

Formation du muscle, cellules souches et régénération musculaire

Jory, A.¹, Cousin, X.^{2,3,*}, Tajbakhsh, S.¹

¹ Institut Pasteur, Cellules souches et développement, CNRS URA 2578, Paris 75015

² INRA, UR1037, Station commune de Recherches en Ichtyophysiologie, Biodiversité et Environnement, Physiologie Animale et Systèmes d'Élevage, Ecologie des Forêts, Prairies et milieux Aquatiques, Centre de recherche de Rennes, RENNES CEDEX, 35042

³ IFREMER, Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer, L'Hourmeau 17137

*: Corresponding author : Cousin X., email address : Xavier.Cousin@ifremer.fr

Résumé:

Après la récente identification des cellules souches du muscle squelettique, on commence à étudier les mécanismes de régulation génique impliqués dans leur autorenouvellement et leur différenciation. La recherche fondamentale portant sur ces types de cellules, ainsi que sur la formation des muscles offre de nouvelles perspectives de thérapies en réponse à une importante question de santé publique.

Quels sont les mécanismes moléculaires et cellulaires qui conduisent à la formation des muscles squelettiques du tronc et des membres chez les vertébrés à partir des somites ? Un modèle de lignage myogénique est représenté sur la figure 1. Les progéniteurs musculaires (MPC, muscle progenitor cell) proviendraient d'une cellule ancestrale souche exprimant les facteurs de transcription à homéodomaine Pax3 et/ou Pax7. Le progéniteur musculaire est la cellule non-différenciée ayant activé les gènes d'identité tels que Myf5, Mrf4 (myogenic regulatory factor 4), MyoD, dits de « détermination myogénique » (1). Les souris mutées pour ces trois gènes sont totalement dépourvues de muscle squelettique (2). Au cours de la vie, on observe au moins trois programmes myogéniques distincts : la myogenèse embryonnaire, foetale et adulte. Cependant, de manière surprenante, un nombre restreint de cellules souches embryonnaires assure la mise en place d'une musculature adulte fonctionnelle composée de plusieurs millions de cellules différenciées. Ceci démontre l'extraordinaire capacité d'autorenouvellement de ces cellules au cours du développement et suppose une régulation fine des choix de destins cellulaires au cours de la progression du lignage.

Les muscles du tronc et des membres dérivent des somites

Le somite est une structure embryonnaire qui résulte de la segmentation régulière et progressive du mésoderme présomitique (PSM) (figure 1). Chez les vertébrés, un somite mature est composé de plusieurs compartiments (figure 3A, B). Le myotome, premier muscle détecté chez l'embryon, est adjacent au sclérotome, à l'origine du squelette axial et des côtes. Dorsalement, un épithélium : le dermomyotome (DM), qui participe à la formation des muscles du corps, et de quelques muscles de la tête. Plus tard, un troisième compartiment, le syndétome à l'origine des tendons, s'intercale entre le myotome et le sclérotome. Le DM héberge également d'autres progéniteurs, tels que ceux du derme dorsal et des cellules endothéliales. Les mécanismes assurant la sortie de divers types cellulaires à partir de cette structure sont encore mal connus.

L'action des facteurs Hedgehog, Fgf et Wnt au cours de la myogenèse

Les compartiments somitiques sont globalement conservés entre les amniotes (poulet, souris, homme) et les poissons. Il en est de même pour les signaux qui contrôlent leur différenciation. Les structures axiales émettent des facteurs de la famille Hedgehog (Hh). Ces derniers participent à la mise en place d'un équilibre entre la prolifération et la différenciation des

précurseurs musculaires en fonction de leur proximité de la source de Hh et donc en fonction de l'intensité du signal reçu. Curieusement, chez le poisson zèbre, une forte concentration de Hh intervient initialement dans l'activation des cellules immédiatement apposées aux structures axiales, les cellules adaxiales, qui constituent les précurseurs des fibres lentes. Les facteurs de la famille des Fgf (*fibroblast growth factor*), initialement décrits comme régulant la prolifération cellulaire, interviennent également dans le contrôle des processus de différenciation, en particulier dans le somite. Ainsi, chez le poisson zèbre, la synthèse locale d'acide rétinoïque (le dérivé actif de la vitamine A) dans le PSM et le somite active l'expression de *Fgf8*, qui à son tour active l'expression de *MyoD* et donc la différenciation musculaire dans le somite (3). Les facteurs Hh et *Fgf8* interviennent également dans le contrôle de la formation du dermomyotome (4).

Plusieurs membres de la famille Wnt interviennent à différents niveaux au cours du processus de myogenèse. De nombreux Wnt sécrétés par le tube neural vont promouvoir la détermination et la différenciation des précurseurs musculaires dans le dermomyotome adjacent. Plus récemment d'autres rôles ont été démontrés pour les Wnt. Ainsi, le facteur Wnt5b, exprimé dans le mésoderme présomitique, active l'expression de *MyoD* dans les somites en cours de formation (5). Plus tardivement, Wnt6, sécrété par l'ectoderme dorsal, contrôle *via* le facteur de transcription Paraxis le maintien de la structure épithéliale du dermomyotome, indispensable au bon déroulement de la myogenèse (6).

Une cascade de signaux dans la formation des membres

Au cours du développement, les membres se forment à partir du mésoderme de la plaque latérale. La croissance des bourgeons de membres est contrôlée par une région de l'ectoderme, l'AER (*apical ectodermal ridge*) qui exprime les facteurs *Fgf4* et *Fgf8*. Le processus qui conduit à la colonisation des membres par des masses musculaires implique la succession de plusieurs étapes : délamination du dermomyotome, migration, prolifération et différenciation. Des expériences de greffe ont montré que les cellules du domaine ventral du dermomyotome peuvent coloniser les membres ; cependant, seules les cellules situées au niveau de l'AER migrent effectivement, ce qui démontre la nécessité de signaux en provenance de l'AER. Les facteurs Fgf produits par l'AER activent l'expression du ligand SF/HGF (*scatter factor/hepatocyte growth factor*) dans le mésoderme latéral au niveau des bourgeons de membres. La réception du signal SF/HGF par le récepteur Met, exprimé par les cellules du dermomyotome ventral, induit leur migration vers le bourgeon de membre. Récemment, un autre signal local a été identifié : le ligand SDF1, exprimé dans le mésenchyme des membres. CXCR4, le récepteur de SDF1, est exprimé transitoirement par les progéniteurs musculaires en migration. Chez des souris invalidées génétiquement pour *CXCR4*, le nombre de cellules en migration est réduit et celui de cellules en apoptose est augmenté (7). Ces gènes sont par ailleurs réactivés au cours de la myogenèse adulte.

Plusieurs types de progéniteurs au sein du dermomyotome

Pour les membres, les cellules souches provenant du dermomyotome établissent les muscles et assurent leur croissance. Une population équivalente va naître le long de l'axe antéro-postérieur au sein des somites pour établir les muscles du tronc : chez le poulet et la souris, une partie des cellules Pax3+/Pax7+ provenant du dermomyotome central constitue le *pool* de cellules souches assurant la croissance musculaire embryonnaire, foetale et adulte, et serait à l'origine des cellules satellites, progéniteurs du muscle adulte (8 à 11). Par ailleurs, ces cellules souches Pax3+/Pax7+ donneraient naissance à des progéniteurs plus engagés dans la myogenèse et distinguables par une expression différentielle des gènes de déterminations myogéniques au cours du développement (9) (figure 1). La voie de signalisation Notch, qui joue un rôle clé dans le développement, agit également à cette étape critique pour réguler

l'auto-renouvellement et la différenciation de la population Pax3/Pax7 au niveau du tronc et des membres (12, 13).

L'importance de ces données soulève un objectif majeur de recherche qui est de pouvoir caractériser la progression d'un lignage au cours du développement en identifiant les différents « états cellulaires » au sein de ce lignage et ainsi distinguer les progéniteurs de leurs descendants plus engagés dans la voie de différenciation.

Un parallèle entre poissons et vertébrés supérieurs

Jusqu'à présent la présence d'un dermomyotome était discutée chez les poissons. Ceci étant, des travaux récents ont montré que la partie antérieure du somite contient des progéniteurs musculaires exprimant *Pax7*. Par rotation naturelle du somite, ces cellules vont se retrouver en bordure externe de ce dernier (figure 3C'). Cette rotation est contrôlée par les facteurs SDF1 et CXCR4, établissant un parallèle intéressant entre la migration des progéniteurs musculaires dans le dermomyotome des poissons et dans les membres des amniotes (14). Par la suite, une partie des cellules restées externes vont coloniser le myotome en continuant à exprimer *Pax7* et *Met*, ce qui suggère qu'il pourrait s'agir de précurseurs homologues aux cellules satellites identifiées chez les amniotes (figure 3D).

La cellule satellite : cellule souche musculaire adulte ?

Des études récentes ont mis en évidence des cellules souches non musculaires capables de participer à la régénération du muscle (15). Mais la plupart de ces cellules se révèlent en fait avoir un potentiel de régénération fonctionnelle très peu efficace. La cellule satellite est donc aujourd'hui définie comme le progéniteur musculaire principal chez l'adulte. Les cellules satellites dérivent de cellules souches embryonnaires provenant du somite. Elles apparaissent en fin de myogenèse foetale et se positionnent sur la fibre sous la membrane basale (figures 1 et 2). Au repos, les cellules satellites adultes expriment *Pax7* et sont dans un état quiescent, c'est-à-dire en arrêt mitotique. Elles réceptionnent et intègrent les signaux provenant du microenvironnement qui les entoure, aussi appelé « niche ».

Lors d'un stress musculaire tel qu'un effort physique important conduisant à une hypertrophie musculaire, ou lors de lésions musculaires, la cellule satellite va passer du stade quiescent à un stade activé et exprimer *Myf5* et *MyoD* afin de produire des myoblastes qui vont fusionner à la fibre musculaire (figure 2). Certaines maladies telles que les myopathies (par exemple la myopathie de Duchenne due à une mutation dans un gène de structure de la fibre musculaire, qui code la dystrophine) miment une lésion musculaire chronique, et recrutent en permanence les cellules satellites jusqu'à un épuisement total.

Pax7 et MyoD, des gènes clés

Des résultats récents donnent des indications sur les mécanismes qui permettent l'autorenouvellement des cellules satellites et ouvrent des perspectives thérapeutiques intéressantes. En effet, un mécanisme permettant d'expliquer à la fois le potentiel de régénération musculaire et la préservation du *pool* de cellules satellites pourrait être celui de la division asymétrique. Des données récentes suggèrent que les divisions symétriques seraient orientées parallèlement à l'axe longitudinal de la fibre alors que les divisions asymétriques seraient orientées perpendiculairement à cet axe : une des cellules filles serait alors engagée vers la différenciation en exprimant *Myf5* ou *MyoD* et la deuxième cellule donnerait une cellule satellite Pax7+ en assurant ainsi son autorenouvellement au sein de la niche (figure 2) (16).

Ces résultats démontrent que *Pax7* et *MyoD* jouent un rôle crucial dans le contrôle du choix de destin cellulaire pendant la croissance et au moment de la régénération musculaire.

Certaines données suggèrent que *Pax7* jouerait aussi un rôle dans la survie cellulaire et aurait des propriétés anti-apoptotiques (9, 17).

Toutefois les événements qui régulent l'expression de ces deux gènes et leur influence sur l'identité cellulaire sont encore mal connus.

L'action nuancée de Numb

Comme chez l'embryon, la voie de signalisation Notch joue un rôle dans la différenciation des cellules satellites. Lors de la myogenèse adulte, il est suggéré que l'inhibition de Notch par l'antagoniste Numb favorise la différenciation cellulaire. Toutefois, le rôle de Numb reste controversé car seulement quelques cellules exprimant Numb se différencient. Ceci révèle la possibilité que l'action de ces deux molécules soit dépendante du contexte environnemental et cellulaire. Par ailleurs, comme il a été montré dans de nombreux lignages chez la drosophile, Numb peut ségréger de manière asymétrique lors de divisions de cellules satellites murines (18, 19).

En plus de poursuivre la caractérisation du mécanisme moléculaire qui contrôle la division asymétrique (Notch/Numb ou un autre mécanisme), il sera également important d'identifier les mécanismes qui orientent la division des cellules satellites vers un mode ou un autre lors de l'autorenouvellement et la production de myoblastes.

Les cellules satellites et la régénération musculaire

Ces dernières années, des techniques sophistiquées de transplantations musculaires de quelques cellules satellites ou d'une fibre musculaire isolée ont permis des avancées majeures dans la compréhension de l'autorenouvellement de la cellule satellite et dans sa contribution à la réparation du muscle receveur (20).

Ces résultats montrent non seulement la force d'autorenouvellement de la cellule satellite mais aussi sa capacité à retrouver sa position « satellite » et à repeupler la niche (16). De plus, ils ont révélé que les cellules satellites constituent une population hétérogène ; notamment, des travaux récents soulignent la présence de deux populations discernables par leur capacité à coloniser la niche après transplantation. Cependant, la transplantation de cellules satellites ne donne pas encore de résultat satisfaisant quant à la reconstitution de la force fonctionnelle des fibres musculaires. En revanche, les mesoangioblastes, qui représentent probablement une population de péricytes (cellules adjacentes aux vaisseaux sanguins), démontrent un potentiel fortement régénératif pour le muscle (21). À la différence des cellules satellites, les mesoangioblastes peuvent traverser les vaisseaux et sont donc de bons candidats pour la distribution de cellules par la voie systémique. Ceci est une considération importante au regard des stratégies thérapeutiques des myopathies.

De manière intéressante, bien que le nombre de cellules satellites diminue avec l'âge, des expériences de transplantations de « vieilles » cellules satellites dans des « jeunes » souris montrent que ces « vieilles » cellules ne perdent pas leur capacité régénérative (15). Un défi majeur est d'identifier et de caractériser les sous-fractions de cellules satellites qui sont maintenues dans un état souche (16, 22). Cette hétérogénéité fonctionnelle au sein de la population satellite est soutenue par des observations récentes qui montrent que dans certaines cellules satellites les brins matrice d'ADN co-ségrègent dans une seule des cellules filles pendant la division cellulaire. Ces données sont en accord avec l'hypothèse de Cairns émise il y a une trentaine d'années et qui stipule que les cellules souches protègeraient leur ADN de l'incorporation d'erreurs survenant lors de la réplication via une ségrégation des brins d'ADN matrice dans la cellule « mère » au cours de chaque cycle de division cellulaire successif, permettant ainsi la protection du « patrimoine génétique » souche (23).

Ces observations de ségrégation asymétrique de brins d'ADN matrice pourraient trouver une explication alternative : elles peuvent révéler un mécanisme épigénétique contrôlant des loci

activés et inactivés. La cellule satellite qui aurait ses gènes de différenciation réprimés serait ainsi marquée épigénétiquement (19) (voir encadré ADN immortel). Si ce modèle s'avère vrai, il pourrait avoir un grand impact dans le domaine de la biologie des cellules souches et la compréhension de la tumorigenèse.

Identités et rôles des cellules souches

Qu'est-ce qu'une cellule souche ? En prenant le muscle squelettique comme modèle, cette entité cellulaire commence à être finement caractérisée. Plus on pourra attribuer de propriétés uniques et précises à cette cellule énigmatique, plus on parviendra à l'isoler de ses descendants cellulaires directs au sein d'un tissu donné. Cette caractérisation extensive des cellules souches est indispensable à leur bonne manipulation dans le contexte thérapeutique. D'un point de vue plus fondamental, il est crucial de pouvoir approfondir nos connaissances sur les régulations d'épistasies génétiques au cours de la myogenèse ainsi que sur les voies de signalisation et sur les mouvements morphogénétiques responsables de la bonne mise en place du muscle au cours du développement. Comme le décrivent les recherches décrites ici, c'est en s'appuyant sur les différents organismes modèles que nous pouvons étudier ces aspects de la myogenèse *in vivo*, dans un contexte développemental normal, afin de pouvoir mieux comprendre et appréhender les différents mécanismes associés à des pathologies ou à des dégénérescences tissulaires.

Figure 1 : Myogenèse chez la souris

Figure 2 : Régénération musculaire chez la souris

Figure 3 : Myogenèse embryonnaire et mouvements cellulaires somitiques

A, B, C, D : Coupes transversales au niveau des somites montrant une moitié de l'embryon.
C' : *Coupe selon les pointillés jaunes indiqués dans C. L'âge des embryons est indiqué à côté de chaque figure. Les migrations cellulaires sont indiquées par les flèches.

Encadré 1 - L'ADN immortel

Il est suggéré que les cellules souches se divisent lentement au sein de leur niche. Pour mieux les identifier et les caractériser, des analogues de nucléotides ont été utilisés pour marquer l'ADN neo-synthétisé. Dans ce contexte, les cellules souches vont ainsi garder le marquage tandis que leurs descendantes le perdent après division et ségrégation aléatoire de leurs brins d'ADN. Ces expériences ont conduit, en 1975, J. Cairns à proposer que les cellules souches gardent les brins matrices (parentaux) d'ADN, et donc préservent l'ADN original, dit « immortel », tandis que la cellule qui entre dans la cascade de différenciation hérite les brins neo-synthétisés qui accumulent les erreurs pendant le processus de réplication de l'ADN. Ceci suggère donc que les cellules souches pourraient retenir le marquage en se divisant dans la niche. Toutefois, il est également possible que ce phénomène de ségrégation sélective des brins d'ADN dans une des cellules filles après la division cellulaire reflète une signature épigénétique de l'état chromatinien, distinct dans la cellule plus souche de celle qui va se différencier.

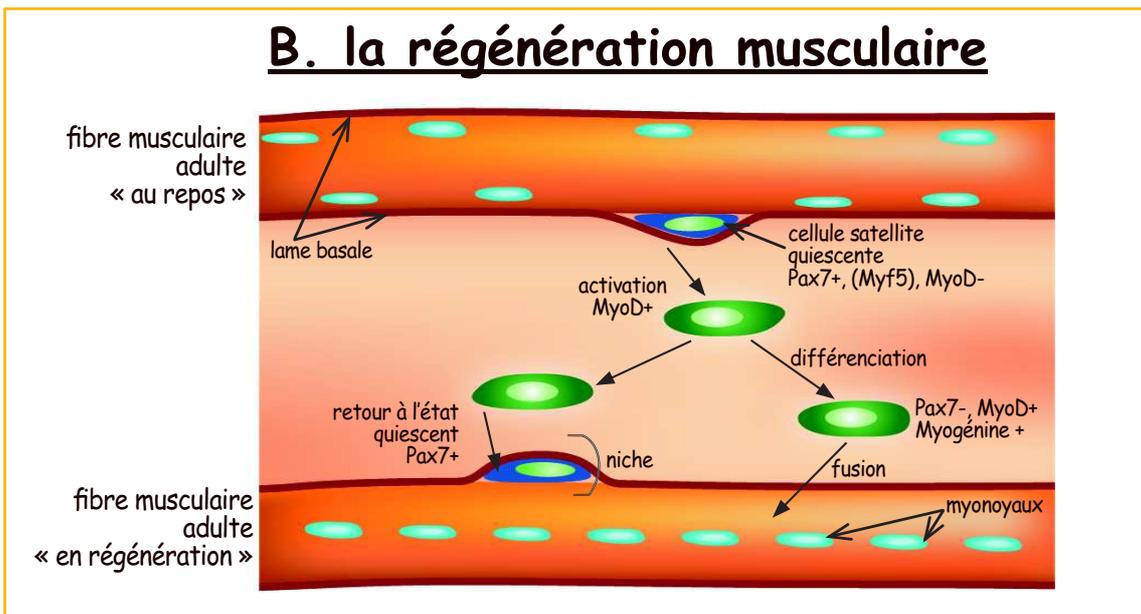
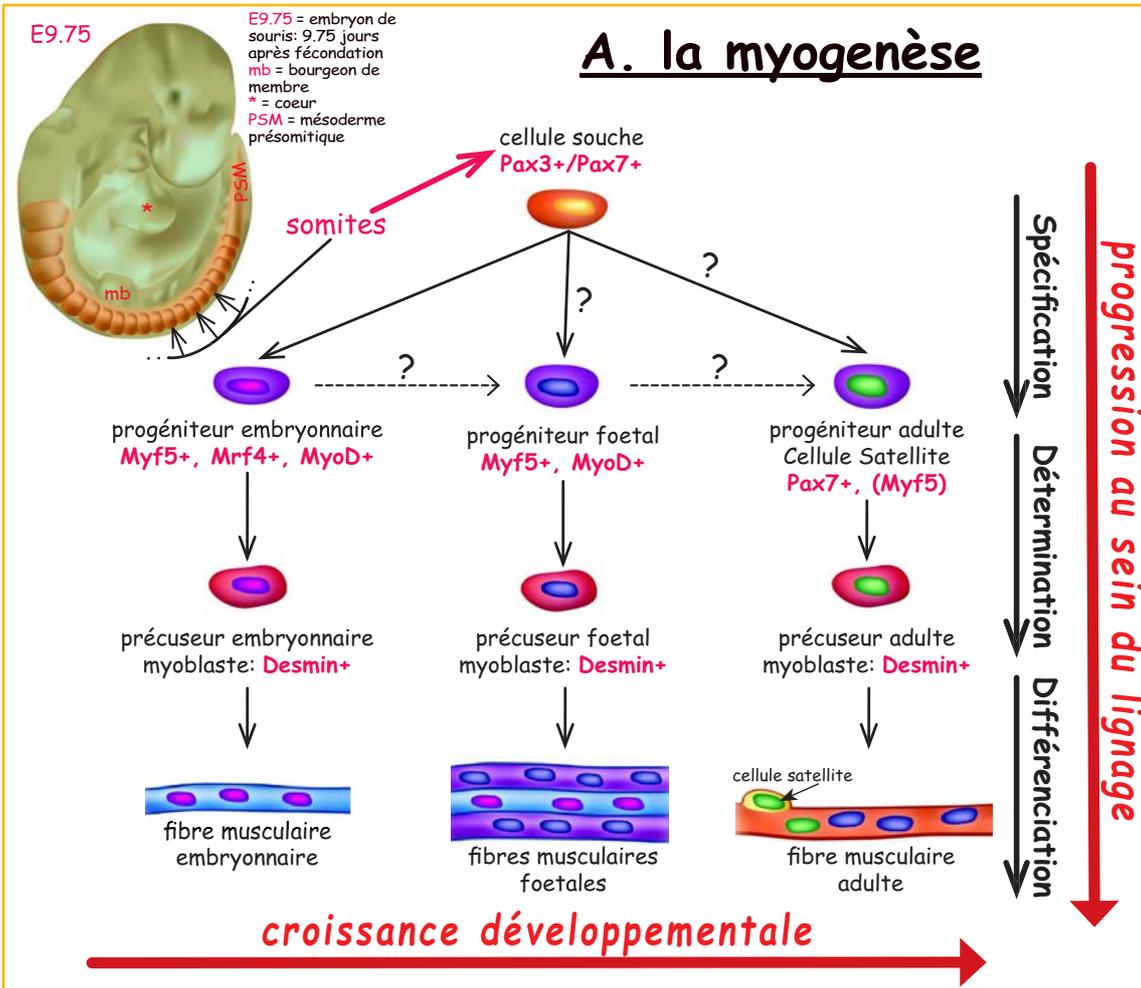
Encadré 2 - Myostatine, de l'agronomie à la médecine

Les races à viande ont été sélectionnées depuis longtemps pour leur masse musculaire importante. Chez plusieurs races d'animaux d'élevage, le gène codant la myostatine, un régulateur négatif de la croissance musculaire, est muté et l'activité de la protéine est réduite ou abolie ce qui entraîne une prolifération plus importante des cellules musculaires et une hypertrophie. Dans plusieurs situations pathologiques chez l'homme, une élévation du niveau de myostatine dans le muscle est associée à une diminution de la masse musculaire (24). De ces observations, est née l'idée qu'une inhibition de l'activité de myostatine pourrait

contribuer au renforcement de la masse musculaire. Des expériences en ce sens ont été réalisées chez la souris Mdx (modèle murin de la myopathie de Duchenne) et on conduit à la fois à un accroissement de la masse et de la force musculaire. De même, des approches de thérapies cellulaires combinant l'injection de myoblastes contenant à la fois une dystrophine fonctionnelle et une forme dominante-négative d'un récepteur de la myostatine montrent une amélioration du rendement de cette approche. Un essai clinique est actuellement en cours utilisant un anticorps neutralisant la myostatine chez des patients atteints de myopathies (25).

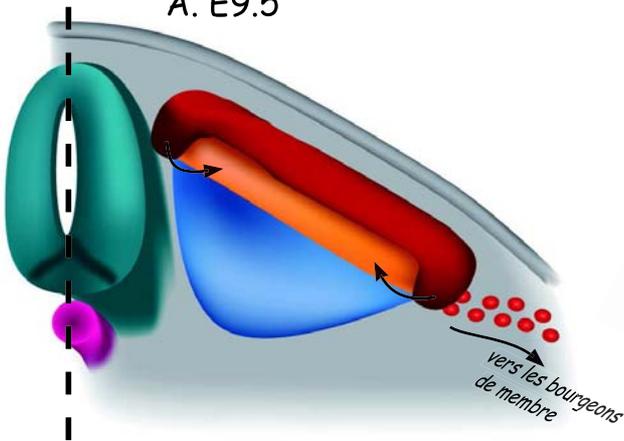
Références bibliographiques

- (1) Tajbakhsh S (2005) *Exp Cell Res* 306 (2), 364-72
- (2) Kassar-Duchossoy L *et al.* (2004) *Nature* 431 (7007), 466-71
- (3) Hamade A *et al.* (2006) *Dev Biol* 289 (1), 127-40
- (4) Hammond CL *et al.* (2007) *Dev Biol* 302 (2), 504-21
- (5) Linker C *et al.* (2003) *Development* 130 (20), 4797-807
- (6) Linker C *et al.* (2005) *Development* 132 (17), 3895-905
- (7) Vasyutina E *et al.* (2005) *Genes Dev* 19 (18), 2187-98
- (8) Ben-Yair R, Kalcheim C (2005) *Development* 132 (4), 689-701
- (9) Kassar-Duchossoy L *et al.* (2005) *Genes Dev* 19 (12), 1426-31
- (10) Relaix F *et al.* (2005) *Nature* 435 (7044), 948-53
- (11) Gros J *et al.* (2005) *Nature* 435 (7044), 954-8
- (12) Vasyutina E *et al.* (2007) *Proc Natl Acad Sci USA* 104 (11), 4443-8
- (13) Schuster-Gossler K *et al.* (2007) *Proc Natl Acad Sci USA* 104 (2), 537-42
- (14) Hollway GE *et al.* (2007) *Dev Cell* 12 (2), 207-19
- (15) Zammit PS *et al.* (2006) *J Histochem Cytochem* 54, 1177-91
- (16) Kuang S *et al.* (2007) *Cell* 129 (5), 999-1010
- (17) Relaix F *et al.* (2006) *J Cell Biol* 172 (1), 91-102
- (18) Conboy IM, Rando TA (2002) *Dev Cell* 3 (3), 397-409
- (19) Shinin V *et al.* (2006) *Nat Cell Biol* 8 (7), 677-82
- (20) Collins CA *et al.* (2005) *Cell* 122 (2), 289-301
- (21) Sampaolesi M *et al.* (2006) *Nature* 444 (7119), 574-9
- (22) Cossu G, Tajbakhsh S (2007) *Cell* 129(5), 859-861
- (23) Cairns J (1975) *Nature* 255 (5505), 197-200
- (24) Lee SJ, McPherron AC (1999) *Curr Opin Genet Dev* 9(5), 604-7
- (25) Carnac G *et al.* (2006) *Mini Rev Med Chem* 6 (7), 765-70

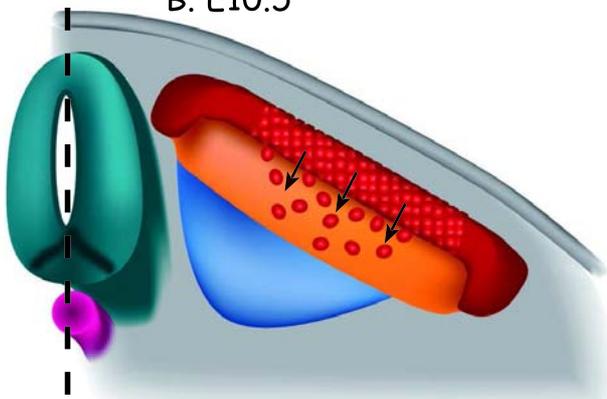


myogenèse embryonnaire chez
la souris

A. E9.5

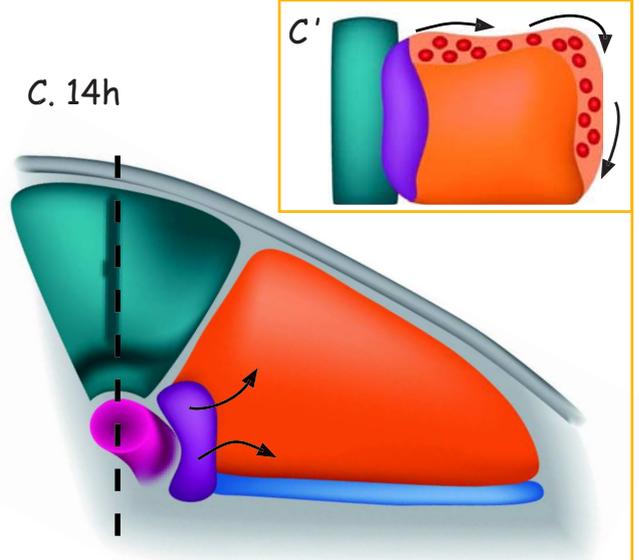


B. E10.5

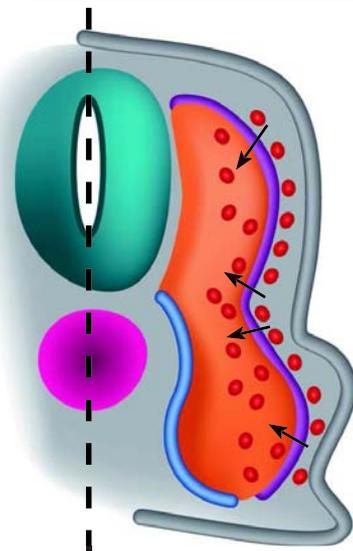


myogenèse embryonnaire chez
le poisson zèbre

C. 14h



D. 24h



dorsal

ventral

dorsal

ventral

axe de
symétrie
axiale

ectoderme

tube neural

sclerotome

cellules adaxiales

dermomyotome

notochorde

myotome

progéniteurs musculaires