



Thèse

2006

Open Access

This version of the publication is provided by the author(s) and made available in accordance with the copyright holder(s).

Potentiel thérapeutique de la transplantation autologue de précurseurs myogéniques dans le tissu musculaire squelettique

Holzer, Nicolas

How to cite

HOLZER, Nicolas. Potentiel thérapeutique de la transplantation autologue de précurseurs myogéniques dans le tissu musculaire squelettique. Doctoral Thesis, 2006. doi: 10.13097/archive-ouverte/unige:408

This publication URL: <https://archive-ouverte.unige.ch/unige:408>

Publication DOI: [10.13097/archive-ouverte/unige:408](https://doi.org/10.13097/archive-ouverte/unige:408)

UNIVERSITE DE GENEVE

FACULTE DE MEDECINE

Section de *médecine clinique*

Département: Neurosciences Cliniques
et Dermatologie

Unité: Myologie

Thèse préparée sous la direction du Professeur Charles Roland BADER

Potentiel thérapeutique de la transplantation autologue de précurseurs myogéniques dans le tissu musculaire squelettique

THESE

présentée à la Faculté de médecine
de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de Docteur en médecine

par

Nicolas HOLZER
de
Brig/Glis (VS)

Thèse n° **10479**
Genève
2006



**UNIVERSITÉ
DE GENÈVE**

FACULTÉ DE MÉDECINE

DOCTORAT EN MEDECINE

Thèse de :

Monsieur Nicolas HOLZER

originaire de Brig/Glis (VS)

Intitulée :

POTENTIEL THERAPEUTIQUE DE LA TRANSPLANTATION AUTOLOGUE DE PRECURSEURS MYOGENIQUES DANS LE TISSU MUSCULAIRE SQUELETTIQUE

La Faculté de médecine, sur le préavis de Monsieur Charles R. BADER, professeur ordinaire au Département des Neurosciences cliniques et Dermatologie, autorise l'impression de la présente thèse, sans prétendre par là émettre d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 23 août 2006

Thèse n° **10479**



Jean-Louis Carpentier
Doyen

N.B. - La thèse doit porter la déclaration précédente et remplir les conditions énumérées dans les "Informations relatives à la présentation des thèses de doctorat à l'Université de Genève".

RESUME

La transplantation de myoblastes est un outil thérapeutique potentiel reconnu en cas de myopathie, de dysfonction ventriculaire post-infarctus et de lésion musculaire. Les premiers essais d'application à l'homme de cette technique développée principalement dans des modèles murins sont néanmoins restés sans succès. Dans ce contexte, le développement de modèles animaux pré-cliniques, permettant le développement de protocoles compatible avec la physiologie de l'être humain a été suggéré. Dans ce travail, nous décrivons des techniques d'isolation, de cultures, de caractérisation et de transplantation de cellules porcines (*sus scrofa*) permettant d'obtenir une implantation ainsi qu'une survie des myoblastes transplantés supérieure ou comparable avec les modèles expérimentaux utilisés actuellement. Les similitudes entre la physiologie humaine et porcine, déjà mise à profit dans le cadre de xénogreffes, suggère que le porc représente un modèle adéquat, permettant l'étude de stratégies de transplantation de cellules myogéniques applicables à des patients.

I. INTRODUCTION :	p. 5
▷ Cellules satellites	p. 7
<i>isolation et culture</i>	p. 9
<i>caractérisation</i>	p. 10
▷ Transplantation de précurseurs myogéniques	p. 11
<i>historique</i>	p. 11
<i>technique</i>	p. 12
▷ Objectifs de thèse	p. 15
 II. PUBLICATION :	 p. 16
▷ Résumé de l'article	p. 17
▷ Article	p. 18
 III. DISCUSSION :	 p. 26
 IV. ANNEXE :	 p. 28
▷ Remerciements	p. 28
 V. REFERENCES :	 p. 29

I. INTRODUCTION :

Le tissu musculaire squelettique est impliqué dans plusieurs processus physiologiques cruciaux. En collaboration avec le système ostéo-articulaire, il est responsable du développement des activités motrices émotionnelles et volontaires ainsi que de la locomotion requise par le mode de vie des organismes supérieurs. De part son volume, plus de la moitié de la masse corporelle totale de la plupart des mammifères, le muscle squelettique joue également un rôle important dans le contrôle du métabolisme des glucides et lipides, ainsi que dans le contrôle de la température (63).

Bien que le muscle squelettique soit doté de mécanismes permettant potentiellement de reconstituer intégralement son architecture en cas de lésion (13), de nombreuses pathologies mènent à une altération de la fonction musculaire. Les myopathies, par exemple, qu'elles soient héréditaires ou acquises, représentent un groupe important de maladies affectant la fonction des fibres musculaires. Leurs étiologies sont aussi variées que leurs pronostiques, certaines formes étant pratiquement indécélables pendant longtemps (la dystrophie oculopharyngée par exemple) alors que d'autres peuvent mener au décès précoce de la personne affectée (la dystrophie musculaire de Duchenne par exemple). Les lésions traumatiques du muscle squelettique, déchirures ou contusions musculaires dont les complications peuvent être particulièrement invalidantes sont un autre problème de santé publique, relevant aussi bien du domaine de l'orthopédie que de la gynécologie-obstétrique.

Un des points communs de plusieurs de ces affections est le manque, à l'heure actuelle, de traitement permettant une guérison même partielle. Les myopathies héréditaires ne disposent en effet que de traitements symptomatiques permettant au plus de retarder la progression

normale de la maladie et les lésions musculaires graves sont généralement considérées avec un pessimisme illustré par le vieil adage de chirurgie: "muscle cousu, muscle foutu".

Dans ce contexte, le développement actuel des connaissances dans le domaine de la myologie, résultants d'études multidisciplinaires, relevant des domaines de la biologie moléculaire et cellulaire, la biochimie, la physiologie, la médecine du sport, la neurologie, la chirurgie orthopédique et la pathologie, permet d'envisager de nouvelles approches thérapeutiques de ces pathologies.

La thérapie cellulaire dans le domaine du muscle squelettique est une des techniques les plus prometteuses pour le traitement de certaines de ces affections. Inspirée par le succès des greffes de cellules hématopoïétique, elle repose sur l'existence d'une population spécifique de cellules myogéniques, les cellules satellites, pouvant être isolées, amplifiées, transplantées et finalement incorporées dans un tissu musculaire cible (56). Dans le domaine des dystrophies musculaires, le transfert de cette technique des modèles de laboratoire principalement murins à l'homme s'est néanmoins révélé décevant (pour revue: (41)), soulignant la nécessité de développer des modèles animaux, précliniques, plus proches de l'homme (14).

Dans ce travail, nous décrivons la mise au point d'un modèle animal porcin de transplantation autologue de précurseurs myogéniques, comprenant les techniques d'isolation, de culture, de caractérisation puis de transplantations de ces cellules. Nous démontrons également l'incorporation de la greffe dans le tissu hôte ainsi qu'un taux de survie à court terme en accord avec les résultats obtenus dans d'autres modèles. Nous en concluons que le porc, dont la physiologie est suffisamment proche de l'être humain pour en faire un animal de choix en tant que pourvoyeur de xénogreffes (46), constitue un modèle avantageux permettant de tester de nouvelles approches thérapeutiques en phase préclinique dans le domaine de la transplantation de cellules musculaires.

Culture de cellules satellites

Le muscle strié squelettique démontre une capacité d'adaptation remarquable. Il est capable non seulement d'entreprendre des modifications architecturales et métaboliques en fonction du type d'effort auquel il est soumis, processus connu sous le nom de *plasticité musculaire*, mais il est également capable de se réparer rapidement en cas de lésions consécutives à des maladies ou des traumatismes, processus connu sous le nom de *régénération musculaire*. Le déroulement de ces processus de *remodelages* est largement attribué à l'existence d'une population de cellules originellement mises en évidence sur des fibres musculaires de grenouille (34), puis identifiée dans le muscle de mammifère, aviaire ainsi que reptilien (17, 24, 29).

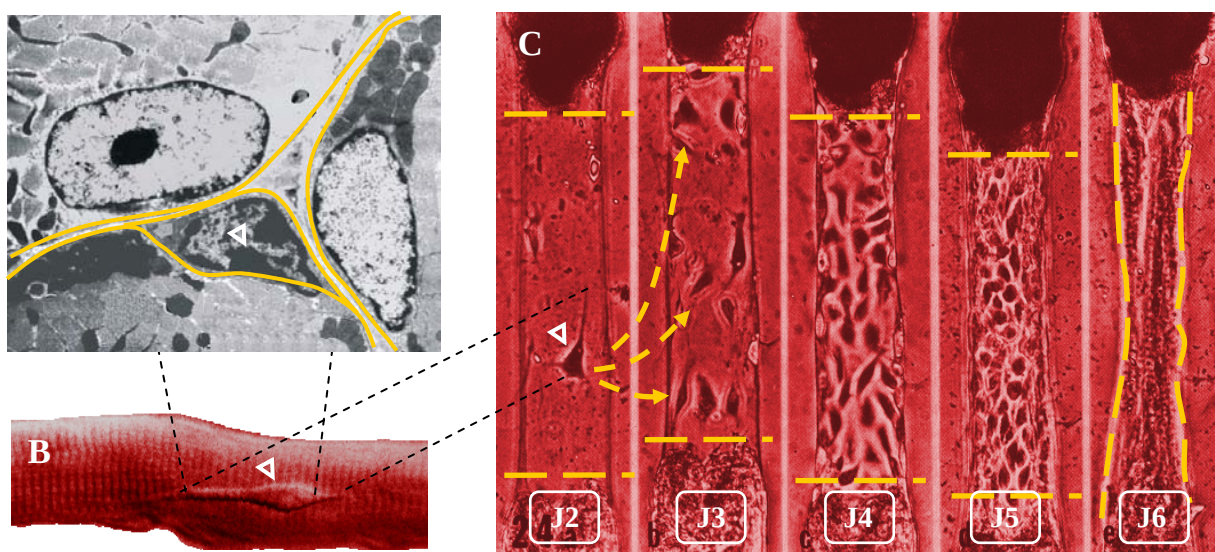


Fig. 1 *Cellules satellites.* **A** En microscopie électronique, les cellules satellites ► se distinguent des autres noyaux des fibres musculaire par leur contenu plus important en hétérochromatine, dense, ainsi que par leur localisation entre la lame basale et la membrane plasmique (surlignées en jaune). *tiré de (25).* **B** Aspect microscopique d'une cellule satellite associée à une fibre musculaire (noter la striation caractéristique). *tiré de (1)* **C** In vitro, la persistance d'un cylindre de lame basale lors du retrait du sarcoplasme après rupture d'une fibre musculaire délimite un espace dans lequel l'activation au deuxième jour (J2) d'une cellule satellite par la lésion aboutit à la génération d'une population de myoblastes capables de s'amplifier jusqu'à combler complètement le déficit (J5) puis de fusionner pour recréer une fibre fonctionnelle (J6). *tiré de (6)*

Ces cellules, appelées *cellules satellites* de part leur localisation périphérique sur la fibre musculaire, résident dans des encoches entre la membrane sarcoplasmique et la lame basale (Fig. 1A) et participent aux phénomènes de remodelage musculaire en générant des cellules capables de fusionner avec des fibres préexistantes lors de la croissance du muscle ou entre elles lors du processus de régénération post-traumatique.

Des expériences au moyen de thymidine tritiée marquant la chromatine des cellules en division ont montré que la synthèse d'ADN parmi les noyaux situés sous la lame basale était limitée aux cellules satellites et que les "vrais" noyaux musculaire n'entreprennent pas de mitose (40).

De plus, bien que les cellules satellites ne soient que rarement marquées en condition normale en utilisant ces méthodes, indiquant un état de quiescence relative (49), il est possible d'observer l'apparition de thymidine dans quelques noyaux musculaire durant la période suivant le marquage, démontrant la capacité de cellules, dérivées des cellules satellites, à fusionner avec des fibres musculaires existantes, ceci même en l'absence de lésion musculaire (40). Ces expériences sont à la base du modèle de remodelage musculaire post-natal généralement accepté actuellement qui implique l'activation d'un pool de cellules satellites quiescentes par des stimuli comme des changements de l'intensité ou du type d'exercice auquel le muscle est soumis, ou une lésion musculaire.

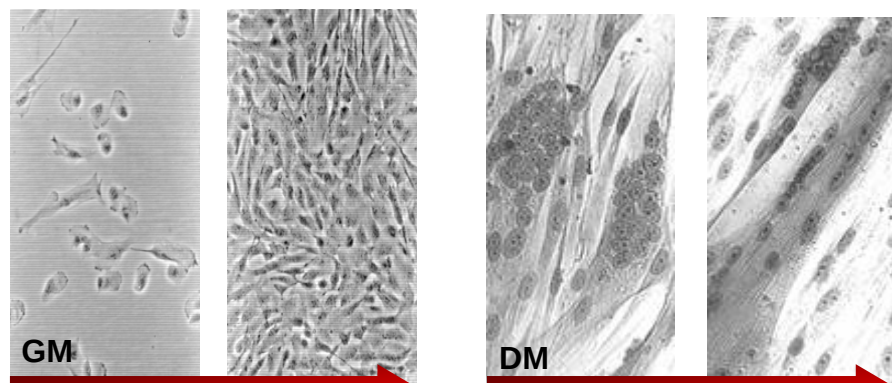
Une fois activées les cellules satellites prolifèrent, donnant naissance à une population de cellules myogéniques appelées *myoblastes*, capables de se différencier terminalement et de fusionner avec des fibres préexistantes ou entre eux, aboutissant à la formation de *myotubes*, précurseur des fibres musculaires fonctionnelles adultes (Fig. 1C). Le maintien de la population des cellules satellites au cours de la vie implique qu'elles soient renouvelées après chaque épisode d'activation tout en maintenant leur capacité à générer une progéniture

capable de se différencier, ce qui suggère que les cellules satellites représentent une population de cellules souches adultes pour le muscle squelettique.

isolation et culture

Il est généralement admis que la transplantation de précurseurs myogéniques nécessite l'isolation et/ou l'amplification de nombres importants de cellules afin d'avoir une chance d'être efficace (53). Dans notre laboratoire, les cellules satellites sont isolées à partir de biopsies musculaires au moyen d'une dissociation mécanique suivit d'une digestion protéolytique des fragments musculaires ainsi générés. Cette étape est suivie par une filtration des débris cellulaires et extracellulaires (collagène) puis d'une lyse osmotique des globules rouges (2). Le rendement de cette procédure en termes cellules obtenues par milligrammes de biopsie musculaire peut s'élever jusqu'à 200 c/mg chez l'homme (data non publié) et 1000 c/mg chez le porc domestique (*sus scrofa*) (cf. article). Ces cellules représentent un mélange de plusieurs types cellulaires provenant des différentes lignées présentes dans le muscle (myogénique, fibroblastique, endothéliale, adipeuse ...). Il est donc nécessaire de s'assurer que les conditions de culture amplifient sélectivement les cellules myogéniques (cf. ch. caractérisation) ou de trier les cellules dissociées pour éliminer les éléments non myogéniques (cf. ch. discussion).

Fig. 2 Culture cellulaire. Les cellules isolées par dissociation prolifèrent jusqu'à confluence en milieu de croissance (GM). Après passage en milieu de différenciation (DM), la fusion des myoblastes mène à la formation de myotubes puis de fibres musculaires contractiles. tiré de (5)



Des techniques de cultures de cellules satellites isolées à partir de biopsie humaine sont décrites depuis longtemps (10, 61). Après dissociation, les cellules satellites sont activées et peuvent être amplifiées *in vitro* au moyen d'un milieu de prolifération (GM: *Growth Medium*) riche en facteurs de croissances, générant une population de cellules myogéniques nommées *myoblastes* de part leur analogie avec les précurseurs embryonnaires et fœtaux du muscle squelettique (pour revue: (15)). Une fois la confluence atteinte dans le support de culture, les myoblastes peuvent être maintenus en croissance et repiqués à plusieurs reprises sans perdre leur potentiel myogénique (3) ou induits à se différencier dans un milieu de différenciation (DM: *Differentiation Medium*) dépourvu de facteurs de croissance (Fig. 2). Le processus de différenciation du muscle squelettique, également connu sous le nom de *myogenèse*, est caractérisé par l'activation de familles de facteurs de transcription menant au retrait du cycle cellulaire des myoblastes en culture. L'étape suivante est l'expression de gènes spécifiques du muscle suivit finalement par la *fusion* des myoblastes entre eux pour former des cellules multinucléées nommées *myotubes*. Ces derniers, après une période de *maturation*, développent un appareil contractile fonctionnel *in vitro* et se transforment donc en véritables *fibres musculaires*.

caractérisation

La contamination inévitable de la population de cellules myogéniques, obtenues à partir de la dissociation d'une biopsie musculaire, par des fibroblastes et d'autres types cellulaires a mené au développement de plusieurs techniques permettant d'identifier et/ou de purifier les cellules satellites avant transplantation. Chez l'humain, l'utilisation de protocoles de tri par cytométrie de flux (FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting) basé sur la petite taille des cellules satellites (2) ou sur l'expression spécifique à leur surface de protéines de la famille N-CAM (Neuronal Cell Adhesion Molecules) reconnues par l'anticorps 5.1H11 et

CD56 (55, 58) permet de purifier et d'amplifier des populations cellulaires présentant des caractéristiques myogéniques. Ces techniques ne sont néanmoins pas reproductibles dans toutes les espèces, les cellules porcines dans notre modèle n'étant plus capable de proliférer après un tri par FACS et ne montrant pas de différences de taille (Data non publié, en contradiction avec (8, 9)). Dans ce contexte, il est généralement admis qu'une proportion de cellules myogéniques de l'ordre de 80 pourcents à la fin du processus d'amplification est suffisante pour pouvoir être transplantées (7, 35). Cette proportion peut être déterminée par l'analyse des marqueurs décrits précédemment sur un échantillon de cellules préparées pour la transplantation ainsi qu'en analysant le potentiel myogénique de ces cellules en induisant leur différenciation *in vitro* (*index de fusion*: cf. article).

Transplantation de précurseurs myogéniques

historique

Le développement de cultures de myoblastes *in vitro* représente non seulement un excellent modèle de différenciation, mais également un outil thérapeutique présentant un grand intérêt potentiel. La transplantation de myoblastes a initialement été utilisée comme méthode de traçage dans des études développementales (59). L'observation de l'intégration des cellules transplantées ainsi que de l'expression de gènes allogéniques dans les fibres musculaires du receveur (56, 57) a rapidement suggéré le potentiel thérapeutique de cette intervention dans le cadre de maladies musculaires dégénératives. Les premiers rapports décrivant une amélioration des caractéristiques biophysiques de muscles de souris dystrophiques par transfert de myoblastes datent de plus de 15 ans (33, 45). Les résultats encourageants du transfert de myoblastes dans ces modèles murins de dystrophie musculaire

ont motivé l'application rapide de cette technique à l'humain. Le traitement s'est avéré néanmoins décevant, la plupart des essais cliniques ne montrant que peu ou pas d'améliorations fonctionnelles (20, 21, 30, 37). La reprise d'expériences chez le rongeur dans le but de comprendre les raisons de cet échec a permis de mettre en évidence plusieurs facteurs limitant le succès du transfert de myoblastes, tempérant l'optimisme initial entourant cette intervention dans le cadre des dystrophies (cf. discussion). Il faut noter que parallèlement, la transplantation de myoblastes dans le contexte de la dysfonction ventriculaire post infarctus génère des résultats prometteurs, bien que les mécanismes impliqués soient encore mal compris (36).

technique

L'approche la plus commune dans les protocoles de transfert de myoblastes consiste à transplanter les cellules au moyen d'injections intramusculaires localisées (Fig 3A). Cette méthode présente l'avantage de pouvoir délivrer localement de grandes quantités de précurseurs myogéniques, ainsi que de créer, par le traumatisme qu'elle occasionne, un environnement favorable à l'incorporation des cellules greffées dans les fibres de l'hôte (pour revue: (53)). L'impact fonctionnel de cette technique est néanmoins limité par plusieurs facteurs.

La distribution des cellules donneuses est limitée spatialement par leur capacité restreinte à migrer à distance du lieu d'injection, aboutissant après fusion avec les fibres adjacentes à la formation de fines régions de fibres hybrides (*objectivés histologiquement par l'expression d'un gène rapporteur comme le gène lacZ: zones bleues Fig.3A*) entourant le point de ponction (51). Cette observation a permis de définir le concept de *domaine nucléaire* correspondant au volume discret de cytoplasme dont le contenu est influencé par les transcrits

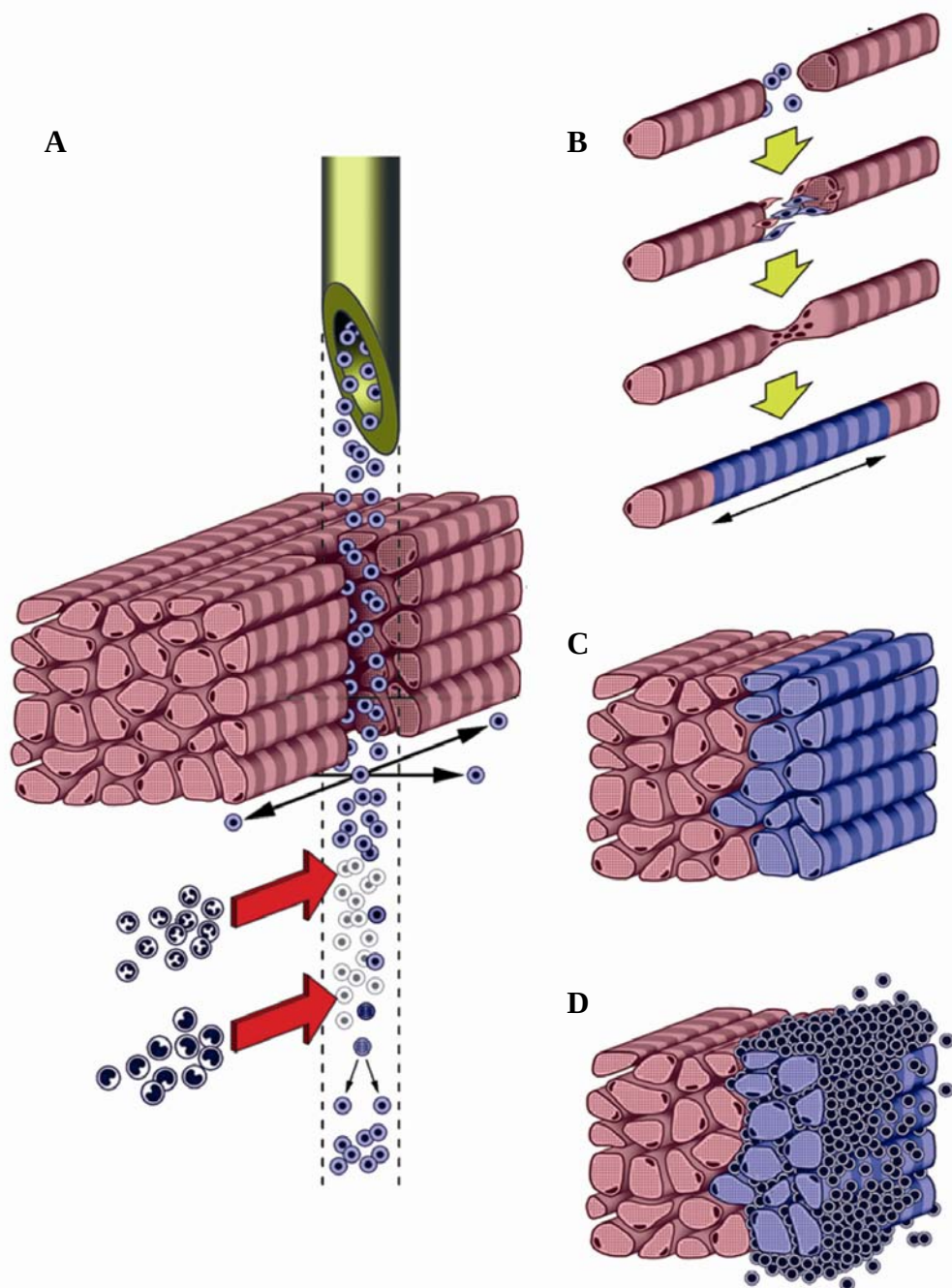


Fig. 1 Transplantation de myoblastes. **A** Les cellules injectées démontrent une capacité migratoire restreinte autour du point d'injection. Après transplantation le nombre de cellules survivantes résulte de l'équilibre entre la perte d'une proportion significative de cellules greffées par des mécanismes immunitaires impliquant plusieurs types cellulaires et la prolifération des cellules restantes. **B** La régénération des fibres lésées est médiée par les cellules de l'hôte ainsi que par les cellules greffées aboutissant à la formation de fibres mixtes. La distribution spatiale des protéines codées par un noyau musculaire étant restreinte (concept de *domaine nucléaire*), seule une partie de la fibre régénérée exprime les gènes codés par les cellules donneuses. **C** En présence de transplantation autologue ou d'une immunosuppression adéquate, les fibres mixtes sont bien tolérées. **D** Les fibres résultant d'allo- ou xéno-greffes sont rapidement détruite par une infiltration de différentes cellules immunitaire en absence d'immunosuppression. *tiré de (53)*

provenant d'un noyau musculaire (Fig. 3B). Des expériences visant à diminuer les pertes par reflux, inévitables lors de la manœuvre d'injection, au moyen de matrices de collagène ou de fibronectine, permettant d'encapsuler les cellules donneuses, ne se sont pas révélées plus efficaces que l'approche classique (datas non publiés). De plus, l'injection intrapéritonéale ou intraveineuse de myoblastes, dans le but de distribuer largement les myoblastes donneurs à l'ensemble des territoires vascularisés de l'hôte sont restées sans succès (44). Lors d'injection intra-artérielle, un certain degré de fusion entre les cellules donneuses et les fibres musculaires irriguées par ces artères a été mis en évidence mais dans des proportions restreintes (43).

Un autre problème rencontré est celui de la survie des cellules transplantées. Bien que les débats concernant l'étendue de la destruction des cellules transplantées dans les étapes précoces semblent aplanis par la standardisation des méthodes de mesure de la survie cellulaire (50), il est néanmoins établi qu'une réaction immunitaire de l'hôte entraîne la destruction d'une partie significative de la population des cellules greffées (Fig. 3A). Plusieurs composants du système immunitaire ont été mis en évidence, aussi bien dans le processus de rejet immédiat (pour revue: (54)), que retardé en absence d'histocompatibilité (Fig. 3c). L'efficacité de la manœuvre de transplantation de myoblastes est donc le résultat de l'équilibre entre la destruction et la prolifération des cellules injectées (Fig. 3A) (4).

Un des défis actuel dans le domaine du transfert de précurseurs myogéniques à but thérapeutique consiste donc à mettre au point des techniques permettant de distribuer largement les cellules (à l'appareil musculaire entier dans le cas des dystrophies), tout en minimisant la réaction inflammatoire de l'hôte.

Objectifs de thèse

Bien que de nombreuses approches aient été proposées pour palier aux différents problèmes rencontrés lors de la transplantation de myoblastes, les problèmes de fond de l'application à l'humain de techniques développées chez la souris ainsi que de la nécessité de recourir à un traitement immunosuppresseur restent handicapant.

Les différences entre la physiologie des modèles murins et de l'être humain en termes de système immunologique (38) ou de régulation du cycle cellulaire (48) rend difficile l'extrapolation de résultats de l'une à l'autre. Dans ce contexte, le développement de nouveaux modèles animaux précliniques, plus proche de l'homme, a été suggéré (pour revue: (14)).

L'objectif de ma thèse a donc été d'adapter les techniques de cultures de myoblastes développées chez l'homme (2) à un modèle porcin de transplantation autologue de myoblastes ainsi que de caractériser le potentiel myogénique de ces cellules in vitro et in vivo (cf. article).

II. PUBLICATION :

Les moyens matériel et méthodes utilisés lors de mon travail de thèse ainsi que les résultats obtenus sont décrits dans la publication originale suivante:

titre: "Transplantation autologue de précurseurs myogéniques porcins dans le muscle squelettique."

Autologous transplantation of porcine myogenic precursor cells in skeletal muscle

*Holzer N., Hogendoorn S., Zurcher L., Garavaglia G., Yang S., Konig S., Laumonier T., Menetrey J..
Neuromuscul Disord.15(3) 237-44, 2005.*



PERGAMON

Neuromuscular Disorders 15 (2005) 237–244



www.elsevier.com/locate/nmd

Autologous transplantation of porcine myogenic precursor cells in skeletal muscle

Nicolas Holzer^a, Simone Hogendoorn^b, Line Zürcher^b, Guido Garavaglia^b, Sheng Yang^b,
Stephane König^c, Thomas Laumonier^b, Jacques Menetrey^{b,*}

^aDepartment of Clinical Neurosciences and Dermatology, Geneva Faculty of Medicine and University Hospital, Geneva, Switzerland

^bDepartment of Orthopaedic Surgery, Geneva Faculty of Medicine and University Hospital, Geneva, Switzerland

^cDepartment of Basic Neurosciences, University Medical Center, CH-1211 Geneva, Switzerland

Received 6 September 2004; received in revised form 8 November 2004; accepted 15 November 2004

Abstract

Myoblast transplantation is a potential therapy for severe muscle trauma, myopathies and heart infarct. Success with this therapy relies on the ability to obtain cell preparations enriched in myogenic precursor cells and on their survival after transplantation. To define myoblast transplantation strategies applicable to patients, we used a large animal model, the pig. Muscle dissociation procedures adapted to porcine tissue gave high yields of cells containing at least 80% myogenic precursor cells. Autologous transplantation of ³[H]-thymidine labeled porcine myogenic precursor cells indicated 60% survival at day 1 followed by a decay to 10% at day 5 post-injection. Nuclei of myogenic precursor cells transduced with a lentivirus encoding the nls-lacZ reporter gene were present in host myotubes 8 days post-transplantation, indicating that injected myogenic precursor cells contribute to muscle regeneration. This work suggests that pig is an adequate large animal model for exploring myogenic precursor cells transplantation strategies applicable in patients.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Myogenic precursor cell; Transplantation; Cell survival; Pig

1. Introduction

Myoblast transplantation (MT) is a cell therapy technique aimed at treating inherited myopathies [1], cardiac failure [2], and severe muscle injuries [3]. In an animal model (*mdx* mice) of Duchenne muscular dystrophy (DMD), transplanted myogenic precursor cells (MPC) from normal animals have been shown to fuse with the host muscle fibers and to restore dystrophin expression [4,5].

However, early clinical trials of MT in DMD patients were mostly unsuccessful [6]. Differences in the experimental conditions used for MT in mice and in human explain in part the results obtained in clinical trials. Human MT were performed in diseased muscle without pre-conditioning. In contrast, the most efficient myoblast injections in mice were obtained in muscle pretreated with cryodamage [7], irradiation [8] or irradiation plus myotoxins [9]. Similar damages to the host muscle prior to MT were done in non-human primates and showed an increased survival of donor cells [10,11]. However, damaging procedure may not be applicable in patients, and other protocols of MT with injection into intact skeletal muscle of large animal models should help to define strategies applicable to humans [12].

We selected the pig as a model for human MT. In fact, porcine tissues show physiological similarity to humans and are currently considered as the most suitable xenograft donor for humans [13]. Our aims were to examine the feasibility of obtaining high yields of MPC from pig

Abbreviations: DM, differentiation medium; DMD, Duchenne muscular dystrophy; GM, growth medium; MPC, myogenic precursor cell; MT, myoblast transplantation; NFC, non-fusing cells; PAS, porcine autologous serum.

* Corresponding author. Address: Unité d'orthopédie et de traumatologie du sport, Service de chirurgie orthopédique et de traumatologie de l'appareil moteur, Hôpitaux Universitaires de Genève, 24, rue Micheli-du-Crest, CH-1211 Genève 14, Switzerland. Tel.: +41 22 372 7911; fax: +41 22 372 7909.

E-mail address: jacques.menetrey@hcuge.ch (J. Menetrey).

skeletal muscle and to assess their myogenic potential. We also wanted to determine the survival of autologous MPC transplanted into intact porcine muscle during the first days after injection, as published results are very inconsistent during this early period [14–16]. We devised methods for obtaining high yields of MPC and observed an increased survival of transplanted pig MPC as compared to experiments with other large animals. We also detected transplanted MPC that had participated to muscle regeneration process at 8 days post injection. Thus, the pig may represent a useful animal model for designing more efficient strategies of MT in patients.

2. Material and methods

2.1. Buffers, media and serum

The following buffers and media were used: Solution A [pH 7.15, 1.98 mg/ml glucose, 7.6 mg/ml NaCl, 0.02 mg/ml KCl, 0.18 mg/ml Na₂HPO₄·H₂O, 7.15 mg/ml hepes, 0.2% phenol red (Invitrogen, Basel, Switzerland)]; Wash medium [80% F10 Nutrient mixture (Invitrogen), 20% FCS (Ready-system, Kibbuth Beth Halmek, Israel) and 5 µg/ml gentamycin (Invitrogen)]; Lysis buffer [pH 7.5, 10% Tris-HCl (26.6 µg/ml), 90% NH₄Cl (6.82 µg/ml)]; Growth medium [GM, 15% FCS or porcine autologous serum (PAS), 85% αMEM/MCDB (80% αMEM (Invitrogen), 20% MCDB 110 (Sigma, St Louis, MO, USA)), containing 0.5 mg/ml BSA (Sigma), 100 µl/ml transferin, 0.18 mg/ml insulin, 15 µg/ml creatinin, 5 µg/ml gentamycin, 3.9 mg/ml dexamethasone (Sigma), 10 µg/ml β-FGF (Invitrogen), 100 µg/ml EGF (Becton Dickinson, Allschwil, Switzerland)]; Differentiation medium [DM, 80% αMEM, 20% MCDB 110, containing 0.5 mg/ml BSA and 5 µg/ml gentamycin].

Porcine autologous serum (PAS) was obtained by centrifugation of blood collected from pigs in which their own MPC would be transplanted. PAS was decomplexed (60 min at 56 °C), filtered (0.22 µm, Millipore Corporation, Bedford, USA) and stored in aliquots at –70 °C until use.

2.2. Myogenic precursor cell isolation and culture

Pig MPC were isolated following a method adapted from that previously described for the isolation of human myoblasts [17]. Pig skeletal muscle biopsies were harvested on the *Vastus Medialis* muscle. Biopsies were minced and enzymatically dissociated (Protease, P 8811, Sigma; diluted in Solution A) for 90 min (rather than 60 min) at 37 °C while stirring. The enzymatic dissociation was stopped using 10% of either FCS or PAS. The preparation was filtered through a 40 µm nylon cell strainer (Becton Dickinson) instead of pelleting undissociated tissue by low speed centrifugations (200 and 400 rpm, respectively) as done previously [17]. After centrifugation (5 min at

1000 rpm), cells were washed to eliminate extra-cellular matrix and the erythrocytes were lysed. After washing, the number of living cells was counted using a trypan blue exclusion test.

Porcine MPC were amplified on gelatin coated dishes (Ø 10 cm, Iwaki glass, Tokyo, Japan) at 37 °C, 7% CO₂ in GM containing 15% FCS or 15% PAS and used at passage 1 for all transplantation experiments. For in vitro studies of their myogenic properties (fusion index), cells were cultured in GM until confluence and transferred to DM for 3 days. In experiments designed to assess the myogenicity of cells that did not form myotubes in DM, myotubes were gently removed by trypsin–EDTA incubation (1 min at 37 °C). The remaining adherent non-fusing cells (NFC) were cultured in GM until confluence and were exposed to DM for 3 days, at which time, fusion indices were again determined.

2.3. Flow cytometry

Confluent monolayers of porcine MPC were harvested using routine trypsin–EDTA detachment, washed twice and resuspended in PBS (100,000 cells per condition). When no pig-specific Ab were available, commercial anti-human reagents of the required specificity were tested for cross reactivity with the respective pig antigen and used instead. CD56 staining: MPC were incubated on ice for 60 min with a mouse anti-human CD56 Ab conjugated to FITC (clone NCAM 16.2, Becton Dickinson) in the presence of mouse total Ig (Sigma). Isotype control was obtained by incubating the cells with a mouse IgG_{2a} FITC Ab (Becton Dickinson). Desmin staining: MPC were permeabilized by incubation on ice for 20 min with a Fix/Perm buffer (Becton Dickinson). Cells were washed twice in Perm/Wash buffer 1× (Becton Dickinson) and unspecific sites blocked using a 15 min incubation with a buffer containing 50% of human male type AB serum (Sigma) and 50% of a Perm/Wash buffer 2×. Afterwards cells were incubated with a mouse anti-desmin Ab for 90 min on ice (clone DE-R11, Dako, Glostrup, Denmark), washed twice and incubated 20 min on ice with a goat anti-mouse IgG FITC (Sigma). Isotype control was obtained using a purified mouse IgG₁ as first Ab (clone MOPC-21, Becton Dickinson). The samples were then resuspended in PBS/2% FCS and the fluorescence measured using a FACSCalibur (Becton Dickinson). Data were analyzed using the CellQuest software (Becton Dickinson). For all flow cytometry experiments, clonal human myoblasts and pig muscle derived clonal fibroblasts were, respectively, used as positive and negative controls.

2.4. Fusion index

Porcine MPC were grown to confluence in GM and were transferred in DM for 3 days to test their myogenic properties by assessing their fusion index. Cells were

fixed in PBS/4% formaldehyde for 10 min, washed with PBS and permeabilized by 20 min incubation in PBS containing 0.25% triton. After washing, unspecific sites were blocked by 15 min incubation in PBS/0.1% Tween-20/2% goat serum (Sigma). Next, cells were incubated for 90 min with a mouse anti human Troponin T Ab (clone JLT 11, Sigma) and washed twice in PBS. After incubation for 60 min with a goat anti mouse FITC (Sigma), all nuclei were stained using a fluorescence specific, DAPI containing, mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). For each sample, 27 randomly chosen fields ($20\times$ objective, $850\times 640\text{ }\mu\text{m}$) had their green- (troponin in myotubes) and blue- (nuclei) labeled surfaces outlined by an investigator and the fusion index (defined as the number of DAPI stained nuclei inside myotubes in a given field divided by the total number of DAPI stained nuclei in the same field) was automatically calculated with the software Metamorph (Zeiss, Fellbach, Switzerland).

2.5. Myogenic precursor cell transplantation

A total of 10 domestic female pigs of 8–9 weeks old, weighting $24.4\pm 3.4\text{ kg}$, were purchased from Animalerie d'Arare (Université de Genève, Plan les Ouates, Switzerland). Isoflurane (Abbott, Baar, Switzerland) was used as the anesthetic in all procedures, supplemented with oxygen through a semi-closed circuit inhalation system. Care and use of animals were in compliance with national as well as international guidelines.

After surgery to expose the *Vastus Lateralis* muscle, porcine MPC were transplanted using a 50 μl syringe with a 27-gauge needle (Hamilton Company, Bonaduz, Switzerland). To mark the injection site, four border stitches were placed and the suspension of cells was injected centrally. After surgery, pigs received daily i.m. injection of cefuroxim (750 mg, Zinacef, GlaxoSmithKline, Münchenbuchsee, Switzerland) for 3 days and fentanyl at 1 $\mu\text{g}/10\text{ kg}$ (Sinteny, Sintetica S.A, Mendrisio, Switzerland) for 2 days.

2.6. Quantitative survival assay

Pig MPC were cultured for 16 h in GM containing 5 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ of ^3H -thymidine (Hartmann Analytic, Braunschweig, Switzerland). Cells were washed twice in PBS, trypsinized and resuspended in cold PBS. 40 μl of the cell suspension ($1.4\pm 0.4\times 10^6$ cells) was injected perpendicularly to the muscle surface at various sites. Biopsies were performed in duplicates at 0, 24, 48 and 120 h after transplantation. Before MPC injections, three biopsies were taken from the same pig muscle for blank measurements. To determine the reference 100% survival, biopsies were performed immediately after MPC injections ('in vivo T0'). In some experiments cells were also injected ex vivo into isolated pig muscle immediately after

the biopsy ('ex vivo T0'). For evaluating correctly cell death, ^3H -thymidine labeled cells were killed by successive freezing in liquid nitrogen and thawing at 37°C , injected into pig muscle and biopsies performed immediately after ('in vivo T0'). All biopsies were homogenized in a Beckman Tissue Solubilizer-450 (BTS-450, Beckman Coulter, Krefeld, Germany) solution for 48 h at 37°C while stirring. ^3H -thymidine was counted with a Beckman LS 600 TA counter system (Beckman Coulter) by mixing 500 μl of dissociated muscle with 10 ml of liquid scintillation cocktail (Ready Organic, Beckman Coulter, Nyon, Switzerland).

2.7. Transduction of MPC and post-transplantation histological analysis

Freshly isolated MPC were transduced with a lentiviral vector coding the nls-lacZ reporter gene ($\text{MOI}=1-10$) and cultured in GM for 8 days. (HIV)-derived lentiviral vector expressing the nls-lacZ gene under the control of an EF1- α promoter has been obtained by cloning the nls-lacZ gene into the plasmid coding the lentivirus HIV-EF1-GFP as previously described [18]. Confluent monolayer of transduced cells were trypsinized and injected in pig muscle (four perpendicular injections to the muscle surface, at the corners of a 5 mm square, 18×10^6 cells in total). After 8 days, a biopsy was performed and prepared for histological analysis. Myogenic properties of the transplanted MPC were tested in parallel by fusion index and flow cytometry.

Muscle samples (1 cm^3) were collected at the sites of a graft and fixed in PBS/2% formaldehyde for 24 h at 37°C while stirring. Biopsies were stained for 48 h at 37°C with the X-gal solution [PBS containing 5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 5 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (Sigma), 2 mM MgCl_2 , 0.02 g/ml sodium deoxycholate, 0.02% NP-40 (Becton Dickinson) and 1 mg/ml X-gal (5-Bromo-4-chloro-indolyl- β -D-galactopyranoside, Roche, Rotkreuz, Switzerland)]. Biopsies were fixed in PBS/4% formaldehyde, embedded in paraffin, cut into 7 μm slices and stained with congo red-eosin for light microscopy.

Anti-desmin immunostaining was obtained by incubating permeabilized slides with a mouse anti-desmin Ab (clone DE-R11) in PBS/0.1% Tween-20/2% donkey serum. After washing, slides were incubated with a goat anti mouse HRP conjugated secondary Ab (Bio-Rad, Reinach, Switzerland) and revealed by PBS/0.05% DAB/0.3% H_2O_2 solution.

2.8. Statistical analysis

Statistical evaluation was performed using Student's *t* test and results were considered significant if *P*-values were <0.05 .

3. Results

3.1. Isolation and characterization of porcine myogenic precursor cells (MPC)

Cells were dissociated from pig skeletal muscle using a modified technique developed for human myoblasts [17]. Increasing the incubation time to 90 min with the proteolytic enzyme and replacing a low-speed centrifugation by a filtration step increased the yield of recovered dissociated porcine MPC from 58 ± 11 to 828 ± 221 cells per mg of tissue ($n=29$). Freshly isolated MPC proliferated in growth medium (GM). When confluent monolayers were switched from GM to differentiation medium (DM), porcine MPC fused and formed myotubes (Fig. 1A) that could be labeled with troponin-T (Fig. 1B), a muscle-specific protein expressed by mature myotubes. Fusion indices for porcine MPC cultures were measured using a semi-automated technique ($64.9 \pm 2.7\%$ of the nuclei were inside myotubes, $n=6$). In an attempt to verify that our dissociation and amplification procedure yields a highly myogenic population, cultured pig cells were trypsinized and phenotyped by flow cytometry for myogenic markers such as CD56 and desmin. After 8 days in GM, $78.3 \pm 4\%$ of the cells were CD56 positive (Fig. 2B). In contrast, desmin was detected in only $51.4 \pm 13.3\%$ of the cells (Fig. 2D). Immunofluorescent staining for CD56 and desmin on adherent proliferating cells confirmed these results

(Fig. 2A and C). The values of fusion indices and the percentage of desmin-positive cells in proliferating cultures were lower than values observed for CD56-positive cells. This led us to examine the nature of the non-fusing cells (NFC). To this end, myotubes were eliminated from the culture dishes and the remaining adherent NFC were exposed again to GM until confluence and fusion was induced by re-exposure to DM. It can be seen in Fig. 1C (troponin-T labeling) and in Fig. 1D (desmin labeling) that fusion took place and reached a similar level as in Fig. 1B ($62 \pm 1\%$; $n=4$). On the basis of this result, it can be concluded that the minimum number of MPC in cultures is 65% (those that have fused), and that the actual number is more likely to be as high as 87% ($65\% + 22\%$) [62% of the nuclei from the 35% NFC] if we assume that all putative cell types in the NFC population re-exposed to GM, grew at the same rate. Based on these results, we conclude that a simple dissociation procedure yields a high fraction of MPC in pig.

3.2. Fate of porcine MPC after transplantation

Freshly isolated porcine MPC were grown to confluence in GM and transplanted into intact pig skeletal muscle. To quantitatively evaluate their survival, MPC were pre-labeled with ^3H -thymidine and injected in pig skeletal muscle. Biopsies were performed at various times after transplantation, up to 5 days and the amount of remaining ^3H -thymidine quantified.

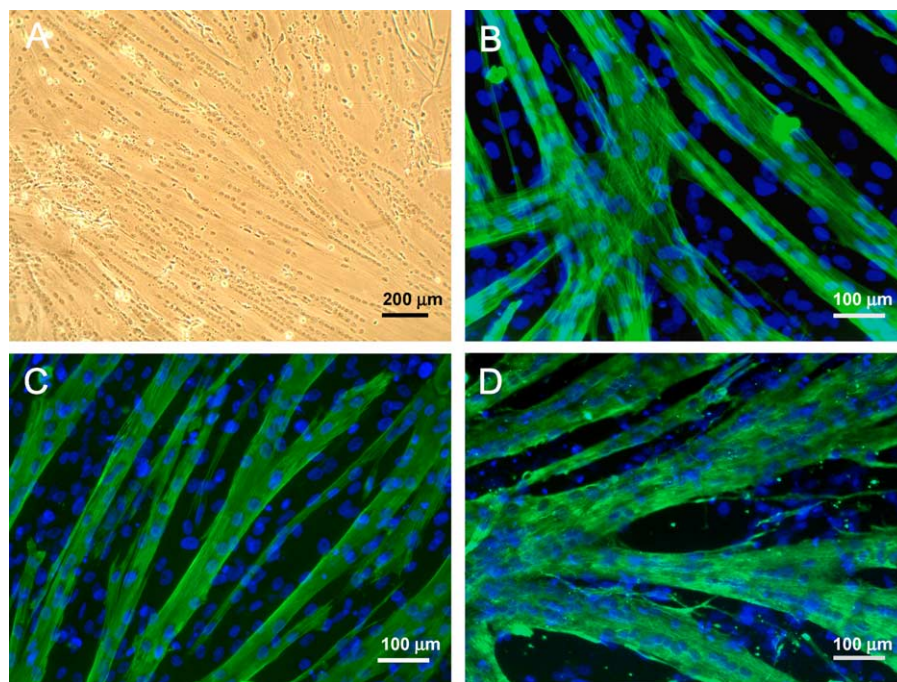


Fig. 1. Ability of freshly dissociated porcine muscle cells to fuse in vitro. (A) Pig cells were grown to confluence for 6–8 days and differentiated into myotubes (alignment of nuclei) when incubated in differentiation medium (DM) for 72 h. (B) In another culture, myotubes were stained with an Ab against troponin-T (green) and nuclei were stained with DAPI (blue). Nuclei of non-fusing cells (NFC) are clearly seen between myotubes. After a slight trypsinisation to remove myotubes, adherent NFC were grown until confluence and switched to DM for 72 h. Myotubes obtained by the fusion of the NFC were then stained with an Ab against troponin-T (C) and against desmin (D).

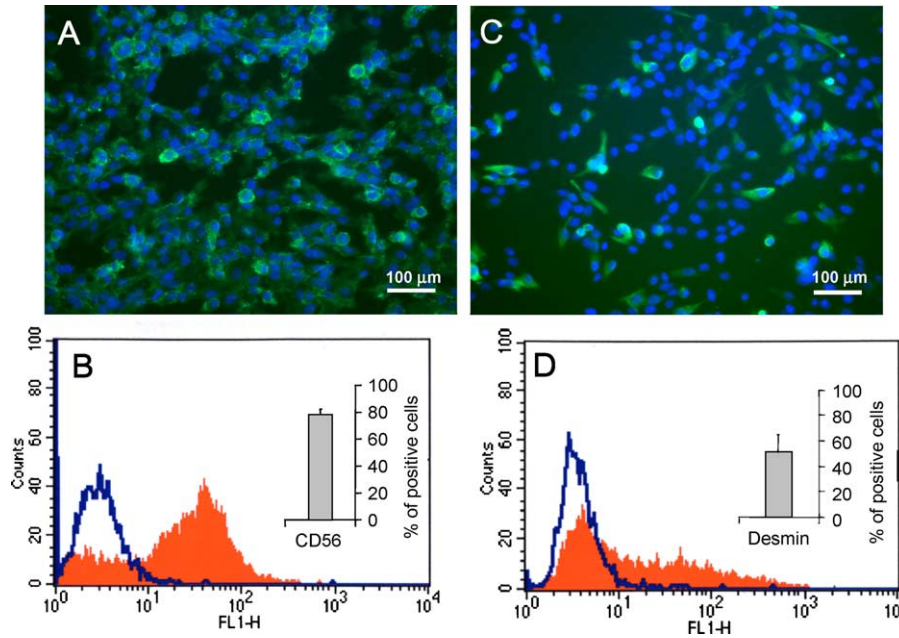


Fig. 2. Characterization of pig dissociated muscle cells. Freshly isolated cells were cultured in GM until confluence and analyzed by flow cytometry for myogenic markers such as CD56 [(B), $78.3 \pm 4\%$ CD56+ cells] and desmin [(D), $51.4 \pm 13.3\%$ desmin+ cells]. These results were confirmed with a green fluorescent staining for CD56 (A) and desmin (C) on confluent monolayer of proliferating cells. Nuclei were stained with DAPI (blue).

The initial definition of an appropriate standard for 100% survival was needed to evaluate porcine MPC transplantation efficacy. To define this standard, we quantified ^3H -thymidine of 1.4×10^6 labeled cells in various conditions. The inset

in Fig. 3 shows that if cells alone were used as the standard 100% survival ('cells only'), a 50% loss of donor cells would appear immediately after injection ('in vivo T0'). ^3H -thymidine detection was not statistically different

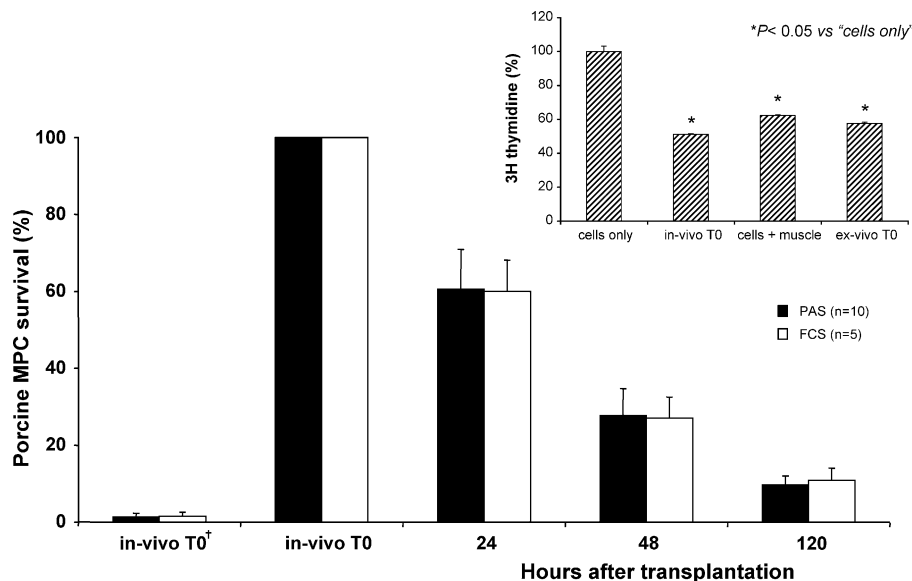


Fig. 3. Survival of autologous porcine myogenic precursor cells (MPC) transplanted into intact skeletal muscle. Inset: to define the appropriate standard for 100% survival, the amount of ^3H -thymidine was assessed on 1.4×10^6 MPC only ('cells only'), on samples extracted from pig muscle injected with 1.4×10^6 MPC in vivo ('in vivo T0'), on 1.4×10^6 MPC mixed with uninjected pig muscle ('cells + muscle'), and on pig muscle injected with 1.4×10^6 MPC ex vivo ('ex vivo T0'). Thus, the 'in vivo T0' was set to 100%. The remaining ^3H -thymidine was quantified as the ratio of (cpm at time T/mg of tissue)/(cpm at time T0/mg tissue), at 24, 48 and 120 h after transplantation. To evaluate correctly cell death, ^3H -thymidine was also quantified immediately after injection of labeled dead porcine MPC ('in vivo T0+'). Black columns represent the group in which pig autologous serum (PAS) treated MPC were injected and white columns the group in which FCS treated MPC were injected. Average values of at least five determinations are illustrated with indication of the standard deviations.

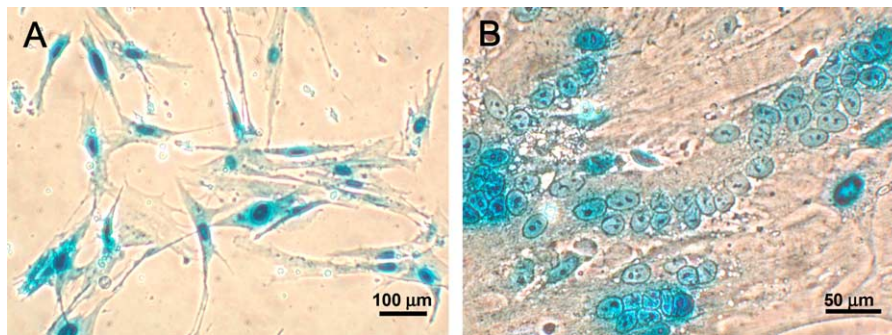


Fig. 4. nls-LacZ transduced porcine cells kept their myogenic capacity to proliferate and fuse. (A) Freshly isolated cells were transduced with a lentivirus coding for the nls-LacZ reporter gene, grown in GM for 5 days and stained with the X-gal solution. (B) Similar staining was done on confluent cells after incubation in DM for 3 days. The pictures are representative of four analyzed cell dishes from different animals.

between the ‘in vivo T0’, the ‘ex vivo T0’ and the ‘cells + muscle’ ($P > 0.05$), supporting the necessity to relate the 100% reference as the quantity of donor MPC recovered from an injected intact muscle immediately after transplantation (Inset, Fig. 3). With an appropriate standard for the 100% donor MPC survival, we followed donor cell fate with time. One day after transplantation, $60.5 \pm 10.4\%$ of the injected cells were radioactively detected. This survival rate decreased to $27.7 \pm 6.8\%$ at 2 days post-injection and $9.7 \pm 2.3\%$ at 5 days (Fig. 3, black columns). Controls were done by evaluating the ^3H -thymidine remaining immediately after injection of dead cells (‘in vivo T0⁺’). $1.5 \pm 1.1\%$ of the injected dead cells were radioactively detected. As previous studies underlined the role of enzymatic dissociation and serum in inducing cell death after transplantation [19], we examined this issue in pigs. We compared two conditions: (a) culture in GM containing 15% PAS followed by an enzyme-free re-suspension procedure (Fig. 3, black columns); (b) culture in GM containing 15% FCS, followed by an enzymatic treatment to re-suspend cells prior to transplantation (Fig. 3, white columns). The porcine MPC survival rate was not significantly different between these two conditions ($P > 0.05$ at 24, 48 and 120 h after transplantation; $n = 5$, Fig. 3B).

3.3. Transduced pig MPC kept their capacity to fuse with the host muscle fibers

Lentivirus are known to transduce purified human myoblasts and porcine muscle cells efficiently in vitro, without loss of myoblast proliferation and differentiation caused by toxicity [20,21]. To follow the fate of injected cells and to evaluate their ability to fuse in vivo, freshly isolated porcine MPC were infected with a lentiviral vector coding the nls-lacZ reporter gene (β -galactosidase). This technique labeled 80–90% of the nuclei (β -gal +) with some spill over the cytoplasm (Fig. 4A). When confluent monolayers of transduced cells were switched to DM, alignment and grouping of β -gal + nuclei in myotubes were visible after 3 days (Fig. 4B), indicating that lentivirus did not alter porcine MPC proliferation and differentiation capacity in vitro.

We injected nls-LacZ transduced cells in vivo and biopsies were taken at 8 days post-transplantation for histological analysis. The presence of β -gal + cells at the sites of injections was confirmed. These cells were located between myotubes as mononucleated cells but labeled nuclei were also located in the myotubes indicating the capacity of transplanted MPC to participate to the regeneration process (Fig. 5A). Immunostaining for

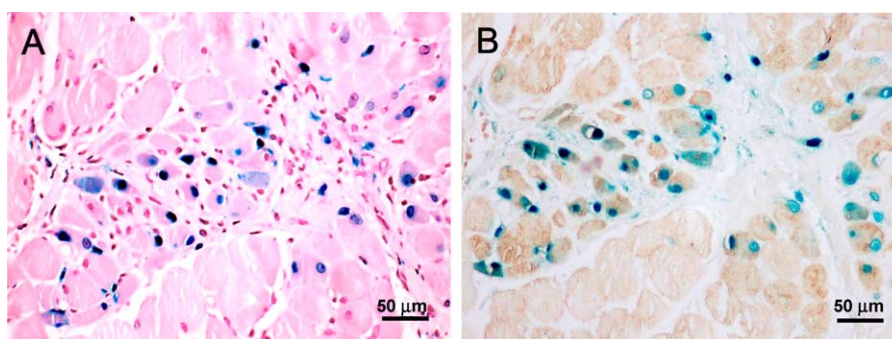


Fig. 5. Histology of pig muscles 8 days after injection of nls-LacZ transduced porcine MPC. (A) Porcine muscle biopsies were stained with congo red (dark pink) and eosin (light pink) after X-gal staining (blue nuclei), and immunostained for desmin (brown) after X-gal staining (B). The sections shown are representative of five analyzed grafts.

desmin in the β -gal+ region confirmed that β -gal+ nuclei are located in myogenic cells (Fig. 5B).

4. Discussion

Several strategies were developed, notably in mice and in non-human primates, to enhance MT efficacy with the aim of improving treatment of DMD patient or of patients with severe muscle trauma. However, these procedures may be not applicable to human and despite recent encouraging results [32], findings from clinical trials in DMD patients underline the lack of a large animal model, which mimics conditions similar to human settings. In the present study, we examined the capacity to use pigs as an animal model for developing MT approaches applicable to patients. We defined conditions for obtaining high yields of porcine cells after muscle dissociation and demonstrated that freshly isolated cells have high myogenic properties. Moreover, after injection of autologous porcine MPC in intact skeletal muscle, we followed donor cells integration in the muscle and to our knowledge, for the first time, we made a quantitative evaluation of donor cell death after transplantation in a large animal.

Porcine MPC were isolated following a modified dissociation protocol with respect to that used for human myoblasts [17]. Changes in procedure increased by 14 times the yield of cells per mg of pig muscle. Isolated cells were tested for their myogenic properties. Around 80% of the cells expressed myogenic markers similar to results obtained with clonal culture of pig myoblasts [22]. These cells fused as well (60–70% for fusion index) as pure clonal human myoblast cultures [23] but not as well as clonal population of pig myoblasts (90% for fusion index) [22]. These discrepancies were also observed in the proportion of desmin⁺ cells (51 versus 90% for Blanton et al.). The lower values observed for fusion index and desmin⁺ cells as compared to CD56⁺ cells may reflect the presence of quiescent, inactivated (CD56⁺/desmin[−]) MPC [24]. However, our data also indicate that a substantial fraction of the non-fusing myogenic cells in our assay are able to proliferate, give rise to desmin⁺ cells and fuse again (see Fig. 1C and D), implying that the proportion of myogenic cells in the heterogeneous mix of freshly isolated porcine cells is as high as 87%, i.e. reaching values similar to those reported by Blanton and colleagues [22].

To address the basic problem of cell survival, ³H-thymidine labeled porcine MPC were transplanted into intact muscle. Preliminary experiments have been performed to assess the impact induced by the mechanical stress through the needle on cell death. No significative differences in MPC survival have been observed between cells that were only trypsinized and cells that were mechanically stressed (unpublished data). The autologous transplantation was used in order to avoid rejection process, which can occur despite the use of immunosuppressive

drugs [25,26]. There was no evidence of an immediate and massive donor cell death within minutes after injection. However, we observed a significant loss of donor MPC at 1 day post-injection, with a further decline up to 5 days. These results are in range with previous studies done on smaller animal models [16,27,28]. They reported survival rate varying from 10 to 69% at 1 day post-injection. These differences may be linked to the methods used to quantify donor cell survival and/or to define the appropriate 100% survival [16,29]. The animal model and the type of cells transplanted may also play a role. In our study, the use of autologous cells may have resulted in faster incorporation, less inflammation, and less cell-mediated host immune response. Also, the relative undifferentiated state of myogenic cells (CD56⁺/desmin[−]) present in the heterogeneous mix population could promote MPC survival and favor the regeneration process. Donor cell death observed after transplantation may also be linked to culture conditions. No significant differences were observed in our model between the two conditions tested (Fig. 3). The exposure to serum has been shown to hinder myotube formation in vivo and the exposure to proteolytical enzymes seems to be detrimental for myoblasts survival [8,18,30]. Furthermore, it has been suggested that tissue culture procedures preceding transplantation could alter myoblast MHC class I expression [19] which would provoke a response by NK cells. NK cells were defined as an important mediator of rapid cell death of donor MPC [31] but a recent report indicates that innate inflammatory cells such as macrophage, neutrophils and NK cells do not seem to play a major role in the rapid cell death of donor MPC after transplantation [29].

In any case, using porcine MPC infected with a lentivirus coding the nls-LacZ reporter gene, we were able to show at 8 days post-transplantation, the presence of donor MPC in myotubes. This indicates that pig MPC participate to the muscle regeneration process.

This paper provides evidence that pigs represent an adequate animal model that may help to develop MPC transplantation strategies in severe muscle injuries and muscle dystrophies in humans.

Acknowledgements

This work was supported by the Swiss National Science Foundation (NRP 46 no. 4046-058639), the Fondation suisse de recherche sur les maladies musculaires and the Fondation Marcel Levaillant.

We would like to thank Professors Laurent Bernheim, Pierre Hoffmeyer and Charles Bader for their continuous encouragement and support and for their comments on this manuscript. The excellent technical assistance of Katia Pomponio, Patrick Teta, Pierre Brawand, and Stephanie Coutant-Zimmerli is kindly acknowledged.

References

- [1] Skuk D, Tremblay JP. Myoblast transplantation: the current status of a potential therapeutic tool for myopathies. *J Muscle Res Cell Motil* 2003;24:285–300.
- [2] Leor J, Battler A, Kloner RA, Etzion S. Reprogramming cells for transplantation. *Heart Fail Rev* 2003;8:285–92.
- [3] Boubaker el Andaloussi R, Daussin PA, Micallef JP, et al. Changes in mass and performance in rabbit muscles after muscle damage with or without transplantation of primary satellite cells. *Cell Transplant* 2002;11:169–80.
- [4] Chen M, Li HJ, Fang Q, Goodwin TG, Florendo JA, Law PK. Dystrophin cytochemistry in mdx mouse muscles injected with labeled normal myoblasts. *Cell Transplant* 1992;1:17–22.
- [5] Karpati G, Pouliot Y, Zubrzycka-Gaarn E, et al. Dystrophin is expressed in mdx skeletal muscle fibers after normal myoblast implantation. *Am J Pathol* 1989;135:27–32.
- [6] Gussoni E, Pavlath GK, Lanctot AM, et al. Normal dystrophin transcripts detected in Duchenne muscular dystrophy patients after myoblast transplantation. *Nature* 1992;356:435–8.
- [7] Morgan JE, Coulton GR, Partridge TA. Muscle precursor cells invade and repopulate freeze-killed muscles. *J Muscle Res Cell Motil* 1987;8:386–96.
- [8] Hodgetts SI, Grounds MD. Irradiation of dystrophic host tissue prior to myoblast transfer therapy enhances initial (but not long-term) survival of donor myoblasts. *J Cell Sci* 2003;116:4131–46.
- [9] Kinoshita I, Vilquin JT, Guerette B, Asselin I, Roy R, Tremblay JP. Very efficient myoblast allotransplantation in mice under FK506 immunosuppression. *Muscle Nerve* 1994;17:1407–15.
- [10] Skuk D, Goulet M, Roy B, Tremblay JP. Myoblast transplantation in whole muscle of nonhuman primates. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000;59:197–206.
- [11] Skuk D, Roy B, Goulet M, Tremblay JP. Successful myoblast transplantation in primates depends on appropriate cell delivery and induction of regeneration in the host muscle. *Exp Neurol* 1999;155:22–30.
- [12] Skuk D, Goulet M, Roy B, Tremblay JP. Efficacy of myoblast transplantation in nonhuman primates following simple intramuscular cell injections: toward defining strategies applicable to humans. *Exp Neurol* 2002;175:112–26.
- [13] Sachs DH. The pig as a potential xenograft donor. *Vet Immunol Immunopathol* 1994;43:185–91.
- [14] Hodgetts SI, Beilharz MW, Scalzo AA, Grounds MD. Why do cultured transplanted myoblasts die in vivo? DNA quantification shows enhanced survival of donor male myoblasts in host mice depleted of CD4+ and CD8+ cells or Nk1.1+ cells. *Cell Transplant* 2000;9:489–502.
- [15] Rando TA, Pavlath GK, Blau HM. The fate of myoblasts following transplantation into mature muscle. *Exp Cell Res* 1995;220:383–9.
- [16] Skuk D, Caron NJ, Goulet M, Roy B, Tremblay JP. Resetting the problem of cell death following muscle-derived cell transplantation: detection, dynamics and mechanisms. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003;62:951–67.
- [17] Baroffio A, Aubry JP, Kaelin A, Krause RM, Hamann M, Bader CR. Purification of human muscle satellite cells by flow cytometry. *Muscle Nerve* 1993;16:498–505.
- [18] Salmon P, Kindler V, Ducrey O, Chapuis B, Zubler RH, Trono D. High-level transgene expression in human hematopoietic progenitors and differentiated blood lineages after transduction with improved lentiviral vectors. *Blood* 2000;96:3392–8.
- [19] Smythe GM, Grounds MD. Exposure to tissue culture conditions can adversely affect myoblast behavior in vivo in whole muscle grafts: implications for myoblast transfer therapy. *Cell Transplant* 2000;9:379–93.
- [20] Cudre-Mauroux C, Occhiodoro T, König S, Salmon P, Bernheim L, Trono D. Lentivector-mediated transfer of Bmi-1 and telomerase in muscle satellite cells yields a Duchenne myoblast cell line with long-term genotypic and phenotypic stability. *Hum Gene Ther* 2003;14:1525–33.
- [21] Blanton Jr JR, Bidwell CA, Sanders DA, et al. Plasmid transfection and retroviral transduction of porcine muscle cells for cell-mediated gene transfer. *J Anim Sci* 2000;78:909–18.
- [22] Blanton Jr JR, Grant AL, McFarland DC, Robinson JP, Bidwell CA. Isolation of two populations of myoblasts from porcine skeletal muscle. *Muscle Nerve* 1999;22:43–50.
- [23] Baroffio A, Hamann M, Bernheim L, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, Bader CR. Identification of self-renewing myoblasts in the progeny of single human muscle satellite cells. *Differentiation* 1996;60:47–57.
- [24] Smythe GM, Davies MJ, Paulin D, Grounds MD. Absence of desmin slightly prolongs myoblast proliferation and delays fusion in vivo in regenerating grafts of skeletal muscle. *Cell Tissue Res* 2001;304:287–94.
- [25] Kinoshita I, Roy R, Dugre FJ, et al. Myoblast transplantation in monkeys: control of immune response by FK506. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996;55:687–97.
- [26] Ito H, Vilquin JT, Skuk D, et al. Myoblast transplantation in non-dystrophic dog. *Neuromuscul Disord* 1998;8:95–110.
- [27] Beauchamp JR, Morgan JE, Pagel CN, Partridge TA. Dynamics of myoblast transplantation reveal a discrete minority of precursors with stem cell-like properties as the myogenic source. *J Cell Biol* 1999;144:1113–22.
- [28] El Fahime E, Bouchentouf M, Benabdallah BF, et al. Tubulyzine, a novel tri-substituted triazine, prevents the early cell death of transplanted myogenic cells and improves transplantation success. *Biochem Cell Biol* 2003;81:81–90.
- [29] Samuels LM, Bosio E, Fragall CT, Grounds MD, van Rooijen N, Beilharz MW. Innate inflammatory cells are not responsible for early death of donor myoblasts after myoblast transfer therapy. *Transplantation* 2004;77:1790–7.
- [30] Fan Y, Beilharz MW, Grounds MD. A potential alternative strategy for myoblast transfer therapy: the use of sliced muscle grafts. *Cell Transplant* 1996;5:421–9.
- [31] Hodgetts SI, Spencer MJ, Grounds MD. A role for natural killer cells in the rapid death of cultured donor myoblasts after transplantation. *Transplantation* 2003;75:863–71.
- [32] Skuk D, Roy B, Goulet M, et al. Dystrophin expression in myofibers of Duchenne muscular dystrophy patients following intramuscular injections of normal myogenic cells. *Mol Ther* 2004;9:475–82.

III. DISCUSSION :

La transplantation de myoblastes, initialement développée dans le but de fournir de nouvelles options thérapeutiques dans le cadre des myopathies héréditaires a vu, depuis, l'éventail de ses applications potentielles s'étendre largement. Le domaine générant à l'heure actuelle les résultats les plus prometteurs est celui de la dysfonction ventriculaire post infarctus dans lequel des études cliniques de phase I ont déjà été menée avec succès (36). L'efficacité du transfert de myoblastes dans le cadre de lésions musculaires squelettiques (11) ainsi que sphinctérienne (62) a également été évaluée. Bien que dans ces deux cas, les résultats préliminaires soient encourageants, les bénéfices fonctionnels de ces approches thérapeutiques restent à démontrer

Le succès de la transplantation de myoblastes en tant que thérapie dans le cadre des myopathies héréditaires, le modèle le plus étudié, a été entravé par plusieurs problèmes dont les principaux sont la survie ainsi que la migration des cellules greffées (pour revue: (53, 54)).

De nombreux facteurs affectant la survie des myoblastes transplantés ont été décrits. En particulier, il a été démontré que les conditions de culture permettant l'amplification des précurseurs myogéniques avant transplantation influencent leur survie in vivo. Ce problème est souligné par la survie nettement améliorée de cellules transplantées sous la forme de tranche entière de muscle par rapport à des cellules isolées à partir de biopsies et amplifiées in vitro (16). Les facteurs incriminés sont, entre autres, l'induction d'une réaction antigénique contre le sérum entrant dans la composition des milieux de culture (12), l'utilisation de facteurs de croissance (32) ou l'altération des protéines de surface lors de la collecte des cellules au moyen d'enzymes protéolytiques (54). De plus, il a été suggéré que l'amplification de cellules in vitro ne présente pas d'avantage par rapport à l'injection de cellules purifiées

directement après la procédure isolation, sans phase de culture, le plus grand nombre de cellules amplifiées étant compensé par une perte équivalente de potentiel myogénique in vitro (39).

La réponse immunitaire de l'hôte représente un problème important dans les protocoles de transfert de myoblastes allogéniques, mais également autologue pour les raisons mentionnées ci-dessus (27). L'utilisation d'immunosuppresseurs, en plus de leurs effets indésirables, ne permet pas de bloquer adéquatement la réponse immune de l'hôte contre les cellules transplantées (28, 31). Plusieurs études se sont par conséquent intéressées à la fonction des différents composants du système immunitaire lors du processus de transplantation, mettant en évidence l'implication du système du complément (52), des systèmes d'histocompatibilité majeur et mineur (23), ainsi que des macrophages (19), des lymphocytes (18), des cellules dendritiques (47) et NK (Natural Killers) (26). Il apparaît que la modulation de chacun de ces éléments se répercute sur la survie des cellules transplantées, soulignant la complexité du processus de rejet après transplantation. (pour revue (54)).

Un autre problème rencontré lors du transfert de myoblastes est la migration restreinte des cellules transplantées, nécessitant le recours à des injections sériées, distantes de l'ordre du millimètre, afin de traiter un muscle cible (53). Bien que l'injection intraveineuse ou intra-artérielle de précurseurs myogéniques ait été tentée, ces approches se sont révélées décevantes (22, 60). Ces résultats ont poussé certains auteurs à suggérer une restriction des thérapies par transplantation de précurseurs myogéniques aux pathologies affectant un nombre de muscles restreint et bien délimité (42).

Dans ce contexte et au vu des différences notables entre la biologie des modèles murins et celle de l'humain (41), la mise au point d'un modèle porcin de transplantation de myoblastes représente un premier pas vers le développement de thérapies applicables à l'homme.

IV. ANNEXE :

Remerciements

Le déroulement de ce travail de thèse a été rendu possible par l'engagement et la collaboration des personnes suivantes, à qui j'adresse toute ma gratitude:

- Les Pr Charles Roland **Bader** et Laurent **Bernheim**, pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire et efficacement conseillé.
- Les Pr Marc **Ballivet**, Jean-Louis **Bény** et Michel **Villaz**, pour avoir accepté d'évaluer ce travail.
- Les Dr Serge **Arnaudeau** et Stéphane **König**, pour m'avoir supervisé et transmit une partie de leurs connaissances.
- Pierre **Brawand**, Marina **Berti**, Catia **Pomponio**, Joan **Stalder**, Patrick **Teta** et Christelle **Viglino** pour leur enseignement technique et excellente assistance.
- Frédéric **Glauser**, Raphaël **Guanella**, Valerie **Hinard**, Joël **Iff**, Frédéric **Lador**, le Dr Thomas **Laumonier** et Roch **Ogier**, pour leur présence rafraîchissante.

Enfin, je remercie chaleureusement mon père et ma mère, dont le support et les encouragements m'ont permis de réaliser plusieurs projets qui me tiennent à cœur.

V. REFERENCES :

1. **Bader CR, Bertrand D, Cooper E, and Mauro A.** Membrane currents of rat satellite cells attached to intact skeletal muscle fibers. *Neuron* 1: 237-240, 1988.
2. **Baroffio A, Aubry JP, Kaelin A, Krause RM, Hamann M, and Bader CR.** Purification of human muscle satellite cells by flow cytometry. *Muscle Nerve* 16: 498-505, 1993.
3. **Baroffio A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, and Bader CR.** Heterogeneity in the progeny of single human muscle satellite cells. *Differentiation* 59: 259-268, 1995.
4. **Beauchamp JR, Pagel CN, and Partridge TA.** A dual-marker system for quantitative studies of myoblast transplantation in the mouse. *Transplantation* 63: 1794-1797, 1997.
5. **Bernheim L and Bader CR.** Human myoblast differentiation: Ca(2+) channels are activated by K(+) channels. *News Physiol Sci* 17: 22-26, 2002.
6. **Bischoff R.** Regeneration of single skeletal muscle fibers in vitro. *Anat Rec* 182: 215-235, 1975.
7. **Blanton JR, Jr., Bidwell CA, Sanders DA, Sharkey CM, McFarland DC, Gerrard DE, and Grant AL.** Plasmid transfection and retroviral transduction of porcine muscle cells for cell-mediated gene transfer. *J Anim Sci* 78: 909-918, 2000.
8. **Blanton JR, Jr., Grant AL, McFarland DC, Robinson JP, and Bidwell CA.** Isolation of two populations of myoblasts from porcine skeletal muscle. *Muscle Nerve* 22: 43-50, 1999.
9. **Blanton JR, Jr., Robinson JP, Gerrard DE, Bidwell CA, and Grant AL.** Rapid purification of transfected porcine muscle cells. *Methods Cell Sci* 22: 217-223, 2000.
10. **Blau HM and Webster C.** Isolation and characterization of human muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 5623-5627, 1981.
11. **Boubaker el Andaloussi R, Daussin PA, Micallef JP, Roux C, Nougues J, Chammas M, Reyne Y, and Bacou F.** Changes in mass and performance in rabbit muscles after muscle damage with or without transplantation of primary satellite cells. *Cell Transplant* 11: 169-180, 2002.
12. **Boulanger A, Asselin I, Roy R, and Tremblay JP.** Role of non-major histocompatibility complex antigens in the rejection of transplanted myoblasts. *Transplantation* 63: 893-899, 1997.
13. **Charge SB and Rudnicki MA.** Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 84: 209-238, 2004.
14. **Collins CA and Morgan JE.** Duchenne's muscular dystrophy: animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. *Int J Exp Pathol* 84: 165-172, 2003.
15. **Dhawan J and Rando TA.** Stem cells in postnatal myogenesis: molecular mechanisms of satellite cell quiescence, activation and replenishment. *Trends Cell Biol* 15: 666-673, 2005.
16. **Fan Y, Beilharz MW, and Grounds MD.** A potential alternative strategy for myoblast transfer therapy: the use of sliced muscle grafts. *Cell Transplant* 5: 421-429, 1996.
17. **Gamble HJ, Fenton J, and Allsopp G.** Electron microscope observations on human fetal striated muscle. *J Anat* 126: 567-589, 1978.

18. **Guerette B, Asselin I, Vilquin JT, Roy R, and Tremblay JP.** Lymphocyte infiltration following allo- and xenomyoblast transplantation in mdx mice. *Muscle Nerve* 18: 39-51, 1995.
19. **Guerette B, Skuk D, Celestin F, Huard C, Tardif F, Asselin I, Roy B, Goulet M, Roy R, Entman M, and Tremblay JP.** Prevention by anti-LFA-1 of acute myoblast death following transplantation. *J Immunol* 159: 2522-2531, 1997.
20. **Gussoni E, Blau HM, and Kunkel LM.** The fate of individual myoblasts after transplantation into muscles of DMD patients. *Nat Med* 3: 970-977, 1997.
21. **Gussoni E, Pavlath GK, Lanctot AM, Sharma KR, Miller RG, Steinman L, and Blau HM.** Normal dystrophin transcripts detected in Duchenne muscular dystrophy patients after myoblast transplantation. *Nature* 356: 435-438, 1992.
22. **Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, Kunkel LM, and Mulligan RC.** Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401: 390-394, 1999.
23. **Harlan DM and Kirk AD.** The future of organ and tissue transplantation: can T-cell costimulatory pathway modifiers revolutionize the prevention of graft rejection? *Jama* 282: 1076-1082, 1999.
24. **Hartley RS, Bandman E, and Yablonka-Reuveni Z.** Skeletal muscle satellite cells appear during late chicken embryogenesis. *Dev Biol* 153: 206-216, 1992.
25. **Hawke TJ and Garry DJ.** Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* 91: 534-551, 2001.
26. **Hodgetts SI, Beilharz MW, Scalzo AA, and Grounds MD.** Why do cultured transplanted myoblasts die in vivo? DNA quantification shows enhanced survival of donor male myoblasts in host mice depleted of CD4⁺ and CD8⁺ cells or Nk1.1⁺ cells. *Cell Transplant* 9: 489-502, 2000.
27. **Huard J, Roy R, Bouchard JP, Malouin F, Richards CL, and Tremblay JP.** Human myoblast transplantation between immunohistocompatible donors and recipients produces immune reactions. *Transplant Proc* 24: 3049-3051, 1992.
28. **Huard J, Roy R, Guerette B, Verreault S, Tremblay G, and Tremblay JP.** Human myoblast transplantation in immunodeficient and immunosuppressed mice: evidence of rejection. *Muscle Nerve* 17: 224-234, 1994.
29. **Kahn EB and Simpson SB, Jr.** Satellite cells in mature, uninjured skeletal muscle of the lizard tail. *Dev Biol* 37: 219-223, 1974.
30. **Karpati G, Ajdukovic D, Arnold D, Gledhill RB, Guttmann R, Holland P, Koch PA, Shoubridge E, Spence D, Vanasse M, and et al.** Myoblast transfer in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* 34: 8-17, 1993.
31. **Kinoshita I, Roy R, Dugre FJ, Gravel C, Roy B, Goulet M, Asselin I, and Tremblay JP.** Myoblast transplantation in monkeys: control of immune response by FK506. *J Neuropathol Exp Neurol* 55: 687-697, 1996.
32. **Kinoshita I, Vilquin JT, and Tremblay JP.** Pretreatment of myoblast cultures with basic fibroblast growth factor increases the efficacy of their transplantation in mdx mice. *Muscle Nerve* 18: 834-841, 1995.
33. **Law PK, Goodwin TG, and Wang MG.** Normal myoblast injections provide genetic treatment for murine dystrophy. *Muscle Nerve* 11: 525-533, 1988.

34. **Mauro A.** Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* 9: 493-495, 1961.
35. **Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, Schwartz K, Vilquin JT, and Marolleau JP.** Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 357: 279-280, 2001.
36. **Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, Desnos M, Abergel E, Pouzet B, Bel A, Sarateanu S, Scorsin M, Schwartz K, Bruneval P, Benbunan M, Marolleau JP, and Duboc D.** Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 41: 1078-1083, 2003.
37. **Mendell JR, Kissel JT, Amato AA, King W, Signore L, Prior TW, Sahenk Z, Benson S, McAndrew PE, Rice R, and et al.** Myoblast transfer in the treatment of Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 333: 832-838, 1995.
38. **Mestas J and Hughes CC.** Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol* 172: 2731-2738, 2004.
39. **Montarras D, Morgan J, Collins C, Relaix F, Zaffran S, Cumano A, Partridge T, and Buckingham M.** Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration. *Science* 309: 2064-2067, 2005.
40. **Moss FP and Leblond CP.** Nature of dividing nuclei in skeletal muscle of growing rats. *J Cell Biol* 44: 459-462, 1970.
41. **Mouly V, Aamiri A, Perie S, Mamchaoui K, Barani A, Bigot A, Bouazza B, Francois V, Furling D, Jacquemin V, Negroni E, Riederer I, Vignaud A, St Guily JL, and Butler-Browne GS.** Myoblast transfer therapy: is there any light at the end of the tunnel? *Acta Myol* 24: 128-133, 2005.
42. **Negroni E, Butler-Browne GS, and Mouly V.** Myogenic stem cells: regeneration and cell therapy in human skeletal muscle. *Pathol Biol (Paris)* 54: 100-108, 2006.
43. **Neumeyer AM, DiGregorio DM, and Brown RH, Jr.** Arterial delivery of myoblasts to skeletal muscle. *Neurology* 42: 2258-2262, 1992.
44. **Partridge TA.** Invited review: myoblast transfer: a possible therapy for inherited myopathies? *Muscle Nerve* 14: 197-212, 1991.
45. **Partridge TA, Morgan JE, Coulton GR, Hoffman EP, and Kunkel LM.** Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts. *Nature* 337: 176-179, 1989.
46. **Piedrahita JA and Mir B.** Cloning and transgenesis in mammals: implications for xenotransplantation. *Am J Transplant* 4 Suppl 6: 43-50, 2004.
47. **Pimorady-Esfahani A, Grounds MD, and McMenamin PG.** Macrophages and dendritic cells in normal and regenerating murine skeletal muscle. *Muscle Nerve* 20: 158-166, 1997.
48. **Prowse KR and Greider CW.** Developmental and tissue-specific regulation of mouse telomerase and telomere length. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 4818-4822, 1995.
49. **Schultz E.** Satellite cell proliferative compartments in growing skeletal muscles. *Dev Biol* 175: 84-94, 1996.
50. **Skuk D, Caron NJ, Goulet M, Roy B, and Tremblay JP.** Resetting the problem of cell death following muscle-derived cell transplantation: detection, dynamics and mechanisms. *J Neuropathol Exp Neurol* 62: 951-967, 2003.

51. **Skuk D, Goulet M, Roy B, and Tremblay JP.** Efficacy of myoblast transplantation in nonhuman primates following simple intramuscular cell injections: toward defining strategies applicable to humans. *Exp Neurol* 175: 112-126, 2002.
52. **Skuk D and Tremblay JP.** Complement deposition and cell death after myoblast transplantation. *Cell Transplant* 7: 427-434, 1998.
53. **Skuk D and Tremblay JP.** Myoblast transplantation: the current status of a potential therapeutic tool for myopathies. *J Muscle Res Cell Motil* 24: 285-300, 2003.
54. **Smythe GM, Hodgetts SI, and Grounds MD.** Immunobiology and the future of myoblast transfer therapy. *Mol Ther* 1: 304-313, 2000.
55. **Walsh FS and Ritter MA.** Surface antigen differentiation during human myogenesis in culture. *Nature* 289: 60-64, 1981.
56. **Watt DJ, Lambert K, Morgan JE, Partridge TA, and Sloper JC.** Incorporation of donor muscle precursor cells into an area of muscle regeneration in the host mouse. *J Neurol Sci* 57: 319-331, 1982.
57. **Watt DJ, Morgan JE, and Partridge TA.** Use of mononuclear precursor cells to insert allogeneic genes into growing mouse muscles. *Muscle Nerve* 7: 741-750, 1984.
58. **Webster C, Pavlath GK, Parks DR, Walsh FS, and Blau HM.** Isolation of human myoblasts with the fluorescence-activated cell sorter. *Exp Cell Res* 174: 252-265, 1988.
59. **Womble MD and Bonner PH.** Developmental fate of a distinct class of chick myoblasts after transplantation of cloned cells into quail embryos. *J Embryol Exp Morphol* 58: 119-130, 1980.
60. **Wuytack F, Raeymaekers L, De Smedt H, Eggermont JA, Missiaen L, Van Den Bosch L, De Jaegere S, Verboomen H, Plessers L, and Casteels R.** Ca²⁺-transport ATPases and their regulation in muscle and brain. *Ann N Y Acad Sci* 671: 82-91, 1992.
61. **Yasin R, Van Beers G, Nurse KC, Al-Ani S, Landon DN, and Thompson EJ.** A quantitative technique for growing human adult skeletal muscle in culture starting from mononucleated cells. *J Neurol Sci* 32: 347-360, 1977.
62. **Yiou R, Dreyfus P, Chopin DK, Abbou CC, and Lefaucheur JP.** Muscle precursor cell autografting in a murine model of urethral sphincter injury. *BJU Int* 89: 298-302, 2002.
63. **Zierath JR and Hawley JA.** Skeletal muscle fiber type: influence on contractile and metabolic properties. *PLoS Biol* 2: e348, 2004.