Pascucci, L., Becherini, P., Varesio, L., et al. (2017). 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.

Banfi, A., Muraglia, A., Dozin, B., Mastrogiacomo, M., Cancedda, R., and Quarto, R. (2000). Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy. *Exp. Hematol.* *28*, 707–715.

Barberi, T., Bradbury, M., Dincer, Z., Panagiotakos, G., Socci, N.D., and Studer, L. (2007). Derivation of engraftable skeletal myoblasts from human embryonic stem cells. *Nat. Med.* *13*, 642–648.

Barclay, E. (2009). Stem-cell experts raise concerns about medical tourism. *Lancet (London, England)* *373*, 883–884.

Barker, J.N., and Wagner, J.E. (2003). Umbilical cord blood transplantation: current practice and future innovations. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 48, 35–43.

Barnes, D., and Sato, G. (1980). Serum-free cell culture: a unifying approach. *Cell* 22, 649–655.

Basu, J., Assaf, B.T., Bertram, T.A., and Rao, M. (2015). Preclinical biosafety evaluation of cell-based therapies: emerging global paradigms. *Toxicol. Pathol.* 43, 115–125.

Baxter, M.A., Wynn, R.F., Jowitt, S.N., Wraith, J.E., Fairbairn, L.J., and Bellantuono, I. (2004). Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem Cells* 22, 675–682.

Beauséjour, C.M., Krtolica, A., Galimi, F., Narita, M., Lowe, S.W., Yaswen, P., and Campisi, J. (2003). Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J.* 22, 4212–4222.

Becker, P.E., and Kiener, F. (1955). [A new x-chromosomal muscular dystrophy]. *Arch. Psychiatr. Nervenkr. Z. Gesamte Neurol. Psychiatr.* 193, 427–448.

Beenakker, E. a. C., de Vries, J., Fock, J.M., van Tol, M., Brouwer, O.F., Maurits, N.M., and van der Hoeven, J.H. (2002). Quantitative assessment of calf circumference in Duchenne muscular dystrophy patients. *Neuromuscul. Disord.* NMD 12, 639–642.

Belicchi, M., Erratico, S., Razini, P., Meregalli, M., Cattaneo, A., Jacchetti, E., Farini, A., Villa, C., Bresolin, N., Porretti, L., et al. (2010). Ex vivo expansion of human circulating myogenic progenitors on cluster-assembled nanostructured TiO₂. *Biomaterials* 31, 5385–5396.

Bellavia, M., Altomare, R., Cacciabaudo, F., Santoro, A., Allegra, A., Concetta Gioviale, M., and Lo Monte, A.I. (2014). Towards an ideal source of mesenchymal stem cell isolation for possible therapeutic application in regenerative medicine. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc. Czech. Repub.* 158, 356–360.

Ben-Porath, I., and Weinberg, R.A. (2005). The signals and pathways activating cellular senescence. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 961–976.

Benchaouir, R., Meregalli, M., Farini, A., D'Antona, G., Belicchi, M., Goyenvalle, A., Battistelli, M., Bresolin, N., Bottinelli, R., Garcia, L., et al. (2007). Restoration of human dystrophin following transplantation of exon-skipping-engineered DMD patient stem cells into dystrophic mice. *Cell Stem Cell* 1, 646–657.

Bencze, M., Negroni, E., Vallese, D., Yacoub-Youssef, H., Chaouch, S., Wolff, A., Aamiri, A., Di Santo, J.P., Chazaud, B., Butler-Browne, G., et al. (2012). Proinflammatory macrophages enhance the regenerative capacity of human myoblasts by modifying their kinetics of proliferation and differentiation. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 20, 2168–2179.

Berardi, E., Annibali, D., Cassano, M., Crippa, S., and Sampaolesi, M. (2014). Molecular and cell-based therapies for muscle degenerations: a road under construction. *Front. Physiol.* 5.

Bernardo, M.E., Avanzini, M.A., Perotti, C., Cometa, A.M., Moretta, A., Lenta, E., Del Fante, C., Novara, F., de Silvestri, A., Amendola, G., et al. (2007a). Optimization of in vitro expansion of human multipotent mesenchymal stromal cells for cell-therapy approaches: further insights in the search for a fetal calf serum substitute. *J. Cell. Physiol.* *211*, 121–130.

Bernardo, M.E., Zaffaroni, N., Novara, F., Cometa, A.M., Avanzini, M.A., Moretta, A., Montagna, D., Maccario, R., Villa, R., Daidone, M.G., et al. (2007b). Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Res.* *67*, 9142–9149.

Bhat, H.F., Mir, S.S., Dar, K.B., Bhat, Z.F., Shah, R.A., and Ganai, N.A. (2017). ABC of multifaceted dystrophin glycoprotein complex (DGC). *J. Cell. Physiol.*

Bieback, K., Kern, S., Klüter, H., and Eichler, H. (2004). Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells* *22*, 625–634.

Bieback, K., Hecker, A., Kocaömer, A., Lannert, H., Schallmoser, K., Strunk, D., and Klüter, H. (2009). Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem Cells* *27*, 2331–2341.

Bieback, K., Kinzebach, S., and Karagianni, M. (2010). Translating Research into Clinical Scale Manufacturing of Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells Int.* *2010*, 1–11.

Bigot, A., Jacquemin, V., Debaq-Chainiaux, F., Butler-Browne, G.S., Toussaint, O., Furling, D., and Mouly, V. (2008). Replicative aging down-regulates the myogenic regulatory factors in human myoblasts. *Biol. Cell* *100*, 189–199.

Bigot, N., Mouche, A., Preti, M., Loisel, S., Renoud, M.-L., Le Guével, R., Sensebé, L., Tarte, K., and Pedoux, R. (2015). Hypoxia Differentially Modulates the Genomic Stability of Clinical-Grade ADSCs and BM-MSCs in Long-Term Culture. *Stem Cells* *33*, 3608–3620.

Bisson, A., Le Corre, S., Joly-Helas, G., Chambon, P., Demoulins, L., Jean, L., Adriouch, S., Drouot, L., Giverne, C., Roussel, F., et al. (2014). Chromosomal instability but lack of transformation in human myoblast preparations. *Cell Transplant.* *23*, 1475–1487.

Le Blanc, K., and Ringdén, O. (2007). Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J. Intern. Med.* *262*, 509–525.

Blasco, M.A., Lee, H.W., Hande, M.P., Samper, E., Lansdorp, P.M., DePinho, R.A., and Greider, C.W. (1997). Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* *91*, 25–34.

Bonab, M.M., Alimoghaddam, K., Talebian, F., Ghaffari, S.H., Ghavamzadeh, A., and Nikbin, B. (2006). Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biol.* *7*, 14.

Bonfanti, C., Rossi, G., Tedesco, F.S., Giannotta, M., Benedetti, S., Tonlorenzi, R., Antonini, S., Marazzi, G., Dejana, E., Sassoon, D., et al. (2015). PW1/Peg3 expression regulates key properties that determine mesoangioblast stem cell competence. *Nat. Commun.* *6*, 6364.

Borchin, B., Chen, J., and Barberi, T. (2013). Derivation and FACS-mediated

purification of PAX3+/PAX7+ skeletal muscle precursors from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* 1, 620–631.

van den Bos, C., Keefe, R., Schirmaier, C., and McCaman, M. (2013). Therapeutic Human Cells: Manufacture for Cell Therapy/Regenerative Medicine. D. Eibl, and R. Eibl, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 61–97.

Bouckenooghe, T., Bertholet, P., Chabrand, L., Viau, S., and Delorme, B. (2016). Standardized and clinical grade human platelet lysate hydrogel (HPLG) for the optimization of large-scale expansion of human mesenchymal stem cells. In 21st ISCT Annual Meeting. *Cytotherapy*, p. 17(6 supplement):S69.

Boyette, L.B., Creasey, O.A., Guzik, L., Lozito, T., and Tuan, R.S. (2014). Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells display enhanced clonogenicity but impaired differentiation with hypoxic preconditioning. *Stem Cells Transl. Med.* 3, 241–254.

Brandl, A., Meyer, M., Bechmann, V., Nerlich, M., and Angele, P. (2011a). Oxidative stress induces senescence in human mesenchymal stem cells. *Exp. Cell Res.* 317, 1541–1547.

Brandl, A., Hartmann, A., Bechmann, V., Graf, B., Nerlich, M., and Angele, P. (2011b). Oxidative stress induces senescence in chondrocytes. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 29, 1114–1120.

Bravery, C.A., Carmen, J., Fong, T., Oprea, W., Hoogendoorn, K.H., Woda, J., Burger, S.R., Rowley, J.A., Bonyhadi, M.L., and Van't Hof, W. (2013). Potency assay development for cellular therapy products: an ISCT review of the requirements and experiences in the industry. *Cytotherapy* 15, 9–19.

Brindley, D.A., Davie, N.L., Culme-Seymour, E.J., Mason, C., Smith, D.W., and Rowley, J.A. (2012). Peak serum: implications of serum supply for cell therapy manufacturing. *Regen. Med.* 7, 7–13.

Brooke, G., Rossetti, T., Pelekanos, R., Ilic, N., Murray, P., Hancock, S., Antonenas, V., Huang, G., Gottlieb, D., Bradstock, K., et al. (2009). Manufacturing of human placenta-derived mesenchymal stem cells for clinical trials. *Br. J. Haematol.* 144, 571–579.

Bubela, T., Li, M.D., Hafez, M., Bieber, M., and Atkins, H. (2012). Is belief larger than fact: expectations, optimism and reality for translational stem cell research. *BMC Med.* 10, 133.

Bulfield, G., Siller, W.G., Wight, P.A., and Moore, K.J. (1984). X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 1189–1192.

Burelle, Y., Khairallah, M., Ascah, A., Allen, B.G., Deschepper, C.F., Petrof, B.J., and Des Rosiers, C. (2010). Alterations in mitochondrial function as a harbinger of cardiomyopathy: lessons from the dystrophic heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 48, 310–321.

Burnouf, T., Strunk, D., Koh, M.B.C., and Schallmoser, K. (2016). Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials* 76, 371–387.

Burova, E., Borodkina, A., Shatrova, A., and Nikolsky, N. (2013). Sublethal oxidative

stress induces the premature senescence of human mesenchymal stem cells derived from endometrium. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013, 474931.

Camargo, F.D., Green, R., Capetanaki, Y., Jackson, K.A., Goodell, M.A., and Capetanaki, Y. (2003). Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates. *Nat. Med.* 9, 1520–1527.

Campbell, A., Brieva, T., Raviv, L., Rowley, J., Niss, K., Brandwein, H., Oh, S., and Karnieli, O. (2015). Concise Review: Process Development Considerations for Cell Therapy. *Stem Cells Transl. Med.* 4, 1155–1163.

Campisi, J. (2005). Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 120, 513–522.

Campisi, J., and d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 729–740.

Cao, B., Zheng, B., Jankowski, R.J., Kimura, S., Ikezawa, M., Deasy, B., Cummins, J., Epperly, M., Qu-Petersen, Z., and Huard, J. (2003). Muscle stem cells differentiate into haematopoietic lineages but retain myogenic potential. *Nat. Cell Biol.* 5, 640–646.

Cao, J., Li, X., Lu, X., Zhang, C., Yu, H., and Zhao, T. (2014). Cells derived from iPSC can be immunogenic - yes or no? *Protein Cell* 5, 1–3.

Chal, J., Al Tanoury, Z., Hestin, M., Gobert, B., Aivio, S., Hick, A., Cherrier, T., Nesmith, A.P., Parker, K.K., and Pourquié, O. (2016). Generation of human muscle fibers and satellite-like cells from human pluripotent stem cells in vitro. *Nat. Protoc.* 11, 1833–1850.

Chamberlain, J.R., and Chamberlain, J.S. (2017). Progress toward Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol. Ther.* 25, 1125–1131.

Chang, Y., Hsieh, P.-H., and Chao, C.C.-K. (2009). The efficiency of Percoll and Ficoll density gradient media in the isolation of marrow derived human mesenchymal stem cells with osteogenic potential. *Chang Gung Med. J.* 32, 264–275.

Charville, G.W., Cheung, T.H., Yoo, B., Santos, P.J., Lee, G.K., Shrager, J.B., and Rando, T.A. (2015). Ex Vivo Expansion and In Vivo Self-Renewal of Human Muscle Stem Cells. *Stem Cell Reports* 5, 621–632.

Chase, L.G., Lakshmipathy, U., Solchaga, L.A., Rao, M.S., and Vemuri, M.C. (2010). A novel serum-free medium for the expansion of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* 1, 8.

Chen, A.K.-L., Chen, X., Choo, A.B.H., Reuveny, S., and Oh, S.K.W. (2011a). Critical microcarrier properties affecting the expansion of undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cell Res.* 7, 97–111.

Chen, G., Gulbranson, D.R., Hou, Z., Bolin, J.M., Ruotti, V., Probasco, M.D., Smuga-Otto, K., Howden, S.E., Diol, N.R., Propson, N.E., et al. (2011b). Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nat. Methods* 8, 424–429.

Chen, Q.M., Liu, J., and Merrett, J.B. (2000). Apoptosis or senescence-like growth

arrest: influence of cell-cycle position, p53, p21 and bax in H₂O₂ response of normal human fibroblasts. *Biochem. J.* 347, 543–551.

Chen, V.C., Ye, J., Shukla, P., Hua, G., Chen, D., Lin, Z., Liu, J., Chai, J., Gold, J., Wu, J., et al. (2015). Development of a scalable suspension culture for cardiac differentiation from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Res.* 15, 365–375.

Chen, X.-D., Dusevich, V., Feng, J.Q., Manolagas, S.C., and Jilka, R.L. (2007). Extracellular matrix made by bone marrow cells facilitates expansion of marrow-derived mesenchymal progenitor cells and prevents their differentiation into osteoblasts. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 22, 1943–1956.

Chirieleison, S.M., Feduska, J.M., Schugar, R.C., Askew, Y., and Deasy, B.M. (2012). Human muscle-derived cell populations isolated by differential adhesion rates: phenotype and contribution to skeletal muscle regeneration in Mdx/SCID mice. *Tissue Eng. Part A* 18, 232–241.

Choi, J.R., Yong, K.W., and Wan Safwani, W.K.Z. (2017). Effect of hypoxia on human adipose-derived mesenchymal stem cells and its potential clinical applications. *Cell. Mol. Life Sci.* 74, 2587–2600.

Choi, J.S., Yoon, H.I., Lee, K.S., Choi, Y.C., Yang, S.H., Kim, I.-S., and Cho, Y.W. (2016). Exosomes from differentiating human skeletal muscle cells trigger myogenesis of stem cells and provide biochemical cues for skeletal muscle regeneration. *J. Control. Release* 222, 107–115.

Chow, S.-C., Wang, H., and Shao, J. (2003). *Sample Size Calculations in Clinical Research* (CRC Press).

Collado, M., Blasco, M.A., and Serrano, M. (2007). Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* 130, 223–233.

Colter, D.C., Sekiya, I., and Prockop, D.J. (2001). Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 7841–7845.

Coopman, K., and Medcalf, N. (2008). *From production to patient: challenges and approaches for delivering cell therapies.* (Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute), p.

Coopman, K., and Medcalf, N. (2014). *From production to patient: challenges and approaches for delivering cell therapies.*

Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A., and Campisi, J. (2010). The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu. Rev. Pathol.* 5, 99–118.

De Coppi, P., Bartsch, G., Siddiqui, M.M., Xu, T., Santos, C.C., Perin, L., Mostoslavsky, G., Serre, A.C., Snyder, E.Y., Yoo, J.J., et al. (2007). Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat. Biotechnol.* 25, 100–106.

Cossu, G., Previtali, S.C., Napolitano, S., Cicalese, M.P., Tedesco, F.S., Nicastro, F., Noviello, M., Roostalu, U., Natali Sora, M.G., Scarlato, M., et al. (2015). Intra-arterial

transplantation of HLA-matched donor mesoangioblasts in Duchenne muscular dystrophy. *EMBO Mol. Med.* 7, 1513–1528.

Cottle, B.J., Lewis, F.C., Shone, V., and Ellison-Hughes, G.M. (2017). Skeletal muscle-derived interstitial progenitor cells (PICs) display stem cell properties, being clonogenic, self-renewing, and multi-potent in vitro and in vivo. *Stem Cell Res. Ther.* 8, 158.

Coulombel, L. (2003). [Adult stem cells: being is not being]. *Med. Sci. M/S* 19, 683–694.

Couture, L.A. (2010). Scalable pluripotent stem cell culture. *Nat. Biotechnol.* 28, 562–563.

Covas, D.T., Panepucci, R.A., Fontes, A.M., Silva, W.A., Orellana, M.D., Freitas, M.C.C., Neder, L., Santos, A.R.D., Peres, L.C., Jamur, M.C., et al. (2008). Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. *Exp. Hematol.* 36, 642–654.

Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C.-W., Corselli, M., Park, T.S., Andriolo, G., Sun, B., Zheng, B., Zhang, L., et al. (2008). A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 3, 301–313.

Cuiffo, B.G., and Karnoub, A.E. (2012). Mesenchymal stem cells in tumor development: emerging roles and concepts. *Cell Adh. Migr.* 6, 220–230.

Culme-Seymour, E.J., Davie, N.L., Brindley, D.A., Edwards-Parton, S., and Mason, C. (2012). A decade of cell therapy clinical trials (2000–2010). *Regen. Med.* 7, 455–462.

Cunningham, J.J., Ulbright, T.M., Pera, M.F., and Looijenga, L.H.J. (2012). Lessons from human teratomas to guide development of safe stem cell therapies. *Nat. Biotechnol.* 30, 849–857.

d’Adda di Fagagna, F. (2008). Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat. Rev. Cancer* 8, 512–522.

d’Adda di Fagagna, F., Reaper, P.M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N.P., and Jackson, S.P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426, 194–198.

D’Amour, K.A., Bang, A.G., Eliazer, S., Kelly, O.G., Agulnick, A.D., Smart, N.G., Moorman, M.A., Kroon, E., Carpenter, M.K., and Baetge, E.E. (2006). Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 24, 1392–1401.

Daley, G.Q. (2010). Stem cells: roadmap to the clinic. *J. Clin. Invest.* 120, 8–10.

Darabi, R., Pan, W., Bosnakovski, D., Baik, J., Kyba, M., and Perlingeiro, R.C.R. (2011). Functional myogenic engraftment from mouse iPS cells. *Stem Cell Rev.* 7, 948–957.

Darabi, R., Arpke, R.W., Irion, S., Dimos, J.T., Grskovic, M., Kyba, M., and Perlingeiro, R.C.R. (2012). Human ES- and iPS-derived myogenic progenitors restore

DYSTROPHIN and improve contractility upon transplantation in dystrophic mice. *Cell Stem Cell* 10, 610–619.

Deasy, B.M., Gharaibeh, B.M., Pollett, J.B., Jones, M.M., Lucas, M.A., Kanda, Y., and Huard, J. (2005). Long-term self-renewal of postnatal muscle-derived stem cells. *Mol. Biol. Cell* 16, 3323–3333.

Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J.D., Campisi, J., and Toussaint, O. (2009). Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat. Protoc.* 4, 1798–1806.

Deconinck, N., and Dan, B. (2007). Pathophysiology of Duchenne Muscular Dystrophy: Current Hypotheses. *Pediatr. Neurol.* 36, 1–7.

Dell’Agnola, C., Wang, Z., Storb, R., Tapscott, S.J., Kuhr, C.S., Hauschka, S.D., Lee, R.S., Sale, G.E., Zellmer, E., Gisburne, S., et al. (2004). Hematopoietic stem cell transplantation does not restore dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy dogs. *Blood* 104, 4311–4318.

Dellavalle, A., Sampaolesi, M., Tonlorenzi, R., Tagliafico, E., Sacchetti, B., Perani, L., Innocenzi, A., Galvez, B.G., Messina, G., Morosetti, R., et al. (2007). Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat. Cell Biol.* 9, 255–267.

Delorme, B., Ringe, J., Gallay, N., Le Vern, Y., Kerboeuf, D., Jorgensen, C., Rosset, P., Sensebé, L., Layrolle, P., Häupl, T., et al. (2008). Specific plasma membrane protein phenotype of culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells. *Blood* 111, 2631–2635.

Deschaseaux, F., and Charbord, P. (2000). Human marrow stromal precursors are alpha 1 integrin subunit-positive. *J. Cell. Physiol.* 184, 319–325.

Dessels, C., Potgieter, M., and Pepper, M.S. (2016). Making the Switch: Alternatives to Fetal Bovine Serum for Adipose-Derived Stromal Cell Expansion. *Front. Cell Dev. Biol.* 4, 115.

Dezawa, M., Ishikawa, H., Itokazu, Y., Yoshihara, T., Hoshino, M., Takeda, S., Ide, C., and Nabeshima, Y. (2005). Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. *Science* 309, 314–317.

Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., and Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 9363–9367.

Ding, Y., Yang, H., Yu, L., Xu, C.L., Zeng, Y., Qiu, Y., and Li, D.S. (2015). Feeder-free and xeno-free culture of human pluripotent stem cells using UCBS matrix: Culturing hPSCs with UCBS matrix. *Cell Biol. Int.* 39, 1111–1119.

Djouad, F., Ponce, P., Bony, C., Tropel, P., Apparailly, F., Sany, J., Noël, D., and Jorgensen, C. (2003). Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 102, 3837–3844.

Dluska, E., Cui, Z., Markowska-Radomska, A., Metera, A., and Kosicki, K. (2017). Cryoprotection and banking of living cells in a 3D multiple emulsion-based carrier. *Biotechnol. J.*

Dodson, B.P., and Levine, A.D. (2015). Challenges in the translation and commercialization of cell therapies. *BMC Biotechnol.* 15.

Dohan Ehrenfest, D.M., Andia, I., Zumstein, M.A., Zhang, C.-Q., Pinto, N.R., and Bielecki, T. (2014). Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives. *Muscles. Ligaments Tendons J.* 4, 3–9.

Domen, J., Wagers, A., and Weissman, I.L. (2006). Bone Marrow (Hematopoietic) Stem Cells. *Regen. Med.* 13–34.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315–317.

Doucet, C., Ernou, I., Zhang, Y., Llense, J.-R., Begot, L., Holy, X., and Lataillade, J.-J. (2005). Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J. Cell. Physiol.* 205, 228–236.

Duan, J., Duan, J., Zhang, Z., and Tong, T. (2005). Irreversible cellular senescence induced by prolonged exposure to H₂O₂ involves DNA-damage-and-repair genes and telomere shortening. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 1407–1420.

Edge, A.S., Gosse, M.E., and Dinsmore, J. (1998). Xenogeneic cell therapy: current progress and future developments in porcine cell transplantation. *Cell Transplant.* 7, 525–539.

Ellerström, C., Strehl, R., Moya, K., Andersson, K., Bergh, C., Lundin, K., Hyllner, J., and Semb, H. (2006). Derivation of a xeno-free human embryonic stem cell line. *Stem Cells* 24, 2170–2176.

EMA/CAT/571134/2009 (2011). Reflection paper on stem cell-based medicinal products.

Emery, A.E.H. (2002). The muscular dystrophies. *Lancet (London, England)* 359, 687–695.

Enderami, S.E., Mortazavi, Y., Soleimani, M., Nadri, S., Biglari, A., and Mansour, R.N. (2017). Generation of Insulin-Producing Cells From Human-Induced Pluripotent Stem Cells Using a Stepwise Differentiation Protocol Optimized With Platelet-Rich Plasma. *J. Cell. Physiol.* 232, 2878–2886.

Engler, A.J., Griffin, M.A., Sen, S., Bönnemann, C.G., Sweeney, H.L., and Discher, D.E. (2004). Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: pathological implications for soft or stiff microenvironments. *J. Cell Biol.* 166, 877–887.

Engler, A.J., Sen, S., Sweeney, H.L., and Discher, D.E. (2006). Matrix elasticity

directs stem cell lineage specification. *Cell* 126, 677–689.

Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154–156.

Fan, Y., Maley, M., Beilharz, M., and Grounds, M. (1996). Rapid death of injected myoblasts in myoblast transfer therapy. *Muscle Nerve* 19, 853–860.

Fan, Y., Wu, J., Ashok, P., Hsiung, M., and Tzanakakis, E.S. (2015). Production of human pluripotent stem cell therapeutics under defined xeno-free conditions: progress and challenges. *Stem Cell Rev.* 11, 96–109.

Fehrer, C., and Lepperdinger, G. (2005). Mesenchymal stem cell aging. *Exp. Gerontol.* 40, 926–930.

Fehrer, C., Brunauer, R., Laschober, G., Unterluggauer, H., Reiting, S., Kloss, F., Güllly, C., Gaßner, R., and Lepperdinger, G. (2007). Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan: Mesenchymal stem cells and reduced oxygen tension, C. Fehrer et al. *Aging Cell* 6, 745–757.

Fekete, N., Gadelorge, M., Fürst, D., Maurer, C., Dausend, J., Fleury-Cappellesso, S., Mailänder, V., Lotfi, R., Ignatius, A., Sensebé, L., et al. (2012). Platelet lysate from whole blood-derived pooled platelet concentrates and apheresis-derived platelet concentrates for the isolation and expansion of human bone marrow mesenchymal stromal cells: production process, content and identification of active comp. *Cytotherapy* 14, 540–554.

Fennema, E.M., Renard, A.J.S., Leusink, A., van Blitterswijk, C.A., and de Boer, J. (2009). The effect of bone marrow aspiration strategy on the yield and quality of human mesenchymal stem cells. *Acta Orthop.* 80, 618–621.

Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G., and Mavilio, F. (1998). Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279, 1528–1530.

Fischbach, M.A., Bluestone, J.A., and Lim, W.A. (2013). Cell-based therapeutics: the next pillar of medicine. *Sci. Transl. Med.* 5, 179ps7.

Fong, C.-Y., Gauthaman, K., and Bongso, A. (2010). Teratomas from pluripotent stem cells: A clinical hurdle. *J. Cell. Biochem.* 111, 769–781.

Forcales, S.-V. (2015). Potential of adipose-derived stem cells in muscular regenerative therapies. *Front. Aging Neurosci.* 7, 123.

Fossett, E., and Khan, W.S. (2012). Optimising Human Mesenchymal Stem Cell Numbers for Clinical Application: A Literature Review. *Stem Cells Int.* 2012, 1–5.

Francis, K.R., and Wei, L. (2010). Human embryonic stem cell neural differentiation and enhanced cell survival promoted by hypoxic preconditioning. *Cell Death Dis.* 1, e22.

François, M., Copland, I.B., Yuan, S., Romieu-Mourez, R., Waller, E.K., and Galipeau, J. (2012). Cryopreserved mesenchymal stromal cells display impaired immunosuppressive properties as a result of heat-shock response and impaired interferon- γ

licensing. *Cytherapy* 14, 147–152.

Fraser, J.K., Wulur, I., Alfonso, Z., and Hedrick, M.H. (2006). Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 24, 150–154.

Frey-Vasconcells, J., Whittlesey, K.J., Baum, E., and Feigal, E.G. (2012). Translation of Stem Cell Research: Points to Consider in Designing Preclinical Animal Studies. *Stem Cells Transl. Med.* 1, 353–358.

Friedenstein, A.J., Gorskaja, J.F., and Kulagina, N.N. (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp. Hematol.* 4, 267–274.

Führmann, T., Tam, R.Y., Ballarin, B., Coles, B., Elliott Donaghue, I., van der Kooy, D., Nagy, A., Tator, C.H., Morshead, C.M., and Shoichet, M.S. (2016). Injectable hydrogel promotes early survival of induced pluripotent stem cell-derived oligodendrocytes and attenuates longterm teratoma formation in a spinal cord injury model. *Biomaterials* 83, 23–36.

Fung, M., Yuan, Y., Atkins, H., Shi, Q., and Bubela, T. (2017). Responsible Translation of Stem Cell Research: An Assessment of Clinical Trial Registration and Publications. *Stem Cell Reports* 8, 1190–1201.

Galipeau, J. (2013). The mesenchymal stromal cells dilemma--does a negative phase III trial of random donor mesenchymal stromal cells in steroid-resistant graft-versus-host disease represent a death knell or a bump in the road? *Cytherapy* 15, 2–8.

Gang, E.J., Jeong, J.A., Hong, S.H., Hwang, S.H., Kim, S.W., Yang, I.H., Ahn, C., Han, H., and Kim, H. (2004). Skeletal myogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from human umbilical cord blood. *Stem Cells* 22, 617–624.

Gang, E.J., Darabi, R., Bosnakovski, D., Xu, Z., Kamm, K.E., Kyba, M., and Perlingeiro, R.C.R. (2009). Engraftment of mesenchymal stem cells into dystrophin-deficient mice is not accompanied by functional recovery. *Exp. Cell Res.* 315, 2624–2636.

García-Gómez, I., Elvira, G., Zapata, A.G., Lamana, M.L., Ramírez, M., Castro, J.G., Arranz, M.G., Vicente, A., Bueren, J., and García-Olmo, D. (2010). Mesenchymal stem cells: biological properties and clinical applications. *Expert Opin. Biol. Ther.* 10, 1453–1468.

Geffner, L.F., Santacruz, P., Izurieta, M., Flor, L., Maldonado, B., Auad, A.H., Montenegro, X., Gonzalez, R., and Silva, F. (2008). Administration of autologous bone marrow stem cells into spinal cord injury patients via multiple routes is safe and improves their quality of life: comprehensive case studies. *Cell Transplant.* 17, 1277–1293.

Gharaibeh, B., Lu, A., Tebbets, J., Zheng, B., Feduska, J., Crisan, M., Péault, B., Cummins, J., and Huard, J. (2008). Isolation of a slowly adhering cell fraction containing stem cells from murine skeletal muscle by the preplate technique. *Nat. Protoc.* 3, 1501–1509.

Gilbert, P.M., Havenstrite, K.L., Magnusson, K.E.G., Sacco, A., Leonardi, N.A., Kraft, P., Nguyen, N.K., Thrun, S., Lutolf, M.P., and Blau, H.M. (2010). Substrate elasticity regulates skeletal muscle stem cell self-renewal in culture. *Science* 329, 1078–1081.

de Girolamo, L., Lucarelli, E., Alessandri, G., Avanzini, M.A., Bernardo, M.E., Biagi, E., Brini, A.T., D'Amico, G., Fagioli, F., Ferrero, I., et al. (2013). Mesenchymal stem/stromal

cells: a new cells as drugs'' paradigm. Efficacy and critical aspects in cell therapy. *Curr. Pharm. Des.* 19, 2459–2473.

Godier-Furnémont, A.F.G., Martens, T.P., Koeckert, M.S., Wan, L., Parks, J., Arai, K., Zhang, G., Hudson, B., Homma, S., and Vunjak-Novakovic, G. (2011). Composite scaffold provides a cell delivery platform for cardiovascular repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 7974–7979.

Goldring, C.E.P., Duffy, P.A., Benvenisty, N., Andrews, P.W., Ben-David, U., Eakins, R., French, N., Hanley, N.A., Kelly, L., Kitteringham, N.R., et al. (2011). Assessing the safety of stem cell therapeutics. *Cell Stem Cell* 8, 618–628.

Goodell, M.A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A.S., and Mulligan, R.C. (1996). Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J. Exp. Med.* 183, 1797–1806.

Greenhalgh, S.N., Iredale, J.P., and Henderson, N.C. (2013). Origins of fibrosis: pericytes take centre stage. *F1000Prime Rep.* 5.

Greider, C.W., and Blackburn, E.H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* 43, 405–413.

Griffiths, S., Baraniak, P.R., Copland, I.B., Nerem, R.M., and McDevitt, T.C. (2013). Human platelet lysate stimulates high-passage and senescent human multipotent mesenchymal stromal cell growth and rejuvenation in vitro. *Cytherapy* 15, 1469–1483.

Grinnemo, K.-H., Sylvén, C., Hovatta, O., Dellgren, G., and Corbascio, M. (2008). Immunogenicity of human embryonic stem cells. *Cell Tissue Res.* 331, 67–78.

Gronthos, S., Zannettino, A.C.W., Hay, S.J., Shi, S., Graves, S.E., Kortessidis, A., and Simmons, P.J. (2003). Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J. Cell Sci.* 116, 1827–1835.

Guérette, B., Asselin, I., Vilquin, J.T., Roy, R., and Tremblay, J.P. (1994). Lymphocyte infiltration following allo- and xenomyoblast transplantation in mice. *Transplant. Proc.* 26, 3461–3462.

Guiraud, S., and Davies, K.E. (2017). Pharmacological advances for treatment in Duchenne muscular dystrophy. *Curr. Opin. Pharmacol.* 34, 36–48.

Gussoni, E., Pavlath, G.K., Lanctot, A.M., Sharma, K.R., Miller, R.G., Steinman, L., and Blau, H.M. (1992). Normal dystrophin transcripts detected in Duchenne muscular dystrophy patients after myoblast transplantation. *Nature* 356, 435–438.

Gussoni, E., Soneoka, Y., Strickland, C.D., Buzney, E.A., Khan, M.K., Flint, A.F., Kunkel, L.M., and Mulligan, R.C. (1999). Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401, 390–394.

Hanley, P.J., Mei, Z., da Graca Cabreira-Hansen, M., Klis, M., Li, W., Zhao, Y., Durett, A.G., Zheng, X., Wang, Y., Gee, A.P., et al. (2013). Manufacturing mesenchymal stromal cells for phase I clinical trials. *Cytherapy* 15, 416–422.

Hawkins, K.E., Sharp, T. V., and McKay, T.R. (2013). The role of hypoxia in stem cell potency and differentiation. *Regen. Med.* 8, 771–782.

Hayflick, L. (1965). THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. *Exp. Cell Res.* 37, 614–636.

Hayflick, L., and Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 25, 585–621.

Heathman, T.R.J., Nienow, A.W., McCall, M.J., Coopman, K., Kara, B., and Hewitt, C.J. (2015). The translation of cell-based therapies: clinical landscape and manufacturing challenges. *Regen. Med.* 10, 49–64.

Heng, B.C., Li, J., Chen, A.K.-L., Reuveny, S., Cool, S.M., Birch, W.R., and Oh, S.K.-W. (2012). Translating human embryonic stem cells from 2-dimensional to 3-dimensional cultures in a defined medium on laminin- and vitronectin-coated surfaces. *Stem Cells Dev.* 21, 1701–1715.

Herberts, C.A., Kwa, M.S.G., and Hermsen, H.P.H. (2011). Risk factors in the development of stem cell therapy. *J. Transl. Med.* 9, 29.

Herbig, U., Jobling, W.A., Chen, B.P.C., Chen, D.J., and Sedivy, J.M. (2004). Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol. Cell* 14, 501–513.

Herrmann, J.L., Wang, Y., Abarbanell, A.M., Weil, B.R., Tan, J., and Meldrum, D.R. (2010). Preconditioning mesenchymal stem cells with transforming growth factor- α improves mesenchymal stem cell-mediated cardioprotection. *Shock* 33, 24–30.

Heslop, J.A., Hammond, T.G., Santeramo, I., Tort Piella, A., Hopp, I., Zhou, J., Baty, R., Graziano, E.I., Proto Marco, B., Caron, A., et al. (2015). Concise Review: Workshop Review: Understanding and Assessing the Risks of Stem Cell-Based Therapies: Safety of Stem Cell Therapeutics. *Stem Cells Transl. Med.* 4, 389–400.

Hiyama, E., and Hiyama, K. (2007). Telomere and telomerase in stem cells. *Br. J. Cancer* 96, 1020–1024.

Ho, A.D., Wagner, W., and Mahlknecht, U. (2005). Stem cells and ageing. The potential of stem cells to overcome age-related deteriorations of the body in regenerative medicine. *EMBO Rep.* 6 *Spec No*, S35-38.

Hocquet, D., Sauget, M., Roussel, S., Malugani, C., Pouthier, F., Morel, P., Gbaguidi-Haore, H., Bertrand, X., and Grenouillet, F. (2014). Validation of an automated blood culture system for sterility testing of cell therapy products. *Cytotherapy* 16, 692–698.

Hoffman, E.P., Brown, R.H., and Kunkel, L.M. (1987). Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51, 919–928.

Hollinger, K., Yang, C.X., Montz, R.E., Nonneman, D., Ross, J.W., and Selsby, J.T. (2014). Dystrophin insufficiency causes selective muscle histopathology and loss of dystrophin-glycoprotein complex assembly in pig skeletal muscle. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 28, 1600–1609.

Horn, P., Bokermann, G., Cholewa, D., Bork, S., Walenda, T., Koch, C., Drescher, W., Hutschenreuther, G., Zenke, M., Ho, A.D., et al. (2010). Impact of individual platelet lysates on isolation and growth of human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 12, 888–898.

Horwitz, E.M., Gordon, P.L., Koo, W.K.K., Marx, J.C., Neel, M.D., McNall, R.Y., Muul, L., and Hofmann, T. (2002). Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 8932–8937.

Huard, J., Tremblay, G., Verreault, S., Labrecque, C., and Tremblay, J.P. (1993). Utilization of an antibody specific for human dystrophin to follow myoblast transplantation in nude mice. *Cell Transplant.* 2, 113–118.

Huard, J., Verreault, S., Roy, R., Tremblay, M., and Tremblay, J.P. (1994). High efficiency of muscle regeneration after human myoblast clone transplantation in SCID mice. *J. Clin. Invest.* 93, 586–599.

Huard, J., Cao, B., and Qu-Petersen, Z. (2003). Muscle-derived stem cells: potential for muscle regeneration. *Birth Defects Res. Part C, Embryo Today Rev.* 69, 230–237.

Ikeda, K., Nagata, S., Okitsu, T., and Takeuchi, S. (2017). Cell fiber-based three-dimensional culture system for highly efficient expansion of human induced pluripotent stem cells. *Sci. Rep.* 7.

Itahana, K., Campisi, J., and Dimri, G.P. (2004). Mechanisms of cellular senescence in human and mouse cells. *Biogerontology* 5, 1–10.

Itahana, K., Itahana, Y., and Dimri, G.P. (2013). Colorimetric detection of senescence-associated β galactosidase. *Methods Mol. Biol.* 965, 143–156.

Iwańczak, F., Stawarski, A., Potyrała, M., Siedlecka-Dawidko, J., and Agrawal, G.S. (2000). Early symptoms of Duchenne muscular dystrophy--description of cases of an 18-month-old and an 8-year-old patient. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 6, 592–595.

Jackson, J.G., and Pereira-Smith, O.M. (2006). p53 is preferentially recruited to the promoters of growth arrest genes p21 and GADD45 during replicative senescence of normal human fibroblasts. *Cancer Res.* 66, 8356–8360.

Jacobs, J.J.L., and de Lange, T. (2004). Significant role for p16INK4a in p53-independent telomere-directed senescence. *Curr. Biol. CB* 14, 2302–2308.

Jacobs, K., Zambelli, F., Mertzaniidou, A., Smolders, I., Geens, M., Nguyen, H.T., Barbé, L., Sermon, K., and Spits, C. (2016). Higher-Density Culture in Human Embryonic Stem Cells Results in DNA Damage and Genome Instability. *Stem Cell Reports* 6, 330–341.

Jang, T.H., Park, S.C., Yang, J.H., Kim, J.Y., Seok, J.H., Park, U.S., Choi, C.W., Lee, S.R., and Han, J. (2017). Cryopreservation and its clinical applications. *Integr. Med. Res.* 6, 12–18.

Jankowski, R.J., Haluszczak, C., Trucco, M., and Huard, J. (2001). Flow cytometric

characterization of myogenic cell populations obtained via the preplate technique: potential for rapid isolation of muscle-derived stem cells. *Hum. Gene Ther.* *12*, 619–628.

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

Jin, H., Bae, Y., Kim, M., Kwon, S.-J., Jeon, H., Choi, S., Kim, S., Yang, Y., Oh, W., and Chang, J. (2013). Comparative Analysis of Human Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Adipose Tissue, and Umbilical Cord Blood as Sources of Cell Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 17986–18001.

Jin, X., Xu, Q., Champion, K., and Kruth, H.S. (2015). Endotoxin contamination of apolipoprotein A-I: effect on macrophage proliferation--a cautionary tale. *Atherosclerosis* *240*, 121–124.

Jin, Y., Kato, T., Furu, M., Nasu, A., Kajita, Y., Mitsui, H., Ueda, M., Aoyama, T., Nakayama, T., Nakamura, T., et al. (2010). Mesenchymal stem cells cultured under hypoxia escape from senescence via down-regulation of p16 and extracellular signal regulated kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *391*, 1471–1476.

Jochems, C.E.A., van der Valk, J.B.F., Stafleu, F.R., and Baumans, V. (2002). The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? *Altern. to Lab. Anim. ATLA* *30*, 219–227.

Jung, J.W., Kwon, M., Choi, J.C., Shin, J.W., Park, I.W., Choi, B.W., and Kim, J.Y. (2013). Familial occurrence of pulmonary embolism after intravenous, adipose tissue-derived stem cell therapy. *Yonsei Med. J.* *54*, 1293–1296.

Jung, S., Sen, A., Rosenberg, L., and Behie, L.A. (2010). Identification of growth and attachment factors for the serum-free isolation and expansion of human mesenchymal stromal cells. *Cytherapy* *12*, 637–657.

Jurgielewicz, P., Harmsen, S., Wei, E., Bachmann, M.H., Ting, R., and Aras, O. (2017). New imaging probes to track cell fate: reporter genes in stem cell research. *Cell. Mol. Life Sci. C*.

Kainer, M.A., Linden, J. V., Whaley, D.N., Holmes, H.T., Jarvis, W.R., Jernigan, D.B., and Archibald, L.K. (2004). Clostridium infections associated with musculoskeletal-tissue allografts. *N. Engl. J. Med.* *350*, 2564–2571.

Kaplan, A., Sackett, K., Sumstad, D., Kadidlo, D., and McKenna, D.H. (2017). Impact of starting material (fresh versus cryopreserved marrow) on mesenchymal stem cell culture. *Transfusion*.

Karantalis, V., Schulman, I.H., Balkan, W., and Hare, J.M. (2015). Allogeneic Cell Therapy: A New Paradigm in Therapeutics. *Circ. Res.* *116*, 12–15.

Kelly, O.G., Chan, M.Y., Martinson, L.A., Kadoya, K., Ostertag, T.M., Ross, K.G., Richardson, M., Carpenter, M.K., D'Amour, K.A., Kroon, E., et al. (2011). Cell-surface markers for the isolation of pancreatic cell types derived from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* *29*, 750–756.

Khirani, S., Ramirez, A., Aubertin, G., Boulé, M., Chemouny, C., Forin, V., and Fauroux, B. (2014). Respiratory muscle decline in Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr. Pulmonol.* *49*, 473–481.

Kim, D.S., Ko, Y.J., Lee, M.W., Park, H.J., Park, Y.J., Kim, D.-I., Sung, K.W., Koo, H.H., and Yoo, K.H. (2016). Effect of low oxygen tension on the biological characteristics of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Stress Chaperones* *21*, 1089–1099.

Kimbrel, E.A., and Lanza, R. (2015). Current status of pluripotent stem cells: moving the first therapies to the clinic. *Nat. Rev. Drug Discov.* *14*, 681–692.

King, W.M., Ruttencutter, R., Nagaraja, H.N., Matkovic, V., Landoll, J., Hoyle, C., Mendell, J.R., and Kissel, J.T. (2007). Orthopedic outcomes of long-term daily corticosteroid treatment in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* *68*, 1607–1613.

Kinoshita, I., Vilquin, J.T., Guérette, B., Asselin, I., Roy, R., and Tremblay, J.P. (1994). Very efficient myoblast allotransplantation in mice under FK506 immunosuppression. *Muscle Nerve* *17*, 1407–1415.

Kircher, M.F., Gambhir, S.S., and Grimm, J. (2011). Noninvasive cell-tracking methods. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *8*, 677–688.

Klymiuk, N., Blutke, A., Graf, A., Krause, S., Burkhardt, K., Wuensch, A., Krebs, S., Kessler, B., Zakhartchenko, V., Kurome, M., et al. (2013). Dystrophin-deficient pigs provide new insights into the hierarchy of physiological derangements of dystrophic muscle. *Hum. Mol. Genet.* *22*, 4368–4382.

Knoepfler, P.S. (2009). Deconstructing stem cell tumorigenicity: a roadmap to safe regenerative medicine. *Stem Cells* *27*, 1050–1056.

Kobayashi, T., Watanabe, H., Yanagawa, T., Tsutsumi, S., Kayakabe, M., Shinozaki, T., Higuchi, H., and Takagishi, K. (2005). Motility and growth of human bone-marrow mesenchymal stem cells during ex vivo expansion in autologous serum. *J. Bone Joint Surg. Br.* *87*, 1426–1433.

Kocaoemer, A., Kern, S., Klüter, H., and Bieback, K. (2007). Human AB serum and thrombin-activated platelet-rich plasma are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Stem Cells* *25*, 1270–1278.

Koenig, M., Monaco, A.P., and Kunkel, L.M. (1988). The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* *53*, 219–228.

Kolios, G., and Moodley, Y. (2013). Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration.* *85*, 3–10.

Kornegay, J.N. (2017). The golden retriever model of Duchenne muscular dystrophy. *Skelet. Muscle* *7*, 9.

Kovacic, J.C., Moreno, P., Hachinski, V., Nabel, E.G., and Fuster, V. (2011). Cellular senescence, vascular disease, and aging: Part 1 of a 2-part review. *Circulation* *123*, 1650–1660.

Krauss, R.S., Cole, F., Gaio, U., Takaesu, G., Zhang, W., and Kang, J.-S. (2005). Close encounters: regulation of vertebrate skeletal myogenesis by cell-cell contact. *J. Cell Sci.* *118*, 2355–2362.

Kuhr, C.S., Lupu, M., and Storb, R. (2007). Hematopoietic cell transplantation directly into dystrophic muscle fails to reconstitute satellite cells and myofibers. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* *13*, 886–888.

Kuilman, T., and Peeper, D.S. (2009). Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 81–94.

Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2010). The essence of senescence. *Genes Dev.* *24*, 2463–2479.

Kumagai, H., Suemori, H., Uesugi, M., Nakatsuji, N., and Kawase, E. (2013). Identification of small molecules that promote human embryonic stem cell self-renewal. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *434*, 710–716.

Kumar, A., Takada, Y., Boriek, A.M., and Aggarwal, B.B. (2004). Nuclear factor- κ B: its role in health and disease. *J. Mol. Med. (Berl)*. *82*, 434–448.

Kumar, D., Anand, T., and Kues, W.A. (2017). Clinical potential of human-induced pluripotent stem cells : Perspectives of induced pluripotent stem cells. *Cell Biol. Toxicol.* *33*, 99–112.

Kuroda, T., Yasuda, S., Kusakawa, S., Hirata, N., Kanda, Y., Suzuki, K., Takahashi, M., Nishikawa, S.-I., Kawamata, S., and Sato, Y. (2012). Highly sensitive in vitro methods for detection of residual undifferentiated cells in retinal pigment epithelial cells derived from human iPS cells. *PLoS One* *7*, e37342.

Kurtz, A. (2008). Mesenchymal stem cell delivery routes and fate. *Int. J. Stem Cells* *1*, 1–7.

Kurz, D.J., Decary, S., Hong, Y., and Erusalimsky, J.D. (2000). Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J. Cell Sci.* *113 (Pt 2)*, 3613–3622.

Kuznetsov, S.A., Mankani, M.H., and Robey, P.G. (2000). Effect of serum on human bone marrow stromal cells: ex vivo expansion and in vivo bone formation. *Transplantation* *70*, 1780–1787.

Kyllönen, L., Haimi, S., Mannerström, B., Huhtala, H., Rajala, K.M., Skottman, H., Sándor, G.K., and Miettinen, S. (2013). Effects of different serum conditions on osteogenic differentiation of human adipose stem cells in vitro. *Stem Cell Res. Ther.* *4*, 17.

Kyttälä, A., Moraghebi, R., Valensisi, C., Kettunen, J., Andrus, C., Pasumarthy, K.K., Nakanishi, M., Nishimura, K., Ohtaka, M., Weltner, J., et al. (2016). Genetic Variability Overrides the Impact of Parental Cell Type and Determines iPSC Differentiation Potential. *Stem Cell Reports* *6*, 200–212.

de la Garza-Rodea, A.S., van der Velde, I., Boersma, H., Gonçalves, M.A.F. V., van Bekkum, D.W., de Vries, A.A.F., and Knaän-Shanzer, S. (2011). Long-term contribution of

human bone marrow mesenchymal stromal cells to skeletal muscle regeneration in mice. *Cell Transplant.* 20, 217–231.

LaBarge, M.A., and Blau, H.M. (2002). Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell* 111, 589–601.

Laing, N.G., Davis, M.R., Bayley, K., Fletcher, S., and Wilton, S.D. (2011). Molecular diagnosis of duchenne muscular dystrophy: past, present and future in relation to implementing therapies. *Clin. Biochem. Rev.* 32, 129–134.

Lancaster, M.A., Renner, M., Martin, C.-A., Wenzel, D., Bicknell, L.S., Hurles, M.E., Homfray, T., Penninger, J.M., Jackson, A.P., and Knoblich, J.A. (2013). Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* 501, 373–379.

Lapan, A.D., Rozkalne, A., and Gussoni, E. (2012). Human fetal skeletal muscle contains a myogenic side population that expresses the melanoma cell-adhesion molecule. *Hum. Mol. Genet.* 21, 3668–3680.

Lapidos, K.A., Kakkar, R., and McNally, E.M. (2004). The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. *Circ. Res.* 94, 1023–1031.

Larcher, T., Lafoux, A., Tesson, L., Remy, S., Thepenier, V., François, V., Le Guiner, C., Goubin, H., Dutilleul, M., Guigand, L., et al. (2014). Characterization of dystrophin deficient rats: a new model for Duchenne muscular dystrophy. *PLoS One* 9, e110371.

Lardenois, A., Jagot, S., Lagarrigue, M., Guével, B., Ledevin, M., Larcher, T., Dubreil, L., Pineau, C., Rouger, K., and Guével, L. (2016). Quantitative proteome profiling of dystrophic dog skeletal muscle reveals a stabilized muscular architecture and protection against oxidative stress after systemic delivery of MuStem cells. *Proteomics* 16, 2028–2042.

Lavasani, M., Lu, A., Thompson, S.D., Robbins, P.D., Huard, J., and Niedernhofer, L.J. (2013). Isolation of muscle-derived stem/progenitor cells based on adhesion characteristics to collagen-coated surfaces. *Methods Mol. Biol.* 976, 53–65.

Lawless, C., Wang, C., Jurk, D., Merz, A., Zglinicki, T. von, and Passos, J.F. (2010). Quantitative assessment of markers for cell senescence. *Exp. Gerontol.* 45, 772–778.

Lazennec, G., and Jorgensen, C. (2008). Concise review: adult multipotent stromal cells and cancer: risk or benefit? *Stem Cells* 26, 1387–1394.

Lei, H., Gui, L., and Xiao, R. (2009). The effect of anticoagulants on the quality and biological efficacy of platelet-rich plasma. *Clin. Biochem.* 42, 1452–1460.

Leibowitz, D., and Dubowitz, V. (1981). Intellect and behaviour in Duchenne muscular dystrophy. *Dev. Med. Child Neurol.* 23, 577–590.

Di Leonardo, A., Linke, S.P., Clarkin, K., and Wahl, G.M. (1994). DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev.* 8, 2540–2551.

Lesault, P.-F., Theret, M., Magnan, M., Cuvellier, S., Niu, Y., Gherardi, R.K.,

Tremblay, J.P., Hittinger, L., and Chazaud, B. (2012). Macrophages improve survival, proliferation and migration of engrafted myogenic precursor cells into MDX skeletal muscle. *PLoS One* 7, e46698.

Leung, H.W., Chen, A., Choo, A.B.H., Reuveny, S., and Oh, S.K.W. (2011). Agitation can induce differentiation of human pluripotent stem cells in microcarrier cultures. *Tissue Eng. Part C. Methods* 17, 165–172.

Levy, M.Z., Allsopp, R.C., Futcher, A.B., Greider, C.W., and Harley, C.B. (1992). Telomere end-replication problem and cell aging. *J. Mol. Biol.* 225, 951–960.

Lewis, F.C., Henning, B.J., Marazzi, G., Sassoon, D., Ellison, G.M., and Nadal-Ginard, B. (2014). Porcine skeletal muscle-derived multipotent PW1pos/Pax7neg interstitial cells: isolation, characterization, and long-term culture. *Stem Cells Transl. Med.* 3, 702–712.

Li, M.D., Atkins, H., and Bubela, T. (2014). The global landscape of stem cell clinical trials. *Regen. Med.* 9, 27–39.

Liu, L., Yuan, W., and Wang, J. (2010). Mechanisms for osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells induced by fluid shear stress. *Biomech. Model. Mechanobiol.* 9, 659–670.

Liu, S., Zhou, J., Zhang, X., Liu, Y., Chen, J., Hu, B., Song, J., and Zhang, Y. (2016). Strategies to Optimize Adult Stem Cell Therapy for Tissue Regeneration. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 982.

Liu, W., Wen, Y., Bi, P., Lai, X., Liu, X.S., Liu, X., and Kuang, S. (2012). Hypoxia promotes satellite cell self-renewal and enhances the efficiency of myoblast transplantation. *Development* 139, 2857–2865.

Liu, Y., Yan, X., Sun, Z., Chen, B., Han, Q., Li, J., and Zhao, R.C. (2007). Flk-1+ adipose-derived mesenchymal stem cells differentiate into skeletal muscle satellite cells and ameliorate muscular dystrophy in mdx mice. *Stem Cells Dev.* 16, 695–706.

Llobet, L., Montoya, J., López-Gallardo, E., and Ruiz-Pesini, E. (2015). Side Effects of Culture Media Antibiotics on Cell Differentiation. *Tissue Eng. Part C. Methods* 21, 1143–1147.

Lohmann, M., Walenda, G., Hemedá, H., Jousen, S., Drescher, W., Jockenhoevel, S., Hutschenreuter, G., Zenke, M., and Wagner, W. (2012). Donor age of human platelet lysate affects proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells. *PLoS One* 7, e37839.

Lorant, J., Saury, C., Schleder, C., Robriquet, F., Lieubeau, B., Negroni, E., Leroux, I., Chabrand, L., Viau, S., Babarit, C., et al. (2017). Skeletal muscle regenerative potential of human MuStem cells following transplantation into injured mice muscle. *Mol. Ther.*, in press

Lucarelli, E., Beccheroni, A., Donati, D., Sangiorgi, L., Cenacchi, A., Del Vento, A.M., Meotti, C., Bertoja, A.Z., Giardino, R., Fornasari, P.M., et al. (2003). Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. *Biomaterials* 24, 3095–3100.

Ludwig, T.E., Levenstein, M.E., Jones, J.M., Berggren, W.T., Mitchen, E.R., Frane,

J.L., Crandall, L.J., Daigh, C.A., Conard, K.R., Piekarczyk, M.S., et al. (2006). Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat. Biotechnol.* *24*, 185–187.

Lukas, J., Parry, D., Aagaard, L., Mann, D.J., Bartkova, J., Strauss, M., Peters, G., and Bartek, J. (1995). Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *Nature* *375*, 503–506.

Luzzani, C., Neiman, G., Garate, X., Questa, M., Solari, C., Fernandez Espinosa, D., García, M., Errecalde, A.L., Guberman, A., Scassa, M.E., et al. (2015). A therapy-grade protocol for differentiation of pluripotent stem cells into mesenchymal stem cells using platelet lysate as supplement. *Stem Cell Res. Ther.* *6*, 6.

Mah, J.K. (2016). Current and emerging treatment strategies for Duchenne muscular dystrophy. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* *12*, 1795–1807.

Maitra, A., Arking, D.E., Shivapurkar, N., Ikeda, M., Stastny, V., Kassaei, K., Sui, G., Cutler, D.J., Liu, Y., Brimble, S.N., et al. (2005). Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. *Nat. Genet.* *37*, 1099–1103.

Mannello, F., and Tonti, G.A. (2007). Concise review: no breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum replacement nonconditioned medium, o. *Stem Cells* *25*, 1603–1609.

Marcotte, R., Lacelle, C., and Wang, E. (2004). Senescent fibroblasts resist apoptosis by downregulating caspase-3. *Mech. Ageing Dev.* *125*, 777–783.

Mason, C., and Dunnill, P. (2009). Assessing the value of autologous and allogeneic cells for regenerative medicine. *Regen. Med.* *4*, 835–853.

Mason, C., and Hoare, M. (2007). Regenerative medicine bioprocessing: building a conceptual framework based on early studies. *Tissue Eng.* *13*, 301–311.

Mason, C., Brindley, D.A., Culme-Seymour, E.J., and Davie, N.L. (2011). Cell therapy industry: billion dollar global business with unlimited potential. *Regen. Med.* *6*, 265–272.

Masoudi, E., Ribas, J., Kaushik, G., Leijten, J., and Khademhosseini, A. (2016). Platelet-Rich Blood Derivatives for Stem Cell-Based Tissue Engineering and Regeneration. *Curr. Stem Cell Reports* *2*, 33–42.

Mauro, A. (1961). Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* *9*, 493–495.

McDevitt, T.C., and Palecek, S.P. (2008). Innovation in the culture and derivation of pluripotent human stem cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* *19*, 527–533.

Meirelles, L. da S., Fontes, A.M., Covas, D.T., and Caplan, A.I. (2009). Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* *20*, 419–427.

Mendell, J.R., Kissel, J.T., Amato, A.A., King, W., Signore, L., Prior, T.W., Sahenk,

Z., Benson, S., McAndrew, P.E., and Rice, R. (1995). Myoblast transfer in the treatment of Duchenne's muscular dystrophy. *N. Engl. J. Med.* 333, 832–838.

Mendicino, M., Bailey, A.M., Wonnacott, K., Puri, R.K., and Bauer, S.R. (2014). MSC-Based Product Characterization for Clinical Trials: An FDA Perspective. *Cell Stem Cell* 14, 141–145.

Meng, J., Muntoni, F., and Morgan, J.E. (2011). Stem cells to treat muscular dystrophies - where are we? *Neuromuscul. Disord.* NMD 21, 4–12.

Meng, J., Chun, S., Asfahani, R., Lochmüller, H., Muntoni, F., and Morgan, J. (2014). Human Skeletal Muscle-derived CD133+ Cells Form Functional Satellite Cells After Intramuscular Transplantation in Immunodeficient Host Mice. *Mol. Ther.* 22, 1008–1017.

Meng, J., Bencze, M., Asfahani, R., Muntoni, F., and Morgan, J.E. (2015). The effect of the muscle environment on the regenerative capacity of human skeletal muscle stem cells. *Skelet. Muscle* 5, 11.

Meyers, V.E., Zayzafoon, M., Douglas, J.T., and McDonald, J.M. (2005). RhoA and cytoskeletal disruption mediate reduced osteoblastogenesis and enhanced adipogenesis of human mesenchymal stem cells in modeled microgravity. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 20, 1858–1866.

Di Micco, R., Fumagalli, M., and d'Adda di Fagagna, F. (2007). Breaking news: high-speed race ends in arrest--how oncogenes induce senescence. *Trends Cell Biol.* 17, 529–536.

Mimeault, M., Hauke, R., and Batra, S.K. (2007). Stem cells: a revolution in therapeutics-recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies. *Clin. Pharmacol. Ther.* 82, 252–264.

Mitchell, K.J., Pannérec, A., Cadot, B., Parlakian, A., Besson, V., Gomes, E.R., Marazzi, G., and Sassoon, D.A. (2010). Identification and characterization of a non-satellite cell muscle resident progenitor during postnatal development. *Nat. Cell Biol.* 12, 257–266.

Miyagoe-Suzuki, Y., and Takeda, S. (2017). Skeletal muscle generated from induced pluripotent stem cells - induction and application. *World J. Stem Cells* 9, 89–97.

Moat, S.J., Bradley, D.M., Salmon, R., Clarke, A., and Hartley, L. (2013). Newborn bloodspot screening for Duchenne muscular dystrophy: 21 years experience in Wales (UK). *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 21, 1049–1053.

Moiseeva, O., Mallette, F.A., Mukhopadhyay, U.K., Moores, A., and Ferbeyre, G. (2006). DNA damage signaling and p53-dependent senescence after prolonged beta-interferon stimulation. *Mol. Biol. Cell* 17, 1583–1592.

Montarras, D., Morgan, J., Collins, C., Relaix, F., Zaffran, S., Cumano, A., Partridge, T., and Buckingham, M. (2005). Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration. *Science* 309, 2064–2067.

Motohashi, N., Uezumi, A., Yada, E., Fukada, S., Fukushima, K., Imaizumi, K., Miyagoe-Suzuki, Y., and Takeda, S. (2008). Muscle CD31(–) CD45(–) Side Population Cells Promote Muscle Regeneration by Stimulating Proliferation and Migration of Myoblasts. *Am.*

J. Pathol. *173*, 781–791.

Mueller, G.M., O'Day, T., Watchko, J.F., and Ontell, M. (2002). Effect of injecting primary myoblasts versus putative muscle-derived stem cells on mass and force generation in mdx mice. *Hum. Gene Ther.* *13*, 1081–1090.

Muraca, M., Piccoli, M., Franzin, C., Tolomeo, A.M., Jurga, M., Pozzobon, M., and Perilongo, G. (2017). Diverging Concepts and Novel Perspectives in Regenerative Medicine. *Int. J. Mol. Sci.* *18*.

Nakamura, K., Fujii, W., Tsuboi, M., Tanihata, J., Teramoto, N., Takeuchi, S., Naito, K., Yamanouchi, K., and Nishihara, M. (2014). Generation of muscular dystrophy model rats with a CRISPR/Cas system. *Sci. Rep.* *4*, 5635.

Nakamura, Y., Miyaki, S., Ishitobi, H., Matsuyama, S., Nakasa, T., Kamei, N., Akimoto, T., Higashi, Y., and Ochi, M. (2015). Mesenchymal-stem-cell-derived exosomes accelerate skeletal muscle regeneration. *FEBS Lett.* *589*, 1257–1265.

Nance, M.E., Hakim, C.H., Yang, N.N., and Duan, D. (2017). Nanotherapy for Duchenne muscular dystrophy: Nanotherapy for Duchenne muscular dystrophy. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* e1472.

Narita, M., Núñez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A.W., Hearn, S.A., Spector, D.L., Hannon, G.J., and Lowe, S.W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* *113*, 703–716.

Negrone, E., Riederer, I., Chaouch, S., Belicchi, M., Razini, P., Di Santo, J., Torrente, Y., Butler-Browne, G.S., and Mouly, V. (2009). In vivo myogenic potential of human CD133+ muscle-derived stem cells: a quantitative study. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *17*, 1771–1778.

Negrone, E., Bigot, A., Butler-Browne, G.S., Trollet, C., and Mouly, V. (2016). Cellular Therapies for Muscular Dystrophies: Frustrations and Clinical Successes. *Hum. Gene Ther.* *27*, 117–126.

Neofytou, E., O'Brien, C.G., Couture, L.A., and Wu, J.C. (2015). Hurdles to clinical translation of human induced pluripotent stem cells. *J. Clin. Invest.* *125*, 2551–2557.

Neumüller, R.A., and Knoblich, J.A. (2009). Dividing cellular asymmetry: asymmetric cell division and its implications for stem cells and cancer. *Genes Dev.* *23*, 2675–2699.

Ngen, E.J., and Artemov, D. (2017). Advances in Monitoring Cell-Based Therapies with Magnetic Resonance Imaging: Future Perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* *18*.

Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanese, M., Longoni, P.D., Matteucci, P., Grisanti, S., and Gianni, A.M. (2002). Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* *99*, 3838–3843.

Nienow, A.W., Rafiq, Q.A., Coopman, K., and Hewitt, C.J. (2014). A potentially scalable method for the harvesting of hMSCs from microcarriers. *Biochem. Eng. J.* *85*, 79–88.

Nigro, G., Comi, L.I., Politano, L., and Bain, R.J. (1990). The incidence and evolution of cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy. *Int. J. Cardiol.* 26, 271–277.

Nikolaev, N.I., Liu, Y., Hussein, H., and Williams, D.J. (2012). The sensitivity of human mesenchymal stem cells to vibration and cold storage conditions representative of cold transportation. *J. R. Soc. Interface* 9, 2503–2515.

Nishio, K., Inoue, A., Qiao, S., Kondo, H., and Mimura, A. (2001). Senescence and cytoskeleton: overproduction of vimentin induces senescent-like morphology in human fibroblasts. *Histochem. Cell Biol.* 116, 321–327.

Nold, P., Brendel, C., Neubauer, A., Bein, G., and Hackstein, H. (2013). Good manufacturing practice-compliant animal-free expansion of human bone marrow derived mesenchymal stroma cells in a closed hollow-fiber-based bioreactor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430, 325–330.

Noviello, M., Tedesco, F.S., Bondanza, A., Tonlorenzi, R., Rosaria Carbone, M., Gerli, M.F.M., Markt, S., Napolitano, S., Cicalese, M.P., Ciceri, F., et al. (2014). Inflammation converts human mesoangioblasts into targets of alloreactive immune responses: implications for allogeneic cell therapy of DMD. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 22, 1342–1352.

Ohtani, N., Zebedee, Z., Huot, T.J., Stinson, J.A., Sugimoto, M., Ohashi, Y., Sharrocks, A.D., Peters, G., and Hara, E. (2001). Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence. *Nature* 409, 1067–1070.

Ojima, K., Uezumi, A., Miyoshi, H., Masuda, S., Morita, Y., Fukase, A., Hattori, A., Nakauchi, H., Miyagoe-Suzuki, Y., and Takeda, S. (2004). Mac-1(low) early myeloid cells in the bone marrow-derived SP fraction migrate into injured skeletal muscle and participate in muscle regeneration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321, 1050–1061.

Okamoto, O.K., Carvalho, A.C.S.R., Marti, L.C., Vêncio, R.Z., and Moreira-Filho, C.A. (2007). Common molecular pathways involved in human CD133+/CD34+ progenitor cell expansion and cancer. *Cancer Cell Int.* 7, 11.

Olovnikov, A.M. (1973). A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J. Theor. Biol.* 41, 181–190.

Outten, J.T., Cheng, X., Gadue, P., French, D.L., and Diamond, S.L. (2011). A high-throughput multiplexed screening assay for optimizing serum-free differentiation protocols of human embryonic stem cells. *Stem Cell Res.* 6, 129–142.

Packer, L., and Fuehr, K. (1977). Low oxygen concentration extends the lifespan of cultured human diploid cells. *Nature* 267, 423–425.

Panch, S.R., Szymanski, J., Savani, B.N., and Stroncek, D.F. (2017). Sources of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells and Methods to Optimize Yields for Clinical Cell Therapy. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* 23, 1241–1249.

Pannérec, A., Formicola, L., Besson, V., Marazzi, G., and Sassoon, D.A. (2013).

Defining skeletal muscle resident progenitors and their cell fate potentials. *Development* *140*, 2879–2891.

Parker, M.H., Kuhr, C., Tapscott, S.J., and Storb, R. (2008). Hematopoietic cell transplantation provides an immune-tolerant platform for myoblast transplantation in dystrophic dogs. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *16*, 1340–1346.

Parrinello, S., Samper, E., Krtolica, A., Goldstein, J., Melov, S., and Campisi, J. (2003). Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat. Cell Biol.* *5*, 741–747.

Partridge, T.A. (2013). The mdx mouse model as a surrogate for Duchenne muscular dystrophy. *FEBS J.* *280*, 4177–4186.

Partridge, T.A., Morgan, J.E., Coulton, G.R., Hoffman, E.P., and Kunkel, L.M. (1989). Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts. *Nature* *337*, 176–179.

Passamano, L., Taglia, A., Palladino, A., Viggiano, E., D'Ambrosio, P., Scutifero, M., Rosaria Cecio, M., Torre, V., DE Luca, F., Picillo, E., et al. (2012). Improvement of survival in Duchenne Muscular Dystrophy: retrospective analysis of 835 patients. *Acta Myol. Myopathies Cardiomyopathies Off. J. Mediterr. Soc. Myol.* *31*, 121–125.

Patrikoski, M., Juntunen, M., Boucher, S., Campbell, A., Vemuri, M.C., Mannerström, B., and Miettinen, S. (2013). Development of fully defined xeno-free culture system for the preparation and propagation of cell therapy-compliant human adipose stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* *4*, 27.

Pellegrini, K.L., and Beilharz, M.W. (2011). The survival of myoblasts after intramuscular transplantation is improved when fewer cells are injected. *Transplantation* *91*, 522–526.

Pendergrass, K.D., Boopathy, A. V., Seshadri, G., Maiellaro-Rafferty, K., Che, P.L., Brown, M.E., and Davis, M.E. (2013). Acute preconditioning of cardiac progenitor cells with hydrogen peroxide enhances angiogenic pathways following ischemia-reperfusion injury. *Stem Cells Dev.* *22*, 2414–2424.

Penton, C.M., Badarinarayana, V., Prisco, J., Powers, E., Pincus, M., Allen, R.E., and August, P.R. (2016). Laminin 521 maintains differentiation potential of mouse and human satellite cell-derived myoblasts during long-term culture expansion. *Skelet. Muscle* *6*, 44.

Perez, A.L., Bachrach, E., Illigens, B.M.W., Jun, S.J., Bagden, E., Steffen, L., Flint, A., McGowan, F.X., Del Nido, P., Montecino-Rodriguez, E., et al. (2009). CXCR4 enhances engraftment of muscle progenitor cells. *Muscle Nerve* *40*, 562–572.

Peters, J.H., Preijers, F.W., Woestenenk, R., Hilbrands, L.B., Koenen, H.J.P.M., and Joosten, I. (2008). Clinical Grade Treg: GMP Isolation, Improvement of Purity by CD127pos Depletion, Treg Expansion, and Treg Cryopreservation. *PLoS One* *3*, e3161.

Petrof, B.J., Shrager, J.B., Stedman, H.H., Kelly, A.M., and Sweeney, H.L. (1993). Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 3710–3714.

Phinney, D.G., and Sensebé, L. (2013). Mesenchymal stromal cells: misconceptions and evolving concepts. *Cytotherapy* 15, 140–145.

Pimpaneau, V., Gianelli, F., Trouvin, J.-H., and Dupraz-Poiseau, A. (2015). The challenges of potency assay development for cell-based medicinal products in Europe.

Pinheiro, J.C., and Bates, D. (2009). *Mixed-Effects Models in S and S-PLUS* (Springer Science & Business Media).

Placzek, M.R., Chung, I.-M., Macedo, H.M., Ismail, S., Mortera Blanco, T., Lim, M., Cha, J.M., Fauzi, I., Kang, Y., Yeo, D.C.L., et al. (2009). Stem cell bioprocessing: fundamentals and principles. *J. R. Soc. Interface* 6, 209–232.

Poloni, A., Maurizi, G., Serrani, F., Mancini, S., Discepoli, G., Tranquilli, A.L., Bencivenga, R., and Leoni, P. (2012). Human AB serum for generation of mesenchymal stem cells from human chorionic villi: comparison with other source and other media including platelet lysate. *Cell Prolif.* 45, 66–75.

Prado-Lopez, S., Conesa, A., Armijo, A., Martínez-Losa, M., Escobedo-Lucea, C., Gandia, C., Tarazona, S., Melguizo, D., Blesa, D., Montaner, D., et al. (2009). Hypoxia Promotes Efficient Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Functional Endothelium. *Stem Cells* N/A-N/A.

Preynat-Seauve, O., and Krause, K.-H. (2011). Stem cell sources for regenerative medicine: the immunological point of view. *Semin. Immunopathol.* 33, 519–524.

Pytlík, R., Slanar, O., Stehlik, D., and Matejková, E. (2011). Production of Clinical Grade Mesenchymal Stromal Cells. In *Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials*, p. 145–178, InTech.

Qiagen Muscular Dystrophies and Dystrophin-Glycoprotein Complex.

Qu, Z., Balkir, L., van Deutekom, J.C., Robbins, P.D., Pruchnic, R., and Huard, J. (1998). Development of approaches to improve cell survival in myoblast transfer therapy. *J. Cell Biol.* 142, 1257–1267.

Qu-Petersen, Z., Deasy, B., Jankowski, R., Ikezawa, M., Cummins, J., Pruchnic, R., Mytinger, J., Cao, B., Gates, C., Wernig, A., et al. (2002). Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *J. Cell Biol.* 157, 851–864.

Quirici, N., Soligo, D., Bossolasco, P., Servida, F., Lumini, C., and Deliliers, G.L. (2002). Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp. Hematol.* 30, 783–791.

Raab, S., Klingenstein, M., Liebau, S., and Linta, L. (2014). A Comparative View on Human Somatic Cell Sources for iPSC Generation. *Stem Cells Int.* 2014, 768391.

Rajala, K., Hakala, H., Panula, S., Aivio, S., Pihlajamäki, H., Suuronen, R., Hovatta, O., and Skottman, H. (2007). Testing of nine different xeno-free culture media for human embryonic stem cell cultures. *Hum. Reprod.* 22, 1231–1238.

Ramirez, R.D., Morales, C.P., Herbert, B.S., Rohde, J.M., Passons, C., Shay, J.W.,

and Wright, W.E. (2001). Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions. *Genes Dev.* *15*, 398–403.

Rana, D., and Ramalingam, M. (2017). Enhanced proliferation of human bone marrow derived mesenchymal stem cells on tough hydrogel substrates. *Mater. Sci. Eng. C* *76*, 1057–1065.

Rao, L., Tang, W., Wei, Y., Bao, L., Chen, J., Chen, H., He, L., Lu, P., Ren, J., Wu, L., et al. (2012). Highly efficient derivation of skeletal myotubes from human embryonic stem cells. *Stem Cell Rev.* *8*, 1109–1119.

Ratcliffe, E., Thomas, R.J., and Williams, D.J. (2011). Current understanding and challenges in bioprocessing of stem cell-based therapies for regenerative medicine. *Br. Med. Bull.* *100*, 137–155.

Ratcliffe, E., Glen, K.E., Naing, M.W., and Williams, D.J. (2013). Current status and perspectives on stem cell-based therapies undergoing clinical trials for regenerative medicine: case studies. *Br. Med. Bull.* *108*, 73–94.

Rayment, E.A., and Williams, D.J. (2010). Concise review: mind the gap: challenges in characterizing and quantifying cell- and tissue-based therapies for clinical translation. *Stem Cells* *28*, 996–1004.

Riederer, I., Negroni, E., Bigot, A., Bencze, M., Di Santo, J., Aamiri, A., Butler-Browne, G., and Mouly, V. (2008). Heat shock treatment increases engraftment of transplanted human myoblasts into immunodeficient mice. *Transplant. Proc.* *40*, 624–630.

Riederer, I., Negroni, E., Bencze, M., Wolff, A., Aamiri, A., Di Santo, J.P., Silva-Barbosa, S.D., Butler-Browne, G., Savino, W., and Mouly, V. (2012). Slowing down differentiation of engrafted human myoblasts into immunodeficient mice correlates with increased proliferation and migration. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *20*, 146–154.

Riis, S., Nielsen, F.M., Pennisi, C.P., Zachar, V., and Fink, T. (2016). Comparative Analysis of Media and Supplements on Initiation and Expansion of Adipose-Derived Stem Cells. *Stem Cells Transl. Med.* *5*, 314–324.

Robriquet, F., Lorant, J., Larcher, T., Dubreil, L., Leroux, I., Zuber, C., Ledevin, M., Viau, S., Chabrand, L., Delorme, B., et al. (2012). Phenotypic characterization and myogenic potential of human MuStem cells, candidates for therapy of Duchenne Muscular Dystrophy. In *ESGCT/SFTCG*, p.

Robriquet, F., Lardenois, A., Babarit, C., Larcher, T., Dubreil, L., Leroux, I., Zuber, C., Ledevin, M., Deschamps, J.-Y., Fromes, Y., et al. (2015). Differential Gene Expression Profiling of Dystrophic Dog Muscle after MuStem Cell Transplantation. *PLoS One* *10*, e0123336.

Robriquet, F., Babarit, C., Larcher, T., Dubreil, L., Ledevin, M., Goubin, H., Rouger, K., and Guével, L. (2016). Identification in GRMD dog muscle of critical miRNAs involved in pathophysiology and effects associated with MuStem cell transplantation. *BMC Musculoskelet. Disord.* *17*, 209.

Roca, I., Requena, J., Edel, M.J., and Alvarez-Palomo, A.B. (2015). Myogenic

Precursors from iPS Cells for Skeletal Muscle Cell Replacement Therapy. *J. Clin. Med.* *4*, 243–259.

Rodier, F., Coppé, J.-P., Patil, C.K., Hoeijmakers, W.A.M., Muñoz, D.P., Raza, S.R., Freund, A., Campeau, E., Davalos, A.R., and Campisi, J. (2009). Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat. Cell Biol.* *11*, 973–979.

Rodillo, E.B., Fernandez-Bermejo, E., Heckmatt, J.Z., and Dubowitz, V. (1988). Prevention of rapidly progressive scoliosis in Duchenne muscular dystrophy by prolongation of walking with orthoses. *J. Child Neurol.* *3*, 269–274.

Rodriguez, A.-M., Pisani, D., Dechesne, C.A., Turc-Carel, C., Kurzenne, J.-Y., Wdziekonski, B., Villageois, A., Bagnis, C., Breittmayer, J.-P., Groux, H., et al. (2005). Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J. Exp. Med.* *201*, 1397–1405.

Rodriguez-Porcel, M., Wu, J.C., and Gambhir, S.S. (2008). *Molecular imaging of stem cells.* (Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute), p.

Roh, K.-H., Nerem, R.M., and Roy, K. (2016). Biomanufacturing of Therapeutic Cells: State of the Art, Current Challenges, and Future Perspectives. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* *7*, 455–478.

Rojewski, M.T., Fekete, N., Baila, S., Nguyen, K., Fürst, D., Antwiler, D., Dausend, J., Kreja, L., Ignatius, A., Sensebé, L., et al. (2013). GMP-compliant isolation and expansion of bone marrow-derived MSCs in the closed, automated device quantum cell expansion system. *Cell Transplant.* *22*, 1981–2000.

Romanazzo, S., Forte, G., Ebara, M., Uto, K., Pagliari, S., Aoyagi, T., Traversa, E., and Taniguchi, A. (2012). Substrate stiffness affects skeletal myoblast differentiation in vitro. *Sci. Technol. Adv. Mater.* *13*, 64211.

Rouger, K., Larcher, T., Dubreil, L., Deschamps, J.-Y., Le Guiner, C., Jouvion, G., Delorme, B., Lieubeau, B., Carlus, M., Fornasari, B., et al. (2011). Systemic delivery of allogenic muscle stem cells induces long-term muscle repair and clinical efficacy in duchenne muscular dystrophy dogs. *Am. J. Pathol.* *179*, 2501–2518.

Rubio-Azpeitia, E., and Andia, I. (2014). Partnership between platelet-rich plasma and mesenchymal stem cells: in vitro experience. *Muscles. Ligaments Tendons J.* *4*, 52–62.

Rybakova, I.N., Patel, J.R., and Ervasti, J.M. (2000). The dystrophin complex forms a mechanically strong link between the sarcolemma and costameric actin. *J. Cell Biol.* *150*, 1209–1214.

Salama, R., Sadaie, M., Hoare, M., and Narita, M. (2014). Cellular senescence and its effector programs. *Genes Dev.* *28*, 99–114.

Saldin, L.T., Cramer, M.C., Velankar, S.S., White, L.J., and Badylak, S.F. (2017). Extracellular matrix hydrogels from decellularized tissues: Structure and function. *Acta Biomater.* *49*, 1–15.

Sampaolesi, M., Torrente, Y., Innocenzi, A., Tonlorenzi, R., D'Antona, G., Pellegrino, M.A., Barresi, R., Bresolin, N., De Angelis, M.G.C., Campbell, K.P., et al. (2003). Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. *Science* 301, 487–492.

Sampaolesi, M., Blot, S., D'Antona, G., Granger, N., Tonlorenzi, R., Innocenzi, A., Mognol, P., Thibaud, J.-L., Galvez, B.G., Barthélémy, I., et al. (2006). Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature* 444, 574–579.

Sander, M., Chavoshan, B., Harris, S.A., Iannaccone, S.T., Stull, J.T., Thomas, G.D., and Victor, R.G. (2000). Functional muscle ischemia in neuronal nitric oxide synthase-deficient skeletal muscle of children with Duchenne muscular dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 13818–13823.

Sarig, R., Baruchi, Z., Fuchs, O., Nudel, U., and Yaffe, D. (2006). Regeneration and transdifferentiation potential of muscle-derived stem cells propagated as myospheres. *Stem Cells* 24, 1769–1778.

Sart, S., Schneider, Y.-J., Li, Y., and Agathos, S.N. (2014a). Stem cell bioprocess engineering towards cGMP production and clinical applications. *Cytotechnology* 66, 709–722.

Sart, S., Tsai, A.-C., Li, Y., and Ma, T. (2014b). Three-dimensional aggregates of mesenchymal stem cells: cellular mechanisms, biological properties, and applications. *Tissue Eng. Part B. Rev.* 20, 365–380.

Sart, S., Ma, T., and Li, Y. (2014c). Preconditioning stem cells for in vivo delivery. *Biores. Open Access* 3, 137–149.

Schlenke, P. (2014). Pathogen inactivation technologies for cellular blood components: an update. *Transfus. Med. Hemotherapy Off. Organ Der Dtsch. Gesellschaft Fur Transfusionsmedizin Und Immunhamatologie* 41, 309–325.

Schriebl, K., Lim, S., Choo, A., Tscheliessnig, A., and Jungbauer, A. (2010). Stem cell separation: a bottleneck in stem cell therapy. *Biotechnol. J.* 5, 50–61.

Science & Vie (2006). Cellules souches : La révolution en marche. *Sci. Vie* n° 1070:54.

Seale, P., Sabourin, L.A., Girgis-Gabardo, A., Mansouri, A., Gruss, P., and Rudnicki, M.A. (2000). Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* 102, 777–786.

Secco, M., Zucconi, E., Vieira, N.M., Fogaça, L.L.Q., Cerqueira, A., Carvalho, M.D.F., Jazedje, T., Okamoto, O.K., Muotri, A.R., and Zatz, M. (2008). Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! *Stem Cells* 26, 146–150.

Seeger, F.H., Tonn, T., Krzossok, N., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. (2007). Cell isolation procedures matter: a comparison of different isolation protocols of bone marrow mononuclear cells used for cell therapy in patients with acute myocardial infarction. *Eur. Heart J.* 28, 766–772.

Selsby, J.T., Ross, J.W., Nonneman, D., and Hollinger, K. (2015). Porcine models of muscular dystrophy. *ILAR J.* 56, 116–126.

Sensebé, L. (2008). Clinical grade production of mesenchymal stem cells. *Biomed. Mater. Eng.* 18, S3-10.

Sensebé, L., Krampera, M., Schrezenmeier, H., Bourin, P., and Giordano, R. (2010). Mesenchymal stem cells for clinical application. *Vox Sang.* 98, 93–107.

Sensebé, L., Bourin, P., and Tarte, K. (2011). Good Manufacturing Practices Production of Mesenchymal Stem/Stromal Cells. *Hum. Gene Ther.* 22, 19–26.

Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., and Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88, 593–602.

Shafiq, M., Jung, Y., and Kim, S.H. (2016). Insight on stem cell preconditioning and instructive biomaterials to enhance cell adhesion, retention, and engraftment for tissue repair. *Biomaterials* 90, 85–115.

Shahdadfar, A., Frønsdal, K., Haug, T., Reinholt, F.P., and Brinchmann, J.E. (2005). In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. *Stem Cells* 23, 1357–1366.

Shakouri-Motlagh, A., O'Connor, A.J., Brennecke, S.P., Kalionis, B., and Heath, D.E. (2017). Native and solubilized decellularized extracellular matrix: A critical assessment of their potential for improving the expansion of mesenchymal stem cells. *Acta Biomater.* 55, 1–12.

Sharp, N.J., Kornegay, J.N., Van Camp, S.D., Herbstreith, M.H., Secore, S.L., Kettle, S., Hung, W.Y., Constantinou, C.D., Dykstra, M.J., and Roses, A.D. (1992). An error in dystrophin mRNA processing in golden retriever muscular dystrophy, an animal homologue of Duchenne muscular dystrophy. *Genomics* 13, 115–121.

Shelton, M., Metz, J., Liu, J., Carpenedo, R.L., Demers, S.-P., Stanford, W.L., and Skerjanc, I.S. (2014). Derivation and expansion of PAX7-positive muscle progenitors from human and mouse embryonic stem cells. *Stem Cell Reports* 3, 516–529.

Shelton, M., Kocharyan, A., Liu, J., Skerjanc, I.S., and Stanford, W.L. (2016). Robust generation and expansion of skeletal muscle progenitors and myocytes from human pluripotent stem cells. *Methods* 101, 73–84.

Sherr, C.J., and DePinho, R.A. (2000). Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell* 102, 407–410.

Sheu, J., Klassen, H., and Bauer, G. (2014). Cellular manufacturing for clinical applications. *Dev. Ophthalmol.* 53, 178–188.

Sheyn, D., Ben-David, S., Shapiro, G., De Mel, S., Bez, M., Ornelas, L., Sahabian, A., Sareen, D., Da, X., Pelled, G., et al. (2016). Human Induced Pluripotent Stem Cells Differentiate Into Functional Mesenchymal Stem Cells and Repair Bone Defects. *Stem Cells*

Transl. Med. 5, 1447–1460.

Shi, M., Ishikawa, M., Kamei, N., Nakasa, T., Adachi, N., Deie, M., Asahara, T., and Ochi, M. (2009). Acceleration of skeletal muscle regeneration in a rat skeletal muscle injury model by local injection of human peripheral blood-derived CD133-positive cells. *Stem Cells* 27, 949–960.

Shieh, P.B. (2013). Muscular Dystrophies and Other Genetic Myopathies. *Neurol. Clin.* 31, 1009–1029.

Shih, D.T.-B., and Burnouf, T. (2015). Preparation, quality criteria, and properties of human blood platelet lysate supplements for ex vivo stem cell expansion. *N. Biotechnol.* 32, 199–211.

Shimada, H., Hashimoto, Y., Nakada, A., Shigeno, K., and Nakamura, T. (2012). Accelerated generation of human induced pluripotent stem cells with retroviral transduction and chemical inhibitors under physiological hypoxia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417, 659–664.

Shu, Z., Heimfeld, S., and Gao, D. (2014). Hematopoietic SCT with cryopreserved grafts: adverse reactions after transplantation and cryoprotectant removal before infusion. *Bone Marrow Transplant.* 49, 469–476.

Skuk, D., and Tremblay, J.P. (2003). Myoblast transplantation: the current status of a potential therapeutic tool for myopathies. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 24, 285–300.

Skuk, D., and Tremblay, J.P. (2015). Cell therapy in muscular dystrophies: many promises in mice and dogs, few facts in patients. *Expert Opin. Biol. Ther.* 15, 1307–1319.

Skuk, D., Roy, B., Goulet, M., Chapdelaine, P., Bouchard, J.-P., Roy, R., Dugré, F.J., Lachance, J.-G., Deschênes, L., Hélène, S., et al. (2004). Dystrophin expression in myofibers of Duchenne muscular dystrophy patients following intramuscular injections of normal myogenic cells. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 9, 475–482.

Skuk, D., Goulet, M., Roy, B., Chapdelaine, P., Bouchard, J.-P., Roy, R., Dugré, F.J., Sylvain, M., Lachance, J.-G., Deschênes, L., et al. (2006). Dystrophin expression in muscles of duchenne muscular dystrophy patients after high-density injections of normal myogenic cells. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 65, 371–386.

Skuk, D., Goulet, M., Roy, B., Piette, V., Côté, C.H., Chapdelaine, P., Hogrel, J.-Y., Paradis, M., Bouchard, J.-P., Sylvain, M., et al. (2007). First test of a “high-density injection” protocol for myogenic cell transplantation throughout large volumes of muscles in a Duchenne muscular dystrophy patient: eighteen months follow-up. *Neuromuscul. Disord.* NMD 17, 38–46.

Skuk, D., Goulet, M., and Tremblay, J.P. (2014). Intramuscular transplantation of myogenic cells in primates: importance of needle size, cell number, and injection volume. *Cell Transplant.* 23, 13–25.

Spangrude, G.J., Muller-Sieburg, C.E., Heimfeld, S., and Weissman, I.L. (1988). Two rare populations of mouse Thy-110 bone marrow cells repopulate the thymus. *J. Exp. Med.* 167, 1671–1683.

Spees, J.L., Gregory, C.A., Singh, H., Tucker, H.A., Peister, A., Lynch, P.J., Hsu, S.-C., Smith, J., and Prockop, D.J. (2004). Internalized antigens must be removed to prepare hypoinmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *9*, 747–756.

Spencer, M.J., and Mellgren, R.L. (2002). Overexpression of a calpastatin transgene in mdx muscle reduces dystrophic pathology. *Hum. Mol. Genet.* *11*, 2645–2655.

Spits, C., Mateizel, I., Geens, M., Mertzaniidou, A., Staessen, C., Vandeskelde, Y., Van der Elst, J., Liebaers, I., and Sermon, K. (2008). Recurrent chromosomal abnormalities in human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* *26*, 1361–1363.

Srijaya, T.C., Ramasamy, T.S., and Kasim, N.H.A. (2014). Advancing stem cell therapy from bench to bedside: lessons from drug therapies. *J. Transl. Med.* *12*, 243.

Stadtfield, M., and Hochedlinger, K. (2010). Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes Dev.* *24*, 2239–2263.

Stein, G.H., Drullinger, L.F., Soulard, A., and Dulić, V. (1999). Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 2109–2117.

Stolzing, A., Jones, E., McGonagle, D., and Scutt, A. (2008). Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mech. Ageing Dev.* *129*, 163–173.

Stuart, M.J., and Pattavilakom, A. (2015). Clinically relevant aspects of stem cell technologies: current state of play. *ANZ J. Surg.* *85*, 615–619.

Stute, N., Holtz, K., Bubenheim, M., Lange, C., Blake, F., and Zander, A.R. (2004). Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. *Exp. Hematol.* *32*, 1212–1225.

Sundin, M., Orvell, C., Rasmusson, I., Sundberg, B., Ringdén, O., and Le Blanc, K. (2006). Mesenchymal stem cells are susceptible to human herpesviruses, but viral DNA cannot be detected in the healthy seropositive individual. *Bone Marrow Transplant.* *37*, 1051–1059.

Suresh, S., Wales, P., Dakin, C., Harris, M.-A., and Cooper, D.G.M. (2005). Sleep-related breathing disorder in Duchenne muscular dystrophy: disease spectrum in the paediatric population. *J. Paediatr. Child Health* *41*, 500–503.

Sverdlov, E.D., and Mineev, K. (2013). Mutation rate in stem cells: an underestimated barrier on the way to therapy. *Trends Mol. Med.* *19*, 273–280.

Swartz, E.W., Baek, J., Pribadi, M., Wojta, K.J., Almeida, S., Karydas, A., Gao, F.-B., Miller, B.L., and Coppola, G. (2016). A Novel Protocol for Directed Differentiation of C9orf72-Associated Human Induced Pluripotent Stem Cells Into Contractile Skeletal Myotubes. *Stem Cells Transl. Med.* *5*, 1461–1472.

Tachibana, M., Amato, P., Sparman, M., Gutierrez, N.M., Tippner-Hedges, R., Ma, H., Kang, E., Fulati, A., Lee, H.-S., Sritanandomchai, H., et al. (2013). Human embryonic

stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell* 153, 1228–1238.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861–872.

Takai, H., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2003). DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr. Biol. CB* 13, 1549–1556.

Tamaki, T., Akatsuka, A., Ando, K., Nakamura, Y., Matsuzawa, H., Hotta, T., Roy, R.R., and Edgerton, V.R. (2002). Identification of myogenic-endothelial progenitor cells in the interstitial spaces of skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 157, 571–577.

Tamaki, T., Uchiyama, Y., Okada, Y., Ishikawa, T., Sato, M., Akatsuka, A., and Asahara, T. (2005). Functional recovery of damaged skeletal muscle through synchronized vasculogenesis, myogenesis, and neurogenesis by muscle-derived stem cells. *Circulation* 112, 2857–2866.

Tamaki, T., Akatsuka, A., Okada, Y., Uchiyama, Y., Tono, K., Wada, M., Hoshi, A., Iwaguro, H., Iwasaki, H., Oyamada, A., et al. (2008). Cardiomyocyte formation by skeletal muscle-derived multi-myogenic stem cells after transplantation into infarcted myocardium. *PLoS One* 3, e1789.

Tan, K.Y., Teo, K.L., Lim, J.F.Y., Chen, A.K.L., Reuveny, S., and Oh, S.K. (2015). Serum-free media formulations are cell line-specific and require optimization for microcarrier culture. *Cytotherapy* 17, 1152–1165.

Tang, C., Lee, A.S., Volkmer, J.-P., Sahoo, D., Nag, D., Mosley, A.R., Inlay, M.A., Ardehali, R., Chavez, S.L., Pera, R.R., et al. (2011). An antibody against SSEA-5 glycan on human pluripotent stem cells enables removal of teratoma-forming cells. *Nat. Biotechnol.* 29, 829–834.

Tarte, K., Gaillard, J., Lataillade, J.-J., Fouillard, L., Becker, M., Mossafa, H., Tchirkov, A., Rouard, H., Henry, C., Spingard, M., et al. (2010). Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. *Blood* 115, 1549–1553.

Tavassoli, M., and Crosby, W.H. (1968). Transplantation of marrow to extramedullary sites. *Science* 161, 54–56.

Tedesco, F.S., Dellavalle, A., Diaz-Manera, J., Messina, G., and Cossu, G. (2010). Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. *J. Clin. Invest.* 120, 11–19.

Tedesco, F.S., Hoshiya, H., D'Antona, G., Gerli, M.F.M., Messina, G., Antonini, S., Tonlrenzi, R., Benedetti, S., Berghella, L., Torrente, Y., et al. (2011). Stem cell-mediated transfer of a human artificial chromosome ameliorates muscular dystrophy. *Sci. Transl. Med.* 3, 96ra78.

Tedesco, F.S., Gerli, M.F.M., Perani, L., Benedetti, S., Ungaro, F., Cassano, M., Antonini, S., Tagliafico, E., Artusi, V., Longa, E., et al. (2012). Transplantation of genetically corrected human iPSC-derived progenitors in mice with limb-girdle muscular dystrophy. *Sci. Transl. Med.* *4*, 140ra89.

Tedesco, F.S., Moyle, L.A., and Perdiguero, E. (2017). Muscle Interstitial Cells: A Brief Field Guide to Non-satellite Cell Populations in Skeletal Muscle. *Methods Mol. Biol.* *1556*, 129–147.

Tekkatte, C., Gunasingh, G.P., Cherian, K.M., and Sankaranarayanan, K. (2011). “Humanized” stem cell culture techniques: the animal serum controversy. *Stem Cells Int.* *2011*, 504723.

Terry, C., Dhawan, A., Mitry, R.R., and Hughes, R.D. (2006). Cryopreservation of isolated human hepatocytes for transplantation: State of the art. *Cryobiology* *53*, 149–159.

Thomas, E.D., Lochte, H.L., Lu, W.C., and Ferrebee, J.W. (1957). Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* *257*, 491–496.

Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* *282*, 1145–1147.

Tonlorenzi, R., Dellavalle, A., Schnapp, E., Cossu, G., and Sampaolesi, M. (2007). Isolation and characterization of mesoangioblasts from mouse, dog, and human tissues. *Curr. Protoc. Stem Cell Biol.* *Chapter 2*, Unit 2B.1.

Tonlorenzi, R., Rossi, G., and Messina, G. (2017). Isolation and Characterization of Vessel-Associated Stem/Progenitor Cells from Skeletal Muscle. *Methods Mol. Biol.* *1556*, 149–177.

Torrente, Y., Tremblay, J.P., Pisati, F., Belicchi, M., Rossi, B., Sironi, M., Fortunato, F., El Fahime, M., D’Angelo, M.G., Caron, N.J., et al. (2001). Intraarterial injection of muscle-derived CD34(+)Sca-1(+) stem cells restores dystrophin in mdx mice. *J. Cell Biol.* *152*, 335–348.

Torrente, Y., Belicchi, M., Sampaolesi, M., Pisati, F., Meregalli, M., D’Antona, G., Tonlorenzi, R., Porretti, L., Gavina, M., Mamchaoui, K., et al. (2004). Human circulating AC133(+) stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle. *J. Clin. Invest.* *114*, 182–195.

Torrente, Y., Belicchi, M., Marchesi, C., D’Antona, G., Cogiமானian, F., Pisati, F., Gavina, M., Giordano, R., Tonlorenzi, R., Fagiolarì, G., et al. (2007). Autologous transplantation of muscle-derived CD133+ stem cells in Duchenne muscle patients. *Cell Transplant.* *16*, 563–577.

Tozetti, P.A., Caruso, S.R., Mizukami, A., Fernandes, T.R., da Silva, F.B., Traina, F., Covas, D.T., Orellana, M.D., and Swiech, K. (2017). Expansion strategies for human mesenchymal stromal cells culture under xeno-free conditions. *Biotechnol. Prog.*

Trounson, A., and McDonald, C. (2015). *Stem Cell Therapies in Clinical Trials:*

Progress and Challenges. *Cell Stem Cell* 17, 11–22.

Tsai, C.-C., Chen, Y.-J., Yew, T.-L., Chen, L.-L., Wang, J.-Y., Chiu, C.-H., and Hung, S.-C. (2011). Hypoxia inhibits senescence and maintains mesenchymal stem cell properties through down-regulation of E2A-p21 by HIF-TWIST. *Blood* 117, 459–469.

Tugwell, B.D., Patel, P.R., Williams, I.T., Hedberg, K., Chai, F., Nainan, O. V., Thomas, A.R., Woll, J.E., Bell, B.P., and Cieslak, P.R. (2005). Transmission of hepatitis C virus to several organ and tissue recipients from an antibody-negative donor. *Ann. Intern. Med.* 143, 648–654.

Turner, L., and Knoepfler, P. (2016). Selling Stem Cells in the USA: Assessing the Direct-to-Consumer Industry. *Cell Stem Cell* 19, 154–157.

Uccelli, A., Moretta, L., and Pistoia, V. (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 726–736.

Uezumi, A., Ojima, K., Fukada, S., Ikemoto, M., Masuda, S., Miyagoe-Suzuki, Y., and Takeda, S. (2006). Functional heterogeneity of side population cells in skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 341, 864–873.

Uezumi, A., Nakatani, M., Ikemoto-Uezumi, M., Yamamoto, N., Morita, M., Yamaguchi, A., Yamada, H., Kasai, T., Masuda, S., Narita, A., et al. (2016). Cell-Surface Protein Profiling Identifies Distinctive Markers of Progenitor Cells in Human Skeletal Muscle. *Stem Cell Reports* 7, 263–278.

De Ugarte, D.A., Morizono, K., Elbarbary, A., Alfonso, Z., Zuk, P.A., Zhu, M., Dragoo, J.L., Ashjian, P., Thomas, B., Benhaim, P., et al. (2003). Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells. Tissues. Organs* 174, 101–109.

Ullah, I., Park, J.-M., Kang, Y.-H., Byun, J.-H., Kim, D.-G., Kim, J.-H., Kang, D.-H., Rho, G.-J., and Park, B.-W. (2017). Transplantation of Human Dental Pulp-Derived Stem Cells or Differentiated Neuronal Cells from Human Dental Pulp-Derived Stem Cells Identically Enhances Regeneration of the Injured Peripheral Nerve. *Stem Cells Dev.*

Vainzof, M., Ayub-Guerrieri, D., Onofre, P.C.G., Martins, P.C.M., Lopes, V.F., Zilberztajn, D., Maia, L.S., Sell, K., and Yamamoto, L.U. (2008). Animal Models for Genetic Neuromuscular Diseases. *J. Mol. Neurosci.* 34, 241–248.

van der Valk, J., Mellor, D., Brands, R., Fischer, R., Gruber, F., Gstraunthaler, G., Hellebrekers, L., Hyllner, J., Jonker, F.H., Prieto, P., et al. (2004). The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. *Toxicol. Vitr. an Int. J. Publ. Assoc. with BIBRA* 18, 1–12.

Vaucheze, K., Marolleau, J.-P., Schmid, M., Khattar, P., Chapel, A., Catelain, C., Lecourt, S., Larghéro, J., Fiszman, M., and Vilquin, J.-T. (2009). Aldehyde dehydrogenase activity identifies a population of human skeletal muscle cells with high myogenic capacities. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 17, 1948–1958.

Viau, S., Chabrand, L., Eap, S., Lorant, J., Rouger, K., Goudaliez, F., Sumian, C., and Delorme, B. (2017a). Pathogen reduction through additive-free short-wave UV light

irradiation retains the optimal efficacy of human platelet lysate for the expansion of human bone marrow mesenchymal stem cells. *PLoS One* 12, e0181406.

Viau, S., Chabrand, L., Eap, S., Bouilliez, J., Bertholet, P., and Bouckenooghe, T. (2017b). A standardized and characterized clinical grade human platelet lysate for efficient expansion of human bone marrow mesenchymal stem cells. In ISCT Annual Meeting. *Cytotherapy*, p. 195(5 supplement):S279.

Vieira, N.M., Brandalise, V., Zucconi, E., Jazedje, T., Secco, M., Nunes, V.A., Strauss, B.E., Vainzof, M., and Zatz, M. (2008). Human multipotent adipose-derived stem cells restore dystrophin expression of Duchenne skeletal-muscle cells in vitro. *Biol. Cell* 100, 231–241.

Vieira, N.M., Valadares, M., Zucconi, E., Secco, M., Bueno, C.R., Brandalise, V., Assoni, A., Gomes, J., Landini, V., Andrade, T., et al. (2012). Human adipose-derived mesenchymal stromal cells injected systemically into GRMD dogs without immunosuppression are able to reach the host muscle and express human dystrophin. *Cell Transplant.* 21, 1407–1417.

Wagner, B.J. (2012). Cell standardization: purity and potency. *Regen. Med.* 7, 89–92.

Wagner, W., Horn, P., Castoldi, M., Diehlmann, A., Bork, S., Saffrich, R., Benes, V., Blake, J., Pfister, S., Eckstein, V., et al. (2008). Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *PLoS One* 3, e2213.

Walenda, G., Hemedda, H., Schneider, R.K., Merkel, R., Hoffmann, B., and Wagner, W. (2012). Human platelet lysate gel provides a novel three dimensional-matrix for enhanced culture expansion of mesenchymal stromal cells. *Tissue Eng. Part C. Methods* 18, 924–934.

Wang, E. (1995). Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved. *Cancer Res.* 55, 2284–2292.

Wang, C., Xiao, R., Cao, Y.-L., and Yin, H.-Y. (2017). Evaluation of human platelet lysate and dimethyl sulfoxide as cryoprotectants for the cryopreservation of human adipose-derived stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*

Wang, Y., Huso, D.L., Harrington, J., Kellner, J., Jeong, D.K., Turney, J., and McNiece, I.K. (2005). Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture. *Cytotherapy* 7, 509–519.

Wang, Y., Chou, B.-K., Dowey, S., He, C., Gerecht, S., and Cheng, L. (2013a). Scalable expansion of human induced pluripotent stem cells in the defined xeno-free E8 medium under adherent and suspension culture conditions. *Stem Cell Res.* 11, 1103–1116.

Wang, Y., Zhang, Z., Chi, Y., Zhang, Q., Xu, F., Yang, Z., Meng, L., Yang, S., Yan, S., Mao, A., et al. (2013b). Long-term cultured mesenchymal stem cells frequently develop genomic mutations but do not undergo malignant transformation. *Cell Death Dis.* 4, e950.

Wang, Y., Cheng, L., and Gerecht, S. (2014a). Efficient and scalable expansion of human pluripotent stem cells under clinically compliant settings: a view in 2013. *Ann. Biomed. Eng.* 42, 1357–1372.

Wang, Y.X., Dumont, N.A., and Rudnicki, M.A. (2014b). Muscle stem cells at a glance. *J. Cell Sci.* *127*, 4543–4548.

Wassef, M.A., Fouad, H., Sabry, D., Afifi, N., Abbas, A.M., Mostafa, W., and Ahmed, S.H. (2016). Therapeutic efficacy of differentiated versus undifferentiated mesenchymal stem cells in experimental type I diabetes in rat. *Biochem. Biophys. Reports* *5*, 468–475.

Watanabe, K., Ueno, M., Kamiya, D., Nishiyama, A., Matsumura, M., Wataya, T., Takahashi, J.B., Nishikawa, S., Nishikawa, S., Muguruma, K., et al. (2007). A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* *25*, 681–686.

Wei, L., Fraser, J.L., Lu, Z.-Y., Hu, X., and Yu, S.P. (2012). Transplantation of hypoxia preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells enhances angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia in rats. *Neurobiol. Dis.* *46*, 635–645.

Wei, Y., Li, Y., Chen, C., Stoelzel, K., Kaufmann, A.M., and Albers, A.E. (2011). Human skeletal muscle-derived stem cells retain stem cell properties after expansion in myosphere culture. *Exp. Cell Res.* *317*, 1016–1027.

Weibrich, G., Kleis, W.K.G., Hafner, G., and Hitzler, W.E. (2002). Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J. Cranio-Maxillo-Facial Surg. Off. Publ. Eur. Assoc. Cranio-Maxillo-Facial Surg.* *30*, 97–102.

Westerman, K.A., Penvose, A., Yang, Z., Allen, P.D., and Vacanti, C.A. (2010). Adult muscle “stem” cells can be sustained in culture as free-floating myospheres. *Exp. Cell Res.* *316*, 1966–1976.

Wexler, S.A., Donaldson, C., Denning-Kendall, P., Rice, C., Bradley, B., and Hows, J.M. (2003). Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal “stem” cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br. J. Haematol.* *121*, 368–374.

Wicklund, M.P. (2013). The muscular dystrophies. *Continuum (Minneap. Minn.)* *19*, 1535–1570.

Windrum, P., Morris, T.C.M., Drake, M.B., Niederwieser, D., Ruutu, T., and EBMT Chronic Leukaemia Working Party Complications Subcommittee (2005). Variation in dimethyl sulfoxide use in stem cell transplantation: a survey of EBMT centres. *Bone Marrow Transplant.* *36*, 601–603.

Wuchter, P., Vetter, M., Saffrich, R., Diehlmann, A., Bieback, K., Ho, A.D., and Horn, P. (2016). Evaluation of GMP-compliant culture media for in vitro expansion of human bone marrow mesenchymal stromal cells. *Exp. Hematol.* *44*, 508–518.

Xiong, F., Xu, Y., Zheng, H., Lu, X., Feng, S., Shang, Y., Li, Y., Zhang, Y., Jin, S., and Zhang, C. (2010). Microdystrophin delivery in dystrophin-deficient (mdx) mice by genetically-corrected syngeneic MSCs transplantation. *Transplant. Proc.* *42*, 2731–2739.

Xu, C., Inokuma, M.S., Denham, J., Golds, K., Kundu, P., Gold, J.D., and Carpenter, M.K. (2001). Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* *19*, 971–974.

Xu, J., Sun, M., Tan, Y., Wang, H., Wang, H., Li, P., Xu, Z., Xia, Y., Li, L., and Li, Y. (2017). Effect of matrix stiffness on the proliferation and differentiation of umbilical cord mesenchymal stem cells. *Differentiation*. *96*, 30–39.

Xu, X., Wilschut, K.J., Kouklis, G., Tian, H., Hesse, R., Garland, C., Sbitany, H., Hansen, S., Seth, R., Knott, P.D., et al. (2015). Human Satellite Cell Transplantation and Regeneration from Diverse Skeletal Muscles. *Stem Cell Reports* *5*, 419–434.

Yaffe, M.P., Noggle, S.A., and Solomon, S.L. (2016). Raising the standards of stem cell line quality. *Nat. Cell Biol.* *18*, 236–237.

Yamaguchi, M., Hirayama, F., Wakamoto, S., Fujihara, M., Murahashi, H., Sato, N., Ikebuchi, K., Sawada, K., Koike, T., Kuwabara, M., et al. (2002). Bone marrow stromal cells prepared using AB serum and bFGF for hematopoietic stem cells expansion. *Transfusion* *42*, 921–927.

Yang, Q., Peng, J., Guo, Q., Huang, J., Zhang, L., Yao, J., Yang, F., Wang, S., Xu, W., Wang, A., et al. (2008). A cartilage ECM-derived 3-D porous acellular matrix scaffold for in vivo cartilage tissue engineering with PKH26-labeled chondrogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biomaterials* *29*, 2378–2387.

Yao, S., Chen, S., Clark, J., Hao, E., Beattie, G.M., Hayek, A., and Ding, S. (2006). Long-term self-renewal and directed differentiation of human embryonic stem cells in chemically defined conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 6907–6912.

Yin, X., Mead, B.E., Safaee, H., Langer, R., Karp, J.M., and Levy, O. (2016). Engineering Stem Cell Organoids. *Cell Stem Cell* *18*, 25–38.

Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., et al. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* *318*, 1917–1920.

Yuan, H., Kaneko, T., and Matsuo, M. (1995). Relevance of oxidative stress to the limited replicative capacity of cultured human diploid cells: the limit of cumulative population doublings increases under low concentrations of oxygen and decreases in response to aminotriazole. *Mech. Ageing Dev.* *81*, 159–168.

Zare, S., Kurd, S., Rostamzadeh, A., and Nilforoushzadeh, M.A. (2014). Types of Stem Cells in Regenerative Medicine: A Review. *J. Ski. Stem Cell* *1*.

Zarzeczny, A., and Caulfield, T. (2009). Emerging ethical, legal and social issues associated with stem cell research & and the current role of the moral status of the embryo. *Stem Cell Rev.* *5*, 96–101.

Zhang, Z. (2017). Injectable biomaterials for stem cell delivery and tissue regeneration. *Expert Opin. Biol. Ther.* *17*, 49–62.

Zhang, H., and Cohen, S.N. (2004). Smurf2 up-regulation activates telomere-dependent senescence. *Genes Dev.* *18*, 3028–3040.

Zhang, R., and Adams, P.D. (2007). Heterochromatin and its relationship to cell senescence and cancer therapy. *Cell Cycle* *6*, 784–789.

Zhang, R., Poustovoitov, M. V., Ye, X., Santos, H.A., Chen, W., Daganzo, S.M., Erzberger, J.P., Serebriiskii, I.G., Canutescu, A.A., Dunbrack, R.L., et al. (2005). Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev. Cell* 8, 19–30.

Zheng, B., Cao, B., Crisan, M., Sun, B., Li, G., Logar, A., Yap, S., Pollett, J.B., Drowley, L., Cassino, T., et al. (2007). Prospective identification of myogenic endothelial cells in human skeletal muscle. *Nat. Biotechnol.* 25, 1025–1034.

Zheng, X., Baker, H., Hancock, W.S., Fawaz, F., McCaman, M., and Pungor, E. (2006). Proteomic analysis for the assessment of different lots of fetal bovine serum as a raw material for cell culture. Part IV. Application of proteomics to the manufacture of biological drugs. *Biotechnol. Prog.* 22, 1294–1300.

Zhu, J., Zhou, L., and XingWu, F. (2006). Tracking neural stem cells in patients with brain trauma. *N. Engl. J. Med.* 355, 2376–2378.

Zucconi, E., Vieira, N.M., Bueno, D.F., Secco, M., Jazedje, T., Ambrosio, C.E., Passos-Bueno, M.R., Miglino, M.A., and Zatz, M. (2010). Mesenchymal stem cells derived from canine umbilical cord vein--a novel source for cell therapy studies. *Stem Cells Dev.* 19, 395–402.

Zucconi, E., Vieira, N.M., Bueno, C.R., Secco, M., Jazedje, T., Costa Valadares, M., Fussa Suzuki, M., Bartolini, P., Vainzof, M., and Zatz, M. (2011). Preclinical studies with umbilical cord mesenchymal stromal cells in different animal models for muscular dystrophy. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, 715251.

Thèse de Doctorat

Charlotte SAURY

Cellules souches dérivées du muscle humain « MuStem » : modalités de préparation *in vitro* et caractéristiques biologiques pour une application clinique

Human muscle-derived stem cells « MuStem »: *in vitro* preparation modalities and biological properties for a clinical application

Résumé

La découverte de cellules souches adultes (CSAs) à potentiel myogénique est à l'origine de nouveaux espoirs pour le traitement des dystrophies musculaires (DMs). L'UMR a identifié une population de CSAs résidentes du muscle, nommées MuStem, et fait la preuve de concept/efficacité de son administration systémique dans le modèle animal cliniquement pertinent de la dystrophie musculaire de Duchenne qui appartient au groupe des maladies orphelines. L'identification de cette population chez l'Homme avec des propriétés phénotypiques et comportementales similaires a conforté son positionnement comme potentiel candidat au traitement des DMs. Cette thèse s'est inscrite dans une démarche préclinique de définition de modalités de préparation *in vitro* compatibles avec un usage clinique. Des études comparées *in vitro* ont permis de définir un protocole de production respectant les bonnes pratiques de fabrication par remplacement des produits de grade recherche. L'étude de la signature phénotypique et de l'engagement myogénique *in vitro* a positionné le sérum humain et le lysat plaquettaire comme alternatives au sérum de veau fœtal pour la culture des cellules hMuStem. En considérant l'équilibre entre la quantité de cellules nécessaire pour les protocoles *in vivo* et les propriétés biologiques d'efficacité/sécurité, la démarche expérimentale mise en place pour évaluer l'impact du temps d'expansion *in vitro* a abouti à une amplification maximale de 22-24 doublements au regard de l'hétérogénéité phénotypique et de l'expression de marqueurs de sénescence. Ces résultats ont contribué à améliorer la préparation de l'agent hMuStem en vue d'un essai clinique pour les patients atteints de DMs.

Mots clés

Dystrophies musculaires, Thérapie cellulaire, Cellules souches, Cellules MuStem, Bonnes pratiques de fabrication

Abstract

The discovery of adult stem cells (ASCs) with myogenic potential had caused new hopes for the treatment of muscular dystrophies (MDs). UMR PAnTher identified a population of muscle-derived stem cells, named MuStem cells, and provided the proof of concept/efficacy of its systemic delivery in the clinically relevant animal model for the orphan disease Duchenne Muscular Dystrophy. The identification of this population in Human with similar phenotypic and behavioral properties reinforced the positioning of MuStem cell population as potential candidate for the treatment of MDs. This thesis is a part of the preclinical approach toward the definition of clinical-compliant *in vitro* preparation modalities. First, comparative *in vitro* studies allowed defining a production process with respect to the good manufacturing practices by replacement of research grade products. A more extensive study of phenotypic signature and *in vitro* myogenic commitment enabled the positioning of human serum and platelet lysate as alternatives to fetal bovine serum for the stage of *in vitro* expansion of the hMuStem cell population. Then, according to the balance between the required cell number for the *in vivo* protocols and the biological properties in terms of efficacy/safety, the experimental approach designed to evaluate impact of *ex vivo* expansion time revealed an amplification duration that should not exceed 22-24 population doublings regarding phenotypic heterogeneity and expression of senescence markers. Overall, these results contributed to the improvement of hMuStem cell population preparation in the prospect of the implementation of a clinical trial devoted to patients affected by MDs.

Key Words

Muscular Dystrophies, Cell therapy, Stem cells, MuStem cells, Good manufacturing practices