

UTILISATION DE SONDAS LNA POUR LA DÉTECTION IN SITU DE MICRO-ARNs DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE DE CHIEN DYSTROPHIQUE

Candice BABARIT

candice.babarit@inra.fr

UMR 703 INRA/Oniris PAnTher « Physiopathologie Animale et bioThérapie du muscle et du système nerveux », Oniris, Atlanpôle La Chantrerie, route de Gachet, CS.40706, 44307 NANTES, France.

RESUME

Les micro-ARNs (miRNAs) sont des ARNs de très petite taille capables d'induire l'extinction de l'expression de gènes par des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle. Des altérations de l'expression de ces micro-ARNs sont décrites dans de nombreuses maladies. Ces petites molécules suscitent l'intérêt de la communauté scientifique dans la recherche de nouveaux biomarqueurs diagnostiques et pronostiques. Des outils techniques ont dû être développés et adaptés à l'exploration des miRNAs. C'est le cas de l'hybridation *in situ* (HIS), la technique histologique de référence pour la visualisation des acides nucléiques sur coupes tissulaires. Par l'utilisation de sondes LNA (Locked Nucleic Acid) hautement spécifiques, notre équipe a étudié le profil d'expression des miR-206 et miR-486 dans le muscle biceps fémoral du chien GRMD (Golden Retriever Muscular Dystrophy), représentant le modèle animal cliniquement pertinent de la dystrophie

musculaire de Duchenne (DMD). Alors que l'analyse quantitative par RT-qPCR ne révèle aucune différence statistiquement significative de l'expression de ces 2 miARNs entre les chiens malades et sains, de façon importante, l'hybridation *in situ* démontre des profils d'expression bien distincts au niveau cellulaire avec une très forte expression dans les myoblastes et les fibres nouvellement régénérées chez le chien GRMD.

MOTS CLES

Micro-ARN, hybridation *in situ*, sonde LNA, muscle, dystrophie musculaire de Duchenne, chien GRMD

ABSTRACT

Micro-RNAs (miRNAs) are very small-sized RNAs able to extinguish gene expression by post-transcriptional regulatory mechanisms. Alterations in the expression of these miRNAs are described in large panel of diseases. These small molecules have aroused the interest of the scientific community in the search for new diagnostic and prognostic biomarkers. Technical tools had to be developed and adapted to the exploration of miRNAs. This is the case of *in situ* hybridization (HIS), the reference histological technique for the visualization of nucleic acids on tissue sections. Using highly specific Locked Nucleic Acid (LNA) probes, our team investigated the expression profile of the miR-206 and miR-486 in the *Biceps femoris* muscle of the Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) dogs, representing the clinically relevant animal model of Duchenne Muscular Dystrophy (DMD). While the quantitative analysis by RT-qPCR reveals no significant difference in the expression of these 2 miRNAs in the pathological context compared to the healthy one, *in situ* hybridization demonstrates distinct expression patterns with a very strong expression in myoblasts and newly-regenerated fibers in the GRMD dog.

KEY WORDS

Micro-RNA, *in situ* hybridization, LNA probe, muscle, Duchenne Muscular Dystrophy, GRMD dogs

INTRODUCTION

Les micro-ARNs (miRNAs) sont de petits ARNs non codants de 21 à 25 nucléotides impliqués dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression de gènes. Ils se fixent par complémentarité de séquence à des ARN messagers (ARNm) cibles afin de conduire à leur dégradation ou à l'inhibition de leur traduction en protéine. Les nombreux travaux sur les miRNAs ont mis en évidence leur omniprésence dans la régulation génique de tous les processus biologiques de la cellule. Ils ont notamment été décrits dans les voies de l'apoptose [1], de la différenciation cellulaire [2] et du développement [3]. Par ailleurs, une dérégulation de l'expression des miRNAs est observée dans de nombreuses pathologies telles que les cancers [4], les maladies neurodégénératives [5] ou les myopathies [6]. Du fait de leur implication dans les mécanismes physiologiques et physiopathologiques, les miRNAs constituent des pistes d'investigation prometteuses dans la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques, de biomarqueurs diagnostiques ou d'efficacité thérapeutique.

Les techniques d'exploration des miRNAs se sont développées au cours de ces dernières années. Ainsi, des approches globales de micro-arrays et de séquençage à haut débit [7] mais aussi des approches ciblées de RT-qPCR [8] et d'hybridation *in situ* [9] ont été adaptées à l'étude des miRNAs. L'hybridation *in situ* est la technique morphologique de référence pour l'exploration tissulaire des acides nucléiques. Contrairement à la RT-qPCR, elle n'est pas quantitative. En revanche, elle permet d'étudier la répartition/cartographie des acides nucléiques dans le tissu et, combinée à des techniques d'immunomarquage, d'identifier les types cellulaires dans lesquels ils sont localisés. Cette exploration tissulaire favorise ainsi une meilleure compréhension des mécanismes biologiques. Les sondes ADN ou ARN utilisées dans la technique d'HIS conventionnelle ne sont pas adaptées à la détection des miRNAs du fait de leur petite taille. Des sondes hautement spécifiques, appelées sondes LNA pour Locked Nucleic Acid, ont été développées et permettent de s'affranchir de cette difficulté [10].

C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à l'exploration des miRNAs dans la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), maladie génétique provoquant une dégénérescence progressive de l'ensemble des muscles. Plusieurs études ont démontré une implication des miRNAs dans le processus physiopathologique, notamment dans la réponse aux dommages musculaires et à la régénération (**Figure 1**). Ces études ont été décrites chez l'Homme [11] et dans le modèle murin

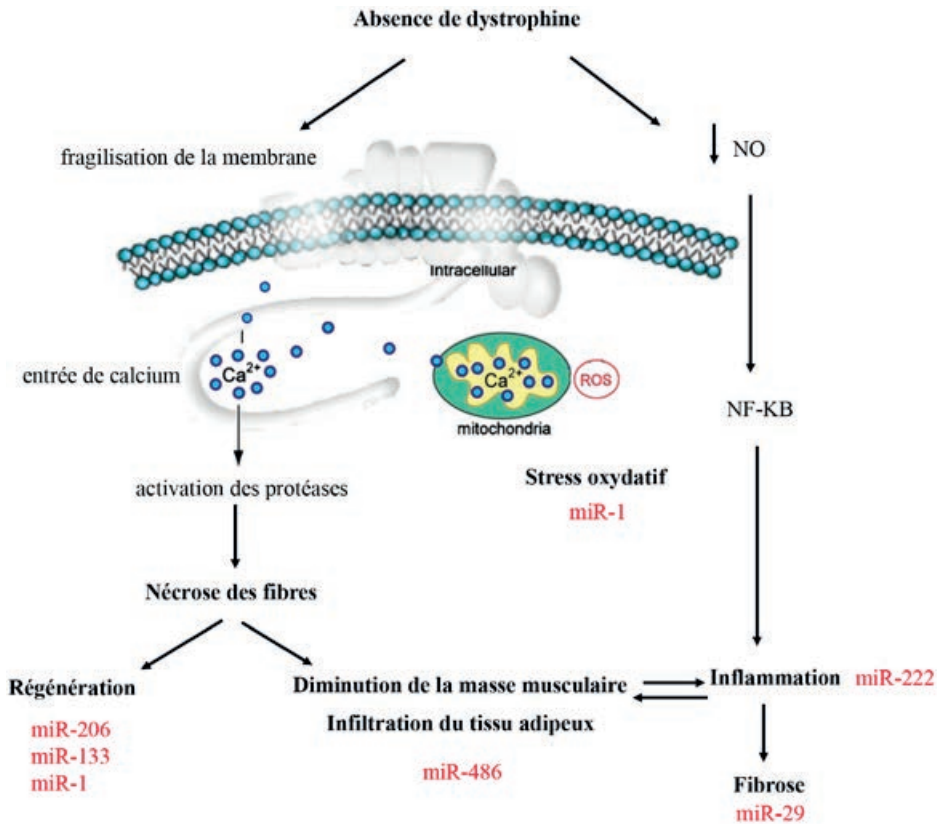


Figure 1 : Micro-ARNs impliqués dans la physiopathologie de la dystrophie musculaire de Duchenne. En absence de dystrophine, la membrane des fibres musculaires est fragilisée. Cette fragilité s'accompagne d'une dérégulation de l'homéostasie calcique et d'une perturbation de la Nitric oxide synthase et du stress oxydatif à l'origine de la nécrose musculaire, suivie d'une régénération initialement efficace. Avec le temps, il y a un épuisement des précurseurs myogéniques et installation de l'inflammation et de la fibrose. Le tissu musculaire est peu à peu remplacé par du tissu adipeux. Les micro-ARNs sont impliqués dans la plupart des processus physiopathologiques de la DMD, notamment dans la régénération musculaire, la perte de la masse musculaire, la dérégulation du stress oxydatif, l'inflammation et la fibrose.

de la maladie, la souris *mdx* [12]. En revanche, aucune donnée n'a été rapportée sur l'expression tissulaire des miRNAs dans le modèle animal cliniquement pertinent de la maladie, à savoir le chien GRMD.

Nous nous sommes focalisés sur 2 miRNAs : le miR-206 et le miR-486. Le miR-206, décrit comme impliqué dans la régénération musculaire [13], est un myomiR

surexprimé dans les muscles de patients DMD et dans les muscles les plus atteints chez la souris *mdx*. Le miR-486 est un miRNA enrichi dans le muscle qui est sous-exprimé chez le patient DMD et la souris *mdx*. Il joue un rôle dans le maintien de la masse musculaire [14]. Par le travail décrit ici, nous avons documenté l'expression de ces 2 miRNAs dans le muscle du chien GRMD par une analyse quantitative de RT-qPCR complétée d'une exploration tissulaire par hybridation *in situ* avec des sondes LNA.

MATERIELS ET METHODES

Déclaration éthique et animaux

L'étude a été approuvée par le comité d'éthique en expérimentation animale de la région Pays de la Loire, en accord avec les lignes directrices du Conseil National de Recherche pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire (Permis: CEEA.2012.104). Trois chiens GRMD et 5 chiens sains, tous âgés de 9 mois, ont été inclus dans l'étude. Ils proviennent du centre d'élevage du Domaine des Souches (Mézilles, France). Ils ont été hébergés au Centre de thérapie génique et cellulaire de Boisbonne (Oniris, Nantes).

Extraction des miRNAs à partir de muscles canins et RT-qPCR

Les miRNAs sont extraits à partir des muscles biceps fémoraux de chiens sains et de chiens GRMD, avec le kit "mirVana miRNA isolation kit" (Ambion, AM1560) selon les instructions du fabricant. Les miRNAs sont rétrotranscrits en ADNc avec le kit «TaqMan miRNA Reverse Transcription kit» (Applied Biosystems, 4366596) et les amorces «tige-boucle» spécifiques du miR-206 ou miR-486 (Applied Biosystems miRNA assays). La PCR quantitative est réalisée en triplicat avec des amorces et sondes Taqman® spécifiques des miR-206 ou miR-486. Les données sont normalisées avec le contrôle interne U6 snRNA (RNU6B). Le différentiel d'expression est calculé en utilisant la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Hybridation *in situ*

L'HIS est réalisée avec des sondes LNA marquées en 3' et 5' à la digoxigénine, spécifiques du miR-486 (Exiqon, hsa-miR-486, 38596-05) et du miR-206 (Exiqon, hsa-

miR-206, 88081-15). Un contrôle négatif, appelé *scramble*, est hybridé sur chaque prélèvement (Exiqon, *scramble-miR* 99004-05). Il est constitué d'une séquence nucléotidique ne présentant aucune homologie de séquence avec les miRNAs référencés dans miRBase. Il permet d'évaluer le bruit de fond dû à un accrochage non spécifique à la matrice extracellulaire ou à des protéines. Les coupes congelées de muscle de 10 μm d'épaisseur ont été fixées 10 min en paraformaldéhyde 4% (Interchim, 15710). Les tissus ont été perméabilisés à la protéinase K (Sigma, P6556) à 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pendant 10 min. Puis, les coupes ont été recouvertes pendant 1h avec du tampon d'hybridation comprenant 50% de formamide (Sigma, F9037), du SSC 4X (Gibco 15557-044), la solution de Denhardt 1X (Sigma, 30915), l'ADN de sperme de saumon à 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Sigma, D7656) et du Blocking Reagent 1X (Roche, 11096176001). Les sondes LNA ont été hybridées sur les coupes de muscle à une concentration de 50 nM, pendant 16h à 55°C, en chambre humide. Après l'hybridation, un premier lavage stringent composé de formamide 50% et de SSC 1X a été réalisé pendant 30 min, suivi de deux lavages en SSC 0,2X de 15 min chacun. Les lames ont ensuite été incubées en présence d'un anticorps anti-digoxigénine couplé à la phosphatase alcaline (Roche, 11093274910), pendant 2h à température ambiante. Les sondes hybridées ont été visualisées par une coloration bleu violet qui apparaît après ajout du nitro-blue tetrazolium (NBT) et du 5-bromo 5-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) (DAKO, K0598). Enfin, les lames ont été contre-colorées au Nuclear Fast Red (Labvision, TA-125-NF) et montées en milieu Vectamount (Vector Laboratories, H-5000).

Immunomarquage de l'isoforme développemental de la chaîne lourde de myosine

Des coupes de 8 μm d'épaisseur ont été réalisées au cryostat à partir des prélèvements musculaires congelés des chiens sains et GRMD. Les coupes de muscles ont été successivement incubées avec un anticorps primaire dirigé contre la chaîne lourde de la myosine (60 min, 37°C; Novocastra, NCL-MHCd), un anticorps secondaire biotinylé (60 min, 37°C; Dako, E0433) et une streptavidine conjuguée à la peroxydase (60 min, 37°C; Dako, P397). Le diamidinobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Dako, K3468) correspondant au substrat de la peroxydase, a finalement été ajouté.

RESULTATS

Absence de dérégulation du niveau d'expression des miR-206 et miR-486 dans le biceps fémoral du chien GRMD mise en évidence par RT-qPCR

Les niveaux d'expression des miR-206 et miR-486 ont été analysés sur les muscles biceps fémoraux des 5 chiens sains et des 3 chiens GRMD (**Figure 2**). Les données ont été normalisées par rapport à RNU6B qui est le contrôle interne couramment utilisé dans les études d'expression des miRNAs. Le niveau d'expression du miR-206 chez les chiens GRMD est sensiblement identique à celui observé chez les chiens sains. Pour le miR-486, une tendance à la diminution d'un facteur 5 est observée chez les chiens GRMD, néanmoins cette baisse d'expression est non significative d'après le test de Mann-Whitney.

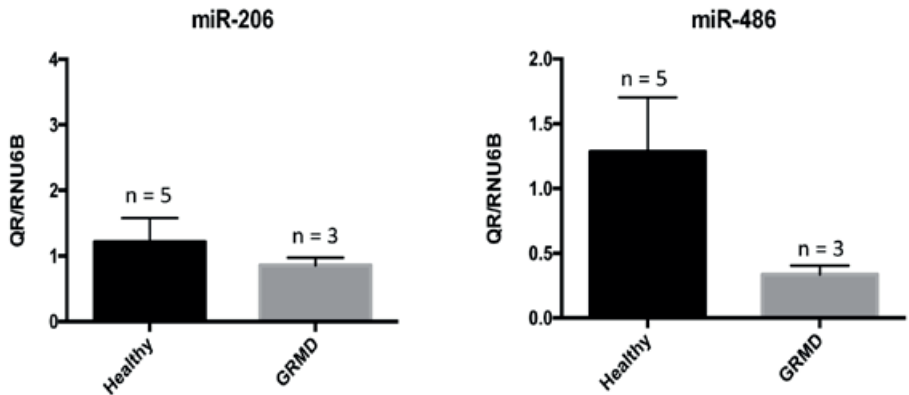


Figure 2 : Analyse quantitative des micro-ARNs dans le muscle de chien. L'expression relative des miR-206 et miR-486 est déterminée dans les biceps fémoraux de chiens sains (n=5) et de chiens GRMD (n=3) par RT-qPCR. Les résultats sont normalisés par rapport à RNU6B et présentés sous forme de moyenne +/- SEM.

Dérégulation du profil d'expression des miR-206 et miR-486 dans le biceps fémoral du chien GRMD

La répartition tissulaire des miR-206 et miR-486 a été effectuée sur les coupes de muscle biceps fémoral par HIS avec les sondes LNA spécifiques de chacun des 2 miRNAs (**Figure 3**). L'HIS mise au point permet de détecter les 2 micro-ARNs d'intérêt et ce avec un bruit de fond très minime. Dans le biceps fémoral des chiens sains, l'HIS révèle une expression des miR-206 et miR-486 dans le cytoplasme

des cellules endothéliales et autour de certains noyaux à la périphérie des fibres musculaires. Chez les chiens GRMD, l'HIS révèle une très forte expression des miR-206 et miR-486 dans les myoblastes et dans certaines fibres musculaires. Un immunomarquage de la myosine développementale réalisée sur des coupes sériées permet de conclure qu'il s'agit principalement de fibres en cours de régénération.

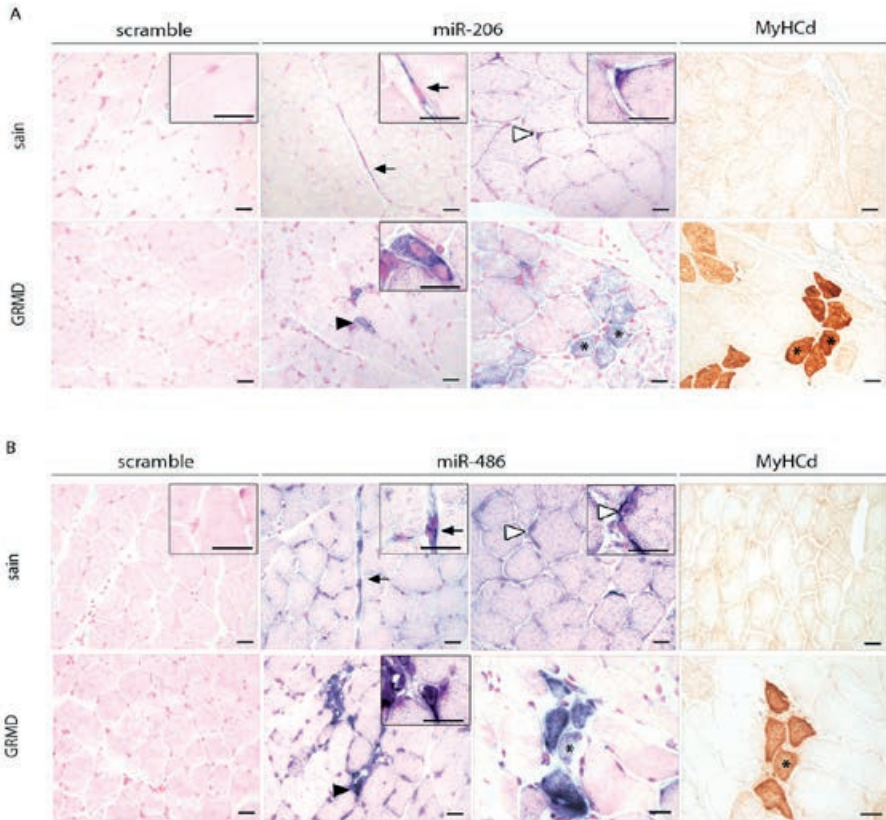


Figure 3 : Exploration tissulaire des miR-206 et miR-486 par hybridation in situ.

A : expression du miR-206. Dans le biceps fémoral du chien sain, le miR-206 est détecté dans le cytoplasme des cellules endothéliales (flèche noire) et autour de noyaux périphériques des fibres musculaires (pointe de flèche vide). Chez le chien GRMD, un fort signal est détecté dans les myoblastes (pointe de flèche noire) et dans les fibres en régénération MyHCd (astérisque).
B : expression du miR-486. Dans le muscle du chien sain, miR-486 est détecté dans les cellules endothéliales (flèche noire) et autour de noyaux périphériques des fibres musculaires (pointe de flèche vide). Dans le muscle du chien GRMD, miR-486 est exprimé dans les myoblastes (pointe de flèche noire) et dans les fibres en régénération (astérisque). Échelle : 25 µm.
 Adaptée de Robriquet et al. (24).

DISCUSSION

La découverte des miRNAs a révolutionné l'étude des mécanismes biologiques, ces derniers étant définis comme des régulateurs importants de l'expression génique. Ces petits ARNs jouent en effet un rôle majeur dans l'état basal de la cellule et de ce fait, leur dérégulation peut être associée à différentes pathologies. De nombreuses études ont démontré un dysfonctionnement de l'expression de certains miRNAs dans les myopathies, notamment dans la dystrophie musculaire de Duchenne [11]. Ces dérégulations ont été décrites chez l'Homme et le modèle murin *mdx*. En revanche, très peu de données ont été rapportées sur le modèle canin de la DMD, le chien GRMD. Pourtant, il s'agit aujourd'hui du seul modèle cliniquement pertinent de la maladie. En effet, bien que la souris *mdx* soit le modèle plus largement utilisé en recherche, sa symptomatologie est très différente de celle de l'Homme puisque seul le diaphragme est fortement atteint. Chez le chien GRMD, l'ensemble des muscles locomoteurs, cardiaques et respiratoires sont touchés. Le phénotype clinique, marqué par une modification précoce de la démarche, une faiblesse musculaire et une atteinte digestive et respiratoire, est très proche de celui de l'Homme. Enfin, sa taille est comparable à celle des jeunes enfants dystrophiques. À ce titre, le chien GRMD est à ce jour le modèle de référence pour les essais précliniques [15]. Une étude de séquençage à haut-débit a démontré dans le sérum des chiens GRMD une dérégulation de l'expression de miRNAs qui ont été évoqués comme de potentiels biomarqueurs pour les patients DMD (16). Néanmoins, aucun profil d'expression tissulaire des miRNAs, pourtant indispensable à la compréhension de la physiopathologie, n'a été établi à ce jour chez le chien GRMD. C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à l'expression de 2 miRNAs dans le muscle de ce modèle : le miR-206 et le miR-486. Nous avons ciblé notre étude sur l'exploration d'un muscle locomoteur, le biceps fémoral, sur lequel des études de transcriptomiques et de protéomiques ont été précédemment menées [17, 18].

Le miR-206 est le plus étudié et le plus caractérisé dans la maladie. Dans le muscle du patient DMD, il est fortement surexprimé [11]. Dans le modèle murin *mdx*, le miR-206 est surexprimé dans le diaphragme correspondant au muscle le plus affecté et sous-exprimé dans les muscles postérieurs [19]. De manière intéressante, notre étude ne révèle pas de dérégulation du niveau d'expression du miR-206 dans le muscle biceps fémoral du chien GRMD. Le miR-486, impliqué dans le maintien

et le développement de la masse musculaire, est décrit comme sous-exprimé chez le patient DMD et la souris *mdx* [11, 12]. Dans le muscle du chien GRMD, nous observons une faible diminution. Afin de compléter ces analyses quantitatives ne mettant pas en évidence de modification du niveau d'expression des 2 miRNAs, nous nous sommes ensuite intéressés à une potentielle dérégulation du profil d'expression par HIS.

En raison de leur nature instable et de leur petite taille, la détection des miRNAs par HIS relève d'un véritable challenge. Par ailleurs, les séquences nucléotidiques de certains miRNAs sont très similaires d'où la nécessité d'utiliser des sondes hautement spécifiques et discriminantes. De nombreuses sondes oligonucléotidiques avec incorporation d'acides nucléiques modifiés ont été développées à cet usage [20]. La plus utilisée actuellement est la sonde LNA. Il s'agit d'une sonde ADN constituée de 30% d'acides nucléiques verrouillés. Ces acides nucléiques LNA contiennent un pont méthylène entre l'hydroxyle en position 2 et le carbone 4 du sucre ce qui bloque l'acide nucléique dans une conformation idéale pour favoriser les liaisons covalentes (**Figure 4**). L'utilisation des sondes LNA permet ainsi d'augmenter l'affinité de liaison avec les nucléotides complémentaires et d'augmenter la spécificité de l'hybridation. Les sondes LNA peuvent être simplement marquées en 3' ou 5' ou bien doublement marquée en 3' et 5' ce qui permet d'augmenter la sensibilité de la détection pour des miRNAs peu abondants. La démarche expérimentale de l'HIS reste similaire à celle d'une hybridation conventionnelle avec des étapes i) de fixation, ii) de perméabilisation à la protéinase K, iii) d'hybridation, et iv) de révélation. Dans notre étude, l'utilisation de ces sondes LNA nous a permis de comparer les profils d'expression des miR-206 et miR-486 dans le muscle biceps fémoral de chiens sains et de chiens GRMD. L'HIS mise au point pour la détection de ces 2 miRNAs est très spécifique, avec un bruit de fond très minime. Chez le chien sain, les miR-206 et miR-486 sont exprimés dans le cytoplasme des cellules endothéliales et autour de certains noyaux à la périphérie des fibres musculaires

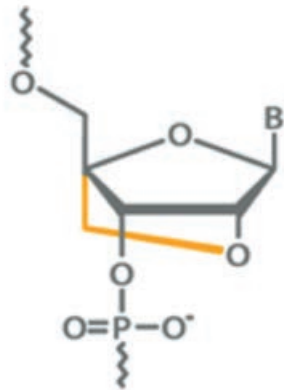


Figure 4 : Structure d'un acide nucléique bloqué (LNA).

Un acide nucléique bloqué est un analogue d'acide nucléique contenant un pont méthylène (ici en orange) entre l'hydroxyle en position 2 et l'atome de carbone 4 du sucre.

qui semblent être des cellules satellites. L'identification de ces cellules n'a pas pu être confirmée par des marquages spécifiques du fait d'une difficulté à mettre au point l'immunomarquage sur du tissu canin, et reste encore à valider. Aucun phénotypage cellulaire de l'expression de ces 2 miR n'a été documentée chez l'Homme et la souris. Néanmoins, de nombreux travaux relatent l'implication des miR-206 et miR-486 dans la différenciation des cellules satellites ce qui justifierait une telle localisation [21, 22].

Chez le chien GRMD, nous démontrons une expression préférentielle de ces 2 miRNAs dans les fibres régénérées, comme l'atteste le marquage avec la myosine développementale. Si aujourd'hui aucune étude ne renseigne sur la localisation cellulaire du miR-486 dans le muscle du patient DMD ou de la souris *mdx*, l'expression du miR-206 est quand à elle bien décrite chez la souris *mdx* et corrobore avec le marquage que nous obtenons chez le chien GRMD [23] (**Tableau 1**).

		Patient DMD	souris <i>mdx</i>	chien GRMD
miR-206	niveau d'expression	↗ Quadriceps ↗ Biceps fémoral	↗ Diaphragme ↗ Tibial antérieur ↘ Gastrocnémien ↘ soleus ↘ muscle plantaire	pas de dérégulation dans le biceps fémoral
	localisation	ND	fibres en régénération	fibres en régénération
miR-486	niveau d'expression	↘ Quadriceps ↘ Biceps fémoral	↘ Diaphragme ↘ Tibial antérieur	↘ Biceps fémoral

Tableau 1 : Comparaison de l'expression et de la localisation des miR-206 et miR-486 chez le patient DMD, la souris *mdx* et le chien GRMD. ND : non documenté

CONCLUSION

Alors que l'analyse quantitative par RT-qPCR ne révèle aucune différence statistiquement significative de l'expression globale tissulaire des miR-206 et miR-486 dans le muscle du chien GRMD comparé à un muscle de chien sain, l'HIS avec utilisation de sondes LNA démontre des profils d'expression bien distincts au niveau cellulaire avec une très forte expression dans les myoblastes et les fibres en régénération chez le chien dystrophique.

REMERCIEMENTS

L'auteur remercie l'ensemble du personnel du centre de Boisbonne pour les soins apportés aux animaux, Mireille Ledevin et Hélicia Goubin de l'UMR703 pour leur aide technique, Thibaut Larcher pour son expertise en anapathologie, Laetitia Guével, Karl Rouger et Marie-Anne Colle pour leurs conseils avisés pour la rédaction de cet article.

Les travaux cités dans cet article ont reçu le soutien de l'IHU-Cesti et du FEDER (Fonds Européens de Développement Régional N°37,085)

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. SU Z, YANG Z, XU Y, CHEN Y and YU Q : MicroRNAs in apoptosis, autophagy and necroptosis. *Oncotarget.*, 2015, **6** (11), 8474-8490.
2. ONG S, WON HEE L, KODO K and WU JC : MicroRNA-mediated regulation of differentiation and trans-differentiation in stem cells. *Adv Drug Deliv Rev.*, 2015, **88**, 3-15.
3. NEILSON J, ZHENG G, BURGE C and SHARP P : Dynamic regulation of miRNA expression in ordered stages of cellular development. *Gene Dev.*, 2007, **21** (5), 578-589.
4. CURI R, KIM T, FASSAN M, MENG W, SUN HL, JEON YJ, VICENTINI C, TILI E, PENG Y, SCARPA A, LIANG G, ZHANG YK, CHAKRAVARTI A and CROCE CM : Micro-RNA-224 is implicated in lung cancer pathogenesis through targeting caspase-3 and caspase 7. *Oncotarget.*, 2015, **6** (26), 21802-21815.
5. FEMMINELLA G, FERRARA N and RENGO G : The emerging role of microRNAs in Alzheimer's disease. *Front Physiol.*, 2015, **6**, 40.
6. ERRIQUEZ D, PERINI G and FERLINI A : Non-coding RNAs in muscle dystrophies. *Int J Mol Sci.*, 2013, **23** (10), 3335-3346.
7. LUI CG, CALIN GA, VOLINIA S and CROCE CM : MicroRNA expression profiling using microarrays. *Nat Protoc.*, 2008, **14**, 19681-19704.
8. CHEN C, RIDZON D, BROOMER A, ZHOU Z, LEE D, NGUYEN J, BARBISIN M, XU N, MAHUVAKAR V, ANDERSEN M, LAO K, LIVAK K and GUEGLER K : Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, 2005, **33**(20), e179.

9. SONG R, RO S and YAN W : *In situ* hybridization detection of microRNAs. *Methods Mol Biol.*, 2010, **629**, 287-294.
10. THOMSEN R, NIELSEN P and JENSEN T : Dramatically improved RNA *in situ* hybridization signals using LNA-modified probes. *RNA.*, 2005, **11** (11), 1745-1748.
11. GRECO S, DE SIMONE M, COLUSSI C, ZACCAGNINI G, FASANARO P, PESCATORI M, CARDANI R, PERBELLINI R, ISAIA E, SALE P, MEOLA G, CAPOGROSSI MC, GAETANO C and MARTELLI F : Common micro-RNA signature in skeletal muscle damage and regeneration induced by Duchenne muscular dystrophy and acute ischemia. *FASEB.*, 2009, **23** (10), 3335-3346.
12. ROBERTS TC, JOHANSSON HJ, McCLOREY G, BLOMBERG KE, COURSENDER T, GAIT MJ, SMITH CI, LEHTIO J, EL ANDALOUSSI S and WOOD MJ : Multi-level omics analysis in a murine model of dystrophin loss and therapeutic restoration. *Hum Mol Genet.*, 2015, **24** (23), 6756-6768.
13. LIU N, WILLIAMS A, MAXEINER J, BEZPROZVANNAYA S, SHELTON J, RICHARDSON J, BASSEL-DUBY R and OLSON E : microRNA-206 promotes skeletal muscle regeneration and delays progression of Duchenne muscular dystrophy in mice. *J Clin Invest.*, 2012, **122** (6), 2054-2065.
14. HITACHI K, NAKATANI M and TSUCHIDA K : Myostatin signaling regulates Akt activity via the regulation of miR-486 expression. *Int J biochem Cell Biol.*, 2014, **47**, 93-103.
15. KORNEGAY JN : The Golden Retriever model of Duchenne muscular dystrophy. *Skelet Muscle.*, 2017, **7** (1), 9.
16. JEANSON-LEH L, LAMETH J, KRIMINI S, BUISSET J, AMOR F, LE GUINER C, BARTHELEMY I, SERVAIS L, BLOT S, VOIT T and ISRAELI D : Serum profiling identifies novel muscle miRNA and cardiomyopathy-related miRNA biomarkers in Golden Retriever Muscular Dystrophy Dogs and Duchenne Muscular Dystrophy patients. *Am J Pathol.*, 2014, **184** (11), 2885-2898.
17. ROBRIQUET F, LARDENOIS A, BABARIT C, LARCHER T, DUBREIL L, LEROUX I, ZUBER C, LEDEVIN M, DESCHAMPS J, FROMES Y, CHEREL Y, GUEVEL L, ROUGER K. Differential gene expression profiling of dystrophic dog muscle after MuStem cell transplantation. *Plos ONE.*, 2015, **10** (5) e0123336.
18. LARDENOIS A, JAGOT S, LAGARRIGUE M , GUEVEL B , LEDEVIN M , LARCHER T, DUBREIL L, PINEAU C, ROUGER K GUEVEL L: Quantitative proteome profiling of dystrophic dog skeletal muscle reveals a stabilized muscular architecture and protection against oxidative stress after systemic delivery of MuStem cells. *Proteomics.*, 2016, **16** (4), 2028-2042.

19. McCARTHY JJ, ESSER K and ANDRADE FH : microRNA-206 is overexpressed in the diaphragm but not the hindlimb muscle of mdx mouse. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 2007, **293**, C451-C457.
20. URBANEK MO, NAWROCKA AU and KRZYZOSIAK WJ. : Small RNA detection by *in situ* hybridization methods. *Int J Mol Sci.*, 2015, **16** (6), 13259-13286.
21. CHEN JF, TAO Y, LI J, DENG Z, YAN Z, XIAO X, WANG DZ: microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7. *J Cell Biol.*, 2010, **190**(5): 867–879.
22. DEY B, GAGAN J, and DUTTA A: miR-206 and -486 induce myoblast differentiation by downregulating Pax7. , 2011, **31**(1): 203-14.
23. YUASA K, HAGIWARA Y, ANDO M, NAKUMARA A, TAKEDA S and HIJIKATA T: MicroRNA-206 is highly expressed in newly formed muscle fibers: implications regarding potential for muscle regeneration and maturation in muscular dystrophy. *Cell Struct Funct.*, 2008, **33**, 163-169.
24. ROBRIQUET F, BABARIT C, LARCHER T, DUBREIL L, LEDEVIN M, GOUBIN H, ROUGER K and GUEVEL L: Identification in GRMD dog muscle of critical miRNAs involved in pathophysiology and effects associated with MuStem cell transplantation. *BMC MusculoSkelet Disord.*, 2016, **17**, 209.