

TASNIM CHAKROUN

Étude du comportement des cellules humaines en présence de l'interleukine 13 humaine *in vitro* et *in vivo* dans le cadre de la thérapie cellulaire pour la dystrophie musculaire de Duchenne

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en biologie moléculaire et cellulaire
pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2010

Résumé

La dystrophie musculaire de Duchenne est une maladie héréditaire qui touche les garçons. Une des approches envisagées pour rétablir l'expression de dystrophine dans le muscle est la thérapie cellulaire. Celle-ci connaît des limitations majeures comme le fort taux de mortalité et le faible potentiel migratoire des cellules transplantées. Dans l'optique de limiter ces obstacles, nous nous sommes intéressés à l'interleukine 13. En effet, il a été prouvé que l'interleukine 13 sécrétée par les fibres musculaires induit l'activation, la différenciation des cellules satellites en myoblastes et leur fusion avec les fibres pour induire l'hypertrophie musculaire. Par ailleurs, les effets de l'interleukine 13 sur les muscles squelettiques sont très peu connus. **Résultats :** L'étude *in vitro* des effets du traitement des myoblastes humains avec l'interleukine 13 humaine montre une augmentation du taux de fusion et une amélioration du potentiel migratoire via une action chémo-attractante. De plus, l'interleukine 13 permet d'améliorer la prolifération et la survie des myoblastes suite à l'induction d'un stress oxydatif. Par ailleurs, Le prétraitement et la co-injection de l'interleukine 13 ne montrent pas une amélioration concluante dans le taux de survie post-greffe. Aussi, l'électroporation d'un plasmide contenant le gène de l'interleukine 13 humaine dans les muscles de souris RAG avant la greffe ne semble pas augmenter le potentiel migratoire des cellules transplantées. **Conclusions :** Les effets de l'interleukine 13 sur les myoblastes observés *in vitro* semblent très prometteurs. Cependant, ces effets ne sont pas observables *in vivo*. Il est nécessaire d'optimiser les méthodes d'introduction du gène dans les muscles de souris et les méthodes d'investigation pour avoir des résultats plus concluants.

Abstract

Duchenne muscular dystrophy is a hereditary disease that affects boys. One of the most promising approaches to restore functional dystrophin expression in skeletal muscles is cellular therapy. There are many limitations for this therapy such as very low rates of cell survival and migration after the transplantation. Herein, we investigate the effects of interleukin 13 on myoblasts *in vitro* and *in vivo*. Interleukin 13 was shown to be secreted by myofibers and recruits satellite cells for activation, differentiation and fusion leading to muscular hypertrophy. Moreover, very little is known about the effects of interleukin 13 on myogenic cells. **Results:** *in vitro* study of interleukin 13 effects on myoblasts showed an increase in fusion and migration potential. Besides, proliferation and survival to oxidative stress were increased by the treatment. Furthermore, pretreatment and co-injection with interleukin 13 did not produce a significant increase in post-transplantation survival rate. Electroporation of interleukin 13 gene in Rag mice muscles before transplantation had no effects on the migratory potential of grafted myoblasts. **Conclusions:** Effects of interleukin 13 on human myoblasts *in vitro* seem to be very promising. Nevertheless, these effects were not observed *in vivo*. It is important to optimize gene introduction and investigation methods to obtain more conclusive results.

Avant-Propos

J'aimerais remercier tout d'abord Dr. Jacques P. Tremblay pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et très souvent dans son bureau. Cette expérience unique m'a permis de beaucoup apprendre, d'approfondir mes connaissances scientifiques et d'aiguiser mon sens critique.

Ensuite, je remercie Dr. Daniel Skuk et Dr. Essam Abdelhamid pour leurs conseils et leur patience. Je remercie aussi Martin Paradis et Marlyne Goulet pour leur aide.

Je remercie aussi du fond du cœur mes collègues et précieux amis qui ont ensoleillé mes journées au laboratoire : Anissa, merci pour ton aide, tes conseils et pour tous les délires, tu es une personne exceptionnelle. Raouia, merci pour ton soutien et ton sens de l'humour. Yann : merci pour toutes les discussions philosophiques. Et finalement, Annick et Marie Anne, sans vous mon passage au laboratoire n'aurait pas été pareil.

Je remercie aussi mes amies Cristina, Élise et Soraya pour leur soutien et leurs encouragements.

Finalement, je remercie très particulièrement ma famille en Tunisie. Toutes mes tantes qui n'ont cessé de croire en moi et particulièrement Aida et son mari Zouhair. Ma très chère maman : merci pour tout ton amour et tes prières. Mon très cher papa : merci pour avoir cru en moi en toutes circonstances et pour tes encouragements. Mon frère Majdi : merci pour avoir pris si bien soin de moi. Et mon frère Mohamed : Merci pour tes encouragements et les discussions très animées à propos des animes. Sans vous je n'aurais pas été capable de mener ce projet à bien. Puissiez-vous trouver dans ce travail le témoignage de mon profond amour.

Je dédie ce mémoire à mes parents et à mes frères. Du fond du cœur, mille mercis.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Avant-Propos.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des figures.....	viii
Introduction.....	1
Chapitre I : La dystrophie musculaire de Duchenne.....	2
1. Historique.....	2
2. Profil des patients.....	2
3. Les causes.....	5
3.1 Le gène DYS et les mutations.....	5
3.2 La dystrophine.....	6
3.2.1 Structure et emplacement.....	6
3.2.2 Fonction du complexe CGD.....	7
4. Les modèles animaux de la dystrophie musculaire de Duchenne.....	9
4.1 La souris <i>mdx</i>	9
4.2 Le chien GRMD.....	9
4.3 Les modèles invertébrés.....	11
5. Les thérapies de la dystrophie musculaire de Duchenne.....	11
5.1 La thérapie pharmacologique.....	11
5.1.1 Les corticostéroïdes.....	12
5.1.2 Les aminoglycosides.....	12
5.1.3 Le PTC 124.....	13
5.1.4 L'utrophine.....	13
5.1.5 Les facteurs de croissance.....	13
5.2 La thérapie génique.....	14
5.2.1 Les méthodes virales.....	14
5.2.2 Les méthodes non virales.....	15
5.3 La thérapie cellulaire.....	19
5.3.1 Les myoblastes.....	19
5.3.2 Les cellules souches hématopoïétiques.....	23
5.3.3 Les mésoangioblastes.....	23
5.3.4 Les cellules souches embryonnaires (ESC).....	23
5.3.5 Autres types cellulaires.....	24
Chapitre II : Le muscle squelettique.....	25
1. Origine embryonnaire.....	25
2. Structure et fonction du muscle squelettique.....	25
2.1 Organisation du muscle.....	25
2.2 Les types de fibres.....	26
3. Formation et régénérescence du muscle squelettique.....	26
3.1 Les facteurs myogéniques.....	26
3.2 Les cellules satellites.....	28
3.3 Les facteurs de croissance.....	28
3.3.1 La myostatine.....	30

3.3.2 L'IGF-1	30
3.4 Les myokines	31
3.4.1 L'interleukine 6.....	31
3.4.2 L'interleukine 15.....	32
3.4.4 L'interleukine 4.....	33
3.4.5 L'interleukine 13.....	33
4. Problématique, hypothèses et objectifs.....	42
4.1 Problématique	42
4.2 Hypothèses.....	43
4.3 Objectifs.....	43
4.3.1 Objectif général.....	43
4.3.2 Objectifs spécifiques.....	43
Matériel et méthodes.....	44
1. Culture cellulaire.....	45
2. Test de fusion <i>in vitro</i>	45
2.1 Culture cellulaire.....	45
2.2 Immunocytochimie	46
2.3 Calcul de l'indice de fusion	46
3. Test de migration <i>in vitro</i>	46
4. Zymographie.....	47
4.1 Culture cellulaire.....	47
4.2 Zymographie.....	47
5. Test de prolifération <i>in vitro</i>	48
6. Test de mortalité <i>in vitro</i>	48
7. Test de mortalité <i>in vivo</i>	49
7.1 Culture cellulaire.....	49
7.2 Transplantation de myoblastes chez la souris Rag	49
7.3 Digestion des muscles et extraction de l'ADN musculaire	50
8. Électroporation <i>in vivo</i>	50
9. Transfection au Pluronic L64 <i>in vivo</i>	51
10. test de migration <i>in vivo</i>	51
10.1 Culture cellulaire.....	51
10.2 Transplantation de myoblastes chez la souris Rag	51
11. Immunohistochimies.....	52
12. Analyses statistiques	52
Résultats.....	53
1. Effets de l'interleukine 13 sur les myoblastes humains <i>in vitro</i>	54
1.1 L'interleukine 13 améliore la fusion des myoblastes humains <i>in vitro</i>	54
1.2 L'interleukine 13 améliore le potentiel migratoire des myoblastes humains <i>in vitro</i> via une action chémo-attractante, mais semble réguler négativement la sécrétion de MMP2.	54
1.3 L'interleukine 13 améliore la prolifération des cellules humaines <i>in vitro</i>	57
1.4 L'interleukine 13 protège les cellules humaines contre le stress oxydatif mais ne les protège pas contre les cytokines pro-inflammatoires	59
2. Le prétraitement et la co-injection avec l'interleukine 13 ont un effet limité dans le temps sur la survie <i>in vivo</i> des myoblastes transplantés.....	59

3. Introduction du gène de l'interleukine 13 humaine dans les muscles de souris Rag et les effets sur la migration <i>in vivo</i>	62
3.1 L'électroporation est plus efficace que la transfection au Pluronic L64 pour l'introduction du gène de l'interleukine 13 humaine dans les muscles de souris.....	62
3.2 L'électroporation de l'interleukine 13 dans les muscles de souris avant la transplantation n'améliore pas la migration des cellules <i>in vivo</i>	66
Discussion.....	67
Conclusions.....	75
Bibliographie	78

Liste des figures

Introduction

Figure 1 : La manœuvre de Gowers.....	3
Figure 2 : Comparaison de l'histologie d'un muscle sain et d'un muscle dystrophique.	4
Figure 3 : Le gène DMD, son emplacement, sa transcription et sa traduction.....	8
Figure 4 : Représentation structurale des quatre domaines de la dystrophine.	8
Figure 5 : Schéma du complexe glycoprotéique de la dystrophine (complexe CGD).	10
Figure 6 : Le saut d'exon.	18
Figure 7 : Les étapes de la thérapie cellulaire.	21
Figure 8 : Limites de la thérapie cellulaire avec des myoblastes.	22
Figure 9 : Organisation et structure du muscle squelettique.	27
Figure 10 : Les facteurs myogéniques et leur expression au cours du processus de la myogénèse.	27
Figure 11 : Le processus de régénération musculaire chez un patient dystrophique.	29
Figure 12 : Les voies de signalisation de l'interleukine 13.	39
Figure 13 : L'action de l'interleukine 13 sur les cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques.	41

Résultats

Figure 1 : Effet de l'interleukine 13 sur la fusion des myoblastes humains <i>in vitro</i>	55
Figure 2 : Effet de l'interleukine 13 sur la migration des myoblastes humains <i>in vitro</i>	56

Figure 3 : Effet de l'interleukine 13 sur la sécrétion de MMP2 par les myoblastes humains <i>in vitro</i>.	56
Figure 4 : Effet de l'interleukine 13 sur la prolifération des myoblastes humains <i>in vitro</i>.	58
Figure 5 : Effet de l'interleukine 13 sur la résistance au stress oxydatif des myoblastes humains <i>in vitro</i>.	60
Figure 6 : Effet de l'interleukine 13 sur la résistance à un cocktail de cytokines pro-inflammatoires des cellules humaines <i>in vitro</i>.	61
Figure 7 : Effet de l'interleukine 13 sur la survie des myoblastes humains transplantés dans les TA de souris RAG.	63
Figure 8 : Comparaison entre deux méthodes d'introduction du gène de l'interleukine 13 humaine-V5 dans les TA de souris RAG	64
Figure 9 : Effet de l'interleukine 13 sur la migration des myoblastes humains <i>in vivo</i>.	65

Introduction

Chapitre I : La dystrophie musculaire de Duchenne

1. Historique

La dystrophie musculaire de Duchenne fut décrite en 1861 par Guillaume Benjamin Amand Duchenne de Boulogne (1806-1875), d'où son appellation. Il a caractérisé la maladie en premier lieu comme désordre cérébral et l'a nommé «paraplégie hypertrophique de l'enfance». Il s'est rendu compte en 1968 qu'elle était plutôt reliée aux muscles. En 1886, William Richard Gowers (1845-1915) décrit la manœuvre dite de Gowers (**Figure 1**). Il s'agit de la manœuvre à laquelle ont recours les enfants atteints de la maladie pour passer de la position couchée à la position debout. En effet, les enfants doivent se servir de leurs membres supérieurs car leurs membres inférieurs sont trop faibles.

En 1982, avec le développement d'outils de biologie moléculaire, le gène responsable de la maladie fut identifié sur le bras court du chromosome X (Murray *et al.* 1982). Ensuite le gène responsable DYS a été identifié en 1986 (Monaco *et al.* 1986), et en 1987, c'est la protéine dystrophine qui a été identifiée et caractérisée (Hoffman *et al.* 1987).

2. Profil des patients

La dystrophie musculaire de Duchenne a une incidence approximative d'un garçon sur 3500 à la naissance (Monckton *et al.* 1982). Les premiers symptômes sont un retard moteur ou une démarche anormale. La maladie est caractérisée par la dégénérescence progressive du tissu musculaire menant à l'atrophie de la plupart des muscles en commençant par les muscles des membres inférieurs. Les fibres musculaires ne pouvant pas se régénérer adéquatement, le tissu est envahi par la fibrose et l'adipose (Yiu and Kornberg 2008) (**Figure 2**). Les garçons affectés présentent une difficulté à courir ou à passer de la position couchée à la position debout.

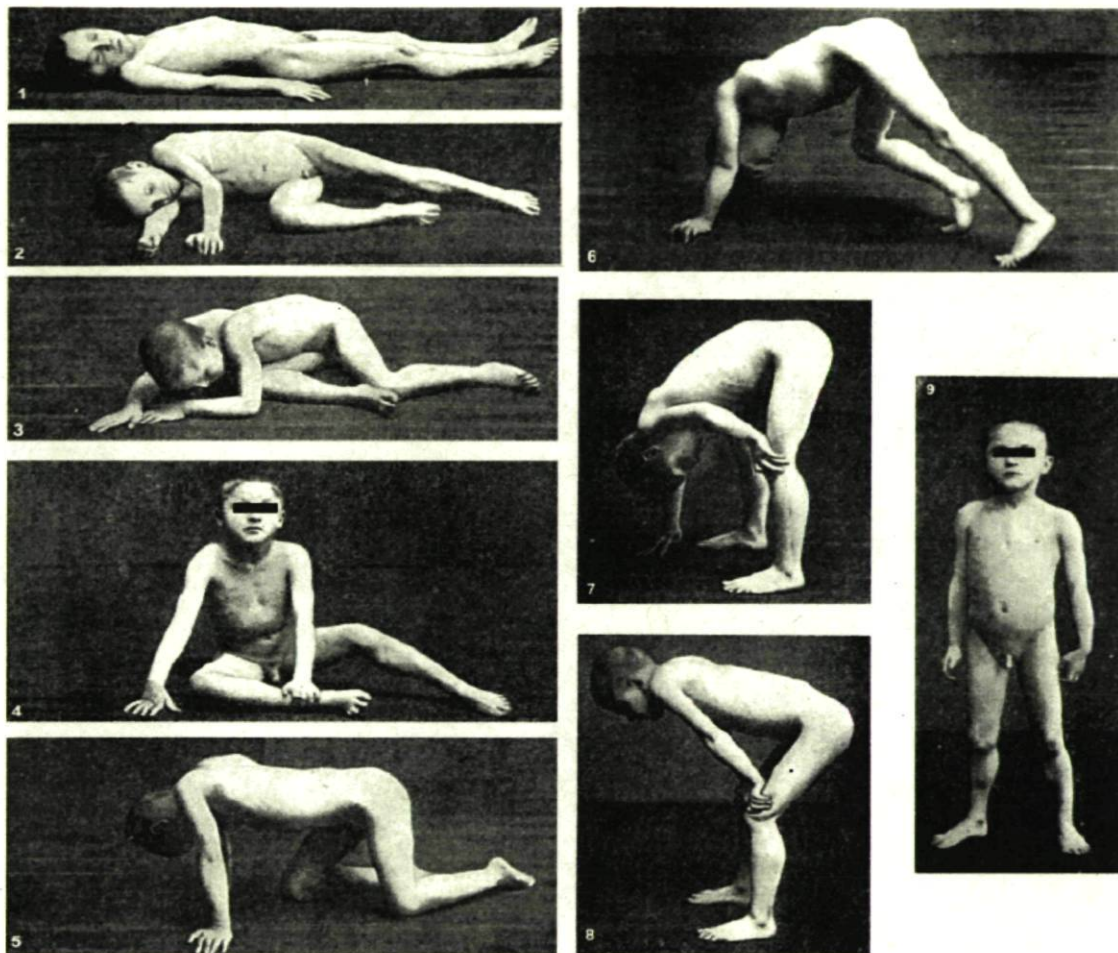


Figure 1 : La manœuvre de Gowers. Cette manœuvre montre les différentes étapes par lesquelles doit passer un enfant atteint de la dystrophie musculaire de Duchenne pour pouvoir passer de la position couchée à la position debout.

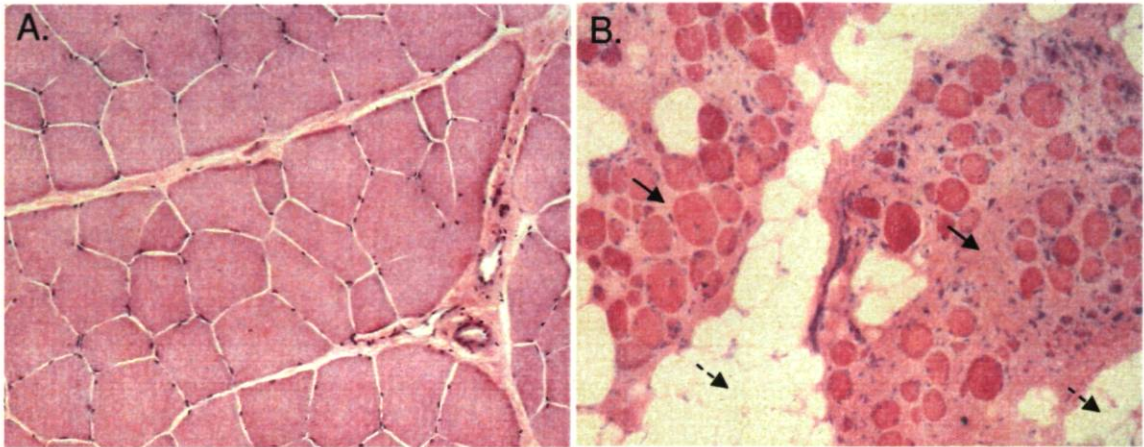


Figure 2 : Comparaison de l'histologie d'un muscle sain et d'un muscle dystrophique. (A) montre une coupe histologique d'un muscle sain. Les fibres musculaires sont toutes de tailles similaires et sont séparées par de fines couches de matrice extracellulaire. (B) montre une coupe histologique d'un muscle dystrophique. Il y a une variabilité marquée dans la taille entre les fibres musculaires, une forme ronde anormale des fibres et une infiltration du tissu musculaire par la fibrose (flèches pleines) et par l'adipose (flèches pointillées). (Adaptation de Yui and Kornberg 2008)

À ce stade de développement, une pseudo hypertrophie au niveau des mollets est observée. Elle est due à une fibrose avancée (Eiholzer *et al.* 1988). Par la suite les symptômes s'aggravent progressivement jusqu'à ce que le patient soit confiné à la chaise roulante vers l'adolescence (Jones *et al.* 2003). La position assise entraîne à son tour plusieurs complications comme des fractures fréquentes des os et la scoliose et la réduction de la capacité respiratoire vitale (Smith *et al.* 1989). Les complications comme l'insuffisance respiratoire chronique apparaît vers l'âge de 10 ans et continue à progresser en diminuant les chances de survie du patient de 8 à 12 % par année (Phillips *et al.* 2001). Aussi vers l'âge de 10 ans, des complications dues à la fibrose cardiaque et au déséquilibre du rythme commencent à apparaître et à se développer pour mener ultimement à un myocarde gravement endommagé (Nigro *et al.* 1990). Ce sont ces problèmes qui conduisent au décès du patient entre l'âge de 10 et 29 ans.

3. Les causes

3.1 Le gène DYS et les mutations

La dystrophie musculaire de Duchenne est causée par des mutations du gène DYS, l'un des plus grands gènes connus. Il se localise au chromosome Xp21 et contient 2,3 méga bases d'ADN (**Figure 3**) ce qui constitue environ 0,1% de la totalité du génome humain (Mandel 1989). Il est constitué de très grands introns et de 79 exons. Sa partie codante consiste en un ADNc de 14 Kilo bases (Kunkel *et al.* 1986; Koenig *et al.* 1987).

La grande taille du gène DYS le rend plus susceptible aux mutations par rapport aux autres gènes. La majorité des mutations sont des délétions intragéniques, ce qui représente environ 65-72% des patients (Muntoni *et al.* 2003; Aartsma-Rus *et al.* 2006). Les duplications d'un seul ou plusieurs exons sont trouvées chez 7% des patients (White *et al.* 2006). Les mutations ponctuelles, les délétions et les insertions d'un seul nucléotide sont retrouvées chez 20% des patients. Il en résulte souvent des mutations de type non-sens ou décalage de cadre de lecture (Roberts *et al.* 1994).

3.2 La dystrophine

3.2.1 Structure et emplacement

La dystrophine a été identifiée un an après l'identification du gène DYS (Hoffman *et al.* 1987). Elle est exprimée sous différents isoformes dans les muscles, le cortex, la rétine et les cellules de Purkinje (Ahn and Kunkel 1993), mais elle est retrouvée de façon majoritaire dans les tissus musculaires squelettiques, cardiaques et lisses. Dans le muscle squelettique, la dystrophine est une protéine de 427 Kilo daltons d'environ 4 nm d'épaisseur et 175 nm de longueur. Elle se situe sous la membrane basale des fibres musculaires (Watkins *et al.* 1988). C'est une protéine oligomérique de structure complexe capable de se déformer lors de la contraction et de la relaxation musculaire (Pons *et al.* 1990).

La séquence protéique de la dystrophine peut être divisée en quatre domaines distincts (**Figure 4**) :

- Un domaine N-terminal constitué de 240 acides aminés qui est très conservé et contient le domaine de liaison à la F-actine.
- Un large domaine central de forme allongée qui contient plusieurs répétitions semblables à la spectrine. Il assure la stabilité de la liaison entre le cytosquelette d'actine et le complexe membranaire CGD (Leger *et al.* 1991). Le complexe CGD est le complexe de glycoprotéines liées à la dystrophine (Toniolo and Minetti 1999). La forme allongée de la dystrophine lui confère l'élasticité nécessaire à son bon fonctionnement.
- Un domaine riche en résidus cystéine, également nommé domaine de liaison au dystroglycane. Il permet de relier l'extrémité du côté C-terminal de la protéine au CGD
- Un domaine C-terminal constitué de 420 acides aminés qui permet à la dystrophine d'interagir avec la dystrobrevine et l' α et la β -syntrophine. Il s'agit de protéines qui permettent le recrutement de complexes signalitiques à la membrane (Schoenwaelder and Burridge 1999).

3.2.2 Fonction du complexe CGD

La dystrophine est fonctionnelle seulement lorsqu'elle est reliée au complexe CGD. Elle assure la liaison entre le cytosquelette d'actine et le β -dystroglycane. À l'intérieur du complexe CGD, le β -dystroglycane est lié à l' α -dystroglycane qui est lié à son tour à la laminine, un composé de la matrice extracellulaire (Khurana and Davies 2003). Cette structure n'est qu'une petite partie du complexe CGD au sein duquel la dystrophine est aussi reliée aux sarcoglycanes (α , β , δ , ϵ , γ), aux syntrophines ($\alpha 1$, $\beta 1$, $\beta 2$) et aux dystrobrevines (Campbell 1995) (**Figure 5**).

Le complexe CGD, en assurant un lien flexible entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette, contribue à la stabilité et l'intégrité physique membranaire pendant les cycles de contraction et de relaxation (Ervasti and Campbell 1993). La dystrophine étant l'élément central du complexe, la fonction de ce dernier n'est plus assurée lorsqu'elle est absente ou non fonctionnelle. Dans le cas des patients dystrophiques, les fibres sont grandement fragilisées et susceptibles aux dommages induits par les contractions (Pasternak *et al.* 1995). Les membranes ne sont plus en mesure de séparer correctement l'intérieur et l'extérieur des fibres. En plus de son rôle structural, le complexe CGD peut aussi avoir un rôle signalitique. La perte de la signalisation associée pourrait être l'une des causes de la mort des fibres (Brenman *et al.* 1995; Rando 2001).

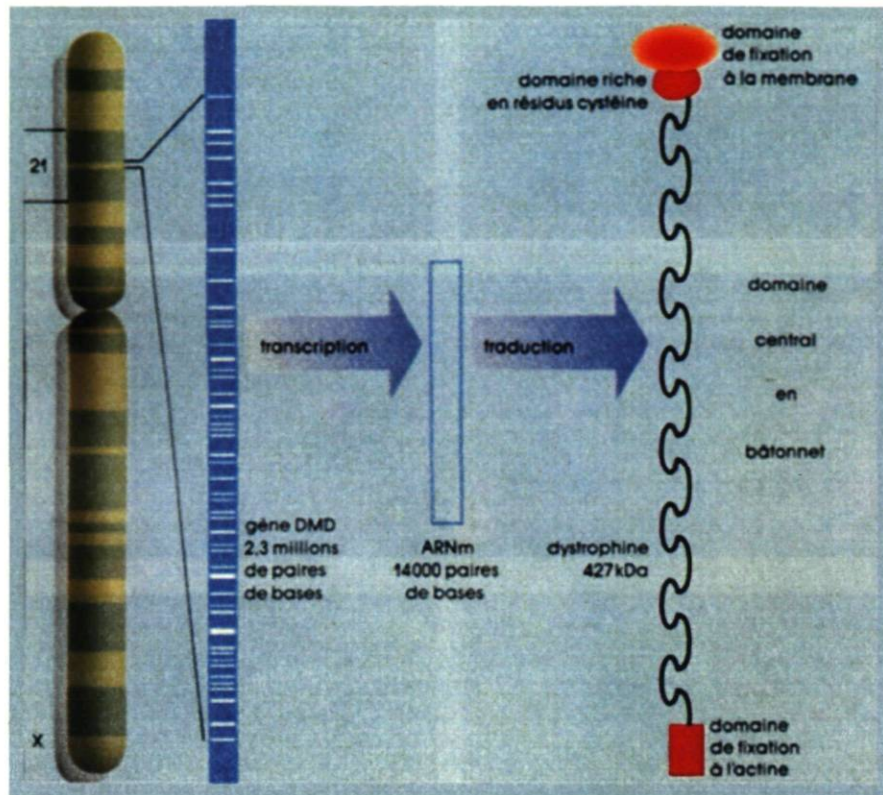


Figure 3 : Le gène DYS, son emplacement, sa transcription et sa traduction. Le gène DYS se situe sur le chromosome Xp21. Il est constitué de 2,3 millions de paires de bases et sa transcription donne lieu à un ARN messager de 14 mille nucléotides. La traduction donne lieu à une protéine de 427 Kilo daltons, la dystrophine.

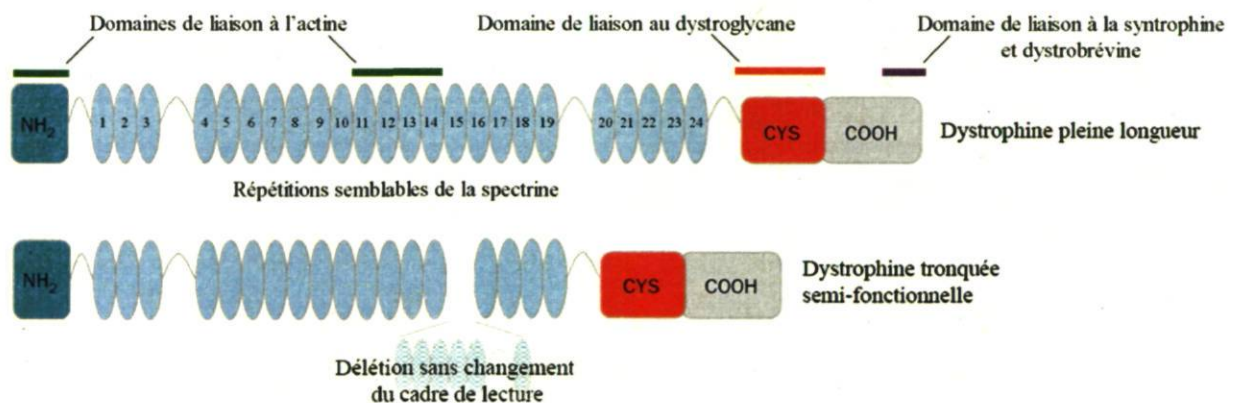


Figure 4 : Représentation structurale des quatre domaines de la dystrophine. Le domaine N-terminal (turquoise); le domaine central (bleu); le domaine riche en résidus cystéines (orange) et le domaine C-terminal (gris). Une mutation causant un phénotype Duchenne cause généralement une absence de protéine. Une délétion dans le domaine central sans changement dans le cadre de lecture donne lieu à une protéine tronquée mais semi fonctionnelle. (Muntoni, Torelli et al. 2003)

4. Les modèles animaux de la dystrophie musculaire de Duchenne

Une grande variété de modèles animaux de la dystrophie musculaire de Duchenne a été utilisée afin d'étudier les mécanismes de mortalité des fibres musculaires et l'application et la faisabilité de différents traitements.

4.1 La souris *mdx*

La souris C57/10ScSn *mdx* est le modèle animal le plus communément utilisé en laboratoire (Bulfield *et al.* 1984). Elle produit une dystrophine tronquée non fonctionnelle. Il s'agit d'un modèle très efficace pour essayer de mettre en place des protocoles pour les différentes thérapies cellulaires et géniques parce qu'il est facile à manipuler, à reproduire et le coût est raisonnable. Cependant, le modèle *mdx* présente un phénotype beaucoup moins sévère que les patients dystrophiques humains. On y observe peu de fibres en nécrose et peu d'infiltration de fibrose et d'adipose et leur mouvement n'est pas restreint à l'âge adulte. Il s'agit d'une limitation de taille pour l'extrapolation de résultats obtenus chez la souris *mdx* à l'Homme (Collins and Morgan 2003).

4.2 Le chien GRMD

L'absence de dystrophine chez le chien donne lieu à un phénotype très sévère semblable à celui de l'Homme. Il y a plusieurs races de chiens dystrophiques mais les plus utilisés en recherche sont les chiens *Golden Retriever* et est due à la mutation A en G sur un site d'épissage se situant à l'extrémité 3' de l'intron 6 (Sharp *et al.* 1992). Ce modèle présente des avantages par rapport au modèle murin, comme la ressemblance du phénotype et de la progression de la maladie entre le chien et l'humain, ce qui rend plus fiable l'extrapolation des résultats de thérapies éventuelles à l'humain. Cependant, il est très difficile et très coûteux d'obtenir et d'entretenir une colonie de chiens dystrophiques. De plus, leur émotivité rend difficile l'expérimentation sur ce genre d'animal (Collins and Morgan 2003).

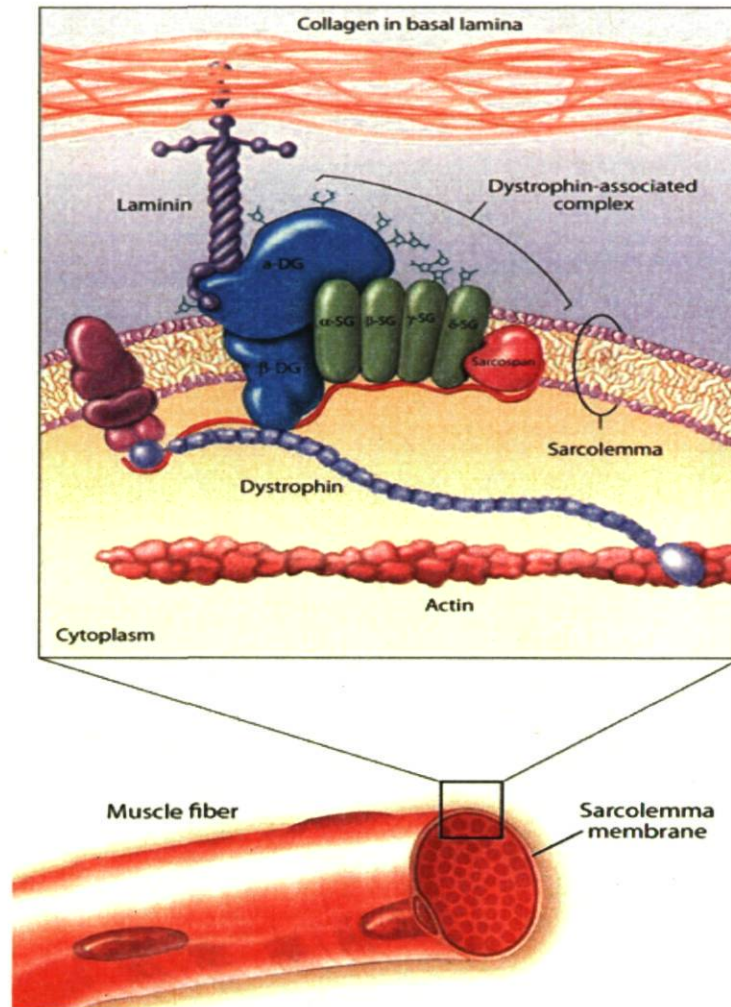


Figure 5 : Schéma du complexe glycoprotéique de la dystrophine (complexe CGD)
 (www.snf.org/briefings)

4.3 Les modèles invertébrés

Le modèle zebrafish est très intéressant puisqu'il contient beaucoup de muscles squelettiques et exprime les orthologues de presque toutes les protéines du complexe CGD de l'humain, avec la même localisation membranaire (Chambers *et al.* 2001; Guyon *et al.* 2003). Le modèle nématode *C.elegans* exprime aussi la dystrophine ainsi que nombreuses protéines du complexe CGD (Bessou *et al.* 1998). D'autres modèles invertébrés comme la drosophile et l'oursin de mer (Neuman *et al.* 2001) peuvent être utilisés pour des études à grande échelle. La manipulation génétique et la production de grandes quantités de clones de ces modèles sont très faciles. Ils sont idéals pour des études génétiques et pharmacologiques à grande échelle (Baumeister and Ge 2002). Cependant, l'inconvénient majeur des modèles invertébrés est que leur phénotype est très différent de celui des patients dystrophiques.

5. Les thérapies de la dystrophie musculaire de Duchenne

Le traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne est présentement envisagé comme une thérapie multidisciplinaire qui combine plusieurs approches permettant de cibler les différentes complications qui surviennent au cours de la maladie. Il s'agit de problèmes au niveau du muscle squelettique, du système pulmonaire, du cœur et des os. Les thérapies potentielles peuvent être classées en trois groupes : la thérapie pharmacologique, la thérapie génique virale et non virale et la thérapie cellulaire.

5.1 La thérapie pharmacologique

La thérapie pharmacologique ne vise pas à corriger le problème à son origine en rétablissant l'expression ou en introduisant une dystrophine fonctionnelle dans le muscle. Néanmoins, en utilisant des agents pharmacologiques, il est possible de cibler les symptômes de la maladie et limiter ses conséquences comme l'inflammation, la dégénérescence et l'affaiblissement du muscle.

5.1.1 Les corticostéroïdes

Il s'agit de la seule approche permettant d'améliorer la qualité de vie des patients. Ils peuvent diminuer la réponse inflammatoire et la fibrose en augmentant la stabilité des membranes et en améliorant la force musculaire. Ils peuvent aussi augmenter l'hypertrophie des muscles *in vivo* (Hayes and Williams 1998). Deux drogues sont régulièrement prescrites aux patients : la prednisone et le déflazacort. Les deux médicaments ont des effets bénéfiques similaires, mais le déflazacort présente moins d'effets secondaires indésirables. Il peut donc être utilisé sur une période de temps prolongée afin de retarder la progression de la maladie (Biggar *et al.* 2001). Toutefois, les effets secondaires conséquents à une prise à long terme ne sont pas négligeables. Il peut en résulter un gain de poids considérable qui augmente l'infiltration de gras dans le muscle dystrophique, l'hypertension, l'hyperglycémie, l'ostéoporose et dans certains cas des cataractes (Kinali *et al.* 2002). Une prise régulière à faible dose peut diminuer les effets secondaires mais ces derniers ne sont pas inévitables.

5.1.2 Les aminoglycosides

C'est l'une des seules approches pharmacologiques qui a le potentiel de corriger le déficit au niveau moléculaire. Les aminoglycosides sont des antibiotiques qui permettent à la machinerie de transcription cellulaire d'outrepasser les codons stop. Ces antibiotiques peuvent restaurer l'expression de la dystrophine chez environ 10 à 15% des patients, c'est-à-dire ceux qui portent une mutation non-sens. À titre d'exemple, la gentamicine permet de dépasser le codon stop UAG. Les résultats obtenus chez la souris *mdx* sont très prometteurs (Barton-Davis *et al.* 1999) mais un premier essai clinique chez l'humain a eu très peu de succès. En effet, les doses utilisées et la durée du traitement ne semblent pas suffisantes pour corriger la mutation. Cependant, utiliser des doses plus élevées ou prolonger la durée du traitement présentent des risques de d'ototoxicité et de néphrotoxicité (Wagner *et al.* 2001).

5.1.3 Le PTC 124

Le PTC 124 est un agent pharmacologique très prometteur. Il s'agit d'une molécule qui permet aux ribosomes de dépasser les codons stop prématurés sur les ARN messagers. Des études chez la souris *mdx* montrent une augmentation de l'expression de la dystrophine de 25% par rapport à un groupe contrôle (Welch *et al.* 2007). Deux études cliniques de phase I ont montré que la drogue est bien tolérée avec de très légers effets secondaires quand la dose est élevée (Hirawat *et al.* 2007), ce qui a conduit à entreprendre une étude clinique de phase IIa. Une des complications potentielles du PTC 124 et des aminoglycosides est la possibilité de dépassement des codons stop sur les ARN messagers de façon générale et aléatoire. Mais comme les gènes contiennent normalement plusieurs codons stop à la fin du transcrit, le risque de telles complications est réduit.

5.1.4 L'utrophine

L'utrophine a une fonction similaire à celle de la dystrophine. Elle est autant capable de restaurer le complexe CGD au niveau de la membrane. Elle ne présente aucune toxicité et aide à prévenir la dégénérescence des muscles chez la souris *mdx* (Fisher *et al.* 2001). L'idée est d'administrer un agent pharmacologique qui augmenterait la quantité de l'utrophine 2 à 3 fois (Tinsley *et al.* 1998), comme l'héréguline, un facteur de croissance dérivé des nerfs. L'héréguline a permis d'augmenter de 3 fois le niveau de l'utrophine chez la souris *mdx* (Krag *et al.* 2004).

5.1.5 Les facteurs de croissance

L'utilisation de ces facteurs a pour but d'augmenter spécifiquement la force et la taille des fibres musculaires puisqu'il a été démontré que l'hypertrophie permet d'augmenter la résistance aux dommages liés aux contractions musculaires (Bogdanovich *et al.* 2002). Ainsi, pour induire l'hypertrophie, il est possible soit d'induire l'IGF-1 (Barton

et al. 2002), soit d'inhiber la myostatine (Minetti *et al.* 2006). Ces facteurs seront discutés plus en détails dans le chapitre sur le muscle squelettique.

5.2 La thérapie génique

Il y a deux types de thérapies géniques : les thérapies virales qui nécessitent l'utilisation de vecteurs viraux pour livrer le transgène de la dystrophine, et les thérapies non virales qui ont recours à d'autres techniques.

5.2.1 Les méthodes virales

Les vecteurs viraux présentent une alternative prometteuse pour délivrer le gène de la dystrophine aux muscles dystrophiques. Il y a quatre types de vecteurs viraux qui peuvent être utilisés : les rétrovirus, les lentivirus, les adénovirus et les AAV. Chacun d'entre eux présente des avantages et des inconvénients qui lui sont propres

5.2.1.1 Les rétrovirus

Ces vecteurs sont peu utilisés dans le cadre de la thérapie pour la dystrophie musculaire de Duchenne. Des études rapportant son utilisation avec le gène de la minidystrophine montrent des résultats peu concluants chez la souris *mdx* (Dunckley *et al.* 1993; Salvatori *et al.* 1993).

5.2.1.2 Les lentivirus

Ils présentent l'avantage majeur de pouvoir infecter les cellules quiescentes. De plus, ils ont une capacité de clonage de 9 Kilo bases. Des études utilisant des lentivirus codant pour la minidystrophine montrent que la livraison du gène d'intérêt par injection intramusculaire est très faible. D'autre part, l'infection de myoblastes *in vitro* puis leur transplantation dans la souris *mdx* permet de former un nombre élevé de fibres dystrophine

positives (Li *et al.* 2005). Des résultats semblables ont été obtenus chez la souris *mdx* et le singe après la transplantation de cellules modifiées génétiquement avec un lentivirus codant pour la microdystrophine (Quenneville *et al.* 2007).

5.2.1.3 Les adénovirus

Ces vecteurs présentent un risque très élevé de réponse immunitaire. De ce fait, nombreuses équipes travaillent sur des façons de le rendre moins immunogène (Amalfitano *et al.* 1998; Scott and Chamberlain 2003). Une étude sur l'utilisation d'un adénovirus modifié véhiculant la dystrophine pleine longueur présente des résultats prometteurs avec la restauration de 30% de l'expression de la dystrophine un mois après une simple injection intramusculaire dans des souris nouvelles-nées (DelloRusso *et al.* 2002).

5.2.1.4 Les AAV

L'AAV est le vecteur de choix pour délivrer le gène de la minidystrophine ou de la microdystrophine (Blankinship *et al.* 2006). Il induit des réponses immunitaires et inflammatoires réduites par rapport aux autres vecteurs viraux. De plus, il infecte les muscles squelettiques et cardiaques avec une grande efficacité (Gao *et al.* 2005). Une étude menée dans le cadre de la dystrophie musculaire de Duchenne montre que l'injection intramusculaire de l'AAV codant pour la minidystrophine ou la microdystrophine induit une amélioration de la pathologie chez la souris *mdx* (Wang *et al.* 2000; Fabb *et al.* 2002). D'autre part, l'injection intraveineuse de l'AAV6 codant pour la microdystrophine a permis d'infecter 90% des muscles squelettiques et cardiaques et 100% du diaphragme chez la souris *mdx* (Gao *et al.* 2005).

5.2.2 Les méthodes non virales

Bien que les méthodes non virales soient moins efficaces que les méthodes virales en termes de livraison du transgène, elles ont l'avantage de causer moins de complications

(Romero *et al.* 2004). Toutefois, avec les avancées en recherche, des techniques de plus en plus efficaces sont disponibles pour introduire l'ADN dans les cellules.

5.2.2.1 L'ADN plasmidique nu

Cette approche consiste à utiliser un plasmide contenant l'ADN complémentaire de la dystrophine pour la délivrer au muscle, sous le contrôle de promoteurs eucaryotes inductibles (Wolff *et al.* 1990). Les avantages de cette approche sont majoritairement la simplicité et le coût abordable. Les bénéfices potentiels ont mené à une étude clinique de phase I où des injections intramusculaires d'un plasmide contenant la dystrophine pleine longueur sous le contrôle du promoteur CMV (cytomégalo virus) ont été effectuées. Le suivi a montré que la dystrophine était présente dans les muscles de 6 patients sur 9, mais en très faibles quantités (Romero *et al.* 2004).

Parmi les inconvénients de cette approche, on peut signaler la difficulté d'augmenter l'efficacité de livraison et de distribution du plasmide dans le muscle. Un des moyens pour résoudre ce problème serait d'avoir recours à la sonoporation (Utilisation d'ultrasons) (Taniyama *et al.* 2002), ou encore l'électroporation (utilisation de chocs électriques) (Aihara and Miyazaki 1998; Mir *et al.* 1999) pour ouvrir les pores de la membrane des fibres et augmenter le taux de pénétration du plasmide. Cependant, ces méthodes sont très invasives et peuvent causer des dommages aux muscles. Il est aussi possible d'utiliser des co-polymères amphiphiliques pour la transfection *in vivo* (Roques *et al.* 2009)

5.2.2.2 L'Editing du génome

Cette approche est basée sur la réparation endogène de l'ADN au niveau d'une mutation ponctuelle. De ce fait, elle ne peut être utilisée qu'au bénéfice de 30% des patients Duchenne (Prior and Bridgeman 2005). Le principe est d'utiliser une séquence d'oligonucléotides (RDO) ou oligodéoxynucléotides (ODN) chimériques qui s'apparient à la région du gène portant la mutation, à l'exception d'un seul mésappariement, qui représente le nucléotide de type sauvage au niveau du gène. Après l'insertion de l'ODN ou

RDO dans le génome par appariement de paires de bases, la machinerie cellulaire de réparation corrige le mésappariement sur l'ADN de l'hôte. Une étude menée en utilisant cette approche montre une certaine efficacité dans la restauration de l'expression de la dystrophine *in vitro* et *in vivo* (Bertoni *et al.* 2005). L'inconvénient majeur est que le niveau de livraison est très faible (Bertoni and Rando 2002).

5.2.2.3 Le saut d'exon

Cette approche vise à moduler l'épissage de l'ARN pré-messager de la dystrophine afin d'éliminer un ou plusieurs exons qui contiennent des mutations, et ce pour restaurer le cadre de lecture (**figure 6**). Le principe repose sur l'utilisation de petites séquences d'ARN nommées oligoribonucléotides antisens ou ONA. Elles sont spécifiquement complémentaires à un site d'épissage particulier sur le transcrit de la dystrophine. Ainsi, en neutralisant un site d'épissage, les ONAs permettent la production d'une dystrophine tronquée mais fonctionnelle en partie (Dunckley *et al.* 1998; Bremmer-Bout *et al.* 2004). Actuellement, deux types d'ONA sont utilisés : Ceux avec des noyaux riboses contenant du 2'-O-méthyl phosphorothioate (ONAs 2'-O-méthyl) et ceux avec des noyaux riboses contenant la modification morpholino-phosphorodiamidate (ONAs morpholino). Une étude menée chez la souris *mdx* montre qu'une simple injection intramusculaire d'ONAs a permis la restauration de l'expression de la dystrophine tronquée dans 23% des fibres (Williams *et al.* 2006). L'injection systémique est aussi possible et permet de restaurer la dystrophine dans les muscles difficiles d'accès comme le diaphragme (Lu *et al.* 2003). Une autre étude menée chez la souris *mdx* montre que deux semaines après l'injection intraveineuse d'ONAs morpholino, l'expression de la dystrophine a été détectée dans tous les muscles squelettiques, incluant le diaphragme, les muscles intercostaux et abdominaux (Alter *et al.* 2006). Une troisième étude, aussi chez la souris *mdx*, montre que des injections intraveineuses hebdomadaires sur une durée de 7 semaines résultent en la restauration de la dystrophine tronquée dans 70% des fibres (Fletcher *et al.* 2007). Des essais clinique sont actuellement en cours.

Il s'agit là d'une approche très prometteuse, mais qui a seulement le potentiel de restaurer l'expression d'une dystrophine tronquée et fonctionnelle en partie. Il en résulte un

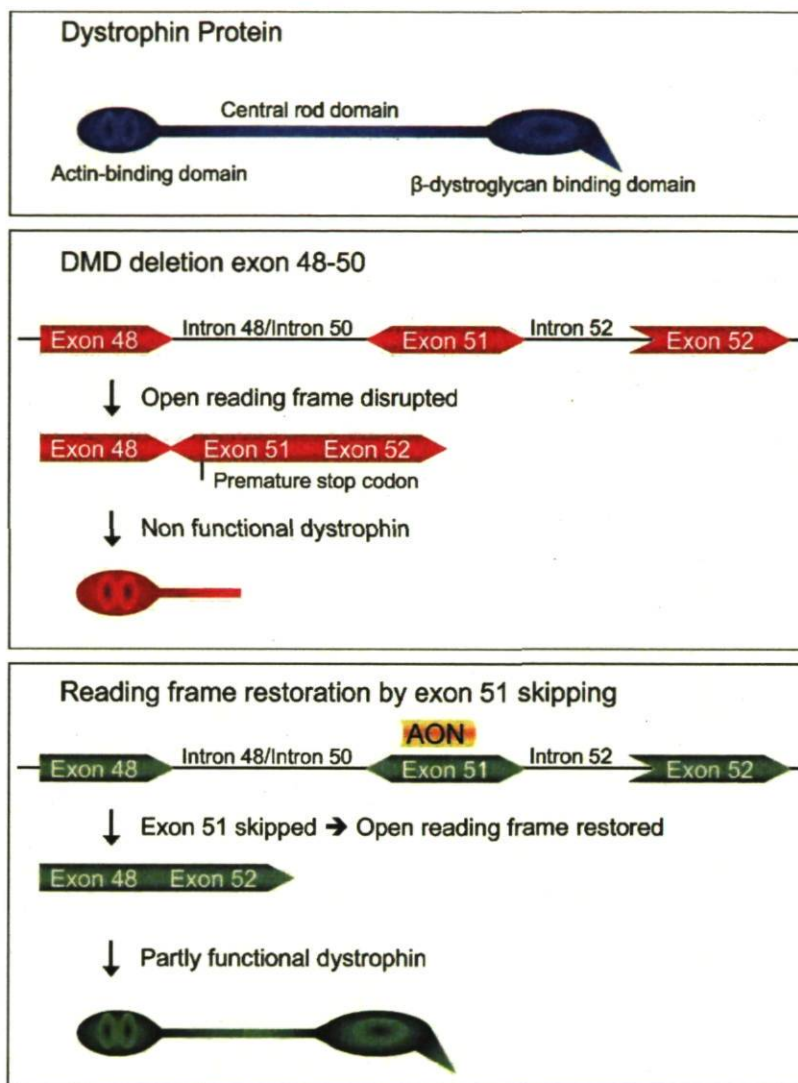


Figure 6 : Le saut d'exon. (Aartsma-Rus and van Ommen 2007).

phénotype moins sévère que celui des patients Duchenne, mais le patient reste malgré tout dystrophique.

5.3 La thérapie cellulaire

La thérapie cellulaire consiste en la transplantation de cellules myogéniques saines à un patient Duchenne. Les cellules transplantées peuvent fusionner avec les fibres dystrophiques pour former des fibres hybrides ou fusionner entre elles pour former de nouvelles fibres. Dans les deux cas, ces fibres formées sont en mesure d'exprimer la dystrophine. Plusieurs types de cellules myogéniques ou de cellules à potentiel myogénique peuvent être utilisés pour la thérapie cellulaire (Peault *et al.* 2007).

5.3.1 Les myoblastes

Les myoblastes sont des cellules myogéniques qui trouvent leur origine dans le mésoderme. Elles résultent de l'activation et de la différenciation des cellules satellites, qui se trouvent sous la lamina basale des fibres musculaires, après un dommage au niveau du muscle. La thérapie cellulaire par le biais de myoblastes est étudiée depuis longtemps par plusieurs équipes, notamment la notre. Les myoblastes proviennent de biopsies musculaires prises chez des personnes saines.

Ce type de thérapie fait face à de nombreux obstacles qui limitent son succès (Skuk and Tremblay 2000). Parmi les obstacles on compte :

- La mort précoce des myoblastes

Il a été démontré par plusieurs équipes que les myoblastes transplantés meurent en majeure partie (70% à 95%) pendant les quatre premiers jours suivant la greffe (Huard *et al.* 1994; Guerette *et al.* 1997). Plusieurs facteurs entrent en jeu pour induire la mort des myoblastes : la réponse inflammatoire médiée par les neutrophiles (Guerette *et al.* 1997), le stress physique induit par la transplantation (Baines and Molkentin 2005), la perte d'adhésion cellulaire ou anoïkose (Bouchentouf *et al.* 2007). Il a été pensé que l'ischémie ou le choc hypoxique était parmi les facteurs induisant la mort précoce des myoblastes mais il a été

récemment démontré dans notre laboratoire que ce n'est pas le cas, tout au contraire, les cellules prolifèrent mieux en conditions hypoxiques (Cheikh et al. Manuscrit en rédaction).

- La réponse immune de l'hôte

Une réponse immunitaire peut être déclenchée par une transplantation de nature hétérologue (cellules provenant de donneur sain) ou autologue (cellules provenant du patient et corrigée *in vitro*). Des anticorps dirigés contre la dystrophine ont été détectés chez des patients dystrophiques et des souris *mdx* qui ont reçu une transplantation sans immunosuppression (Huard *et al.* 1992; Roy *et al.* 1993). Pour contourner la réponse immunitaire de l'hôte, il est d'usage d'administrer des immunosuppresseurs avant et après la greffe. La cyclosporine A et le cyclophosphamide ont été utilisés avant de se rendre compte qu'ils induisaient la mort des cellules par apoptose (Vilquin *et al.* 1995; Hong *et al.* 2002). Le tacrolimus ou FK506 est un immunosuppresseur plus adéquat, mais son utilisation à long terme entraîne une toxicité au niveau neurologique et rénal (McDiarmid *et al.* 1995). L'approche idéale est d'induire le chimérisme du système immunitaire de l'hôte. Pour ce faire, il est possible de combiner deux drogues comme le tréosulfan et le cyclophosphamide (Stephan *et al.* 2006).

- La migration limitée

Les myoblastes transplantés ont un très faible potentiel migratoire à partir de leur trajectoire d'injection. Il est donc nécessaire d'effectuer un grand nombre d'injection à des distances très rapprochées lors des greffes, ce qui les rend très invasives et très pénibles pour le patient (Skuk *et al.* 2000; Skuk *et al.* 2002; Skuk *et al.* 2006). La migration limitée peut être due à l'incapacité des myoblastes à traverser la matrice extracellulaire entre les fibres. Il est donc à envisager d'augmenter la sécrétion de métalloprotéinases de matrice ou MMPs (famille d'enzymes qui dégradent la matrice extracellulaire). Dans ce sens, il a été démontré que traiter les myoblastes avec des inducteurs de MMPs (Ito *et al.* 1998) ou augmenter l'expression de MMPs (El Fahime *et al.* 2000) permet d'augmenter la migration des cellules *in vivo*. Le prétraitement et la co-injection des myoblastes avec des facteurs de croissance comme l'IGF et le MGF qui régulent positivement le système protéolytique permet aussi d'augmenter la migration *in vivo* (Lafreniere *et al.* 2004; Mills *et al.* 2007). Le même résultat est obtenu en utilisant l'interleukine 4 (Lafreniere *et al.* 2006). Dans ce mémoire, l'effet de l'interleukine 13 sur la migration des myoblastes humains est évalué.

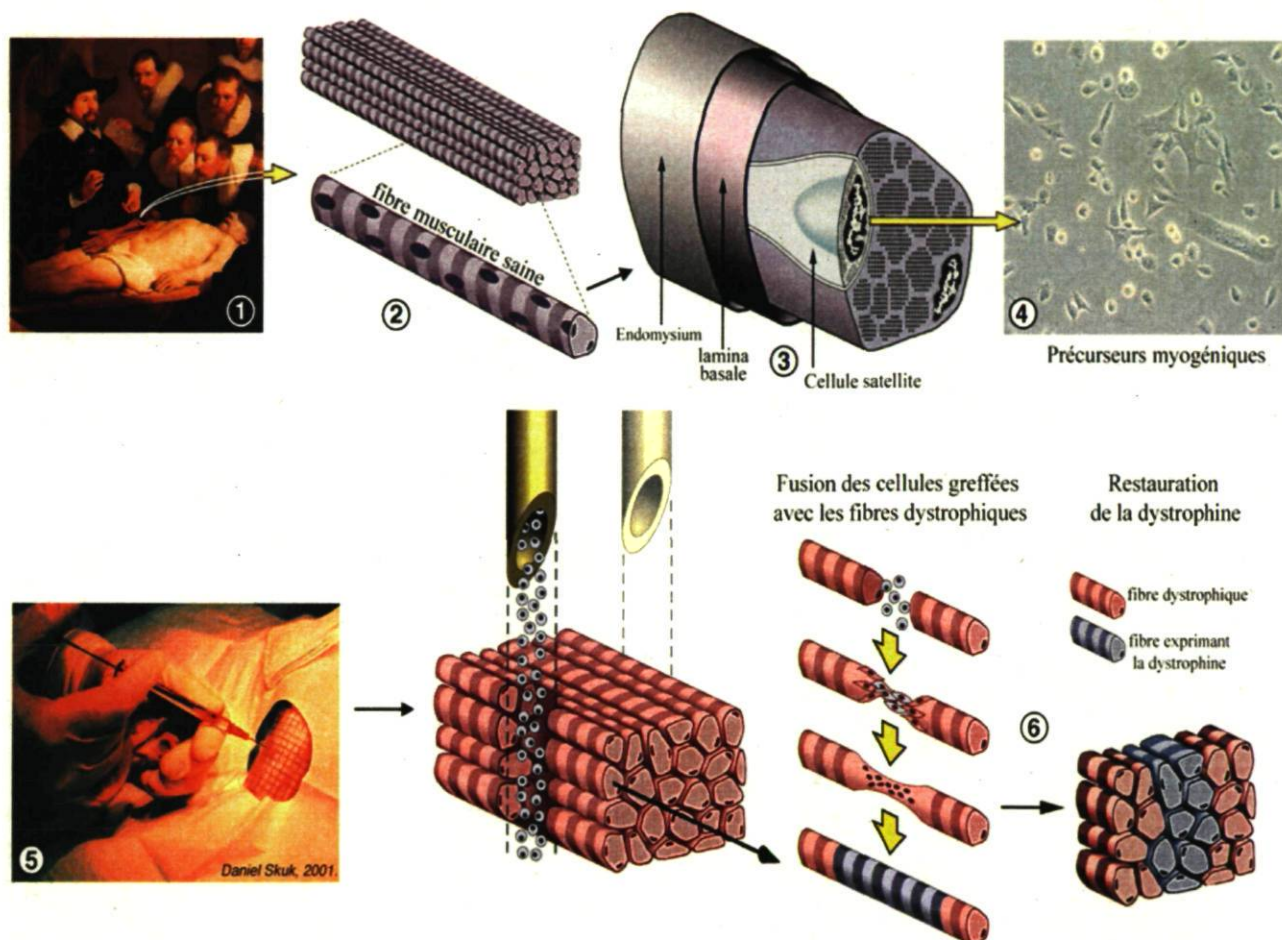


Figure 7 : Les étapes de la thérapie cellulaire. (1) Prélèvement d'une biopsie musculaire d'un donneur sain. (2), (3) et (4) Digestion enzymatique de la biopsie, extraction et mise en culture des cellules myogéniques. (5) transplantation des cellules. (6) Fusion des cellules et formation de fibres hybrides exprimant la dystrophine (Skuk and Tremblay 2001).

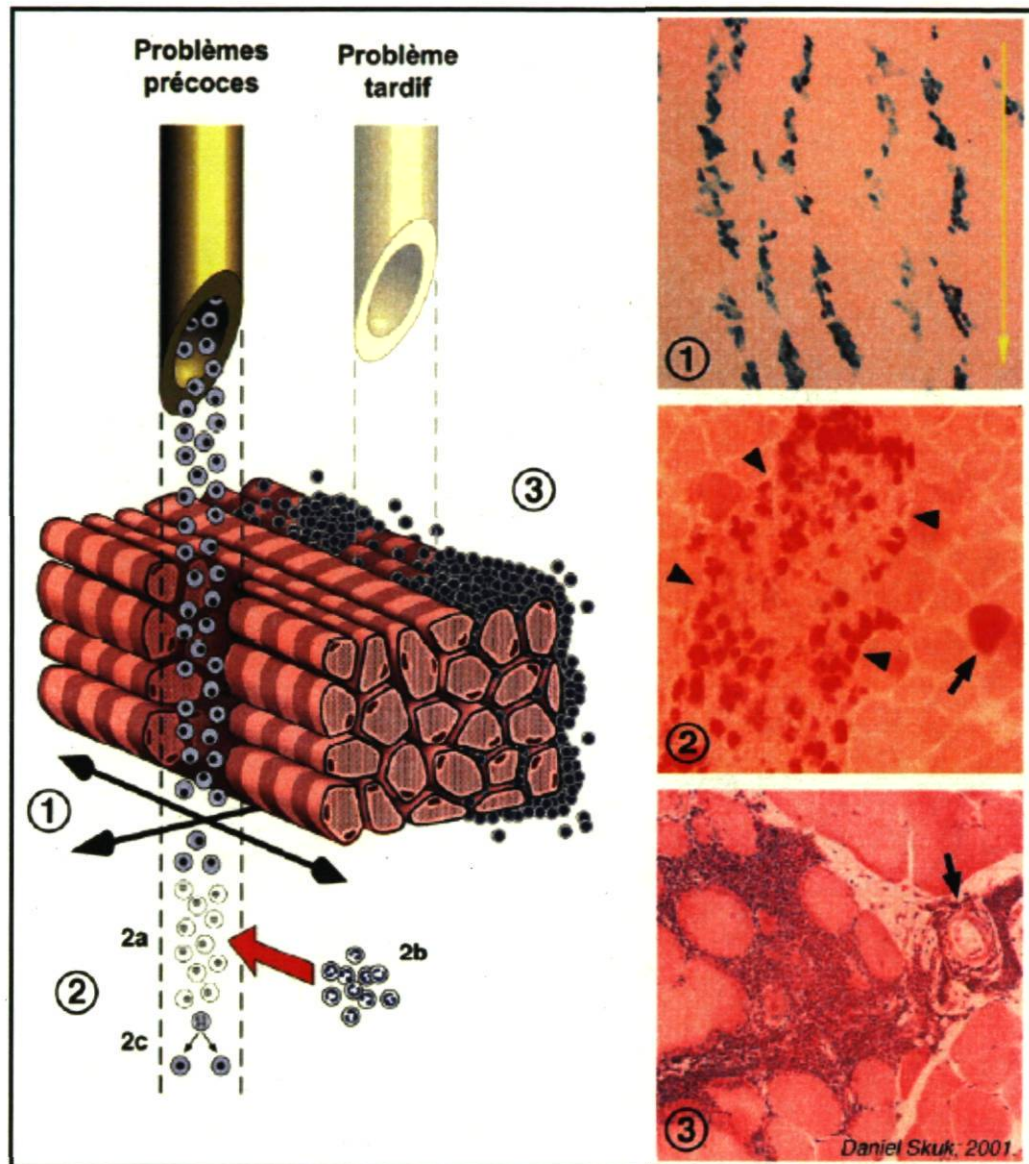


Figure 8 : Limites de la thérapie cellulaire avec des myoblastes. (1) La faible migration des myoblastes à partir de la trajectoire d'injection. Les cellules marquées au LacZ restent confinées dans les trajectoires d'injection. (2) La mort précoce des myoblastes. La coloration à l'alizarine red montre les dépôts calciques résultant de la mort des cellules 6h après la transplantation. (3) La réponse immunitaire. La coloration à l'hématoxyline et éosine montre la mobilisation et l'infiltration de cellules immunitaires au site de transplantation (Skuk and Tremblay 2001).

5.3.2 Les cellules souches hématopoïétiques

Ces cellules proviennent de la moelle osseuse et ont la capacité de migrer du sang vers le tissu musculaire. Il a été mis en évidence que ces cellules ont un potentiel myogénique chez la souris et chez l'Homme (Corti *et al.* 2002). Malheureusement, la transplantation de cellules souches hématopoïétiques chez un enfant dystrophique a donné des résultats très peu satisfaisants en termes de fibres positives pour la dystrophine. Ces résultats sont expliqués par des conditions de transplantation et d'immunosuppression non optimales (Gussoni *et al.* 2002). De plus, des études plus récentes montrent que de telles transplantations peuvent avoir une faible valeur thérapeutique en termes de régénération musculaire dans les modèles animaux (Wang *et al.* 2009).

5.3.3 Les mésoangioblastes

Il s'agit de cellules souches associées à la paroi des vaisseaux sanguins. Elles ont un potentiel myogénique et peuvent améliorer le phénotype dystrophique chez des souris déficientes en α -sarcoglycan (Sampaolesi *et al.* 2003) et chez les chiens GRMD (Cossu and Sampaolesi 2007). Les chiens montraient une motilité et une force de contraction améliorées.

5.3.4 Les cellules souches embryonnaires (ESC)

Les cellules ESC sont pluripotentes. Elles peuvent se différencier en cellules issues de l'endoderme, du mésoderme et de l'ectoderme. Elles ont aussi la capacité de proliférer indéfiniment *in vitro* (Rohwedel *et al.* 1994). À l'aide des facteurs de croissance appropriés, les cellules ESC peuvent se différencier en cellules myogéniques et former des fibres musculaires positives pour la dystrophine chez la souris *mdx* (Ozasa *et al.* 2007). Cependant, la transplantation de cellules souches embryonnaires non différenciées présente des risques de tumorigénicité (Shiba *et al.* 2009)

5.3.5 Autres types cellulaires

D'autres types cellulaires que ceux cités précédemment ont montré un certain potentiel myogénique *in vitro* et/ou *in vivo*, incluant les cellules SP (side population), les cellules MDSC (myoblasts derived stem cells), les péricytes, les cellules myo-endothéliales et les cellules progénitrices CD133 positives. Toutes ces cellules se trouvent dans la périphérie immédiate des myofibres et seraient associées aux vaisseaux sanguins (Peault *et al.* 2007).

Chapitre II : Le muscle squelettique

1. Origine embryonnaire

Le tissu musculaire provient du mésoblaste. C'est le troisième feuillet embryonnaire qui se forme au cours de la troisième semaine de développement. Il est formé à son tour de trois bandes tissulaires : le mésoblaste para-axial, le mésoblaste intermédiaire et le mésoblaste latéral. C'est le mésoblaste para-axial qui est à l'origine du muscle squelettique (Christ and Ordahl 1995).

2. Structure et fonction du muscle squelettique

Le muscle squelettique représente environ 45% de la masse corporelle (Tortora and Grabowski 1994). Il contribue de façon essentielle au mouvement et à la stabilisation du corps. Il est stimulé par les motoneurones via des signaux électriques. Parmi ses caractéristiques principales c'est qu'il peut se contracter pour générer de la force physique en consommant de l'adénosine triphosphate (ATP). Une contraction musculaire inclue une phase d'étirement et une phase de retour à la forme initiale sans dommages.

2.1 Organisation du muscle

Chaque muscle squelettique est formé de milliers de fibres ou myofibres qui constituent l'unité de base de ce dernier. Elles sont toutes parallèles entre elles et leur organisation est très importante à la fonction du muscle (Sauleda *et al.* 1998). Les fibres sont formées suite à la fusion de myoblastes entre eux, formant un syncytia multinucléé (Pavlath and Horsley 2003).

Les fibres sont organisées à trois niveaux. Elles sont d'abord recouvertes d'une couche de tissu conjonctif appelé endomysium. Des faisceaux contenant jusqu'à 150 fibres

sont recouvertes à leur tour par le périmysium. Finalement, l'épimysium qui enveloppe l'ensemble du muscle (Sanes 1991). Le muscle est aussi constitué de capillaires sanguins et de fibres nerveuses (**Figure 9**).

Le cytoplasme des fibres contient des noyaux en périphérie de la membrane cytoplasmique ou sarcolemme, et des myofibrilles qui sont les éléments contractiles du muscle. Les myofibrilles sont, à leur tour, constituées d'unités plus petites : les myofilaments. Ils sont formés à partir de filaments d'actine et de myosine, de tropomyosine et de troponine (Tortora and Grabowski 1994).

2.2 Les types de fibres

Il existe deux types de fibres musculaires. La différence entre elles repose sur les propriétés métaboliques, contractiles et la quantité d'enzymes associés à la production d'ATP (Tortora and Grabowski 1994). On distingue :

- Les fibres de type I ou fibres lentes oxydatives. Leur contraction est lente et elles sont résistantes à la fatigue, ce qui leur permet de soutenir un exercice physique modéré de longue durée.
- Les fibres de type II ou fibres glycolytiques à contraction rapide. Il y a deux types de ces fibres : les fibres IIA résistantes à la fatigue mais à moindre mesure que les fibres de type I, et les fibres IIB sensibles à la fatigue qui permettent de soutenir un exercice physique intense de courte durée.

3. Formation et régénérescence du muscle squelettique

3.1 Les facteurs myogéniques

Tous les muscles squelettiques proviennent de la fusion de progéniteurs myogéniques. La différenciation des progéniteurs dans cette voie est induite par des

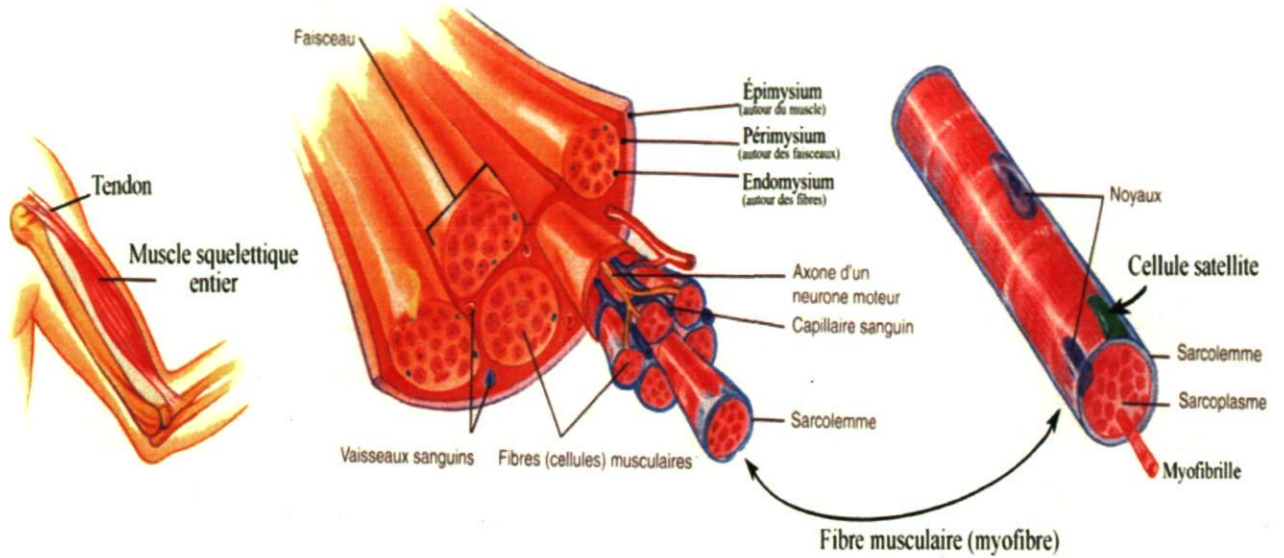


Figure 9 : Organisation et structure du muscle squelettique. Adaptation de Tortora (Tortora 1994)

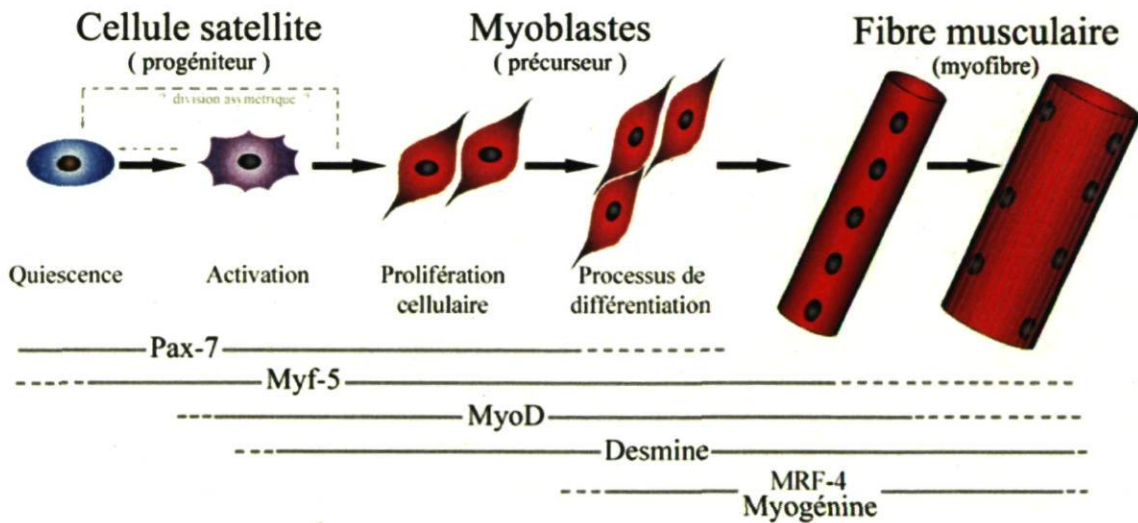


Figure 10 : Les facteurs myogéniques et leur expression au cours du processus de la myogénèse. (Zammit, Partridge et al. 2006)

facteurs de la famille des régulateurs myogéniques ou MRFs. Les cellules positives pour les facteurs de transcription MyoD et/ou Myf5 sont des cellules spécialisées appelées myoblastes. Ces cellules se différencient en fusionnant entre elles pour former des myotubes. Elles expriment alors des MRFs plus tardifs comme la myogénine et MRF4. La maturation des myotubes s'accompagne de l'expression de gènes musculaires comme celui de la créatine kinase et celui de la chaîne lourde de la myosine (MyHC) (Tajbakhsh and Buckingham 2000) (**figure 10**).

3.2 Les cellules satellites

Suite à des dommages au niveau du muscle squelettique, on observe la libération de facteurs qui activent les cellules satellites. Ce sont des cellules mononuclées associées aux fibres. Elles se localisent sous la lamina basale et sont responsables de la croissance et de l'entretien du muscle (Mauro 1961). Elles sont quiescentes jusqu'à leur activation par des facteurs de croissance. Elles se mettent alors à proliférer et se différencient pour produire des myoblastes pouvant fusionner entre eux et avec la fibre endommagée pour la réparer (Bischoff 1986; Schmalbruch and Lewis 2000). La différence entre la régénération d'un muscle sain et celle d'un muscle dystrophique réside dans la disponibilité de cellules satellites. En effet, le muscle dystrophique est sujet à des dommages beaucoup plus fréquemment que le muscle sain. C'est ce qui mène à l'épuisement rapide du pool de cellules satellites (**figure 11**).

3.3 Les facteurs de croissance

Plusieurs facteurs de croissance sont étudiés pour leurs effets sur la régulation de la masse musculaire. Deux de ces facteurs semblent avoir des rôles prépondérants : la myostatine qui a un rôle de régulation négative et l'IGF-1 qui a un rôle de régulation positive.

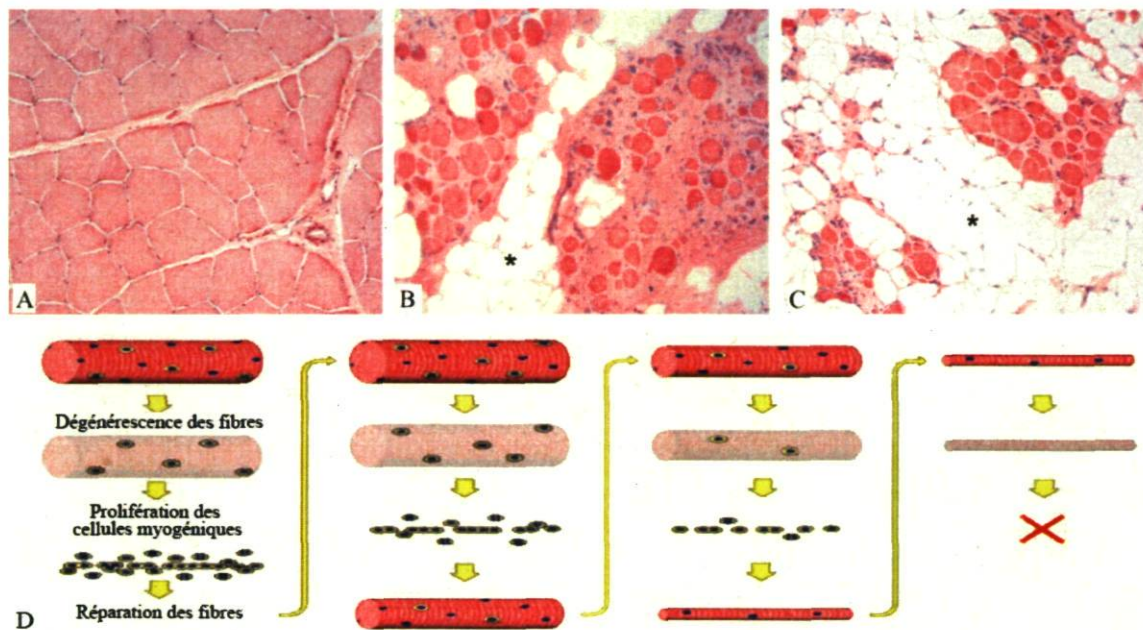


Figure 11 : Le processus de régénération musculaire chez un patient dystrophique. (A) Coupe histologique d'un muscle squelettique normal. (B) et (C) Coupes histologiques de muscles dystrophiques à un stade avancé de la maladie. La coloration à l'hématoxyline et éosine montre une régression de la taille des fibres et une invasion par la fibrose et le gras. (D) Représentation schématique de l'épuisement des cellules satellites chez un patient dystrophique. (Adaptation de Skuk et al. 2004)

3.3.1 La myostatine

Il s'agit d'une protéine impliquée dans l'inhibition naturelle de la croissance des muscles. Elle est exprimée afin d'empêcher l'hypertrophie excessive. Une fois liée à son récepteur, elle bloque les voies de prolifération et de différenciation des cellules myogéniques. Lorsque son activité est inhibée, il en résulte une musculature surdéveloppée. Des cas ont été reportés chez la souris (McPherron *et al.* 1997) ainsi que chez les humains (Schuelke *et al.* 2004). Dans le cas d'un muscle dystrophique, l'inhibition de la myostatine peut s'avérer très efficace pour augmenter la résistance des fibres, la force et la masse musculaire comme le rapporte une étude menée chez la souris *mdx* (Bogdanovich *et al.* 2002; Bogdanovich *et al.* 2005). Il existe plusieurs approches pour inhiber la myostatine : l'injection ou l'expression de protéines antagonistes, l'inactivation de ses récepteurs par thérapie génique ou encore en utilisant des composés qui agissent sur ses voies de signalisation.

Ainsi, inhiber la myostatine à un stade précoce de la maladie de Duchenne aurait le potentiel de ralentir la progression et d'améliorer la qualité de vie des patients (Parsons *et al.* 2006).

3.3.2 L'IGF-1

L'IGF-1 ou Insulin like Growth Factor-1 joue un rôle positif important dans la croissance et la différenciation musculaire (Allen *et al.* 2003). Suite à sa liaison avec son récepteur IGF-1R, il active la prolifération des cellules myogéniques par la voie mitogen activated protein kinase (MAP Kinase). Il induit aussi la différenciation par la voie phosphoinositol 3 kinase (PI3 Kinase) et protéine kinase B ou Akt (Coolican *et al.* 1997). L'IGF-1 permet aussi d'induire l'hypertrophie musculaire et d'augmenter la survie des cellules myogéniques en modulant les voies de la Calcineurine et de la Calmoduline-calcium-dépendante protéine kinase (CamK) (Semsarian *et al.* 1999; Musaro *et al.* 2001). Il a été démontré que l'IGF-1 stimule le métabolisme protéique via Akt en activant la voie mTOR-p70-S6K et en inhibant la voie GSK-3 β , toutes deux impliquées dans le contrôle de la traduction de protéines (Jacquemin *et al.* 2007). De plus, l'IGF-1 favorise la migration

chimiotactique des myoblastes de souris de la lignée C2C12 en passant par les voies Ras et Ral (Suzuki *et al.* 2000).

L'équipe de Mouly a montré que l'IGF-1 induisait l'hypertrophie musculaire *in vivo*, non seulement en augmentant la taille des myotubes et leur teneur en myosine, mais aussi en recrutant les cellules satellites pour la fusion. En effet, ils démontrent qu'il signale exclusivement aux myotubes, ce qui mène, sous le contrôle du facteur de transcription NFATc2, à la sécrétion de l'interleukine 13 qui va à son tour recruter les cellules satellites à la différenciation et à la fusion (Jacquemin *et al.* 2007).

Ces travaux suggèrent que l'interleukine 13 (IL-13) a le potentiel d'induire la différenciation et la fusion des cellules satellites, mais aussi des myoblastes. Elle a aussi éventuellement le potentiel d'augmenter la migration de cellules myogéniques.

3.4 Les myokines

Depuis quelques années, un lien entre les activités contractiles du muscle et les changements immunologiques a été établi. Ce concept est basé sur le fait que l'exercice physique s'accompagne d'une augmentation des niveaux généraux de certaines interleukines dans le muscle. Il a été alors suggéré que toute interleukine ou autre peptide qui est produit, exprimé ou secrété par les fibres musculaires et qui a des effets de nature paracrine ou endocrine devrait être classifié comme myokine. Le muscle squelettique a la capacité de produire plusieurs myokines qui appartiennent à des familles de cytokines différentes (Nielsen and Pedersen 2008). Dans le présent ouvrage, nous nous intéressons à l'interleukine 13. En effet, elle est sécrétées par le muscle après un exercice physique et joue des rôles qui peuvent s'avérer intéressants dans le cadre de la thérapie cellulaire par les myoblastes (Prokopchuk *et al.* 2007; Nielsen and Pedersen 2008).

3.4.1 L'interleukine 6

L'interleukine 6 (IL-6) appartient à la famille de cytokines IL-6. Les membres de cette famille sont caractérisés par leur structure commune et leur utilisation commune du

récepteur pg130 dans les voies de signalisation qui leur sont subséquentes (Kamimura *et al.* 2003). Elle utilise aussi le récepteur IL6R α qui lui est propre. Outre ses effets métaboliques, immunorégulateurs et anti-inflammatoires, IL-6 joue un rôle très important dans l'hypertrophie musculaire. Il a été démontré qu'IL6 est exprimée et secrétée par des myoblastes C2C12 en différenciation (Baeza-Raja and Munoz-Canoves 2004). D'autre part, une étude récente menée *in vivo* montre qu'il s'agit d'un régulateur essentiel de l'hypertrophie musculaire médiée par les cellules satellites. En effet, elle est produite par les myofibres en croissance et par les cellules satellites de façon locale et transitoire. En agissant de façon paracrine, elle permet l'activation et la prolifération des cellules satellites. D'autre part, par son action via le facteur de transcription STAT3, elle régule de façon positive la prolifération et la migration des cellules myogéniques *in vitro* (Serrano *et al.* 2008).

3.4.2 L'interleukine 15

L'interleukine 15 (IL-15) est exprimée dans de nombreux tissus comme le rein, le cœur, les poumons et le muscle (Grabstein *et al.* 1994). Elle a des rôles immunorégulateurs majeurs et ses fonctions dans les cellules hématopoïétiques sont médiées par les chaînes β et γ du récepteur de l'interleukine 2 (Giri *et al.* 1994). De plus, elle joue un rôle important dans le muscle squelettique (Quinn *et al.* 1995). En effet, elle augmente l'expression de la chaîne lourde de la myosine et d'autres protéines contractiles dans les cellules myogéniques différenciées en myotubes. Aussi, la surexpression d'IL-15 induit l'hypertrophie musculaire *in vitro* (Quinn *et al.* 2002). D'autre part, il a été démontré que son administration *in vivo* entraîne des effets anaboliques et diminue la dégradation des protéines musculaires (Carbo *et al.* 2000). Une étude menée sur la souris *mdx* montre que l'administration d'IL-15 permet d'améliorer les symptômes pathologiques de la dystrophie. Le traitement a permis d'augmenter la force du diaphragme et la taille des fibres. Il a aussi diminué l'infiltration du collagène sans induire de réponse inflammatoire (Harcourt *et al.* 2005).

3.4.4 L'interleukine 4

L'interleukine 4 (IL-4) est produite et secrétée de façon prédominante par les cellules hématopoïétiques, notamment les cellules T_{HELPER2} (T_{H2}) (Chomarat and Banchereau 1997). Elle est aussi capable de cibler et d'agir sur une multitude de cellules non hématopoïétiques. Il a récemment été suggéré que les cellules myogéniques peuvent être ciblées par l'IL-4. En effet, elle s'avère être un acteur crucial dans la croissance musculaire. Elle a la capacité de recruter les myoblastes pour fusionner avec les myotubes dans un milieu de différenciation (Horsley *et al.* 2003). Son rôle dans la fusion myogénique est d'autant plus renforcé par le fait que son expression soit sous le contrôle du facteur de transcription NFATc2. Il y a de plus en plus d'évidences que NFATc2 régule l'expression de facteurs importants pour la fusion myogénique (Pavlath and Horsley 2003). D'autre part, les interleukines 4 et 13 sont très similaires de par leur expression, leurs fonctions, leurs récepteurs et leurs voies de signalisation. Ceci sera expliqué en détails dans la section sur l'interleukine 13.

Il a été démontré que l'IL-4 augmente la migration des myoblastes *in vitro* et *in vivo* en régulant de façon positive le système protéolytique des cellules, notamment en augmentant l'expression de MMP2 et MMP9, et en augmentant l'expression d'intégrines importantes pour la migration cellulaire comme β 3 et β 1 (Lafreniere *et al.* 2006).

3.4.5 L'interleukine 13

L'interleukine 13 est une cytokine immunorégulatrice secrétée de façon prédominante par les cellules T_{H2} activées. Elle est très étudiée dans le cadre de l'asthme et de l'allergie inflammatoire où elle joue des rôles clés dans l'évolution de la pathogénèse. Ses effets possibles sur les cellules myogéniques et les muscles squelettiques ont été mis en évidence relativement récemment. Il n'y a donc pas beaucoup de littérature relatant l'interaction entre IL-13 et le muscle squelettique. La partie qui suivra sera une description de la structure, des voies de signalisation et des fonctions d'IL-13 et de ses récepteurs. Les fonctions qui seront décrites ont été observées sur d'autres types cellulaires, mais peuvent

éventuellement être extrapolées aux cellules myogéniques. Bien évidemment, il s'agit là d'un raisonnement purement théorique qui demande à être vérifié expérimentalement.

3.4.5.1 Caractérisation

L'IL-13 a été décrite en premier lieu en 1989. Elle était alors nommée P600 et était définie comme une protéine produite de façon prédominante par les cellules TH2 (Brown *et al.* 1989). Elle appartient à la classe I des cytokines, caractérisée par une structure centrale constituée de quatre hélices α (Leonard and Lin 2000). Le gène d'IL-13 est constitué de 4 exons et de 3 introns et se situe sur le chromosome 5q31. Cette région chromosomique contient aussi les gènes des interleukines 3, 4, 5, 9 et de GM-CSF (McKenzie *et al.* 1993; Smirnov *et al.* 1995). L'ADNc de l'IL-13 humaine été cloné depuis environ 18 ans et son étude a permis de mieux caractériser le gène et la protéine. Il a un seul cadre de lecture et contient 132 acides aminés, dont 20 qui constituent une séquence signal qui est clivée de la protéine mature (de Vries 1996). Sa transfection dans des cellules a montré que la protéine sécrétée est hydrophile, non glycosylée, et a une taille d'environ 10 Kilo Daltons. La totalité de la structure tertiaire de la protéine reste à être déterminée par cristallographie. De plus, il a été établi que l'action d'IL-13 n'est pas espèce spécifique. Ainsi, l'IL-13 de souris a la même capacité d'action sur les cellules humaines et les cellules de souris. Cependant l'IL-13 humaine agit de manière beaucoup plus prononcée sur les cellules humaines que sur les cellules de souris (Minty *et al.* 1993).

3.4.5.2 Les récepteurs

Comme mentionné précédemment, IL-13 est une cytokine de classe I. Sa signalisation passe donc par des récepteurs de cytokines de classe I. Il s'agit de récepteurs associés aux tyrosines kinases qui partagent plusieurs caractéristiques communes : quatre résidus cystéine très conservés, un motif W-S-X-W-S, des modules fibronectine de type II dans le domaine extracellulaire et des régions proline-rich-box dans le domaine intracellulaire qui sert à recruter les tyrosines kinases (Leonard and Lin 2000). Aussi, les récepteurs de cytokines de classe I forment des hétérodimères quand ils sont activés. La signalisation d'IL13 passe un hétérodimère constitué du récepteur de l'interleukine 4

(IL4R α) et du récepteur IL13R α 1. IL-13 peut aussi se lier au récepteur IL13R α 2 qui ne forme pas d'hétérodimère et dont les mécanismes sont encore peu connus (Hershey 2003).

3.4.5.2.1 Le récepteur IL4R α

IL4R α est une protéine de 140 Kilo daltons qui lie son ligand avec une très forte affinité ($K_d = 100$ pmol/L). Il contient un seul domaine transmembranaire et un long domaine intracellulaire, qui contient à son tour cinq résidus tyrosine très conservés. Il est exprimé de façon constitutive dans beaucoup de cellules (Park *et al.* 1987). IL4R α fait partie des récepteurs de l'interleukine 4 de type I et II. Le récepteur de type I ne permet pas la signalisation d'IL-13. Il est constitué d'IL4R α et de la chaîne γ commune (γ_c) qui ne lie aucun ligand, mais joue un rôle essentiel dans la signalisation. Le récepteur de type II est constitué d'IL4R α et d'IL13R α 1 et permet la signalisation des interleukines 4 et 13 (Chomarat and Banchereau 1997), d'où leurs effets biologiques très similaires.

3.4.5.2.2 Le récepteur IL13R α 1

IL13R α 1 se trouve uniquement sur l'hétérodimère de récepteurs de l'interleukine 4 de type II. Son gène se situe sur le chromosome X et encode une séquence de 427 acides aminés (Guo *et al.* 1997). La protéine a un seul domaine transmembranaire et un court domaine intracellulaire. Elle a une taille d'environ 70 Kilo daltons. IL13R α 1 lie son ligand avec une faible affinité lorsqu'il est sous sa forme monomérique ($K_d = 2-10$ nmol/L), mais lorsqu'il est associé au récepteur IL4R α , son affinité pour l'IL-13 augmente considérablement ($K_d = 400$ pmol/L) (Miloux *et al.* 1997). Il est exprimé de façon constitutive sur beaucoup de cellules, notamment les myoblastes, mais aucune expression n'a été détectée sur les cellules T (Ogata *et al.* 1998). De plus, il a été établi que ce récepteur est espèce spécifique et forme un hétérodimère fonctionnel seulement en se liant à IL4R α humain (Andrews *et al.* 2001).

3.4.5.2.3 Le récepteur IL13R α 2

Le gène de ce récepteur se trouve aussi sur le chromosome X et encode une séquence de 380 acides aminés (Guo *et al.* 1997). Il a 37% d'homologie avec la séquence d'acides aminés d'IL13R α 1 (Aman *et al.* 1996), et une très grande affinité pour son ligand

($K_d = 250 \text{ pmol/L}$). Cependant, il n'est pas requis pour la fonction d'IL13. En effet, il a été observé *in vitro* que la surexpression d'IL13R α 2 rend les cellules insensibles à l'IL-13, et ce même en présence d'IL4R α . Ce qui a mené à la spéculation qu'il s'agit d'un récepteur de type «Decoy» ou piège (Donaldson *et al.* 1998). Cette théorie a été d'autant plus renforcée par la mise en évidence de formes solubles *in vivo* (Zhang *et al.* 1997).

Il y a de plus en plus d'évidence que ce récepteur a d'autres rôles plus complexes que la régulation négative de la réponse à IL-13 (Tabata and Khurana Hershey 2007). Il a été proposé qu'IL13R α 2, sous certaines conditions d'activation, permet d'initier des réponses signalitiques impliquant le facteur de transcription AP-1, comme l'expression de TGF β et l'induction de la fibrose dans le cadre de remodelages tissulaires (Fichtner-Feigl *et al.* 2006). Cependant, il est d'ordre général qu'il agit de façon primaire comme récepteur «Decoy» qui séquestre l'IL-13 et inhibe ses fonctions en l'empêchant de se lier au complexe IL4R α /IL13R α 1 (Feng *et al.* 1998), en partie à cause de son très court domaine intracellulaire qui ne contient pas de motifs de signalisation connus (Donaldson *et al.* 1998). Aussi, il n'est pas constitutivement exprimé à la surface des cellules. Il est induit en réponse à de fortes doses d'IL-13 ou d'IL-4. Il y a des indices qui suggèrent l'existence d'un pool intracellulaire de récepteurs qui peuvent être rapidement déployés à la surface cellulaire en réponse à des agents inducteurs (Daines and Hershey 2002). Le déploiement d'IL13R α 2 serait sous le contrôle de TNF α et d'INF γ (Yoshikawa *et al.* 2003).

3.4.5.3 Les voies de signalisation

L'expression d'IL-13 est induite par le facteur de transcription NFATc 2 et sa signalisation, comme la majorité des cytokines, induit les voies JAK/STAT et les voies IRS1/IRS 2. (**figure 12**)

3.4.5.3.1 La voie JAK/STAT

Les protéines JAKs sont des tyrosines kinases qui contiennent un domaine catalytique et un domaine pseudo kinase. Il y a quatre JAKs : JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2. JAK1, JAK2 et TYK2 sont exprimés de façon ubiquitaire, alors que JAK3 est exprimé seulement dans les cellules hématopoïétiques (Leonard and Lin 2000). IL4R α et IL13R α 1

contiennent des régions proline-rich-box 1 dans leurs domaines intracellulaires qui leur permettent de recruter JAK1 et TYK2, respectivement. Le recrutement des JAKs résulte en la phosphorylation de résidus tyrosine spécifiques sur le récepteur, ce qui permet le recrutement des protéines STAT via leur domaine SH2 et leur activation par phosphorylation. Par la suite, les protéines STAT forment des dimères (homodimères ou hétérodimères dépendamment de la voie impliquée) qui se transloquent au noyau et agissent comme facteurs de transcription pour initier la transcription de gènes en aval. La signalisation par IL-13 induit l'activation de STAT6. De plus, le recrutement de STAT6 semble être effectué uniquement par IL4R α . Aucune évidence d'interaction entre IL13R α 1 et STAT6 n'a été trouvée. Il y aurait cependant quelques évidences qu'IL13R α 1 serait capable de recruter STAT3, et TYK2 permettrait de l'activer (Wills-Karp and Finkelman 2008). Ainsi, la signalisation par IL-13 aurait le potentiel de former les dimères STAT6/STAT6, STAT3/STAT3 et STAT6/STAT3. Ceci pourrait expliquer quelques rôles non redondants d'IL-13 et IL-4.

STAT6 et STAT3 régulent l'expression de beaucoup de gènes, notamment ceux impliqués dans les voies de survie comme Bcl_{XL} et Bcl₂ (Hebenstreit *et al.* 2006; Kim *et al.* 2009), et ceux impliqués dans la régulation négative de la signalisation des cytokines comme les protéines SOCS (Kim *et al.* 2009).

3.4.5.3.2 Régulation de la voie JAK/STAT

L'activation de la cascade de signalisation JAK/STAT est régulée à plusieurs niveaux, ce qui souligne l'importance de cette voie. Plusieurs régulateurs négatifs de la voie JAK/STAT ont été caractérisés. On peut nommer les phosphatases à domaine SH2 (SHIP), les suppresseurs de signalisation des cytokines (SOCS) et les inhibiteurs des STATs activés (PIAS).

- Les phosphatases à domaine SH2

La protéine SH2 domain containing tyrosine phosphatase 1 (SHIP-1) est une tyrosine phosphatase intracellulaire impliquée dans la régulation négative de beaucoup de récepteurs de cytokines (Haque *et al.* 1998). Le mécanisme par lequel ces phosphatases agissent n'est pas encore très connu. Il a cependant été montré qu'ils agissent sur les JAKs

par liaison directe (Klingmuller *et al.* 1995). Il a aussi été suggéré qu'ils se lient aux récepteurs et agissent sur les STATs (Kashiwada *et al.* 2001).

- Les protéines SOCS

Les protéines SOCS sont aussi appelées JAK2-binding protein, STAT induced STAT inhibitors et CIS (Naka *et al.* 1997). Elles inhibent de nombreuses voies de signalisation grâce à un «cross-talk» considérable (Chen *et al.* 2000; Greenhalgh and Hilton 2001). Les mécanismes par lesquels ces protéines agissent ne sont pas encore très connus, mais il a été montré que certains membres de la famille se lient aux JAKs et les inhibent (Chen *et al.* 2000). Il a aussi été suggéré que les protéines SOCS, une fois liées aux JAKs, seraient ciblées au protéasome pour dégradation via une interaction avec l'elongine B/C (Narazaki *et al.* 1998; Zhang *et al.* 1999).

- Les inhibiteurs des STATs activés

La famille de protéines PIAS compte de nombreux membres (Chung *et al.* 1997). Elles sont exprimées de façon constitutive et peu est connu sur leur régulation. Ces protéines se lient spécifiquement aux dimères de STATs phosphorylés et empêche leur liaison aux séquences cibles d'ADN (Liao *et al.* 2000). En effet, une fois associés aux STATs, les PIAS semblent masquer un site de méthylation très conservé et nécessaire pour lier l'ADN (Mowen *et al.* 2001).

3.4.5.3.3 La voie IRS1/IRS2

La phosphorylation de résidus tyrosine spécifiques sur le récepteur IL4R α recrute deux isoformes du substrat du récepteur de l'insuline : IRS1 et IRS2. Une fois recrutés, ils sont phosphorylés et activés. Deux cascades de signalisation sont activées par IRS1/IRS2 : la voie phosphoinositol 3 kinase (PI3 kinase) et la voie Ras/Mitogen activated protein kinase (MAP kinase) (Jiang *et al.* 2000). L'activation de la voie PI3 kinase mène à l'activation de protéines kinases C et B, ou PKC et Akt, respectivement, et p70S6K, ce qui induit l'activation des voies de survie et de prolifération. Aussi, la voie MAP kinase mène à l'activation de la transcription de gènes qui mène ultimement à l'activation de voies de prolifération et de survie (Kasaian and Miller 2008).

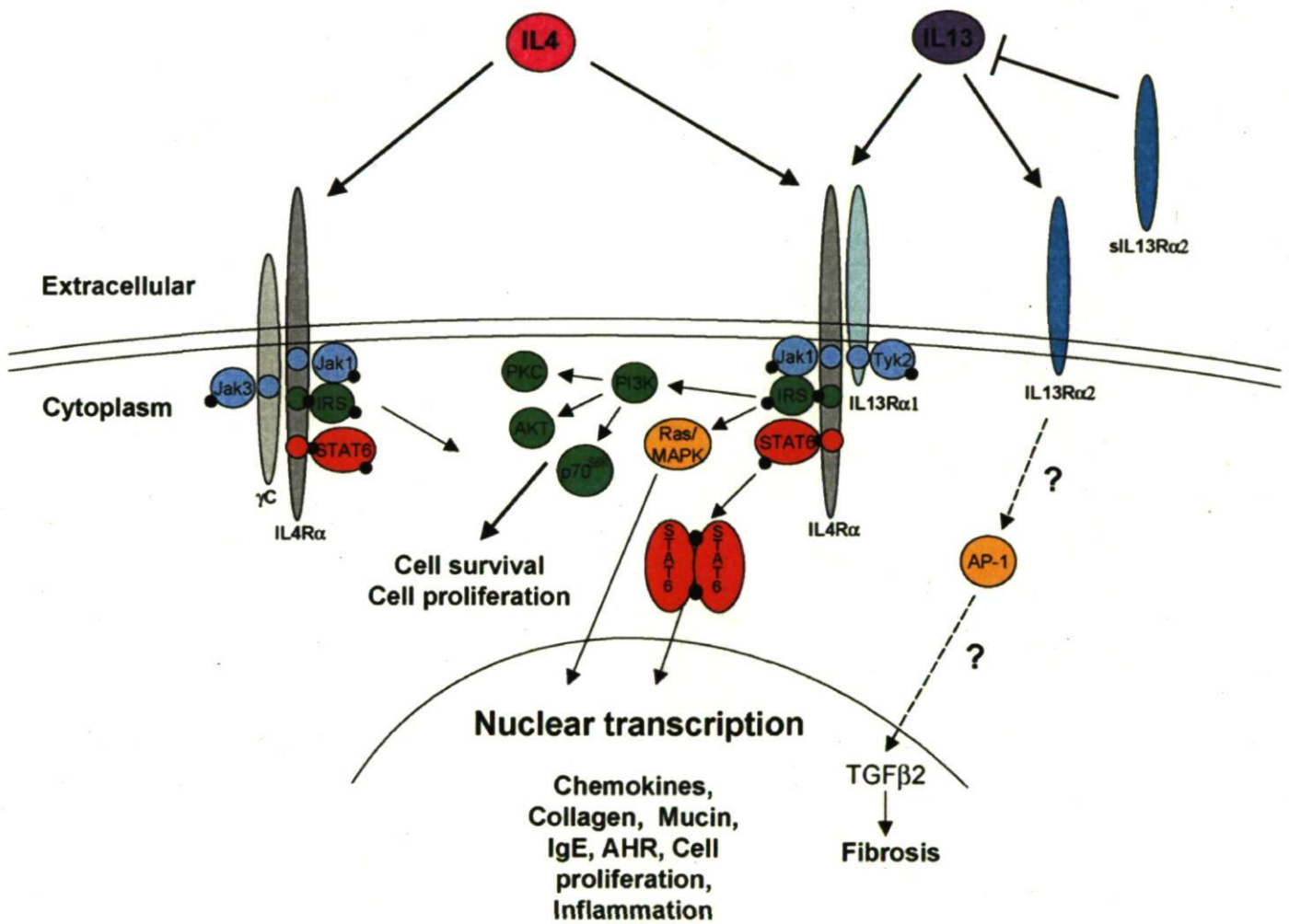


Figure 12 : Les voies de signalisation de l'interleukine 13. (Kasaian and Muller 2008)

3.4.5.3.4 Régulation de la voie IRS1/IRS2

Une protéine kinase associée au récepteur IL4R α , Fes, semble être importante dans la régulation de cette voie. En effet, elle bloque l'activation IL4R α dépendante de IRS1 et de IRS2 et inhibe l'activation subséquente de PI3 kinase et de Ras (Jiang *et al.* 2001). De plus, une multitude de phosphotyrosine phosphatases (PTPs) jouent un rôle important dans la régulation du signal plus en aval de la cascade.

3.4.5.4 Les fonctions

Les fonctions assumées par IL-13 sont reportées dans un grand nombre de cellules. Néanmoins, comme mentionné plus haut, les effets d'IL-13 sur les cellules myogéniques et les muscles squelettiques sont encore peu connus et étudiés. Les fonctions qui seront donc citées se rapportent aux cellules hématopoïétiques, aux fibroblastes et aux cellules du muscle lisse, et ont tous rapport avec l'immunorégulation. (**Figure 13**)

3.4.5.4.1 Les rôles dans les cellules hématopoïétiques

Dans les cellules B humaines, IL-13 induit la prolifération et l'expression de récepteurs de surface comme CD23 et MHC de classe II (Oettgen and Geha 2001). Ce rôle est redondant dans les monocytes et les macrophages, en plus d'augmenter l'expression d'intégrines importantes pour l'adhésion comme CD11, CD18 et CD29 (de Vries 1998). En outre, IL-13 inhibe la production de médiateurs pro-inflammatoires par les monocytes et les macrophages comme les prostaglandines (Endo *et al.* 1996), les intermédiaires réactifs de l'oxygène, les interleukines 1 et 12 et TNF α (de Vries 1998) via un mécanisme qui implique partiellement l'inhibition du facteur nucléaire NF κ B (Lentsch *et al.* 1997). Il a aussi été reporté qu'IL-13 jouerait un rôle dans la survie, l'activation et le recrutement des éosinophiles et des mastocytes (Horie *et al.* 1997; Pope *et al.* 2001).

3.4.5.4.2 Les rôles dans les cellules non hématopoïétiques

Des fonctions importantes d'IL-13 ont été décrites dans les cellules endothéliales et épithéliales, les cellules du muscle lisse et les fibroblastes. Dans les cellules endothéliales,

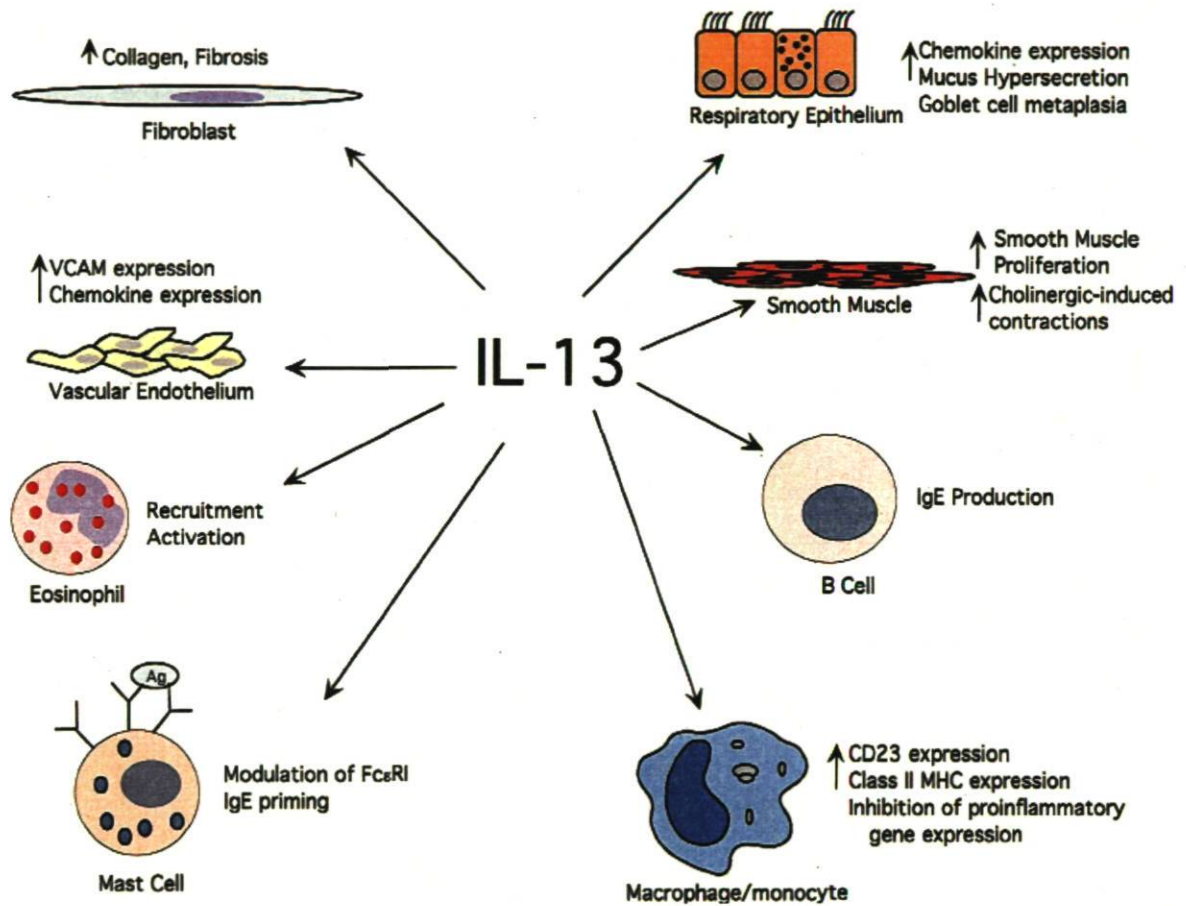


Figure 13 : L'action de l'interleukine 13 sur les cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques.
(Khurana Hershey 2003)

il induit l'expression du vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), ce qui se révèle être important pour le recrutement d'éosinophiles (Bochner *et al.* 1995). De plus, IL-13 augmente la prolifération et la contraction des cellules du muscle lisse (Wills-Karp 2001). Dans les fibroblastes, il augmente aussi la prolifération et induit la synthèse du collagène de type I (Hershey 2003). Finalement, dans les cellules épithéliales, il induit l'expression de chemokines, modifie la différenciation mucociliaire et réduit la fréquence des battements ciliaires (Li *et al.* 1999; Laoukili *et al.* 2001).

Toutes ces fonctions ont un rapport direct avec l'inflammation allergique et la modification de l'épithélium dans l'asthme. IL-13 est aussi impliqué dans l'expulsion des nématodes gastro-intestinaux et dans le développement des cancers, de façon positive ou négative selon le type (Wynn 2003). Il a aussi été démontré qu'il agit comme stimulateur potentiel de métalloprotéinases de matrice (MMPs) et de protéases de type cathepsine (Zheng *et al.* 2000).

De tous les rôles répertoriés d'IL-13, nous avons retenu sa capacité à recruter les cellules satellites pour la différenciation et la fusion et son éventuelle implication dans la stimulation du système protéolytique, comme pour les MMPs. Certains effets d'IL-13 sur les myoblastes humains ont été étudiés et seront présentés dans la section résultats.

4. Problématique, hypothèses et objectifs

4.1 Problématique

La transplantation de myoblastes humains connaît des limites majeures à cause du faible taux de fusion avec les fibres musculaires et du faible potentiel migratoire à partir des trajectoires d'injection.

4.2 Hypothèses

Il est possible d'augmenter la fusion et la migration des myoblastes *in vitro* en traitant les cellules avec IL-13 humaine recombinante.

L'introduction du gène de l'interleukine 13 humaine dans les muscles de souris avant la transplantation, de telle sorte que les fibres la secrètent de façon soutenue, a le potentiel d'augmenter la migration et la fusion des myoblastes avec les fibres *in vivo*.

4.3 Objectifs

4.3.1 Objectif général

L'objectif général est d'améliorer le succès de greffe des myoblastes humains dans les muscles de souris en réduisant le nombre des trajectoires d'injection.

4.3.2 Objectifs spécifiques

Dans un premier temps, étudier les effets de l'interleukine 13 sur les myoblastes humains *in vitro*.

Dans un deuxième temps, étudier les effets de l'interleukine 13 humaine sécrétée par les fibres de souris Rag sur les myoblastes transplantés.

Matériel et méthodes

1. Culture cellulaire

Les myoblastes humains utilisés sont obtenus à partir d'une biopsie de muscle squelettique provenant d'un garçon âgé de 13 mois. Les cellules myogéniques sont relâchées par le tissu émincé suite à une digestion enzymatique. Elles sont cultivées avec du milieu de culture MB-1 (Hyclone) additionné de 20% de sérum fœtal bovin (FBS) (Gibco), de 10 ng/ml de bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), 100 U/ml de pénicilline et 100 U/ml de streptomycine. Dans la suite de la section Matériel et méthodes, le milieu MB-1 ainsi complété sera nommé MB-1 complet. Les cellules sont lavées avec une solution de Hank's Balanced Salt Solution HBSS (Gibco) et le milieu MB-1 complet est changé tous les deux jours. Lors des expériences *in vitro*, les cellules sont détachées des pétris à l'aide d'une solution de HBSS contenant 0,1% de trypsine et 0,02% EDTA m/v (Gibco). Une fois les cellules décollées, l'action de la trypsine est arrêtée par l'ajout de milieu MB-1 additionnée de sérum. Les cellules sont récupérées et centrifugées. Le culot est ensuite resuspendu dans du milieu MB-1 et le nombre approximatif des cellules est compté à l'hématimètre. La suspension des cellules est diluée et distribuée selon les besoins des manipulations.

2. Test de fusion *in vitro*

2.1 Culture cellulaire

Les myoblastes humains sont ensemencés dans des plaques de 24 puits avec du milieu MB-1 complet à raison de 30 000 cellules par puits. Au bout de 24 h d'incubation à 37 C, une fois les cellules adhérees, le milieu de culture est changé pour du Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) additionné de 3% de sérum de cheval (Gibco), de 100 U/ml de pénicilline et 100 U/ml de streptomycine. Le milieu DMEM utilisé pour le test contient aussi les facteurs étudiés : (a) aucun traitement, (b) 5, 25, 50 et 100 ng/ml d'IL-13 (Peprotech). Le milieu est changé tous les deux jours pour assurer l'action des facteurs pour une durée totale de 5 jours.

2.2 Immunocytochimie

Après 5 jours, le milieu de culture est enlevé et les myotubes sont lavés avec une solution de HBSS 1X (Gibco) puis fixés avec une solution d'éthanol 95% pendant 15 minutes sans agitation. La chaîne lourde de la myosine est marquée à l'aide d'un anticorps anti MHC humaine (BD Biosciences) à une dilution de 1 :100. Le marquage est révélé par un anticorps anti souris couplé à l'Alexa (Invitrogen) à une dilution de 1 :300. Les noyaux sont marqués au DAPI (Sigma, St Louis) à une dilution de 1 :125. Les marquages sont observés à l'aide d'un microscope à fluorescence Axiphot (Zeiss) avec un objectif de 10X/0,30. Les photos sont prises avec une caméra digitale (Canon A650 IS) et traitées avec le logiciel Paint Shop Pro Photo 2X (Corel).

2.3 Calcul de l'indice de fusion

Le pourcentage est obtenu en calculant le rapport entre le nombre de noyaux à l'extérieur des fibres multiplié par 100 et le nombre total des noyaux se trouvant dans le champ de la photo. Le nombre de noyau est calculé en utilisant le logiciel Image J. Les valeurs sont obtenues à partir de 15 photos par condition.

3. Test de migration *in vitro*

Des inserts de plaques de 24 puits de type Transwell (Corning Life Sciences) sont utilisés pour étudier la migration des myoblastes. Les puits de 24 (le compartiment du bas) contenant l'insert (compartiment du haut) constituent des chambres de Boyden. Les compartiments du haut et du bas sont séparés par une membrane en polycarbonate contenant des pores de 8 μm . Avant l'ensemencement des cellules, les membranes perméables des transwells sont pré-incubées dans du MB-1 complet pendant 2 h à 37 C pour améliorer l'attachement des cellules. Les myoblastes sont traités à la trypsine et resuspendus dans du milieu MB-1 complet à une concentration de 3×10^5 cellules/ml. 0,11 ml de la suspension cellulaire sont déposés dans le compartiment du haut. Le compartiment

du bas contient 0,6 ml de milieu MB-1 complet contenant les facteurs étudiés : (a) aucun traitement, (b) 5, 25, 50 et 100 ng/ml d'IL-13 recombinant humain (Peprotech). Les facteurs peuvent être rajoutés dans le compartiment du bas et/ou celui du haut selon les besoins de la manipulation. Les chambres de Boyden sont incubées à 37 C pendant 14 h. Suite à cette étape, les inserts sont enlevés et lavés avec phosphate-buffered saline (PBS). Les cellules se trouvant sur la face supérieure de l'insert (cellules qui n'ont pas migré) sont enlevées doucement en utilisant un coton-tige et les cellules se trouvant sur la face inférieure (cellules qui ont migré) sont colorées avec une solution de 10% crystal violet (Chemicon). Les inserts sont par la suite lavés au PBS et séchés à l'air libre. Les cellules qui ont migrés sont visualisées à l'aide d'un stéréomicroscope. Les photos sont prises avec une caméra digitale (Canon A650 IS), traitées avec le logiciel Adobe Photoshop C2 et analysées avec le logiciel d'imagerie Scion.

4. Zymographie

4.1 Culture cellulaire

Les cellules humaines sont ensemencées dans des flasques de culture T25 à une confluence d'environ 65% avec du milieu MB-1 complet. Après 24 heures le milieu est enlevé et les cellules sont rincées au HBSS. Du milieu MB-1 sans sérum est par la suite ajouté et les facteurs testés sont additionnés : (a) aucun traitement. (b) 50 et 100 ng/ml d'IL13 (Peprotech). Les cellules sont incubées 24 h à 37 C ensuite les milieux conditionnés sont récoltés, concentrés avec des centricons de 30 kDa (Millipore) et les protéines sont dosées.

4.2 Zymographie

20 µg de protéines provenant du milieu conditionné sont chargés sur un gel contenant 10% de polyacrylamide (Biorad) et 1,5 mg/ml de gélatine (Laboratoire Mat Inc.)

Après l'électrophorèse, le gel est lavé deux fois avec une solution à 50 mM de Tris-HCl contenant 2,5% de Triton X-100 (pH 7,6) pendant 30 minutes. L'activité des métalloprotéases est augmentée par l'incubation du gel une nuit à 37 C dans une solution d'activation à 50 mM de Tris-HCl contenant 150 nM de NaCl et 10 mM de CaCl₂ (pH 7,6). Après la coloration du gel avec une solution à 0,5% de Coomassie brilliant blue R-250 (Chemicon), l'activité des MMPs est visualisée en tant que bandes claires aux poids moléculaires spécifiques (62-72 kDa pour MMP2)

5. Test de prolifération *in vitro*

Les myoblastes humains sontensemencés dans des plaques de 24 puits avec du milieu MB-1 complet à raison de 2000 cellules par puits. Au bout de 24 h d'incubation à 37 C, une fois les cellules adhérees, le milieu de culture est changé pour du MB-1 additionné de 20% de FBS contenant les facteurs étudiés : (a) aucun traitement, (b) 5, 25 et 50 ng/ml d'IL-13 recombinant humain (Peprotech). Le milieu est changé tous les deux jours pour assurer l'action des facteurs. Le milieu est ensuite enlevé et la plaque est scellée et conservée à -80°C. Les durées présentées dans les résultats correspondent à la durée d'incubation des cellules avec les facteurs. À la fin des périodes d'incubation, toutes les plaques sont décongelées. L'estimation de la prolifération est faite en utilisant un réactif fluorescent qui provient du *Cyquant Proliferation Assay* (Invitrogen) en suivant les directives du fournisseur. La fluorescence est mesurée à l'aide d'un lecteur de plaques.

6. Test de mortalité *in vitro*

Les myoblastes humains sontensemencés dans des plaques de 24 puits avec du milieu MB-1 complet à raison de 25 000 cellules par puits. Au bout de 24 h d'incubation à 37 C, une fois les cellules adhérees, le milieu de culture est changé pour du MB-1 complet contenant les facteurs étudiés : (a) aucun traitement (b) 5 et 50 ng/ml d'IL-13 recombinant humain (Peprotech). Après 24 h de prétraitement, la mort cellulaire est induite par l'ajout de glucose oxydase (Calbiochem) à une concentration de 0,1 U/ml ou par l'ajout d'un

cocktail de cytokines (TNF α 5 ng/ml; IL1 β 0,5 ng/ml; INF γ 25 ng/ml) (Peprotech). L'incubation à 37 C dure 24 h après lesquelles les cellules sont marquées à l'annexin V et au PI (BD Biosciences) en suivant les directives du fournisseur. Les cellules sont analysées à l'aide d'un cytomètre en flux FACSCalibur Becton-Dickinson (BD Biosciences).

7. Test de mortalité *in vivo*

7.1 Culture cellulaire

Les myoblastes humains sont ensemencés dans des pétris de culture 75 cm² à une confluence d'environ 50% et cultivés dans du milieu MB-1 additionné de 20% de sérum. Après 24 h, le milieu est changé et de la thymidine radioactive (Perkin Elmer) est ajoutée à une concentration de 0,25 μ Ci/ml. Après 24 h les facteurs testés sont ajoutés dans le milieu : (a) aucun traitement, (b) 5 et 50 ng/ml d'IL13 (Peprotech). Après 24 h les cellules sont détachées avec de la trypsine comme décrit précédemment. Les cellules sont par la suite comptées et réparties dans des eppendorfs à raison de $5 \cdot 10^5$ cellules par tube suspendues dans du milieu MB-1 complet. Les cellules sont maintenues sur glace jusqu'à leur transplantation.

7.2 Transplantation de myoblastes chez la souris Rag

Les expériences effectuées chez les souris sont conformes aux normes de sécurité et d'éthique établies par l'animalerie du CHUL.

Les souris Rag sont anesthésiées par inhalation d'isoflurane. 1 ml de solution saline contenant du lactate et 0,1 ml de buprénorphine sont administrés par voie sous-cutanée à chaque animal. La peau recouvrant les *Tibialis antérieures* (TA) est rasée et aseptisée avec une solution d'iode. Une incision verticale est effectuée au milieu du TA pour révéler le muscle. Les cellules sont culotées par centrifugation et les culots sont resuspendus dans 10 μ l des solutions relatives à chaque condition : HBSS pour le contrôle négatif; 5 ng/10⁶

cellules et $50 \text{ ng}/10^6$ cellules. La suspension cellulaire est récupérée à l'aide d'une micropipette en verre et une série d'injections est effectuée de façon uniforme dans le TA selon un axe vertical. À la fin de chaque transplantation la peau est recousue au niveau de l'incision. Les souris du jour 0 sont sacrifiées et les TA sont récoltés tout de suite après la greffe. Les souris des jours 2 et 5 sont sacrifiées et leurs TA récupérés respectivement 2 et 5 jours après la greffe. Une fois les muscles prélevés, ils sont tout de suite congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80 C jusqu'à utilisation ultérieure.

7.3 Digestion des muscles et extraction de l'ADN musculaire

Les muscles greffés récupérés sont décongelés et émincés à l'aide de ciseaux stériles. Une suspension de protéinase K dans le tampon approprié est ajoutée aux muscles émincés. Suite à la digestion enzymatique, l'ADN est extrait avec du phénol et du chloroforme. Le culot d'ADN est ensuite resuspendu dans $0,3 \text{ ml}$ de H_2O stérile. La suspension d'ADN est ajoutée au liquide de scintillation et le signal radioactif est mesuré avec à l'aide d'un lecteur de scintigraphie Wallac 1409 (Perkin elmer) en suivant le programme de mesure propre au Carbone 14.

8. Électroporation *in vivo*

Une suspension à $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ du plasmide pCR3.1 hIL13-V5 (contenant la cassette IL13 humaine couplée au tag V5) dans une solution de sels de Tyrode 1X (Sigma) et de H_2O stérile est préparée et gardée sur glace jusqu'à son utilisation ultérieure. Les souris Rag sont anesthésiées et traitées comme décrit précédemment. $40 \mu\text{l}$ de la suspension du plasmide sont injectées dans les TA des souris sans effectuer d'incision au niveau de la peau. Un gel d'électrolytes est ensuite appliqué sur la peau entourant le muscle. Des plaques conductrices sont installées d'un côté et de l'autre du muscle et 10 pulsations à 100 V sont appliquées. Les pulsations électriques ont une durée de 25 ms et sont séparées par

une période de 300 ms. Les muscles sont récupérés après 10 jours et congelés dans du cryomatrix pour effectuer des coupes au cryostat.

9. Transfection au Pluronic L64 *in vivo*

Une suspension à 1 µg/µl du plasmide pCR3.1 hIL13-V5 (contenant la cassette IL13 humaine couplée au tag V5) dans une solution de sels de Tyrode 2X (Sigma) et une suspension de Pluronic L64 à 0,1% dans du H₂O stérile sont préparées. Les deux solutions sont incubées à 37 C séparément pendant 30 min. Elles sont ensuite mélangées et gardées à 37 C pendant 30 min. La solution doit rester à cette température en attendant son utilisation ultérieure. Les souris Rag sont anesthésiées et traitées comme décrit précédemment. 50 µl de la suspension du plasmide sont injectées dans les TA des souris sans effectuer d'incision au niveau de la peau. Les muscles sont récupérés après 10 jours et congelés dans du cryomatrix pour effectuer des coupes au cryostat.

10. test de migration *in vivo*

10.1 Culture cellulaire

Les myoblastes humains sont ensemencés dans des pétris de culture 75 cm² à une confluence d'environ 50% et cultivés dans du milieu MB-1 additionné de 20% de sérum. Après 24 h les cellules sont détachées avec de la trypsine comme décrit précédemment. Les cellules sont par la suite comptées et réparties dans des eppendorfs à raison de 5.10⁵ cellules par tube suspendues dans du milieu MB-1 complet. Les cellules sont maintenues sur glace jusqu'à leur transplantation.

10.2 Transplantation de myoblastes chez la souris Rag

La transplantation de cellules est effectuée comme décrit précédemment dans des TA électroporés avec le plasmide pCR3.1 hIL13 (contenant la cassette IL13 humaine) ou avec une solution saline (contrôle négatif) 20 jours avant la chirurgie. Quatre trajectoires

d'injections sont effectuées au centre du TA selon l'axe vertical. Les souris sont sacrifiées 4 jours après la transplantation et leurs muscles sont récupérés et congelés dans du cryomatrix pour effectuer des coupes au cryostat.

11. Immunohistochimies

Les coupes de muscles d'une épaisseur de 12 μm sont conservées à -20 C jusqu'à leur utilisation ultérieure. Les colorations à l'hématoxyline et l'éosine sont effectuées comme décrit précédemment (Skuk, Caron et al. 2003). Pour les marquages immunohistochimiques, les coupes sont bloquées pendant 30 min avec une solution de PBS à 10% de FBS. Ensuite une suspension du premier anticorps est appliquée sur les coupes : mouse anti V5 à 1 : 200 (Invitrogen), mouse anti LaminA/C humaine à 1 : 100 (BD Biosciences) pendant une heure. Une suspension du deuxième anticorps est appliquée sur les coupes après les lavages au PBS : anti mouse Alexa Fluor rouge à 1 : 300 (Invitrogen), anti mouse Alexa fluor vert à 1 : 300 (Invitrogen), respectivement. Les lames sont ensuite montées avec une solution 1 : 1 de PBS-Glycérol.

12. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques sont effectuées avec le logiciel StatView (version 5.0). Les valeurs de p sont toutes obtenues par des analyses de type ANOVA et sont données à \pm leur 1SD.

Résultats

1. Effets de l'interleukine 13 sur les myoblastes humains *in vitro*

1.1 L'interleukine 13 améliore la fusion des myoblastes humains *in vitro*.

L'ajout d'IL-13 humaine recombinante dans le milieu de culture des myoblastes permet d'augmenter leur taux de fusion. En effet, les myotubes produits en présence des différentes concentrations d'IL-13 sont plus denses, plus épais et semblent être plus nucléés que les myotubes formés en son absence (**figure 1.A**). Cette observation est confirmée par les indices de fusion calculés à partir du nombre de noyaux marqués au DAPI qui se trouvent à l'intérieur des myotubes par rapport au nombre total de noyaux dans les champs photographiés. L'indice de fusion est donné en pourcentage (**figure 1.B**). Ainsi, la présence d'IL-13 dans le milieu de différenciation permet d'augmenter l'indice de fusion d'au moins 15% (à la concentration 25 ng/ml). La concentration 50 ng/ml semble induire le plus haut taux de fusion avec une augmentation d'environ 30% par rapport au contrôle négatif. Par ailleurs, il n'y a pas de différences significatives entre les taux de fusion induits par les quatre concentrations d'IL-13 testées.

1.2 L'interleukine 13 améliore le potentiel migratoire des myoblastes humains *in vitro* via une action chémo-attractante, mais semble réguler négativement la sécrétion de MMP2.

Un test de migration par le biais de transwells a été fait pour évaluer la réponse migratoire des cellules humaines H18 vers un gradient positif d'IL-13 (**figure 2**). Il a été établi auparavant que l'IL-13 améliore la migration seulement par chémo-attraction. Ainsi, l'ajout d'IL-13 dans le compartiment inférieur de la chambre de Boyden améliore le potentiel migratoire des cellules aux quatre concentrations testées. Les cellules traitées avec 5 ng/ml d'IL-13 migrent 2 fois plus que les cellules non traitées, alors que les cellules traitées avec de plus grandes concentrations (25, 50 et 100 ng/ml) migrent environ 2,6 fois plus que les cellules non traitées.

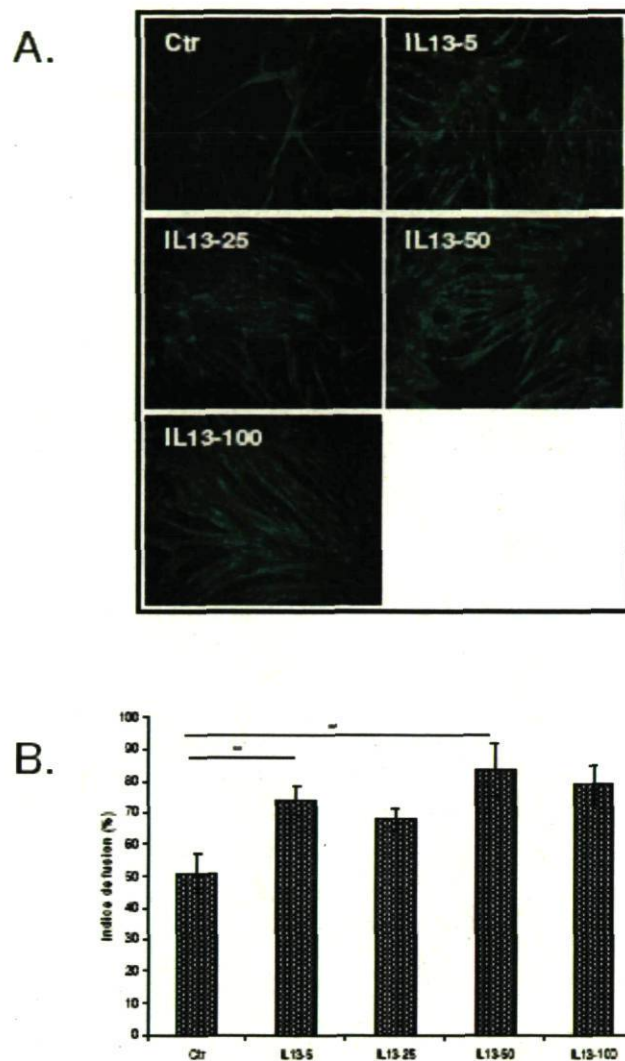


Figure 1 : Effet de l'interleukine 13 sur la fusion des myoblastes humains *in vitro*. Les myoblastes humains provenant d'une biopsie de muscle d'un homme de 18 ans (H18) sont mis en présence d'un milieu de culture appauvri en sérum favorisant la différenciation. L'interleukine 13 est ajoutée au milieu au jour 0 et l'expérience est arrêtée au jour 5. A. Marquage de la chaîne lourde de la myosine humaine (vert) et des noyaux (bleu). B. L'indice de fusion est le pourcentage du nombre de noyaux à l'intérieur des fibres par rapport au nombre total des noyaux. Ctr : contrôle négatif; IL13-5 : IL13 ajoutée à 5 ng/ml; IL13-25 : IL13 ajoutée à 25 ng/ml; IL13-50 : IL13 ajoutée à 50 ng/ml; IL13-100 : IL13 ajoutée à 100 ng/ml. L'expérience a été effectuée avec un n=3 et un test ANOVA a été utilisé pour les analyses statistiques **: p<0,0001.

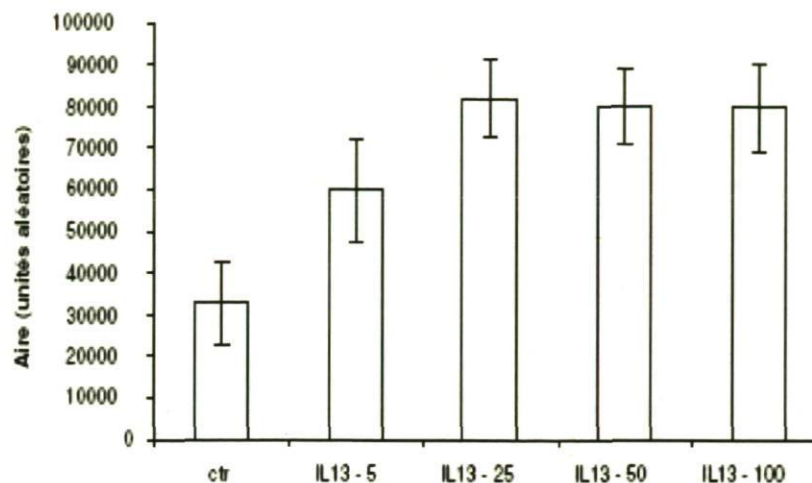


Figure 2 : Effet de l'interleukine 13 sur la migration des myoblastes humains *in vitro*. Évaluation de la capacité d'IL13 à induire la migration des myoblastes humains H18. Les facteurs testés sont ajoutés dans les compartiments inférieurs. La migration est évaluée à partir de l'aire de la membrane de polycarbonate occupée par les cellules. Ctr : contrôle négatif; IL13-5 : IL13 ajoutée à 5 ng/ml; IL13-25 : IL13 ajoutée à 25 ng/ml; IL13-50 : IL13 ajoutée à 50 ng/ml; IL13-100 : IL13 ajoutée à 100 ng/ml. L'expérience a été effectuée avec $n=3$. Un test statistique ANOVA a été effectué. Les valeurs obtenues avec les différentes concentrations d'IL13 ne sont pas significatives entre elles, mais elles sont toutes significatives par rapport au contrôle négatif avec $p<0,005$.

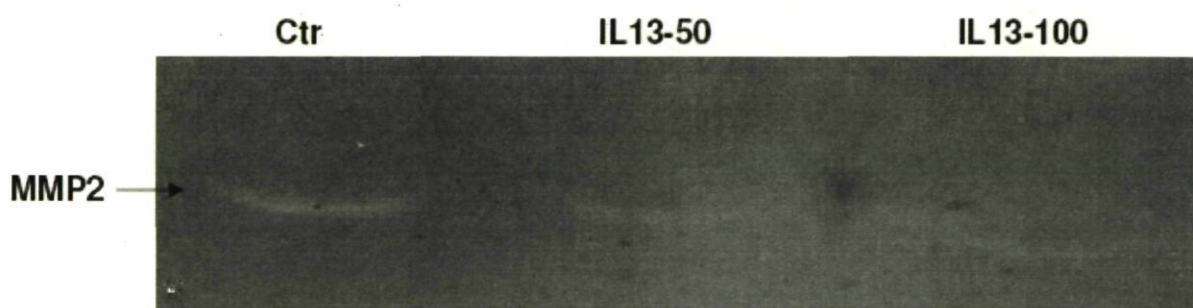


Figure 3 : Effet de l'interleukine 13 sur la sécrétion de MMP2 par les myoblastes humains *in vitro*. Des cellules H18 sont mises en présence d'IL13 dans du milieu sans sérum pendant 24 heures. Le milieu conditionné est ensuite récolté et concentré. Une zymographie est effectuée dessus. Ctr : contrôle négatif; IL13-50 : IL13 ajoutée à 50 ng/ml; IL13-100 : IL13 ajoutés à 100 ng/ml.

Par ailleurs, la migration *in vivo* est plus compliquée que la migration sur surface plane. Les cellules transplantées, afin de pouvoir traverser le tissu conjonctif, doivent être capables de dégrader ou de modifier la structure de la matrice extracellulaire. Pour ce faire, les cellules utilisent un système protéolytique impliquant des endoprotéases comme les métalloprotéases (MMPs). Nous avons donc testé la capacité des cellules utilisées à sécréter des MMPs et l'effet d'IL-13 à ce niveau. À cet effet, une zymographie a été performée (**figure 3**). La seule métalloprotéase qui a été détectée est la MMP2, connue pour son implication dans la migration des cellules myogéniques dans le muscle squelettique (Strongin *et al.* 1995). Le traitement des cellules avec IL-13 semble réguler négativement les niveaux de MMP2 sécrétée dans le milieu conditionné et l'effet paraît être dose dépendant. Plus la concentration d'IL-13 utilisée pour le traitement des cellules est élevée, plus les bandes correspondantes à la digestion de la gélatine par MMP2 sont faibles. Ceci peut indiquer qu'IL-13, même s'il améliore la migration des cellules sur une surface plane, peut compromettre la migration *in vivo*.

1.3 L'interleukine 13 améliore la prolifération des cellules humaines *in vitro*.

La prolifération des cellules est un paramètre important pour la transplantation cellulaire. Si les cellules viables ont un potentiel prolifératif élevé, cela peut compenser en partie la mort précoce massive des cellules après leur transplantation dans le muscle. Ainsi, l'effet d'IL-13 sur la prolifération a été testé *in vitro* (**figure 4**). Le traitement des cellules avec IL-13 aux concentrations 5 ng/ml et 25 ng/ml semble augmenter leur prolifération de façon significative par rapport aux cellules non traitées. La concentration 50 ng/ml ne semble pas donner d'avantage prolifératif aux cellules en comparaison avec le contrôle négatif. Cela indique que l'effet sur ce paramètre est dose dépendant. La concentration d'IL-13 optimale au jour 5 de prolifération est 25 ng/ml où on observe une amélioration d'environ 2,3 fois par rapport au contrôle négatif.

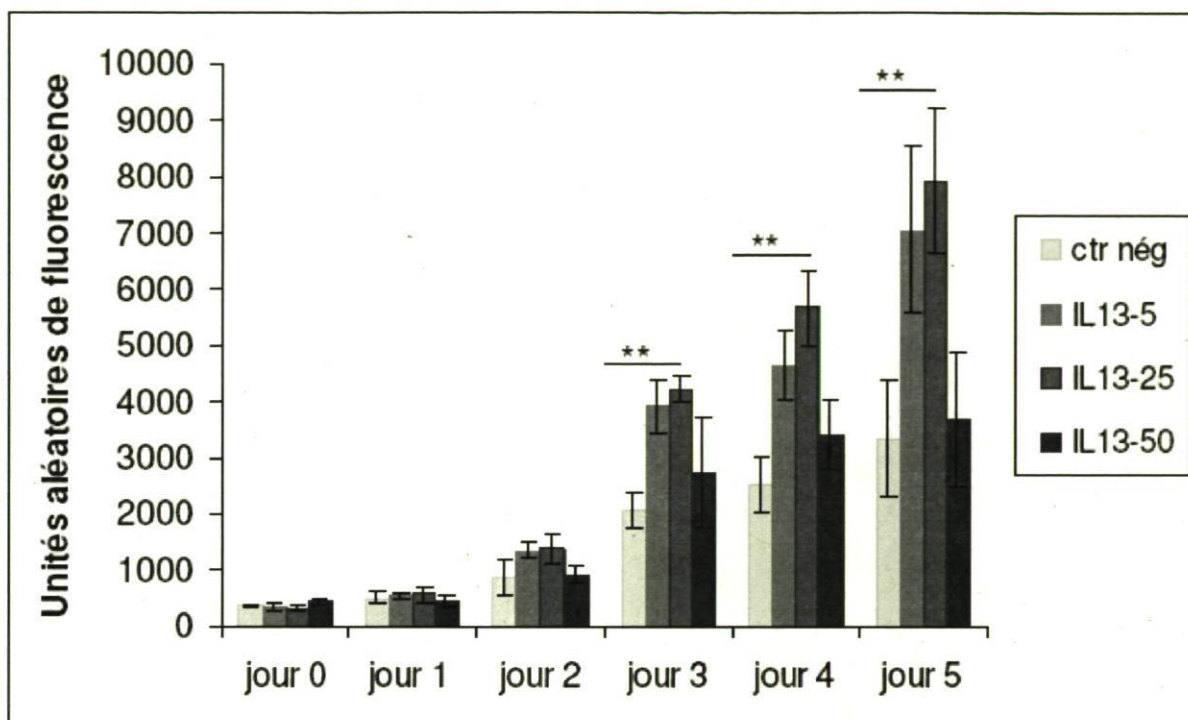


Figure 4 : Effet de l'interleukine 13 sur la prolifération des myoblastes humains *in vitro*. Des cellules H18 sont ensemencées à faible confluence avec du milieu de culture complet. Les facteurs testés sont ajoutés au jour 0 et un suivi de la prolifération dans le temps jusqu'au jour 5 est effectué. La mesure est effectuée en unités aléatoires de fluorescence directement proportionnelles à la quantité d'ADN présente. Ctr nég : contrôle négatif; IL13-5 : IL13 ajoutée à 5 ng/ml; IL13-25 : IL13 ajoutée à 25 ng/ml; IL13-50 : IL13 ajoutée à 50 ng/ml. L'expérience a été effectuée avec n=5. Un test statistique ANOVA a été effectué. ** : $p < 0,005$.

1.4 L'interleukine 13 protège les cellules humaines contre le stress oxydatif mais ne les protège pas contre les cytokines pro-inflammatoires

La mort précoce des cellules transplantées constitue l'une des limitations majeures à la thérapie cellulaire. Cette mort précoce est due entre autres facteurs au stress oxydatif et à la réponse inflammatoire du muscle après la greffe. Ces deux types de stress ont été induits *in vitro* par le biais de la glucose oxydase, une enzyme qui catalyse l'oxydation du glucose en gluconolactone et en peroxyde d'hydrogène, et d'un cocktail de cytokines pro-inflammatoires composé de TNF α , d'IL-1 β et INF γ , respectivement. L'effet du prétraitement des cellules avec IL-13 a été évalué. Dans le cas où le stress oxydatif est induit, le prétraitement avec IL-13 semble protéger les cellules de façon significative aux deux concentrations testées (**figure 5**). Il y a une augmentation du pourcentage de cellules viables d'environ 50% par rapport aux cellules traitées avec la glucose oxydase sans prétraitement. Cette observation est encourageante quant à l'utilisation d'IL-13 *in vivo* pour améliorer la survie des myoblastes transplantés. Dans le cas où le stress inflammatoire est induit, le prétraitement des cellules avec IL-13 ne semble pas les protéger aux concentrations testées (**figure 6**). Le cocktail de cytokines utilisé augmente le taux de mortalité de la population cellulaire d'environ 50% par rapport aux cellules du contrôle négatif qui n'ont reçu aucun traitement. Aucune amélioration de la survie n'est observée pour les cellules prétraitées avec IL-13 avant l'ajout du cocktail de cytokines. Ainsi, IL-13 protégerait les cellules contre le stress oxydatif mais pas contre la réponse inflammatoire.

2. Le prétraitement et la co-injection avec l'interleukine 13 ont un effet limité dans le temps sur la survie *in vivo* des myoblastes transplantés.

Comme mentionné auparavant, l'évaluation de l'effet d'IL-13 sur la survie des myoblastes *in vivo* est importante puisque la mortalité précoce des cellules est un obstacle majeur à la thérapie cellulaire. Le prétraitement des myoblastes humains marqués radioactivement à la thymidine ^{14}C et leur co-injection avec IL13 aux concentrations 5 et 50 ng/10 6 cellules ne semblent pas améliorer la survie des cellules au jour 5 après la transplantation par rapport aux cellules non traitées (**figure 7**).

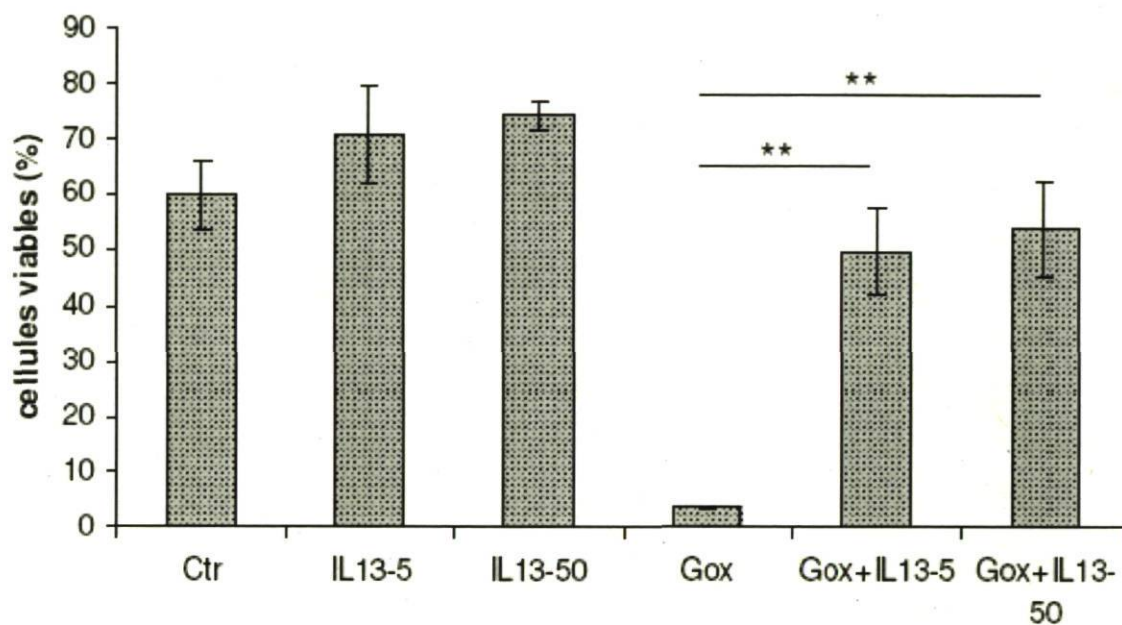


Figure 5 : Effet de l'interleukine 13 sur la résistance au stress oxydatif des myoblastes humains *in vitro*. Des cellules H18 sont prétraitées à l'IL13 pendant 24 heures avant l'ajout de 0,1 U/ml de glucose oxydase, le facteur d'induction du stress oxydatif. Les cellules sont ensuite marquées à l'annexin V et au PI et passées au cytomètre de flux pour évaluer le pourcentage de cellules viables. Ctr : contrôle négatif; IL13-5 : IL13 ajoutée à 5 ng/ml; IL13-50 : IL13 ajoutées à 50 ng/ml; Gox : Glucose oxydase. L'expérience a été effectuée avec n=3. Un test statistique ANOVA a été effectué. **: p<0,005.

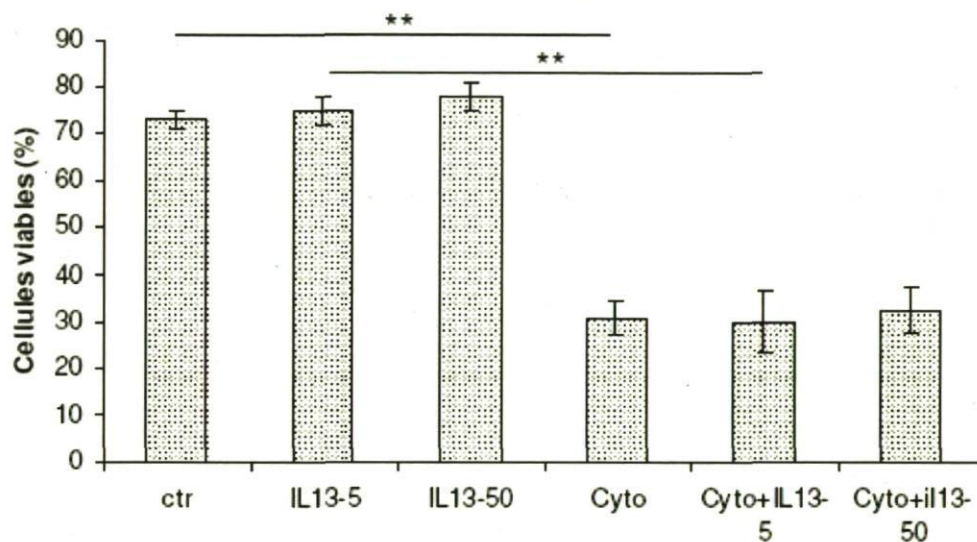


Figure 6 : Effet de l'interleukine 13 sur la résistance à un cocktail de cytokines pro-inflammatoires des cellules humaines *in vitro*. Des cellules H18 sont prétraitées à l'IL13 pendant 24 heures avant l'ajout d'un cocktail de cytokines pro-inflammatoires (TNF α 5 ng/ml; IL1 β 0,5 ng/ml; INF γ 25 ng/ml). Les cellules sont ensuite marquées à l'annexin V et au PI et passées au cytomètre de flux pour évaluer le pourcentage de cellules viables. Ctr : contrôle négatif; IL13-5 : IL13 ajoutée à 5 ng/ml; IL13-50 : IL13 ajoutées à 50 ng/ml; Cyto : cocktail de cytokines. L'expérience a été effectuée avec n=3. Un test statistique ANOVA a été effectué. ** : p<0,005.

Cependant, l'utilisation d'IL-13 à la concentration $50 \text{ ng}/10^6$ cellules semble retarder la mort des cellules par rapport aux cellules non traitées et à celles traitées avec la concentration $5 \text{ ng}/10^6$ cellules au jour 2 après la transplantation, mais cet avantage se dissipe au jour 5.

3. Introduction du gène de l'interleukine 13 humaine dans les muscles de souris Rag et les effets sur la migration *in vivo*.

3.1 L'électroporation est plus efficace que la transfection au Pluronic L64 pour l'introduction du gène de l'interleukine 13 humaine dans les muscles de souris.

L'introduction du gène d'IL-13 dans les muscles de souris avant la transplantation de myoblastes est importante dans le cadre de ce travail. En effet, l'hypothèse de départ stipule que l'IL-13 humaine sécrétée par les fibres de souris est capable de recruter les cellules humaines transplantées pour fusionner avec les fibres. Pour ce faire, plusieurs méthodes ont été utilisées : L'introduction du plasmide contenant le gène d'IL-13 par électroporation, par transfection avec un agent détergeant, le Pluronic L64, et par infection intramusculaire avec un lentivirus portant la séquence de l'IL-13 humaine comme transgène. Les résultats obtenus avec l'infection au lentivirus ne sont pas présentés, mais le taux d'infection est très faible. Un plasmide contenant la séquence de l'IL-13 humaine couplée à la séquence du tag V5 a été utilisé pour faciliter la détection de la protéine de fusion par immunohistochimie sur les coupes de muscles traités. Le marquage avec un anticorps dirigé contre le tag V5 montre une meilleure efficacité de livraison du gène dans les muscles de souris avec l'électroporation, en comparaison avec la transfection au Pluronic L64 (**figure 8**). L'efficacité de livraison avec ce dernier est quasi nulle. Par ailleurs, la coloration des coupes des muscles traités avec l'hématoxyline et l'éosine montre que l'électroporation induit beaucoup de dommages aux muscles. Cependant, les dommages semblent réversibles et les zones touchées se résorbent au 20^{ème} jour après l'électroporation.

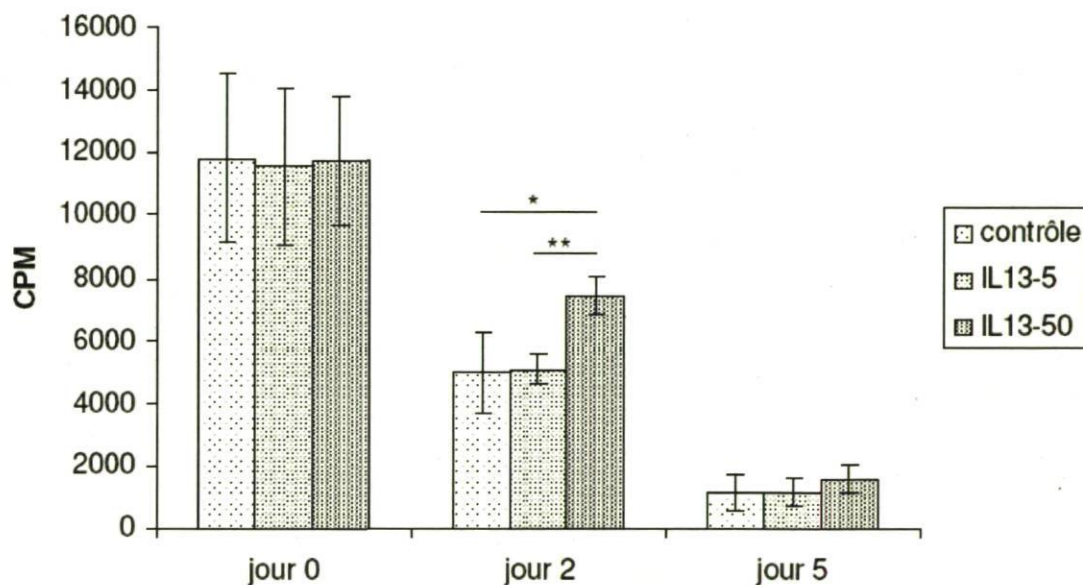


Figure 7 : Effet de l'interleukine 13 sur la survie des myoblastes humains transplantés dans les TA de souris RAG. Des myoblastes H18 sont marqués à la thymidine ^{14}C et prétraités avec l'IL13. Elles sont ensuite transplantées avec une co-injection d'IL13 dans les TA de souris RAG. Les souris sont sacrifiées au jour 0, au jour 2 et au jour 5. Les muscles récupérés sont digérés enzymatiquement et l'ADN marqué radioactivement est extrait. La radioactivité est mesurée par scintigraphie. IL13-5 : prétraitement avec 5 ng/ml et co-injection avec 5 ng/ 10^6 cellules; IL13-50 : prétraitement avec 50 ng/ml et co-injection avec 50 ng/ 10^6 cellules. L'expérience a été effectuée avec n=5. Un test statistique ANOVA a été effectué. Les valeurs obtenues au jour 5 ne sont pas statistiquement significatives entre elles. * : $p = 0,0036$; ** : $p < 0,005$.

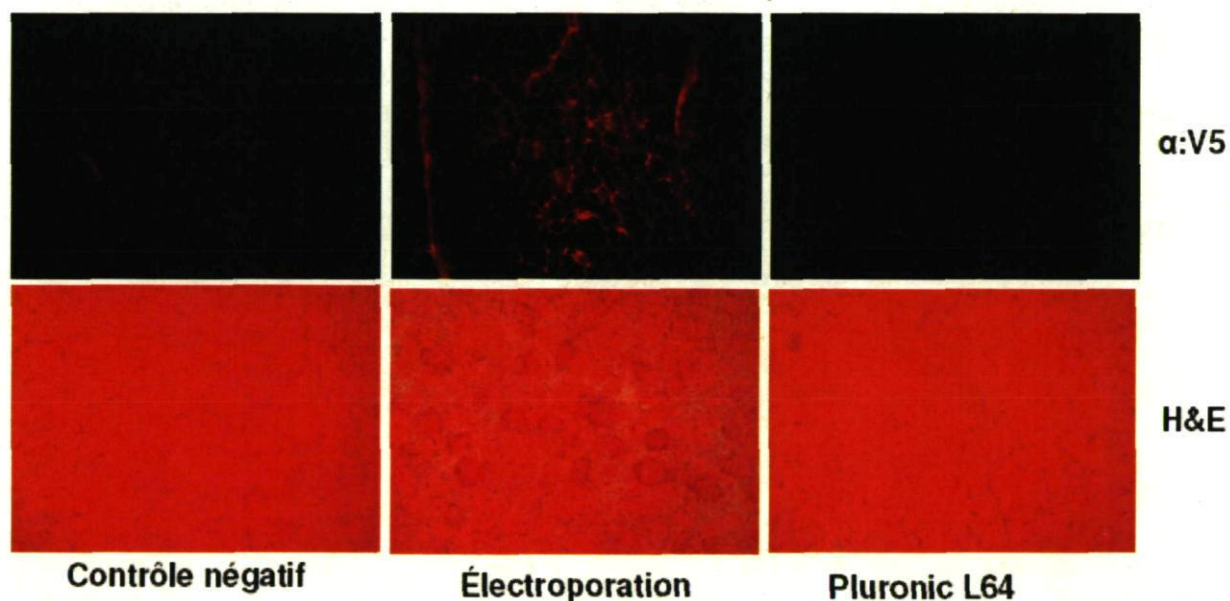


Figure 8 : Comparaison entre deux méthodes d'introduction du gène de l'interleukine 13 humaine-V5 dans les TA de souris RAG. Électroporation : le plasmide pCR3.1 contenant la cassette de l'interleukine 13 humaine accompagnée du tag V5 (hIL13-V5) a été injectée dans les TA de souris RAG dans une solution de sels de Tyrode 1X. Un courant électrique de 100V a ensuite été appliqué sur les muscles pour faciliter l'introduction du plasmide dans les fibres. Pluronic L64 : le plasmide pCR3.1 contenant la cassette hIL13-V5 a été injectée dans les TA de souris RAG dans une solution de sels de Tyrode 1X contenant 0,01% de Pluronic L64, un agent de transfection *in vivo*. Les souris sont sacrifiées après 10 jours et les muscles récupérés. Des immunohistochimies dirigées contre le tag V5 (α :V5) sont effectuées sur des cryosections de 12 μ m des muscles récupérés. Une coloration hématoxyline et éosine (H&E) est aussi effectuée. L'expérience a été effectuée avec $n = 4$.

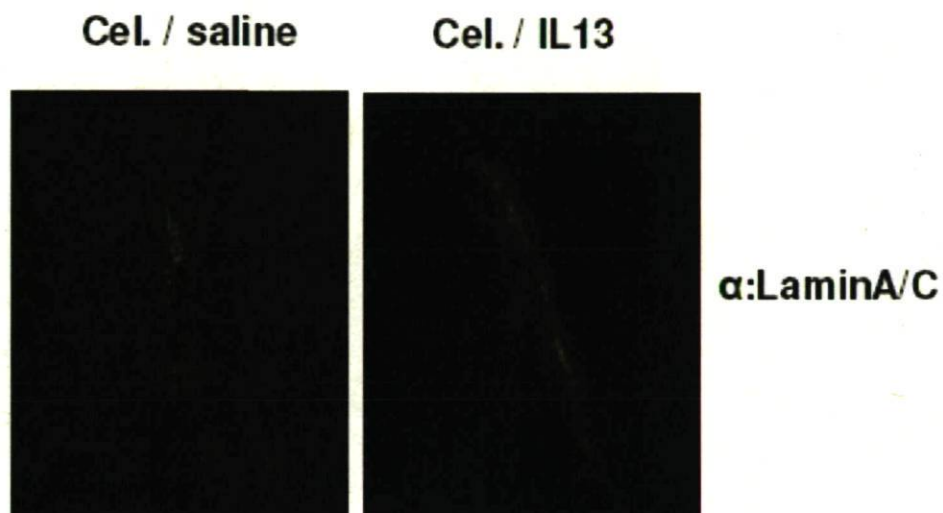


Figure 9 : Effet de l'interleukine 13 sur la migration des myoblastes humains *in vivo*. Des myoblastes H18 sont transplantés dans des TA de souris RAG préalablement électroporés avec une solution saline (contrôle négatif) ou avec le plasmide pCR3.1 hIL13. Les souris sont sacrifiées au jour 4 après la transplantation et les TA sont récupérés. Des immunohistochimies dirigées contre la laminA/C humaine ont été effectuées sur des cryosections de 12 um des muscles récupérés. Une coloration hématoxyline et éosine (H&E) est aussi effectuée. L'expérience a été effectuée avec n =3.

3.2 L'électroporation de l'interleukine 13 dans les muscles de souris avant la transplantation n'améliore pas la migration des cellules *in vivo*.

Pour évaluer la migration des cellules transplantées *in vivo*, les muscles de souris immunodéficientes Rag ont été électroporés avec un plasmide contenant la séquence d'IL-13. Un groupe de souris dont les muscles sont électroporés avec un plasmide contenant la séquence d'IL-13-V5 sert de contrôle d'électroporation. La transplantation est effectuée dans les muscles électroporés avec le plasmide IL-13 seulement si l'expression de la protéine de fusion IL-13-V5 est vérifiée par immunohistochimie dans le groupe contrôle. Les muscles sont récupérés 4 jours après la transplantation et un marquage de la laminA/C humaine est effectué pour visualiser les cellules transplantées et les trajectoires d'injection (**figure 9**). La sécrétion d'IL-13 par les fibres avoisinantes ne semble pas induire une meilleure dispersion des cellules à partir de leur trajectoire d'injection en comparaison avec les cellules transplantées dans les muscles contrôles électroporés avec une solution saline.

Discussion

La transplantation de myoblastes est un traitement potentiel de la dystrophie musculaire de Duchenne et d'autres maladies génétiques ou acquises. Une meilleure compréhension des facteurs limitants de la thérapie cellulaire, comme la faible migration et la mort précoce des cellules après leur transplantation, peut aider à développer des stratégies pour contourner ces obstacles. Nous nous sommes intéressés à l'interleukine 13 parce qu'elle présentait le potentiel d'améliorer le succès de greffe des myoblastes. Par ailleurs, le manque de documentation sur les interactions entre cette interleukine et les cellules myogéniques nous a encouragés à l'étudier.

Dans ce travail, il a été montré que le traitement des myoblastes humains avec de l'interleukine 13 recombinante humaine :

- améliore leur taux de fusion, de migration sur surface plane, de prolifération et leur résistance au stress oxydatif *in vitro*, mais n'améliore pas la résistance aux cytokines pro-inflammatoires
- régule négativement les niveaux de MMP2 sécrétée *in vitro*
- améliore leur taux de survie post-transplantation de façon limitée dans le temps
- n'améliore pas leur potentiel migratoire *in vitro* à court terme.

Il a été démontré auparavant que les myoblastes humains exprimaient le récepteur d'IL-13 (IL13R α 1) et le récepteur d'IL-4 (IL4R α), les deux sous unités nécessaires à la transduction de la signalisation après la liaison d'IL-13 (Lafreniere *et al.* 2006). L'obtention d'une réponse biologique est donc possible en traitant les cellules avec la protéine recombinante *in vitro*.

L'effet d'IL-13 sur la fusion a été testé à cause de sa capacité à recruter les cellules satellites pour la fusion avec les fibres qui la sécrètent chez la souris (Jacquemin *et al.* 2007). Aussi, sa transcription est régulée par le facteur de transcription NFATc2, dont la prépondérance des rôles positifs sur la régulation de la fusion myogénique devient de plus en plus évidente (Horsley *et al.* 2003). L'implication de NFATc2 serait alors liée aux facteurs dont il assure la transcription comme IL-4 et IL-13.

Nous avons par la suite montré une augmentation du potentiel migratoire des myoblastes vers un gradient positif d'IL-13. La migration d'une cellule sur une surface plane implique une activité intense de remaniement du cytosquelette d'actine et des récepteurs de l'adhérence comme les intégrines. Les intégrines sont impliquées dans le processus de migration et la formation de plaques d'adhérence au devant de la cellule polarisée et par leur capacité de signalisation bidirectionnelle. Pour les cellules musculaires squelettiques, des études ont permis d'observer l'expression des sous unités $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, αv et $\beta 1$ (Gullberg *et al.* 1998; Cachaco *et al.* 2005; Brzoska *et al.* 2006). L'effet d'IL-13 sur le profil d'expression des intégrines n'a pas été testé dans cette étude, mais un effet de régulation positive sur certaines sous unités, comme c'est le cas pour l'IL-4 est possible. En effet, il a été montré que l'IL-4 augmente l'expression des sous unités $\beta 1$ et $\beta 3$ de façon significative et que cette régulation positive avait un rôle à jouer dans l'augmentation de la migration des myoblastes observée *in vitro* et *in vivo* (Lafreniere *et al.* 2006). Aussi, il est établi que les remaniements au niveau du cytosquelette d'actine impliquent l'activité des petites GTP_{ases} monomériques comme RhoA. Il n'y a pas de relation établie entre IL-13 et RhoA dans le muscle squelettique, mais il a été démontré qu'IL-13 augmente d'environ 3 fois les niveaux de cette dernière dans les cellules du muscle lisse bronchique (Chiba *et al.* 2009). D'autre part, l'activation de la voie ERK/MAP kinase, une voie commune entre IL-13 et l'insuline médiée par IRS1/2, augmente l'expression de la milli-calpain, une cystéine protéase connue pour son rôle important dans l'induction de la motilité des myoblastes murins C2C12 (Leloup *et al.* 2007). Il s'agit de quelques facteurs qui peuvent expliquer l'augmentation du potentiel migratoire des myoblastes humains *in vitro* en réponse à IL-13 au niveau moléculaire. D'autres voies pourraient être impliquées.

Une régulation négative du niveau de l'expression de MMP2 par IL-13 a été observée au cours de cette étude. Il paraît évident que l'IL-13 a de nombreuses interactions avec les métalloprotéases de matrice dans de nombreux types cellulaires, et ces interactions peuvent être très différentes selon le type cellulaire. Nous nous sommes intéressés aux MMPs 1, 2 et 9 parce qu'elles sont grandement impliquées dans la migration dans le tissu musculaire. À titre d'exemple, IL-13 diminue les niveaux d'expression de MMP9 (Jinnin *et*

al. 2006), inhibe la production de MMP1 et augmente la production de l'inhibiteur tissulaire de MMP1 (TIMP-1) dans les fibroblastes humains (Oriente *et al.* 2000). Dans les kératinocytes humains, IL-13 augmente la production de la forme active de MMP9 de façon significative mais ne semble pas avoir d'effets sur MMP2 (Purwar *et al.* 2008). D'autres études montrent une régulation positive des niveaux de MMP2 et de MMP9 par IL-13 dans le tissu pulmonaire (Corry *et al.* 2002; Lanone *et al.* 2002; Lee *et al.* 2006).

Nous avons par la suite montré qu'IL-13 a un effet sur la prolifération des myoblastes humains. La prolifération est induite par l'activation des voies PI3K/Akt et ERK1/2/MAPK. En effet, il a été montré que ERK1/2 est activé par IL-13 dans le poumon de manière STAT6 indépendante. Aussi, IL-13 induit l'activation de ERK1/2, mais pas celle de JNK1/2 ou p38 (Lee *et al.* 2006).

Ensuite, nous avons montré qu'IL-13 a le potentiel de protéger les myoblastes humains contre le stress oxydatif, mais non contre le stress pro-inflammatoire. Dans le cadre du stress oxydatif, il y a peu d'explications au niveau moléculaire. Cependant, quelques effets observés de l'IL-13 sur la production d'oxyde nitrique (NO) peuvent apporter des éléments de réponse. En effet, le stress oxydatif implique la présence de superoxyde, une molécule très instable qui réagit avec le NO pour former du peroxynitrite, un agent oxydant très réactif impliqué dans la dégradation de l'ADN et des protéines. Or, il a été montré qu'IL-13 inhibe la production de NO dans le diaphragme et le protège de certaines endotoxines (Takahashi *et al.* 1999). Bien évidemment, le NO peut aussi protéger les cellules contre le stress oxydatif selon sa concentration et les conditions de son utilisation. Par ailleurs, il a été montré qu'IL-13 induit la translocation au noyau du facteur de transcription NF- κ B dans les cellules du muscle lisse bronchique (Goto *et al.* 2009). NF- κ B régule l'expression de plus de 150 gènes impliqués dans les réponses immunes et inflammatoires, dont celui de la superoxyde dismutase mitochondriale, une enzyme antioxydante, qui réduit le stress oxydatif dans les neurones (Sompol *et al.* 2006) et dans les cellules endothéliales microvasculaires (Murley *et al.* 2006). Il faut noter que NF- κ B induit aussi le catabolisme des protéines et induit la mort cellulaire par apoptose, en plus de

l'induction de la perte de masse musculaire conduisant à l'atrophie (Kandarian and Jackman 2006).

Dans le cadre des réponses inflammatoires, les interactions entre IL-13 et NF- κ B semblent très complexes. En effet, certaines études montrent qu'IL-13 est une cytokine anti-inflammatoire et inhibe la translocation de NF- κ B dans le noyau des macrophages alvéolaires et des monocytes et inhibe ainsi la production de cytokines pro-inflammatoires comme TNF α et IL-1 β (Lentsch *et al.* 1997). Cette propriété peut expliquer l'amélioration de la survie des myoblastes transplantés avec IL-13 observée au cours de cette étude. Le fait que la survie est limitée dans le temps peut être simplement expliqué par l'épuisement d'IL-13 injecté dans le muscle et la perte de ses effets. Il s'agit d'une hypothèse qu'il faut vérifier parce que les interactions inter espèces d'IL-13 laisse supposer que l'interleukine co-injectée avec les myoblastes agit majoritairement sur ces derniers et en plus faible mesure sur les cellules murines. D'autre part, nous attribuons l'incapacité d'IL-13 à protéger les myoblastes contre les effets du cocktail de cytokines pro-inflammatoires aux interactions entre le TNF α et l'INF γ avec le récepteur IL13R α 2. En effet, il est démontré que ces deux cytokines induisent la production du récepteur et son déploiement à la surface des cellules pour inhiber les effets biologiques de l'IL-13 (Yoshikawa *et al.* 2003).

Pour introduire le gène d'IL-13 humaine dans les muscles de souris, nous avons eu recours à deux méthodes de thérapie génique non virale : l'électroporation et la transfection *in vivo* avec un co-polymère non ionique, le Pluronic L64. L'électroporation semblait plus efficace que l'utilisation du Pluronic pour la livraison du gène. Cela pourrait être attribué, entre autres facteurs, aux difficultés rencontrées pour le marquage immunohistochimique d'IL-13 sur des coupes histologiques de muscle. Cela étant dit, il faut aussi prendre en considération que, pour ces deux procédés, l'efficacité de livraison du gène est directement liée à l'optimisation des paramètres de l'expérience.

L'électroporation est utilisée en recherche *in vitro* depuis plus de 25 ans. L'intérêt récent à la thérapie génique non virale a mené à l'optimisation de cette technique, et à son utilisation dans des études cliniques actuellement en cours pour le traitement de différents

cancers et infections virales (Bodles-Brakhop *et al.* 2009). L'électroporation dans le muscle squelettique est très étudiée. Le principe est basé sur le fait que la membrane lipidique peut être considérée comme un élément diélectrique placé entre le cytoplasme et le milieu extracellulaire, tous deux conducteurs. Ainsi, un courant électrique appliqué aux cellules induit un potentiel transmembranaire qui induit à son tour l'apparition de pores transitoires sur la membrane plasmique. Les pores sont stables pour une période limitée après l'arrêt du stimulus électrique (Vaughan and Weaver 1996). Ceci permet la diffusion passive des molécules chargées comme l'ADN dans le cytoplasme. Aussi, l'efficacité de l'électroporation est influencée par plusieurs paramètres comme la taille des cellules traitées, la force du champ électrique et la durée des pulsations, et la nature de la composition de la matrice extracellulaire et des fluides interstitiels. En effet, les cellules de grande taille sont plus efficacement électroporées à faible voltage que les cellules de plus petite taille (Chu *et al.* 1987; Mumper *et al.* 1996). Aussi, l'environnement tissulaire complexe dans lequel se trouvent les cellules *in vivo* modifie les paramètres du champ électrique selon la conductivité relative de la matrice extracellulaire et des fluides interstitiels. Par ailleurs, la présence et la quantité des jonctions gap est un paramètre important parce qu'elles permettent la connexion électrique des cellules et l'uniformisation du champ électrique dans le tissu (Fattori *et al.* 2002). L'une des limitations majeures de l'électroporation est le dommage infligé aux tissus. Dans le muscle squelettique, une augmentation considérable des niveaux de créatine kinase dans le sérum est observée suite à l'électroporation. La détection d'éléments cytoplasmiques dans le sang indique une perte de l'intégrité des membranes des fibres comme barrières physiologiques. Une des méthodes qui peuvent être utilisées pour limiter les dégâts est la co-injection de Poloxamer 188 ou Pluronic F68 avec le plasmide (Hartikka *et al.* 2001).

La livraison de gènes par le biais de vecteurs synthétiques est fréquemment utilisée. Le composé cationique polyéthylèneimine (PEI) est le vecteur le plus documenté dans la littérature. Son efficacité pour la livraison de gènes est prouvée dans de nombreux types cellulaires et tissus, mais il cause des effets secondaires sévères *in vivo*. Il y a un grand intérêt naissant pour les co-polymères amphiphilliques comme vecteurs de livraison de gènes dans les muscles striés *in vivo*, cependant, leurs mécanismes d'action sont très peu

connus. Le Pluronic L64 est un co-polymère amphiphillique qui forme des micelles et interagit avec l'ADN. Cette interaction est possible uniquement si les micelles sont formés, et la micellisation en question ne peut avoir lieu qu'à des températures supérieures à 37 C. Ainsi, la température est un paramètre très important pour l'efficacité de cette méthode. D'autres paramètres comme la composition du diluent et le type tissulaire sont aussi importants. L'interaction optimale entre le Pluronic L64 et l'ADN a lieu dans une solution de sels de tyrode et l'utilisation d'eau ou d'autres solutions salines conduit à de moins bons résultats. Aussi, la transfection avec Pluronic L64 donne lieu à l'expression du gène introduit de façon efficace et sécuritaire, même avec une faible quantité d'ADN dans le muscle squelettique, mais non dans le muscle cardiaque (Roques *et al.* 2009). Ainsi, la méthode et les conditions de préparation des solutions de transfection constituent des paramètres sensibles et très importants. Les faibles niveaux de transfection observés dans cette étude pourraient être attribués à ces éléments. D'autres co-polymères amphiphilliques comme le Tetronic 304 peuvent être utilisés pour la transfection *in vivo*. Ce dernier présente moins de contraintes dans les conditions de préparation et l'interaction entre la molécule et l'ADN sont moins influençables par la température et la composition du milieu.

En conclusion, plusieurs éléments de réponse permettent d'expliquer en théorie les effets d'IL-13 observés sur les cellules humaines *in vitro*. L'absence de relation dose réponse entre la quantité d'IL-13 et la réponse cellulaire est avantageuse car la quantité d'interleukine sécrétée par le muscle ne peut pas être contrôlée. Bien que ces effets semblent très prometteurs quant aux paramètres importants pour le succès de greffe, certains effets ne semblent pas se reproduire *in vivo*. IL-13 ne semble pas améliorer la migration *in vivo* des cellules transplantées, et son action sur la survie des cellules paraît limitée. Le problème de la migration pourrait être résolu par l'induction de la surexpression de MMPs comme MMP9 par les cellules transplantées. De façon générale, les résultats obtenus *in vivo* constituent des observations préliminaires qui nécessitent la confirmation en améliorant les méthodes d'introduction de gènes dans le muscle squelettique ainsi que les méthodes d'évaluation de la migration. Aussi, il est important d'effectuer des expériences de succès de greffe pour pouvoir déterminer si, ultimement, l'introduction de

l'expression d'IL-13 améliore le recrutement des cellules transplantées par les fibres pour la fusion et s'il y a une augmentation du nombre de fibres exprimant la dystrophine humaine.

Conclusions

La dystrophie musculaire de Duchenne est une myopathie très sévère qui conduit à une réduction considérable de l'espérance de vie des patients. Les traitements disponibles permettent d'améliorer leur qualité de vie et de retarder l'aggravation des symptômes. Un traitement curatif consiste en la correction des défauts moléculaires à l'origine de la maladie, c'est-à-dire la restauration de l'expression d'une dystrophine fonctionnelle. La thérapie cellulaire constitue une approche très prometteuse, cependant, son efficacité est limitée par la faible migration et la mortalité précoce des cellules une fois transplantées dans le muscle.

Les objectifs de ce travail étaient de mettre en évidence les différents effets que l'interleukine 13 peut avoir sur les myoblastes humains et de vérifier si l'expression de cette interleukine par les fibres musculaires de souris améliore la migration et le recrutement des cellules transplantées pour la fusion. Nous avons montré en premier lieu qu'IL-13 permet d'améliorer la fusion, la migration et la résistance au stress oxydatif des myoblastes humains. Elle régule aussi négativement les niveaux de MMP2 et n'améliore pas la survie suite l'induction d'un environnement pro-inflammatoire *in vitro*. En deuxième lieu nous avons utilisé l'électroporation et la transfection avec le Pluronic L64 *in vivo* et comparé l'efficacité de livraison génique pour chacune d'entre elles. Il faut souligner le fait que même si nous avons obtenu une meilleure efficacité avec l'électroporation qu'avec la transfection, nous ne pouvons pas généraliser cette observation parce que les différences au niveau de l'efficacité sont attribuées aux conditions intrinsèques à nos manipulations et non aux méthodes elles-mêmes. En dernier lieu, nous avons testé l'effet de l'IL-13 sécrétée par les fibres sur la migration des cellules transplantées *in vivo* et nous avons conclu que, d'un premier abord, IL-13 ne semble pas améliorer la migration, mais que ce n'est pas une conclusion définitive puisqu'il s'agit d'un résultat préliminaire obtenu dans des conditions qui nécessitent l'optimisation.

L'étude présentée ici montre une des nombreuses stratégies pour aborder les problèmes de la thérapie cellulaire. Même si les résultats préliminaires *in vivo* ne sont pas concluants, les résultats obtenus *in vitro* sont très encourageants et incitent à continuer les investigations *in vivo* en apportant de légères modifications à l'approche comme

l'utilisation d'autres interleukines en combinaison avec l'IL-13. Les effets synergiques éventuels peuvent avoir des effets très positifs. À titre d'exemple, les interleukines 4, 6 et 15 jouent toutes un rôle dans l'induction de l'hypertrophie musculaire *in vivo* ainsi que dans l'amélioration du potentiel migratoire et de fusion des myoblastes *in vitro*.

Bibliographie

- Aartsma-Rus, A., J. C. Van Deutekom, I. F. Fokkema, G. J. Van Ommen and J. T. Den Dunnen (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**, 135-44.
- Aartsma-Rus, A. and G. J. van Ommen (2007) Antisense-mediated exon skipping: a versatile tool with therapeutic and research applications. *RNA*. **13**, 1609-24.
- Ahn, A. H. and L. M. Kunkel (1993) The structural and functional diversity of dystrophin. *Nat Genet*. **3**, 283-91.
- Aihara, H. and J. Miyazaki (1998) Gene transfer into muscle by electroporation in vivo. *Nat Biotechnol*. **16**, 867-70.
- Allen, D. L., D. H. Teitelbaum and K. Kurachi (2003) Growth factor stimulation of matrix metalloproteinase expression and myoblast migration and invasion in vitro. *Am J Physiol Cell Physiol*. **284**, C805-15.
- Alter, J., F. Lou, A. Rabinowitz, H. Yin, J. Rosenfeld, S. D. Wilton, T. A. Partridge and Q. L. Lu (2006) Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression bodywide and improves dystrophic pathology. *Nat Med*. **12**, 175-7.
- Amalfitano, A., M. A. Hauser, H. Hu, D. Serra, C. R. Begy and J. S. Chamberlain (1998) Production and characterization of improved adenovirus vectors with the E1, E2b, and E3 genes deleted. *J Virol*. **72**, 926-33.
- Aman, M. J., N. Tayebi, N. I. Obiri, R. K. Puri, W. S. Modi and W. J. Leonard (1996) cDNA cloning and characterization of the human interleukin 13 receptor alpha chain. *J Biol Chem*. **271**, 29265-70.
- Andrews, R., L. Rosa, M. Daines and G. Khurana Hershey (2001) Reconstitution of a functional human type II IL-4/IL-13 receptor in mouse B cells: demonstration of species specificity. *J Immunol*. **166**, 1716-22.
- Baeza-Raja, B. and P. Munoz-Canoves (2004) p38 MAPK-induced nuclear factor-kappaB activity is required for skeletal muscle differentiation: role of interleukin-6. *Mol Biol Cell*. **15**, 2013-26.
- Baines, C. P. and J. D. Molkentin (2005) STRESS signaling pathways that modulate cardiac myocyte apoptosis. *J Mol Cell Cardiol*. **38**, 47-62.
- Barton-Davis, E. R., L. Cordier, D. I. Shoturma, S. E. Leland and H. L. Sweeney (1999) Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. *J Clin Invest*. **104**, 375-81.
- Barton, E. R., L. Morris, A. Musaro, N. Rosenthal and H. L. Sweeney (2002) Muscle-specific expression of insulin-like growth factor I counters muscle decline in mdx mice. *J Cell Biol*. **157**, 137-48.
- Baumeister, R. and L. Ge (2002) The worm in us - *Caenorhabditis elegans* as a model of human disease. *Trends Biotechnol*. **20**, 147-8.
- Bertoni, C., G. E. Morris and T. A. Rando (2005) Strand bias in oligonucleotide-mediated dystrophin gene editing. *Hum Mol Genet*. **14**, 221-33.
- Bertoni, C. and T. A. Rando (2002) Dystrophin gene repair in mdx muscle precursor cells in vitro and in vivo mediated by RNA-DNA chimeric oligonucleotides. *Hum Gene Ther*. **13**, 707-18.
- Bessou, C., J. B. Giuglia, C. J. Franks, L. Holden-Dye and L. Segalat (1998) Mutations in the *Caenorhabditis elegans* dystrophin-like gene *dys-1* lead to hyperactivity and suggest a link with cholinergic transmission. *Neurogenetics*. **2**, 61-72.

- Biggar, W. D., M. Gingras, D. L. Fehlings, V. A. Harris and C. A. Steele (2001) Deflazacort treatment of Duchenne muscular dystrophy. *J Pediatr.* **138**, 45-50.
- Bischoff, R. (1986) Proliferation of muscle satellite cells on intact myofibers in culture. *Dev Biol.* **115**, 129-39.
- Blankinship, M. J., P. Gregorevic and J. S. Chamberlain (2006) Gene therapy strategies for Duchenne muscular dystrophy utilizing recombinant adeno-associated virus vectors. *Mol Ther.* **13**, 241-9.
- Bochner, B. S., D. A. Klunk, S. A. Sterbinsky, R. L. Coffman and R. P. Schleimer (1995) IL-13 selectively induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *J Immunol.* **154**, 799-803.
- Bodles-Brakhop, A. M., R. Heller and R. Draghia-Akli (2009) Electroporation for the delivery of DNA-based vaccines and immunotherapeutics: current clinical developments. *Mol Ther.* **17**, 585-92.
- Bogdanovich, S., T. O. Krag, E. R. Barton, L. D. Morris, L. A. Whittemore, R. S. Ahima and T. S. Khurana (2002) Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature.* **420**, 418-21.
- Bogdanovich, S., K. J. Perkins, T. O. Krag, L. A. Whittemore and T. S. Khurana (2005) Myostatin propeptide-mediated amelioration of dystrophic pathophysiology. *FASEB J.* **19**, 543-9.
- Bouchentouf, M., B. F. Benabdallah, J. Rousseau, L. M. Schwartz and J. P. Tremblay (2007) Induction of Anoikis following myoblast transplantation into SCID mouse muscles requires the Bit1 and FADD pathways. *Am J Transplant.* **7**, 1491-505.
- Bremmer-Bout, M., A. Aartsma-Rus, E. J. de Meijer, W. E. Kaman, A. A. Janson, R. H. Vossen, G. J. van Ommen, J. T. den Dunnen and J. C. van Deutekom (2004) Targeted exon skipping in transgenic hDMD mice: A model for direct preclinical screening of human-specific antisense oligonucleotides. *Mol Ther.* **10**, 232-40.
- Brenman, J. E., D. S. Chao, H. Xia, K. Aldape and D. S. Brecht (1995) Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell.* **82**, 743-52.
- Brown, K. D., S. M. Zurawski, T. R. Mosmann and G. Zurawski (1989) A family of small inducible proteins secreted by leukocytes are members of a new superfamily that includes leukocyte and fibroblast-derived inflammatory agents, growth factors, and indicators of various activation processes. *J Immunol.* **142**, 679-87.
- Brzoska, E., V. Bello, T. Darribere and J. Moraczewski (2006) Integrin alpha3 subunit participates in myoblast adhesion and fusion in vitro. *Differentiation.* **74**, 105-18.
- Bulfield, G., W. G. Siller, P. A. Wight and K. J. Moore (1984) X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **81**, 1189-92.
- Cachaco, A. S., C. S. Pereira, R. G. Pardal, F. Bajanca and S. Thorsteinsdottir (2005) Integrin repertoire on myogenic cells changes during the course of primary myogenesis in the mouse. *Dev Dyn.* **232**, 1069-78.
- Campbell, K. P. (1995) Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell.* **80**, 675-9.
- Carbo, N., J. Lopez-Soriano, P. Costelli, S. Busquets, B. Alvarez, F. M. Baccino, L. S. Quinn, F. J. Lopez-Soriano and J. M. Argiles (2000) Interleukin-15 antagonizes muscle protein waste in tumour-bearing rats. *Br J Cancer.* **83**, 526-31.

- Chambers, S. P., A. Dodd, R. Overall, T. Sirey, L. T. Lam, G. E. Morris and D. R. Love (2001) Dystrophin in adult zebrafish muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* **286**, 478-83.
- Chen, X. P., J. A. Losman and P. Rothman (2000) SOCS proteins, regulators of intracellular signaling. *Immunity.* **13**, 287-90.
- Chiba, Y., S. Nakazawa, M. Todoroki, K. Shinozaki, H. Sakai and M. Misawa (2009) Interleukin-13 augments bronchial smooth muscle contractility with an up-regulation of RhoA protein. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **40**, 159-67.
- Chomarat, P. and J. Banchereau (1997) An update on interleukin-4 and its receptor. *Eur Cytokine Netw.* **8**, 333-44.
- Christ, B. and C. P. Ordahl (1995) Early stages of chick somite development. *Anat Embryol (Berl).* **191**, 381-96.
- Chu, G., H. Hayakawa and P. Berg (1987) Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA. *Nucleic Acids Res.* **15**, 1311-26.
- Chung, C. D., J. Liao, B. Liu, X. Rao, P. Jay, P. Berta and K. Shuai (1997) Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science.* **278**, 1803-5.
- Collins, C. A. and J. E. Morgan (2003) Duchenne's muscular dystrophy: animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. *Int J Exp Pathol.* **84**, 165-72.
- Coolican, S. A., D. S. Samuel, D. Z. Ewton, F. J. McWade and J. R. Florini (1997) The mitogenic and myogenic actions of insulin-like growth factors utilize distinct signaling pathways. *J Biol Chem.* **272**, 6653-62.
- Corry, D. B., K. Rishi, J. Kanellis, A. Kiss, L. Z. Song Lz, J. Xu, L. Feng, Z. Werb and F. Kheradmand (2002) Decreased allergic lung inflammatory cell egression and increased susceptibility to asphyxiation in MMP2-deficiency. *Nat Immunol.* **3**, 347-53.
- Corti, S., S. Strazzer, R. Del Bo, S. Salani, P. Bossolasco, F. Fortunato, F. Locatelli, D. Soligo, M. Moggio, P. Ciscato, A. Prella, C. Borsotti, N. Bresolin, G. Scarlato and G. P. Comi (2002) A subpopulation of murine bone marrow cells fully differentiates along the myogenic pathway and participates in muscle repair in the mdx dystrophic mouse. *Exp Cell Res.* **277**, 74-85.
- Cossu, G. and M. Sampaolesi (2007) New therapies for Duchenne muscular dystrophy: challenges, prospects and clinical trials. *Trends Mol Med.* **13**, 520-6.
- Daines, M. O. and G. K. Hershey (2002) A novel mechanism by which interferon-gamma can regulate interleukin (IL)-13 responses. Evidence for intracellular stores of IL-13 receptor alpha -2 and their rapid mobilization by interferon-gamma. *J Biol Chem.* **277**, 10387-93.
- de Vries, J. E. (1996) Molecular and biological characteristics of interleukin-13. *Chem Immunol.* **63**, 204-18.
- de Vries, J. E. (1998) The role of IL-13 and its receptor in allergy and inflammatory responses. *J Allergy Clin Immunol.* **102**, 165-9.
- DelloRusso, C., J. M. Scott, D. Hartigan-O'Connor, G. Salvatori, C. Barjot, A. S. Robinson, R. W. Crawford, S. V. Brooks and J. S. Chamberlain (2002) Functional correction of adult mdx mouse muscle using gutted adenoviral vectors expressing full-length dystrophin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**, 12979-84.
- Donaldson, D. D., M. J. Whitters, L. J. Fitz, T. Y. Neben, H. Finnerty, S. L. Henderson, R. M. O'Hara, Jr., D. R. Beier, K. J. Turner, C. R. Wood and M. Collins (1998) The

- murine IL-13 receptor alpha 2: molecular cloning, characterization, and comparison with murine IL-13 receptor alpha 1. *J Immunol.* **161**, 2317-24.
- Dunckley, M. G., M. Manoharan, P. Villiet, I. C. Eperon and G. Dickson (1998) Modification of splicing in the dystrophin gene in cultured Mdx muscle cells by antisense oligoribonucleotides. *Hum Mol Genet.* **7**, 1083-90.
- Dunckley, M. G., D. J. Wells, F. S. Walsh and G. Dickson (1993) Direct retroviral-mediated transfer of a dystrophin minigene into mdx mouse muscle in vivo. *Hum Mol Genet.* **2**, 717-23.
- Eiholzer, U., E. Boltshauser, D. Frey, L. Molinari and M. Zachmann (1988) Short stature: a common feature in Duchenne muscular dystrophy. *Eur J Pediatr.* **147**, 602-5.
- El Fahime, E., Y. Torrente, N. J. Caron, M. D. Bresolin and J. P. Tremblay (2000) In vivo migration of transplanted myoblasts requires matrix metalloproteinase activity. *Exp Cell Res.* **258**, 279-87.
- Endo, T., F. Ogushi and S. Sone (1996) LPS-dependent cyclooxygenase-2 induction in human monocytes is down-regulated by IL-13, but not by IFN-gamma. *J Immunol.* **156**, 2240-6.
- Ervasti, J. M. and K. P. Campbell (1993) Dystrophin-associated glycoproteins: their possible roles in the pathogenesis of Duchenne muscular dystrophy. *Mol Cell Biol Hum Dis Ser.* **3**, 139-66.
- Fabb, S. A., D. J. Wells, P. Serpente and G. Dickson (2002) Adeno-associated virus vector gene transfer and sarcolemmal expression of a 144 kDa micro-dystrophin effectively restores the dystrophin-associated protein complex and inhibits myofibre degeneration in nude/mdx mice. *Hum Mol Genet.* **11**, 733-41.
- Fattori, E., N. La Monica, G. Ciliberto and C. Toniatti (2002) Electro-gene-transfer: a new approach for muscle gene delivery. *Somat Cell Mol Genet.* **27**, 75-83.
- Feng, N., S. M. Lugli, B. Schnyder, J. F. Gauchat, P. Graber, E. Schlagenhauf, B. Schnarr, M. Wiederkehr-Adam, A. Duschl, M. H. Heim, R. A. Lutz and R. Moser (1998) The interleukin-4/interleukin-13 receptor of human synovial fibroblasts: overexpression of the nonsignaling interleukin-13 receptor alpha2. *Lab Invest.* **78**, 591-602.
- Fichtner-Feigl, S., W. Strober, K. Kawakami, R. K. Puri and A. Kitani (2006) IL-13 signaling through the IL-13alpha2 receptor is involved in induction of TGF-beta1 production and fibrosis. *Nat Med.* **12**, 99-106.
- Fisher, R., J. M. Tinsley, S. R. Phelps, S. E. Squire, E. R. Townsend, J. E. Martin and K. E. Davies (2001) Non-toxic ubiquitous over-expression of utrophin in the mdx mouse. *Neuromuscul Disord.* **11**, 713-21.
- Fletcher, S., K. Honeyman, A. M. Fall, P. L. Harding, R. D. Johnsen, J. P. Steinhaus, H. M. Moulton, P. L. Iversen and S. D. Wilton (2007) Morpholino oligomer-mediated exon skipping averts the onset of dystrophic pathology in the mdx mouse. *Mol Ther.* **15**, 1587-92.
- Gao, G., L. H. Vandenberghe and J. M. Wilson (2005) New recombinant serotypes of AAV vectors. *Curr Gene Ther.* **5**, 285-97.
- Giri, J. G., M. Ahdieh, J. Eisenman, K. Shanebeck, K. Grabstein, S. Kumaki, A. Namen, L. S. Park, D. Cosman and D. Anderson (1994) Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *EMBO J.* **13**, 2822-30.
- Goto, K., Y. Chiba and M. Misawa (2009) IL-13 induces translocation of NF-kappaB in cultured human bronchial smooth muscle cells. *Cytokine.* **46**, 96-9.

- Grabstein, K. H., J. Eisenman, K. Shanebeck, C. Rauch, S. Srinivasan, V. Fung, C. Beers, J. Richardson, M. A. Schoenborn, M. Ahdieh and et al. (1994) Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science*. **264**, 965-8.
- Greenhalgh, C. J. and D. J. Hilton (2001) Negative regulation of cytokine signaling. *J Leukoc Biol*. **70**, 348-56.
- Guerette, B., D. Skuk, F. Celestin, C. Huard, F. Tardif, I. Asselin, B. Roy, M. Goulet, R. Roy, M. Entman and J. P. Tremblay (1997) Prevention by anti-LFA-1 of acute myoblast death following transplantation. *J Immunol*. **159**, 2522-31.
- Gullberg, D., T. Velling, L. Lohikangas and C. F. Tiger (1998) Integrins during muscle development and in muscular dystrophies. *Front Biosci*. **3**, D1039-50.
- Guo, J., F. Apiou, M. P. Mellerin, B. Lebeau, Y. Jacques and S. Minvielle (1997) Chromosome mapping and expression of the human interleukin-13 receptor. *Genomics*. **42**, 141-5.
- Gussoni, E., R. R. Bennett, K. R. Muskiewicz, T. Meyerrose, J. A. Nolte, I. Gilgoff, J. Stein, Y. M. Chan, H. G. Lidov, C. G. Bonnemann, A. Von Moers, G. E. Morris, J. T. Den Dunnen, J. S. Chamberlain, L. M. Kunkel and K. Weinberg (2002) Long-term persistence of donor nuclei in a Duchenne muscular dystrophy patient receiving bone marrow transplantation. *J Clin Invest*. **110**, 807-14.
- Guyon, J. R., A. N. Mosley, Y. Zhou, K. F. O'Brien, X. Sheng, K. Chiang, A. J. Davidson, J. M. Volinski, L. I. Zon and L. M. Kunkel (2003) The dystrophin associated protein complex in zebrafish. *Hum Mol Genet*. **12**, 601-15.
- Haque, S. J., P. Harbor, M. Tabrizi, T. Yi and B. R. Williams (1998) Protein-tyrosine phosphatase Shp-1 is a negative regulator of IL-4- and IL-13-dependent signal transduction. *J Biol Chem*. **273**, 33893-6.
- Harcourt, L. J., A. G. Holmes, P. Gregorevic, J. D. Schertzer, N. Stupka, D. R. Plant and G. S. Lynch (2005) Interleukin-15 administration improves diaphragm muscle pathology and function in dystrophic mdx mice. *Am J Pathol*. **166**, 1131-41.
- Hartikka, J., L. Sukhu, C. Buchner, D. Hazard, V. Bozoukova, M. Margalith, W. K. Nishioka, C. J. Wheeler, M. Manthorp and M. Sawdey (2001) Electroporation-facilitated delivery of plasmid DNA in skeletal muscle: plasmid dependence of muscle damage and effect of poloxamer 188. *Mol Ther*. **4**, 407-15.
- Hayes, A. and D. A. Williams (1998) Examining potential drug therapies for muscular dystrophy utilising the dy/dy mouse: I. Clenbuterol. *J Neurol Sci*. **157**, 122-8.
- Hebenstreit, D., G. Wirnsberger, J. Horejs-Hoeck and A. Duschl (2006) Signaling mechanisms, interaction partners, and target genes of STAT6. *Cytokine Growth Factor Rev*. **17**, 173-88.
- Hershey, G. K. (2003) IL-13 receptors and signaling pathways: an evolving web. *J Allergy Clin Immunol*. **111**, 677-90; quiz 691.
- Hirawat, S., E. M. Welch, G. L. Elfring, V. J. Northcutt, S. Paushkin, S. Hwang, E. M. Leonard, N. G. Almstead, W. Ju, S. W. Peltz and L. L. Miller (2007) Safety, tolerability, and pharmacokinetics of PTC124, a nonaminoglycoside nonsense mutation suppressor, following single- and multiple-dose administration to healthy male and female adult volunteers. *J Clin Pharmacol*. **47**, 430-44.
- Hoffman, E. P., R. H. Brown, Jr. and L. M. Kunkel (1987) Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*. **51**, 919-28.

- Hong, F., J. Lee, J. W. Song, S. J. Lee, H. Ahn, J. J. Cho, J. Ha and S. S. Kim (2002) Cyclosporin A blocks muscle differentiation by inducing oxidative stress and inhibiting the peptidyl-prolyl-cis-trans isomerase activity of cyclophilin A: cyclophilin A protects myoblasts from cyclosporin A-induced cytotoxicity. *FASEB J.* **16**, 1633-5.
- Horie, S., Y. Okubo, M. Hossain, E. Sato, H. Nomura, S. Koyama, J. Suzuki, M. Isobe and M. Sekiguchi (1997) Interleukin-13 but not interleukin-4 prolongs eosinophil survival and induces eosinophil chemotaxis. *Intern Med.* **36**, 179-85.
- Horsley, V., K. M. Jansen, S. T. Mills and G. K. Pavlath (2003) IL-4 acts as a myoblast recruitment factor during mammalian muscle growth. *Cell.* **113**, 483-94.
- Huard, J., G. Acsadi, A. Jani, B. Massie and G. Karpati (1994) Gene transfer into skeletal muscles by isogenic myoblasts. *Hum Gene Ther.* **5**, 949-58.
- Huard, J., J. P. Bouchard, R. Roy, F. Malouin, G. Dansereau, C. Labrecque, N. Albert, C. L. Richards, B. Lemieux and J. P. Tremblay (1992) Human myoblast transplantation: preliminary results of 4 cases. *Muscle Nerve.* **15**, 550-60.
- Ito, H., P. L. Hallauer, K. E. Hastings and J. P. Tremblay (1998) Prior culture with concanavalin A increases intramuscular migration of transplanted myoblast. *Muscle Nerve.* **21**, 291-7.
- Jacquemin, V., G. S. Butler-Browne, D. Furling and V. Mouly (2007) IL-13 mediates the recruitment of reserve cells for fusion during IGF-1-induced hypertrophy of human myotubes. *J Cell Sci.* **120**, 670-81.
- Jiang, H., K. Foltenyi, M. Kashiwada, L. Donahue, B. Vuong, B. Hehn and P. Rothman (2001) Fes mediates the IL-4 activation of insulin receptor substrate-2 and cellular proliferation. *J Immunol.* **166**, 2627-34.
- Jiang, H., M. B. Harris and P. Rothman (2000) IL-4/IL-13 signaling beyond JAK/STAT. *J Allergy Clin Immunol.* **105**, 1063-70.
- Jinnin, M., H. Ihn, Y. Asano, K. Yamane, M. Trojanowska and K. Tamaki (2006) Upregulation of tenascin-C expression by IL-13 in human dermal fibroblasts via the phosphoinositide 3-kinase/Akt and the protein kinase C signaling pathways. *J Invest Dermatol.* **126**, 551-60.
- Kamimura, D., K. Ishihara and T. Hirano (2003) IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* **149**, 1-38.
- Kandarian, S. C. and R. W. Jackman (2006) Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy. *Muscle Nerve.* **33**, 155-65.
- Kasaian, M. T. and D. K. Miller (2008) IL-13 as a therapeutic target for respiratory disease. *Biochem Pharmacol.* **76**, 147-55.
- Kashiwada, M., C. C. Giallourakis, P. Y. Pan and P. B. Rothman (2001) Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif of the IL-4 receptor associates with SH2-containing phosphatases and regulates IL-4-induced proliferation. *J Immunol.* **167**, 6382-7.
- Khurana, T. S. and K. E. Davies (2003) Pharmacological strategies for muscular dystrophy. *Nat Rev Drug Discov.* **2**, 379-90.
- Kim, J. H., R. A. Bachmann and J. Chen (2009) Interleukin-6 and insulin resistance. *Vitam Horm.* **80**, 613-33.
- Kinali, M., E. Mercuri, M. Main, F. Muntoni and V. Dubowitz (2002) An effective, low-dosage, intermittent schedule of prednisolone in the long-term treatment of early cases of Duchenne dystrophy. *Neuromuscul Disord.* **12 Suppl 1**, S169-74.

- Klingmuller, U., U. Lorenz, L. C. Cantley, B. G. Neel and H. F. Lodish (1995) Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell*. **80**, 729-38.
- Koenig, M., E. P. Hoffman, C. J. Bertelson, A. P. Monaco, C. Feener and L. M. Kunkel (1987) Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell*. **50**, 509-17.
- Krag, T. O., S. Bogdanovich, C. J. Jensen, M. D. Fischer, J. Hansen-Schwartz, E. H. Javazon, A. W. Flake, L. Edvinsson and T. S. Khurana (2004) Heregulin ameliorates the dystrophic phenotype in mdx mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **101**, 13856-60.
- Kunkel, L. M., J. F. Hejtmancik, C. T. Caskey, A. Speer, A. P. Monaco, W. Middlesworth, C. A. Colletti, C. Bertelson, U. Muller, M. Bresnan, F. Shapiro, U. Tantravahi, J. Speer, S. A. Latt, R. Bartlett, M. A. Pericak-Vance, A. D. Roses, M. W. Thompson, P. N. Ray, R. G. Worton, K. H. Fischbeck, P. Gallano, M. Coulon, C. Duros, J. Boue, C. Junien, J. Chelly, G. Hamard, M. Jeanpierre, M. Lambert, J. C. Kaplan, A. Emery, H. Dorkins, S. McGlade, K. E. Davies, C. Boehm, B. Arveiler, C. Lemaire, G. J. Morgan, M. J. Denton, J. Amos, M. Bobrow, F. Benham, E. Boswinkel, C. Cole, V. Dubowitz, K. Hart, S. Hodgson, L. Johnson, A. Walker, L. Roncuzzi, A. Ferlini, C. Nobile, G. Romeo, D. E. Wilcox, N. A. Affara, M. A. Ferguson-Smith, M. Lindolf, H. Kaariainen, A. de la Chapelle, V. Ionasescu, C. Searby, R. Ionasescu, E. Bakker, G. J. van Ommen, P. L. Pearson, C. R. Greenberg, J. L. Hamerton, K. Wrogemann, R. A. Doherty, R. Polakowska, C. Hyser, S. Quirk, N. Thomas, J. F. Harper, B. T. Darras and U. Francke (1986) Analysis of deletions in DNA from patients with Becker and Duchenne muscular dystrophy. *Nature*. **322**, 73-7.
- Lafreniere, J. F., P. Mills, M. Bouchentouf and J. P. Tremblay (2006) Interleukin-4 improves the migration of human myogenic precursor cells in vitro and in vivo. *Exp Cell Res*. **312**, 1127-41.
- Lafreniere, J. F., P. Mills, J. P. Tremblay and E. El Fahime (2004) Growth factors improve the in vivo migration of human skeletal myoblasts by modulating their endogenous proteolytic activity. *Transplantation*. **77**, 1741-7.
- Lanone, S., T. Zheng, Z. Zhu, W. Liu, C. G. Lee, B. Ma, Q. Chen, R. J. Homer, J. Wang, L. A. Rabach, M. E. Rabach, J. M. Shipley, S. D. Shapiro, R. M. Senior and J. A. Elias (2002) Overlapping and enzyme-specific contributions of matrix metalloproteinases-9 and -12 in IL-13-induced inflammation and remodeling. *J Clin Invest*. **110**, 463-74.
- Laoukili, J., E. Perret, T. Willems, A. Minty, E. Parthoens, O. Houcine, A. Coste, M. Jorissen, F. Marano, D. Caput and F. Tournier (2001) IL-13 alters mucociliary differentiation and ciliary beating of human respiratory epithelial cells. *J Clin Invest*. **108**, 1817-24.
- Lee, P. J., X. Zhang, P. Shan, B. Ma, C. G. Lee, R. J. Homer, Z. Zhu, M. Rincon, B. T. Mossman and J. A. Elias (2006) ERK1/2 mitogen-activated protein kinase selectively mediates IL-13-induced lung inflammation and remodeling in vivo. *J Clin Invest*. **116**, 163-73.

- Leloup, L., L. Daury, G. Mazeret, P. Cottin and J. J. Brustis (2007) Involvement of the ERK/MAP kinase signalling pathway in milli-calpain activation and myogenic cell migration. *Int J Biochem Cell Biol.* **39**, 1177-89.
- Lentsch, A. B., T. P. Shanley, V. Sarma and P. A. Ward (1997) In vivo suppression of NF-kappa B and preservation of I kappa B alpha by interleukin-10 and interleukin-13. *J Clin Invest.* **100**, 2443-8.
- Leonard, W. J. and J. X. Lin (2000) Cytokine receptor signaling pathways. *J Allergy Clin Immunol.* **105**, 877-88.
- Li, L., Y. Xia, A. Nguyen, Y. H. Lai, L. Feng, T. R. Mosmann and D. Lo (1999) Effects of Th2 cytokines on chemokine expression in the lung: IL-13 potently induces eotaxin expression by airway epithelial cells. *J Immunol.* **162**, 2477-87.
- Li, S., E. Kimura, B. M. Fall, M. Reyes, J. C. Angello, R. Welikson, S. D. Hauschka and J. S. Chamberlain (2005) Stable transduction of myogenic cells with lentiviral vectors expressing a minidystrophin. *Gene Ther.* **12**, 1099-108.
- Liao, J., Y. Fu and K. Shuai (2000) Distinct roles of the NH₂- and COOH-terminal domains of the protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 (PIAS1) in cytokine-induced PIAS1-Stat1 interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**, 5267-72.
- Lu, Q. L., C. J. Mann, F. Lou, G. Bou-Gharios, G. E. Morris, S. A. Xue, S. Fletcher, T. A. Partridge and S. D. Wilton (2003) Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse. *Nat Med.* **9**, 1009-14.
- Mandel, J. L. (1989) Dystrophin. The gene and its product. *Nature.* **339**, 584-6.
- Mauro, A. (1961) Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol.* **9**, 493-5.
- McDiarmid, S. V., R. W. Busuttill, N. L. Ascher, J. Burdick, A. M. D'Alessandro, C. Esquivel, M. Kalayoglu, A. S. Klein, J. W. Marsh, C. M. Miller and et al. (1995) FK506 (tacrolimus) compared with cyclosporine for primary immunosuppression after pediatric liver transplantation. Results from the U.S. Multicenter Trial. *Transplantation.* **59**, 530-6.
- McKenzie, A. N., J. A. Culpepper, R. de Waal Malefyt, F. Briere, J. Punnonen, G. Aversa, A. Sato, W. Dang, B. G. Cocks, S. Menon and et al. (1993) Interleukin 13, a T-cell-derived cytokine that regulates human monocyte and B-cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**, 3735-9.
- McPherron, A. C., A. M. Lawler and S. J. Lee (1997) Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature.* **387**, 83-90.
- Mills, P., J. F. Lafreniere, B. F. Benabdallah, M. El Fahime el and J. P. Tremblay (2007) A new pro-migratory activity on human myogenic precursor cells for a synthetic peptide within the E domain of the mechano growth factor. *Exp Cell Res.* **313**, 527-37.
- Miloux, B., P. Laurent, O. Bonnin, J. Lupker, D. Caput, N. Vita and P. Ferrara (1997) Cloning of the human IL-13R alpha1 chain and reconstitution with the IL4R alpha of a functional IL-4/IL-13 receptor complex. *FEBS Lett.* **401**, 163-6.
- Minetti, G. C., C. Colussi, R. Adami, C. Serra, C. Mozzetta, V. Parente, S. Fortuni, S. Straino, M. Sampaolesi, M. Di Padova, B. Illi, P. Gallinari, C. Steinkuhler, M. C. Capogrossi, V. Sartorelli, R. Bottinelli, C. Gaetano and P. L. Puri (2006) Functional and morphological recovery of dystrophic muscles in mice treated with deacetylase inhibitors. *Nat Med.* **12**, 1147-50.

- Minty, A., P. Chalon, J. M. Derocq, X. Dumont, J. C. Guillemot, M. Kaghad, C. Labit, P. Leplatois, P. Liauzun, B. Miloux and et al. (1993) Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature*. **362**, 248-50.
- Mir, L. M., M. F. Bureau, J. Gehl, R. Rangara, D. Rouy, J. M. Caillaud, P. Delaere, D. Branellec, B. Schwartz and D. Scherman (1999) High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96**, 4262-7.
- Monaco, A. P., R. L. Neve, C. Colletti-Feener, C. J. Bertelson, D. M. Kurnit and L. M. Kunkel (1986) Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature*. **323**, 646-50.
- Monckton, G., V. Hoskin and S. Warren (1982) Prevalence and incidence of muscular dystrophy in Alberta, Canada. *Clin Genet*. **21**, 19-24.
- Mowen, K. A., J. Tang, W. Zhu, B. T. Schurter, K. Shuai, H. R. Herschman and M. David (2001) Arginine methylation of STAT1 modulates IFNalpha/beta-induced transcription. *Cell*. **104**, 731-41.
- Mumper, R. J., J. G. Duguid, K. Anwer, M. K. Barron, H. Nitta and A. P. Rolland (1996) Polyvinyl derivatives as novel interactive polymers for controlled gene delivery to muscle. *Pharm Res*. **13**, 701-9.
- Muntoni, F., S. Torelli and A. Ferlini (2003) Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol*. **2**, 731-40.
- Murley, J. S., Y. Kataoka, C. J. Weydert, L. W. Oberley and D. J. Grdina (2006) Delayed radioprotection by nuclear transcription factor kappaB -mediated induction of manganese superoxide dismutase in human microvascular endothelial cells after exposure to the free radical scavenger WR1065. *Free Radic Biol Med*. **40**, 1004-16.
- Murray, J. M., K. E. Davies, P. S. Harper, L. Meredith, C. R. Mueller and R. Williamson (1982) Linkage relationship of a cloned DNA sequence on the short arm of the X chromosome to Duchenne muscular dystrophy. *Nature*. **300**, 69-71.
- Musaro, A., K. McCullagh, A. Paul, L. Houghton, G. Dobrowolny, M. Molinaro, E. R. Barton, H. L. Sweeney and N. Rosenthal (2001) Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nat Genet*. **27**, 195-200.
- Naka, T., M. Narazaki, M. Hirata, T. Matsumoto, S. Minamoto, A. Aono, N. Nishimoto, T. Kajita, T. Taga, K. Yoshizaki, S. Akira and T. Kishimoto (1997) Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature*. **387**, 924-9.
- Narazaki, M., M. Fujimoto, T. Matsumoto, Y. Morita, H. Saito, T. Kajita, K. Yoshizaki, T. Naka and T. Kishimoto (1998) Three distinct domains of SSI-1/SOCS-1/JAB protein are required for its suppression of interleukin 6 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**, 13130-4.
- Neuman, S., A. Kaban, T. Volk, D. Yaffe and U. Nudel (2001) The dystrophin / utrophin homologues in Drosophila and in sea urchin. *Gene*. **263**, 17-29.
- Nielsen, S. and B. K. Pedersen (2008) Skeletal muscle as an immunogenic organ. *Curr Opin Pharmacol*. **8**, 346-51.
- Nigro, G., L. I. Comi, L. Politano and R. J. Bain (1990) The incidence and evolution of cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy. *Int J Cardiol*. **26**, 271-7.
- Oettgen, H. C. and R. S. Geha (2001) IgE regulation and roles in asthma pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol*. **107**, 429-40.

- Ogata, H., D. Ford, N. Kouttab, T. C. King, N. Vita, A. Minty, J. Stoeckler, D. Morgan, C. Girasole, J. W. Morgan and A. L. Maizel (1998) Regulation of interleukin-13 receptor constituents on mature human B lymphocytes. *J Biol Chem.* **273**, 9864-71.
- Oriente, A., N. S. Fedarko, S. E. Pacocha, S. K. Huang, L. M. Lichtenstein and D. M. Essayan (2000) Interleukin-13 modulates collagen homeostasis in human skin and keloid fibroblasts. *J Pharmacol Exp Ther.* **292**, 988-94.
- Ozasa, S., S. Kimura, K. Ito, H. Ueno, M. Ikezawa, M. Matsukura, K. Yoshioka, K. Araki, K. I. Yamamura, K. Abe, H. Niwa and T. Miike (2007) Efficient conversion of ES cells into myogenic lineage using the gene-inducible system. *Biochem Biophys Res Commun.* **357**, 957-63.
- Park, L. S., D. Friend, H. M. Sassenfeld and D. L. Urdal (1987) Characterization of the human B cell stimulatory factor 1 receptor. *J Exp Med.* **166**, 476-88.
- Parsons, S. A., D. P. Millay, M. A. Sargent, E. M. McNally and J. D. Molkentin (2006) Age-dependent effect of myostatin blockade on disease severity in a murine model of limb-girdle muscular dystrophy. *Am J Pathol.* **168**, 1975-85.
- Pasternak, C., S. Wong and E. L. Elson (1995) Mechanical function of dystrophin in muscle cells. *J Cell Biol.* **128**, 355-61.
- Pavlat, G. K. and V. Horsley (2003) Cell fusion in skeletal muscle--central role of NFATC2 in regulating muscle cell size. *Cell Cycle.* **2**, 420-3.
- Peault, B., M. Rudnicki, Y. Torrente, G. Cossu, J. P. Tremblay, T. Partridge, E. Gussoni, L. M. Kunkel and J. Huard (2007) Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy. *Mol Ther.* **15**, 867-77.
- Phillips, M. F., R. C. Quinlivan, R. H. Edwards and P. M. Calverley (2001) Changes in spirometry over time as a prognostic marker in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Am J Respir Crit Care Med.* **164**, 2191-4.
- Pons, F., N. Augier, R. Heilig, J. Leger, D. Mornet and J. J. Leger (1990) Isolated dystrophin molecules as seen by electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87**, 7851-5.
- Pope, S. M., E. B. Brandt, A. Mishra, S. P. Hogan, N. Zimmermann, K. I. Matthaei, P. S. Foster and M. E. Rothenberg (2001) IL-13 induces eosinophil recruitment into the lung by an IL-5- and eotaxin-dependent mechanism. *J Allergy Clin Immunol.* **108**, 594-601.
- Prior, T. W. and S. J. Bridgeman (2005) Experience and strategy for the molecular testing of Duchenne muscular dystrophy. *J Mol Diagn.* **7**, 317-26.
- Prokopchuk, O., Y. Liu, L. Wang, K. Wirth, D. Schmidtbleicher and J. M. Steinacker (2007) Skeletal muscle IL-4, IL-4Ralpha, IL-13 and IL-13Ralpha1 expression and response to strength training. *Exerc Immunol Rev.* **13**, 67-75.
- Purwar, R., M. Kraus, T. Werfel and M. Wittmann (2008) Modulation of keratinocyte-derived MMP-9 by IL-13: a possible role for the pathogenesis of epidermal inflammation. *J Invest Dermatol.* **128**, 59-66.
- Quenneville, S. P., P. Chapdelaine, D. Skuk, M. Paradis, M. Goulet, J. Rousseau, X. Xiao, L. Garcia and J. P. Tremblay (2007) Autologous transplantation of muscle precursor cells modified with a lentivirus for muscular dystrophy: human cells and primate models. *Mol Ther.* **15**, 431-8.
- Quinn, L. S., B. G. Anderson, R. H. Drivdahl, B. Alvarez and J. M. Argiles (2002) Overexpression of interleukin-15 induces skeletal muscle hypertrophy in vitro: implications for treatment of muscle wasting disorders. *Exp Cell Res.* **280**, 55-63.

- Quinn, L. S., K. L. Haugk and K. H. Grabstein (1995) Interleukin-15: a novel anabolic cytokine for skeletal muscle. *Endocrinology*. **136**, 3669-72.
- Rando, T. A. (2001) The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle Nerve*. **24**, 1575-94.
- Roberts, R. G., R. J. Gardner and M. Bobrow (1994) Searching for the 1 in 2,400,000: a review of dystrophin gene point mutations. *Hum Mutat*. **4**, 1-11.
- Rohwedel, J., V. Maltsev, E. Bober, H. H. Arnold, J. Hescheler and A. M. Wobus (1994) Muscle cell differentiation of embryonic stem cells reflects myogenesis in vivo: developmentally regulated expression of myogenic determination genes and functional expression of ionic currents. *Dev Biol*. **164**, 87-101.
- Romero, N. B., S. Braun, O. Benveniste, F. Leturcq, J. Y. Hogrel, G. E. Morris, A. Barois, B. Eymard, C. Payan, V. Ortega, A. L. Boch, L. Lejean, C. Thioudellet, B. Mourot, C. Escot, A. Choquel, D. Recan, J. C. Kaplan, G. Dickson, D. Klatzmann, V. Molinier-Frenckel, J. G. Guillet, P. Squiban, S. Herson and M. Fardeau (2004) Phase I study of dystrophin plasmid-based gene therapy in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Hum Gene Ther*. **15**, 1065-76.
- Roques, C., K. Bouchemal, G. Ponchel, Y. Fromes and E. Fattal (2009) Parameters affecting organization and transfection efficiency of amphiphilic copolymers/DNA carriers. *J Control Release*. **138**, 71-7.
- Roy, R., J. P. Tremblay, J. Huard, C. Richards, F. Malouin and J. P. Bouchard (1993) Antibody formation after myoblast transplantation in Duchenne-dystrophic patients, donor HLA compatible. *Transplant Proc*. **25**, 995-7.
- Salvatori, G., G. Ferrari, A. Mezzogiorno, S. Servidei, M. Coletta, P. Tonali, R. Giavazzi, G. Cossu and F. Mavilio (1993) Retroviral vector-mediated gene transfer into human primary myogenic cells leads to expression in muscle fibers in vivo. *Hum Gene Ther*. **4**, 713-23.
- Sampaolesi, M., Y. Torrente, A. Innocenzi, R. Tonlorenzi, G. D'Antona, M. A. Pellegrino, R. Barresi, N. Bresolin, M. G. De Angelis, K. P. Campbell, R. Bottinelli and G. Cossu (2003) Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. *Science*. **301**, 487-92.
- Sauleda, J., J. Gea, M. Orozco-Levi, J. Corominas, J. Minguella, C. Aguar, J. Broquetas and A. G. Agusti (1998) Structure and function relationships of the respiratory muscles. *Eur Respir J*. **11**, 906-11.
- Schmalbruch, H. and D. M. Lewis (2000) Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. *Muscle Nerve*. **23**, 617-26.
- Schoenwaelder, S. M. and K. Burridge (1999) Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Curr Opin Cell Biol*. **11**, 274-86.
- Schuelke, M., K. R. Wagner, L. E. Stolz, C. Hubner, T. Riebel, W. Komen, T. Braun, J. F. Tobin and S. J. Lee (2004) Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N Engl J Med*. **350**, 2682-8.
- Scott, J. M. and J. S. Chamberlain (2003) Guttated adenoviral vectors for gene transfer to muscle. *Methods Mol Biol*. **219**, 19-28.
- Semsarian, C., M. J. Wu, Y. K. Ju, T. Marciniak, T. Yeoh, D. G. Allen, R. P. Harvey and R. M. Graham (1999) Skeletal muscle hypertrophy is mediated by a Ca²⁺-dependent calcineurin signalling pathway. *Nature*. **400**, 576-81.

- Serrano, A. L., B. Baeza-Raja, E. Perdiguero, M. Jardi and P. Munoz-Canoves (2008) Interleukin-6 is an essential regulator of satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy. *Cell Metab.* **7**, 33-44.
- Sharp, N. J., J. N. Kornegay, S. D. Van Camp, M. H. Herbstreith, S. L. Secore, S. Kettle, W. Y. Hung, C. D. Constantinou, M. J. Dykstra, A. D. Roses and et al. (1992) An error in dystrophin mRNA processing in golden retriever muscular dystrophy, an animal homologue of Duchenne muscular dystrophy. *Genomics.* **13**, 115-21.
- Shiba, Y., K. D. Hauch and M. A. Laflamme (2009) Cardiac applications for human pluripotent stem cells. *Curr Pharm Des.* **15**, 2791-806.
- Skuk, D., M. Goulet, B. Roy, P. Chapdelaine, J. P. Bouchard, R. Roy, F. J. Dugre, M. Sylvain, J. G. Lachance, L. Deschenes, H. Senay and J. P. Tremblay (2006) Dystrophin expression in muscles of duchenne muscular dystrophy patients after high-density injections of normal myogenic cells. *J Neuropathol Exp Neurol.* **65**, 371-86.
- Skuk, D., M. Goulet, B. Roy and J. P. Tremblay (2000) Myoblast transplantation in whole muscle of nonhuman primates. *J Neuropathol Exp Neurol.* **59**, 197-206.
- Skuk, D., M. Goulet, B. Roy and J. P. Tremblay (2002) Efficacy of myoblast transplantation in nonhuman primates following simple intramuscular cell injections: toward defining strategies applicable to humans. *Exp Neurol.* **175**, 112-26.
- Skuk, D. and J. P. Tremblay (2000) Progress in myoblast transplantation: a potential treatment of dystrophies. *Microsc Res Tech.* **48**, 213-22.
- Smirnov, D. V., M. G. Smirnova, V. G. Korobko and E. I. Frolova (1995) Tandem arrangement of human genes for interleukin-4 and interleukin-13: resemblance in their organization. *Gene.* **155**, 277-81.
- Smith, A. D., J. Koreska and C. F. Moseley (1989) Progression of scoliosis in Duchenne muscular dystrophy. *J Bone Joint Surg Am.* **71**, 1066-74.
- Sompol, P., Y. Xu, W. Ittarat, C. Daosukho and D. St Clair (2006) NF-kappaB-associated MnSOD induction protects against beta-amyloid-induced neuronal apoptosis. *J Mol Neurosci.* **29**, 279-88.
- Stephan, L., C. Pichavant, M. Bouchentouf, P. Mills, G. Camirand, S. Tagmouti, D. Rothstein and J. P. Tremblay (2006) Induction of tolerance across fully mismatched barriers by a nonmyeloablative treatment excluding antibodies or irradiation use. *Cell Transplant.* **15**, 835-46.
- Strongin, A. Y., I. Collier, G. Bannikov, B. L. Marmer, G. A. Grant and G. I. Goldberg (1995) Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem.* **270**, 5331-8.
- Suzuki, J., Y. Yamazaki, G. Li, Y. Kaziro and H. Koide (2000) Involvement of Ras and Ral in chemotactic migration of skeletal myoblasts. *Mol Cell Biol.* **20**, 4658-65.
- Tabata, Y. and G. K. Khurana Hershey (2007) IL-13 receptor isoforms: breaking through the complexity. *Curr Allergy Asthma Rep.* **7**, 338-45.
- Tajbakhsh, S. and M. Buckingham (2000) The birth of muscle progenitor cells in the mouse: spatiotemporal considerations. *Curr Top Dev Biol.* **48**, 225-68.
- Takahashi, Y., D. Katayose and C. Shindoh (1999) Interleukin-13 prevents diaphragm muscle deterioration in a septic animal model. *Tohoku J Exp Med.* **189**, 191-202.

- Taniyama, Y., K. Tachibana, K. Hiraoka, M. Aoki, S. Yamamoto, K. Matsumoto, T. Nakamura, T. Ogihara, Y. Kaneda and R. Morishita (2002) Development of safe and efficient novel nonviral gene transfer using ultrasound: enhancement of transfection efficiency of naked plasmid DNA in skeletal muscle. *Gene Ther.* **9**, 372-80.
- Tinsley, J., N. Deconinck, R. Fisher, D. Kahn, S. Phelps, J. M. Gillis and K. Davies (1998) Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice. *Nat Med.* **4**, 1441-4.
- Toniolo, D. and C. Minetti (1999) Muscular dystrophies: alterations in a limited number of cellular pathways? *Curr Opin Genet Dev.* **9**, 275-82.
- Vaughan, T. E. and J. C. Weaver (1996) Energetic constraints on the creation of cell membrane pores by magnetic particles. *Biophys J.* **71**, 616-22.
- Vilquin, J. T., I. Kinoshita, R. Roy and J. P. Tremblay (1995) Cyclophosphamide immunosuppression does not permit successful myoblast allotransplantation in mouse. *Neuromuscul Disord.* **5**, 511-7.
- Wagner, K. R., S. Hamed, D. W. Hadley, A. L. Gropman, A. H. Burstein, D. M. Escolar, E. P. Hoffman and K. H. Fischbeck (2001) Gentamicin treatment of Duchenne and Becker muscular dystrophy due to nonsense mutations. *Ann Neurol.* **49**, 706-11.
- Wang, B., J. Li and X. Xiao (2000) Adeno-associated virus vector carrying human minidystrophin genes effectively ameliorates muscular dystrophy in mdx mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**, 13714-9.
- Wang, Z., J. S. Chamberlain, S. J. Tapscott and R. Storb (2009) Gene therapy in large animal models of muscular dystrophy. *ILAR J.* **50**, 187-98.
- Watkins, S. C., E. P. Hoffman, H. S. Slayter and L. M. Kunkel (1988) Immunoelectron microscopic localization of dystrophin in myofibres. *Nature.* **333**, 863-6.
- Welch, E. M., E. R. Barton, J. Zhuo, Y. Tomizawa, W. J. Friesen, P. Trifillis, S. Paushkin, M. Patel, C. R. Trotta, S. Hwang, R. G. Wilde, G. Karp, J. Takasugi, G. Chen, S. Jones, H. Ren, Y. C. Moon, D. Corson, A. A. Turpoff, J. A. Campbell, M. M. Conn, A. Khan, N. G. Almstead, J. Hedrick, A. Mollin, N. Risher, M. Weetall, S. Yeh, A. A. Branstrom, J. M. Colacino, J. Babiak, W. D. Ju, S. Hirawat, V. J. Northcutt, L. L. Miller, P. Spatrack, F. He, M. Kawana, H. Feng, A. Jacobson, S. W. Peltz and H. L. Sweeney (2007) PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature.* **447**, 87-91.
- White, S. J., A. Aartsma-Rus, K. M. Flanigan, R. B. Weiss, A. L. Kneppers, T. Lalic, A. A. Janson, H. B. Ginjaar, M. H. Breuning and J. T. den Dunnen (2006) Duplications in the DMD gene. *Hum Mutat.* **27**, 938-45.
- Williams, J. H., S. R. Sirsi, D. R. Latta and G. J. Lutz (2006) Induction of dystrophin expression by exon skipping in mdx mice following intramuscular injection of antisense oligonucleotides complexed with PEG-PEI copolymers. *Mol Ther.* **14**, 88-96.
- Wills-Karp, M. (2001) IL-12/IL-13 axis in allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol.* **107**, 9-18.
- Wills-Karp, M. and F. D. Finkelman (2008) Untangling the complex web of IL-4- and IL-13-mediated signaling pathways. *Sci Signal.* **1**, pe55.
- Wolff, J. A., R. W. Malone, P. Williams, W. Chong, G. Acsadi, A. Jani and P. L. Felgner (1990) Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science.* **247**, 1465-8.
- Wynn, T. A. (2003) IL-13 effector functions. *Annu Rev Immunol.* **21**, 425-56.

- Yiu, E. M. and A. J. Kornberg (2008) Duchenne muscular dystrophy. *Neurol India*. **56**, 236-47.
- Yoshikawa, M., T. Nakajima, T. Tsukidate, K. Matsumoto, M. Iida, N. Otori, S. Haruna, H. Moriyama and H. Saito (2003) TNF-alpha and IL-4 regulate expression of IL-13 receptor alpha2 on human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. **312**, 1248-55.
- Zhang, J. G., A. Farley, S. E. Nicholson, T. A. Willson, L. M. Zugaro, R. J. Simpson, R. L. Moritz, D. Cary, R. Richardson, G. Hausmann, B. J. Kile, S. B. Kent, W. S. Alexander, D. Metcalf, D. J. Hilton, N. A. Nicola and M. Baca (1999) The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96**, 2071-6.
- Zhang, J. G., D. J. Hilton, T. A. Willson, C. McFarlane, B. A. Roberts, R. L. Moritz, R. J. Simpson, W. S. Alexander, D. Metcalf and N. A. Nicola (1997) Identification, purification, and characterization of a soluble interleukin (IL)-13-binding protein. Evidence that it is distinct from the cloned Il-13 receptor and Il-4 receptor alpha-chains. *J Biol Chem*. **272**, 9474-80.
- Zheng, T., Z. Zhu, Z. Wang, R. J. Homer, B. Ma, R. J. Riese, Jr., H. A. Chapman, Jr., S. D. Shapiro and J. A. Elias (2000) Inducible targeting of IL-13 to the adult lung causes matrix metalloproteinase- and cathepsin-dependent emphysema. *J Clin Invest*. **106**, 1081-93.