

Université de Sherbrooke

Influence de l'environnement biochimique et biomécanique sur les cellules souches du muscle squelettique

par
Frédéric Trenzsz
Programme de biologie cellulaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.) en biologie cellulaire

Sherbrooke, Québec, Canada
Juin 2013

Membres du jury d'évaluation:

Pr Guillaume GRENIER, département de chirurgie
Pr François BOUDREAU, département d'anatomie et biologie cellulaire
Pr Fernand-Pierre GENDRON, département d'anatomie et biologie cellulaire
Pr Pedro Miguel GERALDES, département de médecine
Pre Julie FRADETTE, département de chirurgie, faculté de médecine, Université Laval

© Frederic Trenzsz, 2013



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-499-00432-1

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-499-00432-1

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

Résumé

La réparation du muscle squelettique est possible grâce aux cellules satellites et aux cellules stromales résidentes (mrSC), responsables de la régénération myogénique et du remodelage de la matrice extracellulaire (MEC) respectivement. Le maintien à l'état quiescent et la différenciation de ces cellules sont finement régulés par les signaux provenant de leur microenvironnement, aussi appelé niche. Nous avons posé l'HYPOTHÈSE selon laquelle les altérations de ce microenvironnement se répercutent sur le comportement des cellules progénitrices et modulent leur capacité à régénérer le muscle squelettique.

Le muscle âgé est caractérisé par la présence de tissu adipeux, une accumulation excessive de MEC (fibrose) ainsi qu'un faible potentiel régénératif. Nous avons donc caractérisé les cellules progénitrices présentes dans le muscle âgé. Nos résultats montrent que les cellules progénitrices myogéniques (CPM) du muscle âgé tendent à se différencier plutôt qu'à proliférer. De plus, nous avons montré une augmentation de la population des mrSC dans le muscle âgé, pouvant expliquer la présence plus importante de tissu adipeux et de MEC.

Le muscle de souris dystrophique est caractérisé par des cycles perpétuels de dégénérescence/régénération conduisant à une fibrose du tissu. Puisqu'une modulation de la voie Wnt canonique est responsable de la fibrose de différents organes, nous avons caractérisé son implication dans le muscle des souris dystrophiques. Nous avons montré que l'activation de cette voie induit une augmentation de la prolifération des mrSC ainsi que de leur synthèse de collagène *in vitro* et *in vivo*. À l'opposé, l'inhibition de l'activité Wnt canonique induit une diminution de la population des mrSC et du dépôt fibreux. En somme, la voie Wnt canonique favorise la fibrose du muscle dystrophique par l'intermédiaire des mrSC.

Des études récentes ont montré que des modifications biomécaniques du microenvironnement peuvent altérer les propriétés souches des CPM. Nous avons examiné l'influence de la rigidité du microenvironnement sur le comportement des CPM. Des analyses en microscopie à force atomique ont montré que la perte de tension des fibres *ex vivo* causait une légère augmentation de la rigidité du microenvironnement des cellules satellites, favorable à leur prolifération. Nous avons corrélé ces résultats avec une approche *in vivo* où l'on a causé la perte de tension des fibres par ténotomie. Nos conclusions suggèrent que la rigidité du microenvironnement influence l'activation des cellules satellites et leur état prolifératif.

Ces observations ont été mises à profit afin de développer une méthode originale pour isoler les CPM. Celle-ci permet d'obtenir rapidement et à partir de seulement quelques fibres, un nombre important de CPM hautement purifiés.

En résumé, ces travaux ont permis une meilleure compréhension des facteurs présents dans le microenvironnement des cellules progénitrices et contribuant à la réparation du muscle squelettique.

Mots-clés: niche, cellules satellites, cellules stromales résidentes du muscle, fibres musculaires, dystrophie, vieillissement, fibrose, module de Young

À mon fils, Lucas

Table des Matières

Résumé	II
Table des Matières	IV
Liste des Illustrations	VIII
Liste des Tableaux	X
Liste des Annexes	X
Liste des Abréviations	XI
CHAPITRE I: Introduction	1
1.1 Le muscle squelettique	1
1.1.1 Anatomie du muscle squelettique	1
1.1.2 La portion myogénique du muscle squelettique	3
1.1.2.1 <i>Les fibres musculaires</i>	3
1.1.2.2 <i>Les cellules satellites</i>	4
1.1.3 Le compartiment stromal du muscle squelettique	6
1.1.3.1 <i>Portion matricielle du stroma</i>	6
1.1.3.2 <i>Rôle mécanique et biologique de la MEC</i>	7
1.1.3.3 <i>Les cellules stromales résidentes du muscle (mrSC)</i>	10
1.2 La myogenèse	11
1.2.1 Myogenèse prénatale	11
1.2.2 Myogenèse adulte	14
1.2.2.1 <i>Le dommage musculaire</i>	15
1.2.2.2 <i>La régénération du muscle squelettique</i>	16
1.3 Principales voies de signalisation impliquées dans la myogenèse adulte	19
1.3.1 La voie Notch	19
1.3.1.1 <i>Généralités</i>	19
1.3.1.2 <i>La voie Notch dans la myogenèse adulte</i>	20
1.3.2 La voie Wnt	22
1.3.2.1 <i>Généralités</i>	22
1.3.2.2 <i>La voie Wnt dans la myogenèse adulte</i>	25
1.4 La niche des cellules satellites	27
1.4.1 L'environnement biochimique des cellules satellites	29
1.4.2 L'environnement biomécanique des cellules satellites	32
1.5 Les altérations de la fonction musculaire	36
1.5.1 Le vieillissement du muscle	36

1.5.1.1	<i>Caractéristiques du muscle vieillissant</i>	36
1.5.1.2	<i>Altérations du microenvironnement du muscle âgé</i>	37
1.5.2	Les dystrophies musculaires	43
1.5.2.1	<i>Le complexe dystrophine-glycoprotéine</i>	43
1.5.2.2	<i>Les souris dystrophiques (mdx)</i>	45
1.5.3	La fibrose musculaire	46
1.5.3.1	<i>Types cellulaires impliqués dans la fibrose</i>	47
1.5.3.2	<i>Voies de signalisations impliquées dans la fibrose musculaire</i>	49
1.6	Techniques d'isolement et d'étude des cellules progénitrices myogéniques	51
1.6.1	Isolément des CPM par dissociation enzymatique	52
1.6.1.1	<i>La méthode d'enrichissement par adhérence préférentielle (pre-plating)</i>	52
1.6.1.2	<i>Autres méthodes d'enrichissement</i>	53
1.6.2	Isolément des CPM par culture de fibres individuelles	55
1.6.2.1	<i>Isolément des fibres musculaires</i>	55
1.6.2.2	<i>La culture de fibres individuelles pour l'étude des cellules satellites</i>	56
1.7	Hypothèse de travail et objectifs de recherche	58
CHAPITRE II	Matériel et méthodes	60
2.1	Animaux	60
2.2	Isolément des muscles	60
2.3	Isolément du sérum	60
2.4	Injections intramusculaires	61
2.5	Ténotomies	61
2.6	Isolément et culture des cellules progénitrices du muscle squelettique	61
2.6.1	Les cellules stromales résidentes du muscle squelettique (mrSC).....	61
2.6.2	Les cellules progénitrices myogéniques (CPM): méthode classique d'adhésion préférentielle (pre-plating).....	62
2.6.3	Les fibres musculaires (myofibres)	63
2.6.4	Différenciation des CPM en myotubes.....	63
2.6.5	Traitement à la Mitomycine-C	64
2.7	Préparation des coupes histologiques de muscles	64
2.8	Colorations cyto- et histologiques	65
2.8.1	Colorations histologiques communes	65
2.8.2	Marquage au X-gal.....	66
2.8.3	Immuno-marquages en fluorescence.....	66
2.8.4	Coloration au bleu Evans.....	68
2.9	Observations microscopiques	68
2.10	Quantification de l'aire des fibres	68
2.11	Analyse par cytométrie de flux	69
2.12	PCR quantitative en temps réel	70

2.13 Immunobuvardage de type western	71
2.14 Mesure de l'activité de la voie Wnt/caténine/TCF.....	72
2.15 Mesure de la rigidité de surface par microscopie à force atomique ...	73
2.16 Synthèse de substrats à base de gels d'acrylamide.....	77
2.17 Analyses statistiques	79
Chapitre III: Résultats	81
3.1 Modulation de l'environnement et du comportement des cellules progénitrices du muscle squelettique lors du vieillissement	81
3.1.1 La structure et la composition du muscle âgé sont différentes du muscle adulte	81
3.1.2 L'état des cellules progénitrices myogéniques est altéré lors du vieillissement	84
3.1.3 L'état de différenciation des CPM est altéré dans le muscle vieillissant	87
3.2 La voie Wnt canonique contribue à la formation de la fibrose du muscle squelettique de souris <i>mdx</i>	91
3.2.1 La population des mrSC est augmentée dans le muscle des souris <i>mdx</i>	91
3.2.2 L'activité de la voie Wnt canonique est augmentée chez les souris <i>mdx</i> et stimule la prolifération des mrSC et leur synthèse de collagène in vitro.....	94
3.2.3 L'activation de la voie Wnt canonique réduit la prolifération des CPM in vitro, mais n'a pas d'effet sur leur synthèse de collagène	97
3.2.4 Wnt3a stimule la prolifération et l'expression de collagène des mrSC <i>in vivo</i>	100
3.2.5 L'antagoniste Dickkopf 1 (DKK1) inhibe l'effet de la voie Wnt canonique dans le muscle de souris <i>mdx</i>	103
3.3 La modulation mécanique du microenvironnement favorise la prolifération des CPM	107
3.3.1 La perte de tension interne des fibres individuelles en culture induit la prolifération des CPM.....	107
3.3.2 La réduction des fibres constitue un environnement favorable à la prolifération des CPM.....	109
3.3.3 La réduction des fibres est induite par la perte de leur viabilité	111
3.3.4 La perte de tension des fibres musculaires induit une augmentation de la rigidité de l'environnement des CPM	113
3.3.5 L'augmentation de la rigidité du microenvironnement des CPM favorise leur prolifération	115
3.3.6 La perte de tension du muscle induit la prolifération des CPM <i>in vivo</i>	118
3.4 Technique originale d'isolement des CPM à partir des fibres réduites	121
3.4.1 L'isolement de CPM par culture de fibres permet d'éliminer les cellules contaminantes.....	121
3.4.2 Les fibres réduites permettent l'enrichissement des CPM indépendamment de la qualité du sérum utilisé.....	124

3.4.3 La qualité du sérum influence la vitesse d'enrichissement des CPM isolées par la méthode classique contrairement aux fibres réduites.....	127
3.4.4 L'isolement de CPM par culture de fibres réduites nécessite peu de tissu et ne diminue pas leur potentiel prolifératif et de différenciation	130
CHAPITRE IV: Discussion, perspectives & conclusions	134
4.1 Les cellules progénitrices du muscle des souris âgées	134
4.1.1. Le phénotype des cellules satellites et les CPM sont altérés dans le muscle des souris âgées	134
4.1.2. Directions futures et résultats anticipés	137
4.2 L'activité de la voie Wnt canonique dans le microenvironnement des mrSC contribue à la fibrose dans le muscle de souris <i>mdx</i>	138
4.2.1 L'activité de la voie Wnt canonique est augmentée dans le muscle fibrotique des souris <i>mdx</i>	139
4.2.2 Les mrSC sont sensibles à une modulation de l'activité Wnt dans leur environnement.....	140
4.2.3 Implication possible des mrSC dans la fibrose du muscle vieillissant.....	144
4.2.4 Directions futures et résultats anticipés	145
4.3 La rigidité du microenvironnement module le phénotype des CPM ...	147
4.3.1 La réduction des fibres in vitro induit l'activation et la prolifération des CPM	147
4.3.2 La réduction des fibres en culture entraîne leur dégénérescence	150
4.3.3 La réduction des fibres en culture induit la modification de la rigidité du microenvironnement des CPM favorable à leur prolifération	151
4.3.4. Directions futures et résultats anticipés	154
4.4 La culture de fibres réduites: une approche originale pour isoler les CPM.....	157
4.1.1 Directions futures et résultats anticipés	160
4.5 Conclusion	161
Remerciements	163
Liste des références	165
Annexes	195

Liste des Illustrations

Figure 1.1 Organisation du muscle squelettique	2
Figure 1.2 Structure interne d'une fibre musculaire	3
Figure 1.3 La fibre musculaire et la cellule satellite	4
Figure 1.4 Modèles de division asymétrique et symétrique des cellules satellites ..	6
Figure 1.5 Interactions entre la MEC et la fibre du muscle squelettique.....	9
Figure 1.6 Facteurs de signalisation impliqués dans la myogenèse prénatale.....	12
Figure 1.7 Facteurs de transcription intervenant dans les différentes étapes de la différenciation myogénique adulte	17
Figure 1.8 Régénération du muscle squelettique adulte.....	19
Figure 1.9 La voie de signalisation Delta/Notch.....	21
Figure 1.10 Activation et inhibition de la voie Wnt canonique.....	24
Figure 1.11 La niche des cellules satellites.....	28
Figure 1.12 Principales voies de signalisation de la mécanotransduction	33
Figure 1.13 Effet du vieillissement et de la stimulation de voies de signalisation sur la myogenèse du muscle âgé	40
Figure 1.14 Illustration des modifications de la niche des cellules satellites dans le muscle âgé.....	42
Figure 1.15 Le complexe dystrophine-glycoprotéine et les dystrophies musculaires associées	44
Figure 1.16 La voie de signalisation du TGF- β	50
Figure 1.17 Méthode d'isolement et d'enrichissement des CPM par digestion enzymatique.....	53
Figure 1.18 Méthode d'isolement des fibres individualisées	57
Figure 2.1 Schéma du montage de l'AFM.....	74
Figure 2.2 Schéma illustrant les types de courbes F/D obtenues en fonction du type d'échantillon	75
Figure 2.3 Analyse informatisée d'une courbe F/D pour l'obtention d'un Module de Young.....	76
Figure 2.4 Obtention du Module de Young d'une courbe F/D.....	77
Figure 2.5 Schéma de fabrication des substrats à base d'acrylamide	79
Figure 3.1.1 Caractérisations macroscopiques, histologiques et de compositions cellulaires entre les muscles de souris adultes et âgées	83
Figure 3.1.2 L'état prolifératif des CPM est altéré lors du vieillissement.....	86
Figure 3.1.3 L'état de différenciation des CPM est modulé dans le muscle vieillissant.....	89

Figure 3.2.1 Les muscles des souris mdx sont fibrotiques et ont une population de mrSC augmentée	93
Figure 3.2.2 L'activité de la voie Wnt canonique est augmentée chez les souris mdx et stimule la prolifération des mrSC et la synthèse de collagène <i>in vitro</i>	96
Figure 3.2.3 L'activation de la voie Wnt canonique réduit la prolifération des CPM mais n'a pas d'effet sur l'expression du collagène de type I	99
Figure 3.2.4 Wnt3a stimule la prolifération et l'expression de collagène des mrSC <i>in vivo</i>	102
Figure 3.2.5 L'antagoniste Dickkopf 1 (DKK1) inhibe l'effet profibrotique de la voie Wnt canonique dans le muscle de souris mdx	105
Figure 3.3.1 La perte de tension interne des fibres individuelles en culture induit la prolifération des CPM	108
Figure 3.3.2 La réduction des fibres constitue un environnement favorable à la prolifération des CPM	110
Figure 3.3.3 La perte de viabilité cause la réduction de la fibre et une désorganisation de son cytosquelette	112
Figure 3.3.4 La perte de tension des fibres musculaires induit une augmentation de la rigidité de l'environnement des CPM	114
Figure 3.3.5 L'augmentation de la rigidité de l'environnement maintient les CPM dans un état prolifératif	117
Figure 3.3.6 La perte de tension des fibres <i>in vivo</i> induit la prolifération des CPM	119
Figure 3.4.1 L'isolement de CPM par culture de fibres permet d'éliminer les cellules contaminantes et de prévenir leur différenciation	123
Figure 3.4.2 Les fibres réduites constituent un environnement permettant l'enrichissement des CPM indépendamment de la qualité du sérum utilisé	126
Figure 3.4.3 L'enrichissement des CPM à partir des fibres n'est pas influencé par la qualité du sérum	129
Figure 3.4.4 La culture de fibres musculaires nécessite peu de tissu et aboutit à l'obtention de CPM avec des caractéristiques similaires à celles isolées par la méthode classique	132
Figure 4.1 Schéma récapitulatif de l'impact de la voie Wnt sur la fibrose musculaire par l'intermédiaire des mrSC	143
Figure 4.2 Caractéristiques histologiques des muscles de souris sFRP2 KO	146
Figure 4.3 Rigidité de fibres individuelles provenant d'EDL de souris adultes et âgées	153
Figure 4.4 Capacités prolifératives de CPM sur des substrats de différentes rigidités	154
Figure 4.5 Récapitulatif des effets de la réduction des fibres individuelles en culture	159

Liste des Tableaux

Tableau 2.1 Anticorps primaires utilisés en immunofluorescence	67
Tableau 2.2 Anticorps secondaires utilisés en immunofluorescence	67
Tableau 2.3 Anticorps directement conjugués à un fluorochrome utilisés en cytométrie de flux	69
Tableau 2.4 Amorces utilisées en PCR quantitative en temps réel	71
Tableau 2.5 Concentrations d'acrylamide et de bis-acrylamide utilisées pour la synthèse des substrats.....	78

Liste des Annexes

Annexe 1 Les dystrophies musculaires et protéines associées	195
Annexe 2 Modèles murins déficients pour une protéine du complexe DGC	196
Annexe 3 Figure S1	197
Annexe 4 Figure S2	198
Annexe 5 Figure S3	199

Liste des Abréviations

AAV	<i>Adeno-Associated Virus</i>
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i>
ALK5	<i>Activin-Linked Kinase 5</i>
α -SMA	<i>Alpha-smooth muscle actin</i>
APC	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
APES	<i>Aminopropyltriethoxysilane</i>
bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
β -gal	β -galactosidase
BMD	<i>Becker Muscular Dystrophy</i>
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CFU-F	<i>Colony-Forming Units-Fibroblast</i>
CLS	<i>CBF1/RBP-Jk, Suppressor of Hairless, Lag1</i>
CPM	<i>Cellule progénitrice myogénique</i>
CRD	<i>Cystein-Rich Domain</i>
CSM	<i>Cellule souche mésenchymateuse</i>
CTGF	<i>Connective Tissue Growth Factor</i>
CTX	<i>Cardiotoxine</i>
DAPI	<i>4',6'-diamidino-2-phénylindole</i>
DCDMS	<i>Dichlorodimethylsilane</i>
DGC	<i>Dystrophin/Glycoprotein complex</i>
Dia	<i>Diaphragme</i>
DKK	<i>Dickkopf</i>
DMD	<i>Duchenne Muscular Dystrophy</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EDL	<i>Extensor Digitorum Longus</i>
EDMD	<i>Emerly-Dreyfus Muscular Dystrophy</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>

FAP	<i>Fibro/Adipogenic Progenitor</i>
FBS	<i>Foetal Bovin Serum</i>
FDB	<i>Flexor Digitorum Brevis</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FITC	Fluorescéine isothiocyanate
FSC	<i>Forward scatter channel</i>
Gas	<i>Gastrocnemius</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GSK3	<i>Glycogen synthetase Kinase-3</i>
H&E	Hématoxyline & Éosine
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxydase</i>
HS	<i>Horse serum</i>
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
LGMD	<i>Limb-Girdle Muscular Dystrophy</i>
LEF	<i>Lymphoid Enhancer Factor</i>
LRP	<i>Low-Density Lipoprotein-Related Protein</i>
LTBP4	<i>Latent TGF-β-Binding Protein-4</i>
MDSC	<i>Muscle-Derived Stem Cell</i>
mdx	<i>X chromosome-linked Muscular Dystrophy</i>
MHC	<i>Myosin Heavy Chain</i>
MEC	Matrice extracellulaire
MMP	Métalloprotéinase
MRF	<i>Myogenic-Related Factor</i>
mrSC	<i>Muscle-Resident Stromal Cells</i>
NF- κ B	<i>Nuclear Factor-κB</i>
NICD	<i>Notch Intracellular Domain</i>
NO	<i>Nitric Oxide</i>
NTX	Notexine
OCT	<i>Optimal Cutting Temperature</i>

Pax	<i>Paired-box</i>
PCP	<i>Planar Cell Polarity</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PE	<i>Phycoérythrine</i>
PFA	<i>Paraformaldéhyde</i>
PIC	<i>PW1+ interstitial cell</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositide 3-Kinase</i>
RIPA	<i>Radio-immunoprecipitation assay</i>
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
Sca-1	<i>Stem cell antigen-1</i>
sFRP	<i>secreted Frizzled-Related Protein</i>
SHH	<i>Sonic Hedgehog</i>
Sol	<i>Muscle soléaire</i>
SP	<i>Side population</i>
SSC	<i>Side Scatter Channel</i>
TA	<i>Tibialis anterior</i>
TCF	<i>T Cell Factor</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TIMP	<i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinase</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i>
Wif1	<i>Wnt Inhibitory Factor-1</i>
Wnt	<i>Wingless-related integration site</i>
x-Gal	<i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside</i>

CHAPITRE I: Introduction

1.1 Le muscle squelettique

Le muscle squelettique représente chez l'homme jusqu'à 40% de sa masse corporelle. Son apparence striée est due au haut niveau d'organisation des protéines de ses fibres musculaires qui lui confère sa capacité à se contracter en réponse à des stimuli chimiques afin de générer une force mécanique. Il possède deux autres propriétés importantes à son fonctionnement soient son extensibilité et son élasticité, qui lui permettent de s'étirer sans subir de dommage puis de reprendre sa forme initiale. Du fait de sa masse relative importante, le muscle squelettique a également un rôle de premier ordre dans l'homéostasie métabolique de l'organisme.

1.1.1 Anatomie du muscle squelettique

Le muscle squelettique est rattaché aux os de part et d'autre par les tendons (**Figure 1.1**). Il possède une portion myogénique et une portion stromale. La portion myogénique comprend les fibres musculaires, qui constituent l'unité contractile du muscle, ainsi que les cellules satellites logées à leur périphérie. Les fibres musculaires sont enveloppées et maintenues ensemble par différentes couches de tissu conjonctif faisant partie du stroma. L'épimysium, aussi appelé fascia, est une couche qui recouvre l'ensemble du muscle. Les faisceaux sont entourés d'une couche de tissu conjonctif, le péri-mysium. Finalement, les fibres musculaires sont enveloppées individuellement par un endomysium qui les sépare les unes des autres (GILLIES et LIEBER 2011).

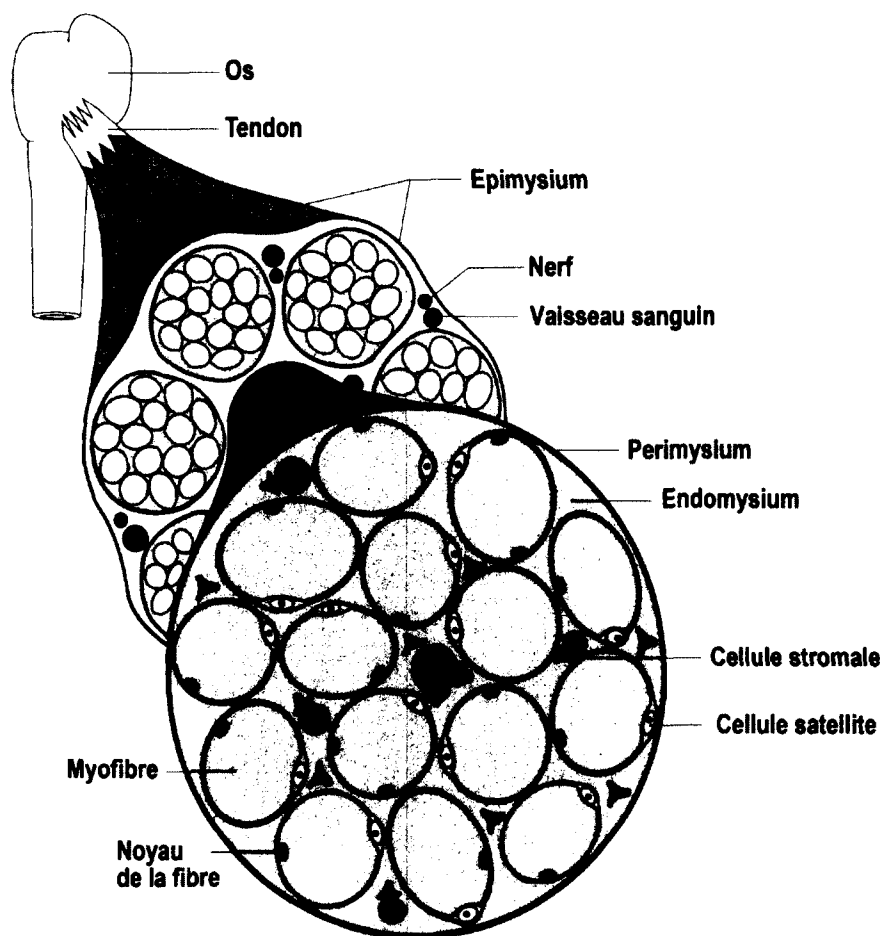


Figure 1.1 Organisation du muscle squelettique

Le muscle squelettique est subdivisé en une portion stromale (bleu) et une portion myogénique (rouge). La portion stromale du muscle est subdivisée en trois parties : l'endomysium, le périmysium et l'épimysium. Le tissu conjonctif entourant les fibres musculaires contient un réseau de capillaires et de nerfs nécessaires pour l'apport en nutriment et l'innervation du tissu respectivement. De nombreux types cellulaires tels que les cellules stromales sont retrouvés à proximité des vaisseaux sanguins (illustration non publiée).

Le tissu conjonctif est formé d'un réseau complexe de matrice extracellulaire (MEC) dans lequel se trouvent les capillaires permettant l'apport en oxygène et en nutriments, ainsi que l'innervation nécessaire à l'induction de la contraction (**Figure 1.1**). Le stroma contient également différents types cellulaires dont des cellules stromales progénitrices et différenciées ainsi que des cellules dérivées du système hématopoïétique (e.g. macrophages). Les fibres musculaires sont enveloppées individuellement par un mince feuillet de composants spécialisés de la MEC, la lame basale.

1.1.2 La portion myogénique du muscle squelettique

1.1.2.1 Les fibres musculaires

La fibre musculaire, aussi appelée myofibre, constitue l'unité contractile des muscles. Il s'agit d'un syncytium issu de la fusion de centaines de cellules progénitrices myogéniques (CPM), aussi appelées myoblastes (BENTZINGER et al. 2012). Les fibres musculaires sont des structures cylindriques de 10 à 100 microns et ont une longueur qui peut atteindre 30 cm chez l'homme. Elles contiennent des centaines de noyaux que l'on retrouve à leur périphérie. La membrane des fibres (sarcolemme) a la particularité de présenter de fines invaginations tubulaires (tubules transverses ou tubules T) réparties régulièrement le long de la fibre. Ce réseau membranaire est responsable de la conduction nerveuse transmise au niveau de la jonction neuromusculaire. Le cytosquelette des fibres musculaires est essentiellement constitué de myofibrilles qui constituent l'élément contractile des fibres musculaires. Chaque myofibrille est composée d'une chaîne d'unités contractiles répétitives, les sarcomères. À l'échelle moléculaire, les sarcomères sont entre autres composés de filaments épais de myosine et de filaments fins d'actine. C'est cette succession des sarcomères qui donne au muscle squelettique son apparence striée (**Figure 1.2**).

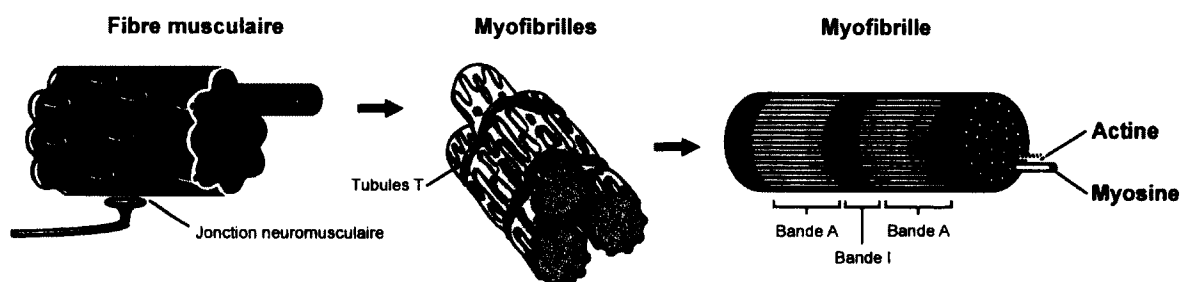


Figure 1.2 Structure interne d'une fibre musculaire

La fibre musculaire est constituée de myofibrilles qui contiennent les filaments d'actine et de myosine. Son organisation en bandes A et I donne au muscle squelettique son allure striée au microscope. Adapté de Servier medical art (SERVIER 2010).

1.1.2.2 Les cellules satellites

La capacité de régénération des myofibres du muscle squelettique adulte est attribuée aux cellules satellites (MAURO 1961; SAMBASIVAN et al. 2011). Normalement quiescentes, les cellules satellites s'activent à la suite d'un dommage et prolifèrent sous l'appellation de CPM. Ces dernières entament ensuite une étape de différenciation qui aboutit à leur fusion afin de réparer des fibres endommagées ou en créer de nouvelles (YIN et al. 2013) (cf. **section 1.2.2.2**). Même après des dommages répétés, les cellules satellites sont capables de produire des milliers de CPM (LUZ et al. 2002; COLLINS et al. 2005). Les cellules satellites sont localisées en périphérie des fibres musculaires, entre le sarcolemme et la lame basale, cette caractéristique étant à l'origine de leur nom (MAURO 1961; BISCHOFF 1990) (**Figure 1.3**).

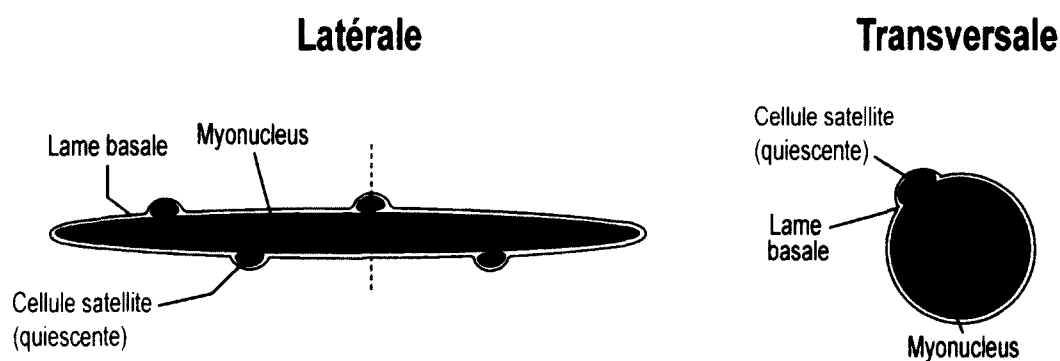


Figure 1.3 La fibre musculaire et la cellule satellite

La fibre musculaire est une cellule multinucléée issue de la fusion de cellules progénitrices myogéniques (CPM). La cellule satellite est séquestrée entre la membrane plasmique de la fibre et la lame basale qui l'enveloppe. Normalement quiescentes, elles sont capables de s'activer et de régénérer les fibres à la suite d'un dommage (illustration non publiée).

Il existe plusieurs moyens d'identifier les cellules satellites. Le facteur de transcription myogénique *Pax7* (*Paired-box 7*) est exprimé uniquement par les cellules satellites, et ce chez de nombreuses espèces incluant la souris, la salamandre, le poulet ou l'homme (SEALE et al. 2000; MORRISON et al. 2006; YABLONKA-REUVENI et DAY 2011). D'autres marqueurs permettent de localiser, seul ou en combinaison, avec plus ou moins de spécificité les cellules satellites incluant CD34, la cavéoline-1, le récepteur à la calcitonine, la sous-unité intégrine $\alpha 7$, la

nestine, les syndécanes 3 et 4 et la M-cadhérine (IRINTCHEV et al. 1994; BEAUCHAMP et al. 2000; SEALE et al. 2000; CORNELISON et al. 2001; SHERWOOD et al. 2004; DAY et al. 2007; GNOCCHI et al. 2009).

Par ailleurs, il existe d'autres facteurs de transcription myogéniques utilisés comme marqueurs des différentes étapes de différenciation des CPM, notamment les facteurs de transcriptions de la famille des *Myogenic Related Factors* (MRF) tel MyoD, Myf5 et la myogénine. Ces derniers permettent de distinguer avec une très grande spécificité les cellules satellites des CPM prolifératives et en différenciation (cf. section 1.2.2).

Plusieurs études ont montré que les cellules satellites constituaient une population cellulaire hétérogène. En effet, il semble que les capacités prolifératives, de différenciation et d'auto-renouvellement des cellules satellites varient non seulement selon le muscle d'origine, mais aussi à l'intérieur d'un même muscle (LAGORD et al. 1998; DAY et al. 2010; ONO et al. 2010; ONO et al. 2012). Il a été montré qu'une expression hétérogène des marqueurs intégrine- β 1, M-cadhérine, CD34 ou encore Myf5, est associée à des potentiels régénératifs variables (BEAUCHAMP et al. 2000). Il existerait de plus une sous-population de cellules satellites qui se distinguerait par l'expression du facteur de transcription Myf5. De manière plus précise, il existe une sous-population majoritairement (90%) positive pour Myf5 et une autre négative pour Myf5 (10%) (BEAUCHAMP et al. 2000). Kuang et collaborateurs ont montré que les cellules Myf5⁻ possèdent un fort potentiel régénératif et maintiennent une capacité d'auto-renouvellement par rapport à la sous-population Myf5⁺ (KUANG et al. 2007). Ceci s'explique par le fait que les cellules satellites peuvent se diviser selon deux mécanismes (**Figure 1.4**). La division asymétrique génère une cellule fille qui s'engage dans la prolifération et la différenciation myogénique (Pax7⁺Myf5⁺), et une cellule fille qui maintien ses propriétés souches (Pax7⁺Myf5⁻), assurant ainsi leur auto-renouvellement. Ce mécanisme de division asymétrique permet de perpétuer le réservoir de cellules souches myogéniques au cours de la vie. La division symétrique aboutit quant à elle, à deux cellules filles identiques, ce qui permet d'augmenter le nombre de

CPM lors d'un dommage et donc de favoriser une régénération efficace (MORRISON et KIMBLE 2006).

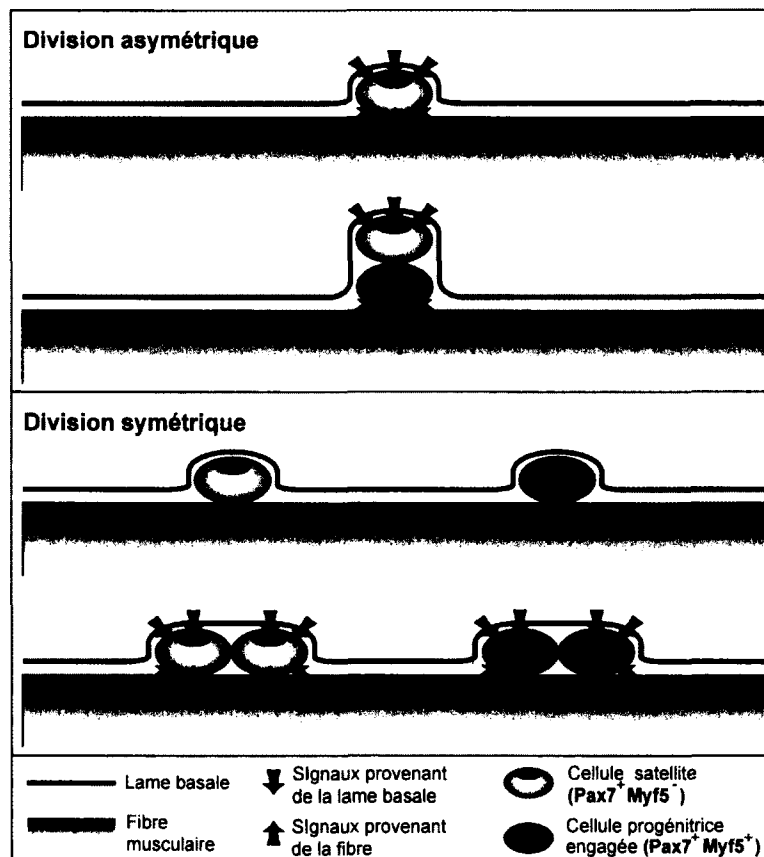


Figure 1.4 Modèles de division asymétrique et symétrique des cellules satellites

La division asymétrique (orientation baso-apicale) des cellules satellites permet de maintenir le réservoir de cellules satellites (Pax7⁺ Myf5⁻) alors que la division symétrique (orientation planaire) conduit à deux cellules filles identiques. Adapté de (BENTZINGER et al. 2012).

1.1.3 Le compartiment stromal du muscle squelettique

1.1.3.1 Portion matricielle du stroma

La MEC du muscle squelettique est un réseau principalement composé de collagènes (types I, III, et VI), fibronectine, vitronectine, tenascine et divers protéoglycanes tels la décorine ou le biglycane (GROUNDS et al. 2005). Elle contient également, mais dans une moindre mesure, du collagène de type IX et XI, de l'élastine et de la fibrilline.

La lame basale située au pourtour des fibres et des vaisseaux sanguins est une structure spécialisée composée de collagène de type IV, laminine, fibronectine

et de divers protéoglycanes et glycoprotéines (SANES 2003; GROUNDS et al. 2005) (**Figure 1.5**). Le réseau de laminine fait face aux fibres musculaires, complété par du collagène de type IV. Ces protéines sont liées par le nidogène pour former une structure complexe contenant de nombreux sites de liaisons entre les protéoglycanes et les intégrines (BOONEN et POST 2008). Les protéines et glycoprotéines à proximité des fibres musculaires sont produites par les cellules musculaires alors que les composants de l'espace interstitiel sont majoritairement synthétisés par les cellules localisées dans le stroma (VOERMANS et al. 2008). Les différents constituants de la MEC forment un réseau complexe et hétérogène de molécules interconnectées dont certaines sont strictement adhésives alors que d'autres ont un rôle structural.

1.1.3.2 Rôle mécanique et biologique de la MEC

La MEC joue un rôle mécanique en assurant le maintien de la structure du muscle et de la transmission des forces induites par la contraction des fibres à l'ensemble du tissu (KJAER 2004). Le transfert des forces se produit à la surface de toute la fibre musculaire ainsi qu'au niveau des jonctions myotendineuses (PURSLOW 2002; TROTTER 2002). Ces forces sont transmises aux tendons, eux-mêmes rattachés au squelette. La majorité des forces induites par la contraction musculaire est transmise latéralement par l'intermédiaire des sarcomères ce qui permet d'homogénéiser les tensions à l'ensemble du muscle et de maintenir l'intégrité des fibres musculaires (BLOCH et GONZALEZ-SERRATOS 2003). Deux principales classes de molécules associées au sarcolemme sont responsables de la transmission des forces, à savoir le complexe dystrophine/glycoprotéine (DGC) et les intégrines. Ces deux complexes constituent un lien physique entre le cytosquelette des fibres et la lame basale par des interactions avec les laminines. Le rôle crucial de ces complexes dans le maintien de l'intégrité musculaire est démontré dans de nombreuses dystrophies musculaires, dont la plus connue: la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) (HOFFMAN et al. 1987) (pour une liste exhaustive des différentes myopathies, voir **Annexe 1**).

Dans cette pathologie, l'absence de la dystrophine cause des lésions dans le sarcolemme menant à la nécrose des fibres. Cette nécrose chronique conduit à un remplacement progressif des fibres musculaires par du tissu fibreux et adipeux (**cf. section 1.5.2**) (BIGGAR 2006).

Bien que la MEC du muscle ait longtemps été considérée comme une structure amorphe servant de support mécanique aux fibres musculaires, il est maintenant établi qu'elle joue un rôle essentiel dans la régénération du tissu (KAARIAINEN et al. 2000). En effet, la MEC est une structure dynamique qui s'adapte aux changements physiologiques en modifiant les propriétés mécaniques et élastiques du tissu.

Dans l'ensemble des tissus, la MEC joue également un rôle clef dans la signalisation. En effet, les récepteurs à la surface membranaire, telles les intégrines, constituent des points d'adhésions focaux par lesquels des signaux sont transmis de la MEC vers le cytosquelette et le noyau des cellules (PUKLIN-FAUCHER et SHEETZ 2009). Ainsi, l'activation d'un type de récepteur induit ou inhibe, par des mécanismes de mécanotransductions, l'expression de gènes de la cellule cible et son comportement (WANG et al. 2009) pouvant moduler par exemple la synthèse et la dégradation de composants de la MEC par les fibroblastes (CHIQUET 1999; CHIQUET et al. 2009). Une légère modification de la composition ou de la rigidité de la MEC peut avoir des répercussions importantes sur le comportement des cellules avoisinantes. À titre d'exemple, il a été montré que la différenciation des cellules progénitrices mésenchymateuses était modulée en fonction de la rigidité de leur microenvironnement (ENGLER et al. 2006). Enfin, il a été montré que le niveau de différenciation des cellules progénitrices myogéniques était influencé par la rigidité de leur environnement (ENGLER et al. 2004a; ENGLER et al. 2004b).

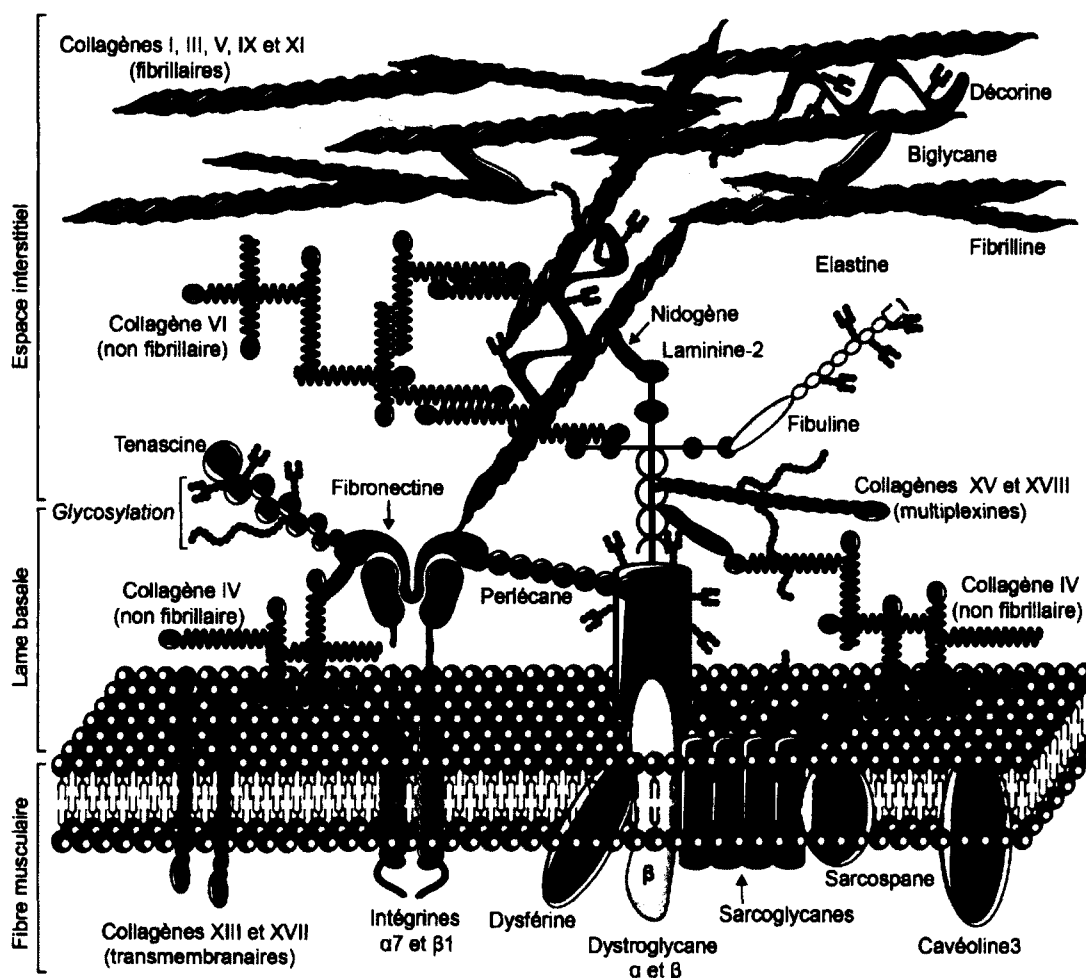


Figure 1.5 Interactions entre la MEC et la fibre du muscle squelettique

Représentation schématique des diverses protéines et glycoprotéines présentes dans la MEC du muscle squelettique ainsi que les complexes membranaires associés. Pour une question de clarté, les interactions possibles entre les nombreux constituants de la MEC ne sont pas toutes représentées. Adapté de (VOERMANS et al. 2008).

Lors de la régénération musculaire, la MEC est à l'origine de nombreux signaux pouvant influencer les cellules du muscle squelettique (cf. section 1.4.1). En effet, de nombreux facteurs de croissance sont séquestrés sous forme active ou inactive par les protéoglycanes et peuvent être libérés lors d'un dommage (TATSUMI et al. 2001; MIURA et al. 2006). Par ailleurs, la régénération musculaire nécessite la migration des cellules satellites au site lésé ainsi que le recrutement des cellules inflammatoires telles que les macrophages, responsables de la phagocytose des débris cellulaires. Enfin, lorsque la lame basale n'est pas endommagée, elle sert d'échafaudage pour la régénération des fibres.

1.1.3.3 Les cellules stromales résidentes du muscle (mrSC)

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) ont été identifiées pour la première fois dans le stroma de la moelle osseuse (FRIEDENSTEIN et al. 1970). Depuis, elles ont pu être localisées dans de nombreux tissus incluant le cordon ombilical (CAN et BALCI 2011), le tissu adipeux (ZUK et al. 2001; SCIME et al. 2005), la glande salivaire (ROTTER et al. 2008), le liquide synovial (FAN et al. 2009), la glande parathyroïde (SHIH et al. 2009), la pulpe dentaire (GRONTHOS et al. 2000) et le muscle squelettique (ASAKURA et RUDNICKI 2002; SCIME et al. 2005; GRENIER et al. 2007; JOE et al. 2010; LEBLANC et al. 2011), indiquant que ces cellules sont ubiquitaires.

Les CSM sont définies par trois critères : (1) la capacité à adhérer au plastique en condition de culture standard, (2) un potentiel de différenciation multipotent, et (3) l'expression de marqueurs de surface tel que CD90, CD105, CD73 et CD44 en l'absence de CD34, CD45 et CD11b (FRIEDENSTEIN et al. 1976; DOMINICI et al. 2006; NOMBELA-ARRIETA et al. 2011; BOURIN et al. 2013). Ces critères ont été établis pour les CSM humaines mais ne s'appliquent pas uniformément aux autres espèces (WILLIAMS et HARE 2011). Les CSM de souris expriment par exemple les marqueurs Sca1 et PDGFR α en l'absence de CD34, CD45 et CD11b (MORIKAWA et al. 2009; MABUCHI et al. 2013). Plusieurs autres noms ont été utilisés pour les décrire: cellules stromales multipotentes, cellules stromales de la moelle ou encore « *colony-forming units-fibroblasts* » (CFU-F) (KEATING 2012).

À la suite d'une stimulation avec des facteurs appropriés, les CSM, incluant les CSM résidentes du muscle squelettique (*muscle resident stromal cells*, mrSC) sont capables de se différencier en de nombreux types cellulaires: fibrocytes, adipocytes, chondrocytes et ostéoblastes (ASAKURA et RUDNICKI 2002; SCIME et al. 2005; GRENIER et al. 2007; JOE et al. 2010; LEBLANC et al. 2011), ce qui en fait une population cellulaire d'un grand intérêt pour la médecine régénératrice, mais également pour comprendre la physiopathologie du muscle squelettique.

Peu de choses sont connues quant à la fonction et au rôle précis que jouent les mrSC dans le muscle squelettique. Toutefois, les mrSC contribuant à la

régénération musculaire (JOE et al. 2010), il est probable qu'elles participent aux modifications stromales observées lors du vieillissement du muscle squelettique, caractérisées par une accumulation de tissu fibreux (fibrose) et de tissu adipeux (dégénérescence graisseuse). De manière intéressante, Hidestrand et collaborateurs ont identifié une population cellulaire non myogénique, exprimant le marqueur de surface Sca1 (*Stem cell antigen-1*) dans le muscle de souris âgées (HIDESTRAND et al. 2008). Les auteurs ont montré que dans le muscle âgé, cette population surexprime des gènes associés à la fibrose tels que Twist1, le CTGF (*Connective Tissue Growth Factor*) et la fibronectine, possiblement tous régulés par la voie Wnt (*Wingless-related integration site*). Le marqueur Sca1, aussi appelé Ly6 A/E, est un marqueur de cellules souches qui a d'abord été utilisé pour identifier les cellules souches hématopoïétiques (KONDO et al. 2003). Il est communément utilisé pour isoler les CSM de nombreux tissus, chez la souris (DEKEL et al. 2006; YAMAMOTO et al. 2007; SUNG et al. 2008; MORIKAWA et al. 2009; HOULIHAN et al. 2012; MABUCHI et al. 2013).

La littérature montre que de nombreux types cellulaires ont été identifiés dans la portion stromale du muscle, incluant les cellules SP (*Side Population*) (ASAKURA et al. 2002; UEZUMI et al. 2006), les péricytes (DELLAVALLE et al. 2007), les MDSC (*Muscle-Derived Stem Cell*) (TORRENTE et al. 2001) et les mésoangioblastes (MINASI et al. 2002; COSSU et BIANCO 2003; SAMPAOLESI et al. 2006; BERRY et al. 2007; TONLORENZI et al. 2007). Ces populations ont été étudiées pour leur capacité à contribuer à la régénération des fibres musculaires par les cellules satellites. Toutefois, leur implication dans le remodelage de la MEC, telle la fibrose musculaire, reste à explorer.

1.2 La myogenèse

1.2.1 Myogenèse prénatale

Outre certains muscles de la tête qui trouvent leur origine dans le mésoderme préchordal et paraxial crânien, presque tous les muscles squelettiques des vertébrés sont issus des somites (LU et al. 2002; NODEN et FRANCIS-WEST

2006). Les somites sont issus de la segmentation du mésoderme paraxial avec une progression rostrale caudale. En réponse à des signaux provenant des structures avoisinantes, les somites se segmentent de manière dorsoventrale pour former le dermomyotome, localisé dorsalement, et donnant naissance à la peau ainsi qu'aux muscles du tronc et des membres (**Figure 1.6**). Du côté ventral, le sclérotome est à l'origine de la formation du cartilage et des os. Sous l'effet de divers facteurs morphogènes provenant de la notochorde (Shh, *Sonic hedgehog*), du tube neural (BMP, *Bone Morphogenetic Protein* et Wnt) et de l'ectoderme de surface (Wnt), les cellules du dermomyotome se différencient et migrent pour former le myotome. La partie épaxiale du myotome donne naissance aux muscles du tronc et du dos tandis que la partie hypaxiale donne naissance aux muscles des membres (SHI et GARRY 2006; BENTZINGER et al. 2012).

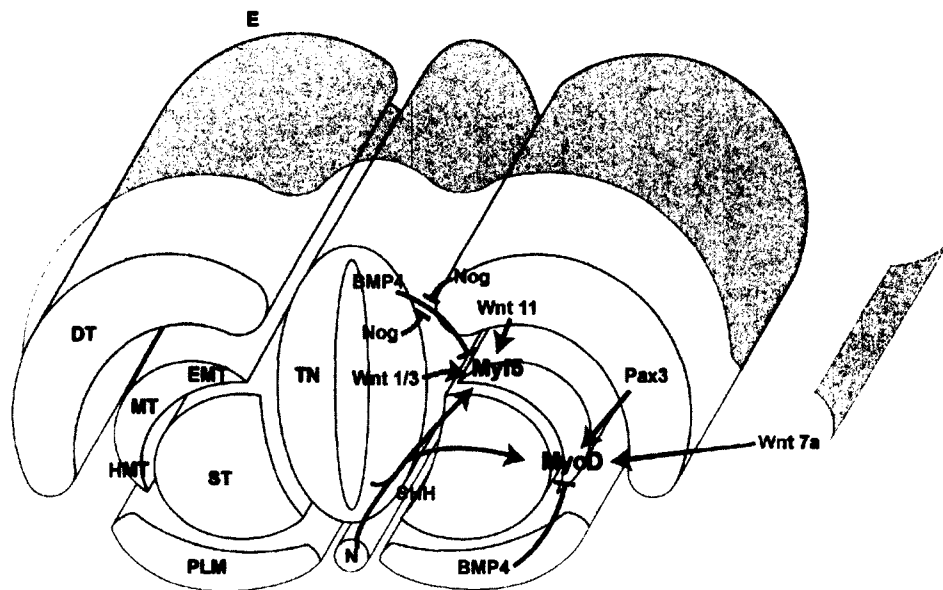


Figure 1.6 Facteurs de signalisation impliqués dans la myogenèse pré-natale

Les progéniteurs myogéniques prennent lors de la somitogénèse sous l'influence de protéines morphogènes telles les Wnts, les BMP ou Sonic Hedgehog. E: ectoderme, DT: dermomyotome, MT: myotome, ST: sclérotome, N: notochorde, TN: tube neural, PLM: plaque latérale du mésoderme. Adaptée de (SHI et GARRY 2006).

Les facteurs morphogènes impliqués dans la segmentation des somites et l'acquisition du caractère myogénique des cellules peuvent avoir un effet positif ou négatif sur les cellules du myotome en régulant l'expression de leurs gènes. Par exemple, des agonistes des voies Wnt et Sonic Hedgehog secrétés par le tube neural, l'ectoderme de surface et la notocorde ont un effet positif sur l'activation des gènes liés à la différenciation myogénique (PARR et al. 1993; CHIANG et al. 1996; IKEYA et TAKADA 1998; TAJBAKSHI et al. 1998; FENG et al. 2006; BENTZINGER et al. 2012). Inversement, des agonistes de la famille des BMP, notamment BMP4, ont un effet inhibiteur sur la différenciation myogénique des cellules du myotome (**Figure 1.6**). Sous l'effet des facteurs morphogéniques, les cellules du myotome entament une différenciation vers la lignée myogénique par le biais de l'expression de facteurs de transcription de la famille des bHLH spécifiques à la myogenèse, les *Myogenic Regulatory Factors* (MRF), incluant MyoD, Myf5, myogénine et MRF4 (BENTZINGER et al. 2012; YIN et al. 2013). C'est suite à la découverte de MyoD dans les années '80 par l'équipe de Buckingham que les différents facteurs de transcription impliqués dans la myogenèse du muscle squelettique ont été décrits (SASSOON et al. 1989; PARKER et al. 2003). Les cellules de la partie épaxiale du myotome expriment MyoD alors que celles de la portion hypaxiale expriment Myf5 (SHI et GARRY 2006). Ainsi, les structures axiales déclenchent la myogenèse par une voie dépendante de Myf5 alors que l'ectoderme dorsal induit la myogenèse de la partie hypaxiale de manière MyoD dépendante. Ces membres de la famille de MyoD sont donc exprimés dès le stade somitique et font partie intégrante de la cascade moléculaire qui dirige la myogenèse. Ils sont capables de former des hétérodimères avec d'autres facteurs de transcription bHLH tels les gènes de la famille E2F pour se lier à des séquences consensus de l'ADN (E box) pour réguler l'expression d'un certain nombre de gènes (LASSAR et al. 1991; MARTIN et al. 1992).

La perte d'expression seule de MyoD, Myf5 ou MRF4 ne cause pas de défauts majeurs dans la myogenèse (BRAUN et al. 1992; RUDNICKI et al. 1992). La mutation seule du gène codant pour la myogénine induit une réduction de la masse musculaire (KNAPP et al. 2006). Par contre, la double mutation de MyoD et

de Myf5 a pour conséquence la perte totale des CPM, des fibres musculaires et la mort des souriceaux peu après leurs naissances (RUDNICKI et al. 1993).

Les facteurs de transcriptions de la famille des *paired-box* (Pax) sont également des acteurs clés de la myogenèse, notamment Pax3 et Pax7. Des techniques de « knock-in » ciblant l'un ou l'autre facteur montrent que la plupart des fonctions de Pax3 peuvent être effectuées par son paralogue Pax7, à l'exception du développement des muscles des membres (RELAIX et al. 2004). Ainsi, les souris déficientes pour Pax3 meurent durant la gestation et présentent de nombreux défauts de formation de la crête neurale, plus particulièrement dans la région caudale de l'embryon. De plus, il n'y a pas de récupération possible (« rescue ») du phénotype par le remplacement de Pax3 par Pax7, appuyant ainsi un rôle bien distinct entre ces deux facteurs (RELAIX et al. 2006). À l'inverse, les souris déficientes pour Pax7 présentent un développement musculaire embryonnaire normal (MANSOURI et al. 1996). Le principal phénotype des souris Pax7^{-/-} est une diminution importante du nombre de cellules satellites postnatales causant la mort de l'animal dans les premières semaines de vie (SEALE et al. 2000). Pax7 a donc un rôle essentiel dans la maturation du muscle post-natal et le renouvellement de la population des cellules satellites (SEALE et al. 2000) (OUSTANINA et al. 2004). Pax7, et Pax3 sont donc des facteurs de transcription essentiels ayant des rôles distincts en raison d'affinités pour les motifs de liaison à l'ADN différentes (SOLEIMANI et al. 2012).

1.2.2 Myogenèse adulte

Il a été montré chez le rat adulte que seulement 1 à 2% des noyaux sont remplacés chaque semaine (SCHMALBRUCH et LEWIS 2000). Toutefois, à la suite d'un dommage, le muscle squelettique est capable de procéder à une régénération complète. Le dommage musculaire entraîne une activation massive des cellules satellites. Cet état d'activation/prolifération des cellules satellites est finement orchestré par l'expression spécifique de facteurs de transcription myogéniques (**Figure 1.7**). Ces patrons d'expression peuvent être utilisés pour identifier les

différents stades de différenciation des cellules satellites et des CPM au cours de leur différenciation.

1.2.2.1 Le dommage musculaire

Les blessures musculaires peuvent être dues à des lésions directes telles la lacération, la contusion, l'élongation, le déchirement, ou encore indirectes comme l'ischémie (BEINER et JOKL 2001).

Dans son ensemble, la régénération du muscle se fait par succession d'étapes comprenant une phase de nécrose (dégénérescence), une phase d'inflammation, la formation de nouvelles fibres musculaires par les CPM et un remodelage de la MEC accompagné de l'hypertrophie des fibres (QUINTERO et al. 2009). Les différentes phases de la régénération musculaire sont similaires selon le type de dommage. Les mécanismes de régénération ont pu être mis en évidence grâce à un certain nombre de modèles de lésion dont font partie l'écrasement du muscle, l'application de froid, la ligation ou l'écrasement du nerf sciatique, ou l'injection de substances cytotoxiques. Les dommages les plus reproductibles et certainement les plus utilisés étant l'utilisation d'agents chimiques tels que la bupivacaïne (Marcaïne), la notexine (NTX) ou la cardiotoxine (CTX) (HALL-CRAGGS 1974; HARRIS et JOHNSON 1978; D'ALBIS et al. 1988). Ce dernier est un peptide issu d'un venin de serpent (*Naja mossambica mossambica*) fonctionnant comme un inhibiteur spécifique de la protéine kinase C qui induit la dépolarisation et la contraction des fibres musculaires, la destruction de son organisation et finalement sa lyse (COUTEAUX et al. 1988; CHARGE et RUDNICKI 2004).

La destruction des fibres musculaires entraîne la libération de protéases dans le tissu endommagé, suivi d'une infiltration de cellules inflammatoires. Cette réaction est de plus exacerbée par la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires par les CPM et les fibres musculaires ainsi que par les macrophages eux-mêmes, qui vont attirer d'autres cellules inflammatoires circulantes sur le site lésé par chimiotaxie (RAPPOLEE et WERB 1992; TIDBALL 1995; CHAZAUD et al. 2003; HIRATA

et al. 2003; TIDBALL et VILLALTA 2010). Ce recrutement est de plus facilité par la destruction des vaisseaux sanguins lors du dommage, donnant aux cellules inflammatoires un accès direct au site de lésion (TIDBALL 1995).

1.2.2.2 La régénération du muscle squelettique

La réparation du muscle suit la phase inflammatoire. Plus elle sera longue (chronique), et plus tardivement le muscle se régénérera. Comme mentionné précédemment, l'activation des cellules satellites est caractérisée par l'expression rapide de deux MRFs, Myf5 et MyoD. Les cellules satellites quiescentes n'expriment aucun MRF à l'exception de Myf5 qui est exprimé à un faible niveau par une partie des cellules satellites. Ce facteur est impliqué dans la régulation du pool des cellules satellites nécessaire au maintien de l'homéostasie du muscle. La délétion de Myf5 induit une hypertrophie des fibres musculaires et une prolifération compromise des CPM Myf5^{-/-} (GAYRAUD-MOREL et al. 2007; USTANINA et al. 2007). Le facteur de transcription MyoD, dont l'expression est augmentée dans les 12 premières heures après un dommage, est le premier signe d'activation des cellules satellites. Les souris déficientes pour MyoD présentent une masse musculaire réduite et une différenciation myogénique retardée (YABLONKA-REUVENI et al. 1999; WHITE et al. 2000). Suite à un dommage, les souris déficientes pour MyoD ont une accumulation de CPM dans le site lésé qui ne sont pas capables de se différencier et fusionner (MEGENEY et al. 1996). De plus, l'expression ectopique de MyoD dans des lignées de fibroblastes est suffisante pour activer le programme myogénique dans ces cellules (HOLLENBERG et al. 1993). Parker et collaborateurs ont récemment montré que MyoD induit la sortie du cycle cellulaire des CPM en agissant sur la localisation cytoplasmique de NF-κB (*Nuclear Factor-κB*) (PARKER et al. 2012), un facteur de transcription impliqué dans la survie et la différenciation cellulaire (HAYDEN et GHOSH 2008). Myf5 et MyoD jouent donc des rôles distincts dans la prolifération et la différenciation des CPM respectivement. Ces observations tendent à montrer que la prédominance de MyoD guide les cellules vers une différenciation précoce. Ce constat est consistant avec le fait que ces

deux facteurs ont des profils d'expression différents lors du cycle cellulaire (KITZMANN et al. 1998).

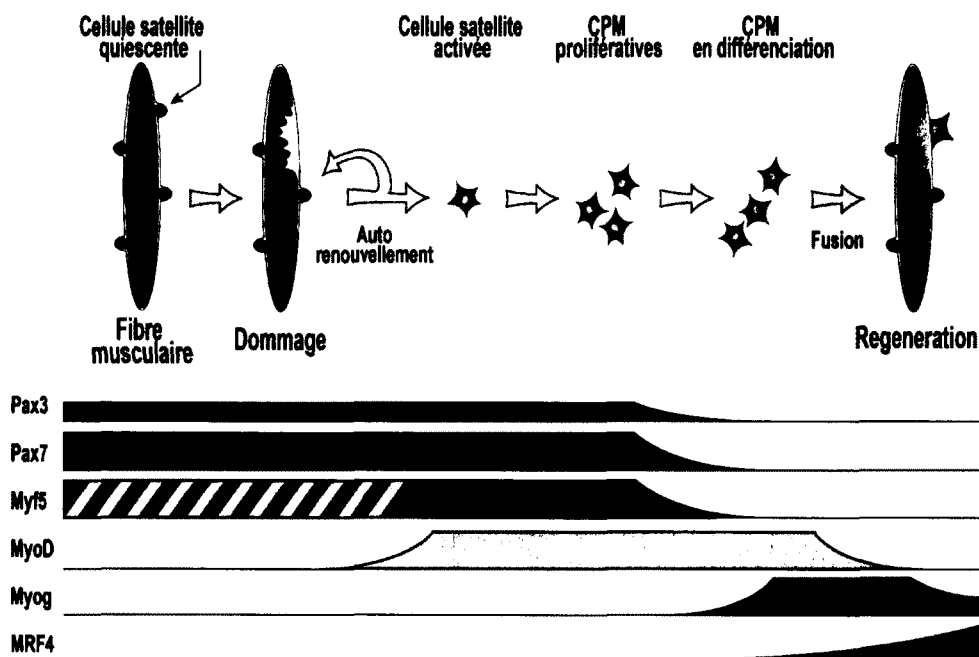


Figure 1.7 Facteurs de transcription intervenant dans les différentes étapes de la différenciation myogénique adulte

Le dommage des fibres musculaires induit l'activation, la prolifération et la différenciation des cellules satellites afin de réparer les fibres endommagées ou d'en former de nouvelles. Ces étapes sont orchestrées par les facteurs de transcription myogéniques. Pax7 et Myf5 sont exprimés par les cellules satellites quiescentes, activées et prolifératives, à l'exception des cellules satellites responsables de l'auto-renouvellement qui n'expriment pas Myf5 (zone hachurée). MyoD est exprimé par les CPM activées et prolifératives et plus fortement en début de différenciation. Myog et MRF4 sont quant à eux exprimés lors de la maturation et la fusion des CPM. Ces facteurs de transcription peuvent être utilisés comme marqueurs de l'état de différenciation des CPM. (illustration non publiée).

Suite à la phase de prolifération des CPM, deux autres membres des MRF sont exprimés, notamment la Myogénine et MRF4. Leur expression est suivie par la sortie du cycle cellulaire des progéniteurs myogéniques suite à l'activation de la protéine p21 (GUO et al. 1995; HALEVY et al. 1995; YIN et al. 2013). La perte d'expression de la myogénine par un système Cre-Lox n'induit qu'une augmentation et une diminution légère de l'expression de MyoD et de MRF4 respectivement, ainsi qu'une diminution de la taille des souris (KNAPP et al. 2006).

Le système Cre-Lox permet entre autre la délétion d'un gène entouré de séquences « Lox » suite à l'expression de la recombinaise Cre. Dans cet article, cette dernière est induite par injection de tamoxifène, permettant la délétion de la myogénine après la myogenèse embryonnaire. La myogénine joue donc des rôles bien distincts lors de la myogenèse adulte et prénatale où sa délétion cause de graves défauts musculaires (KNAPP et al. 2006; MEADOWS et al. 2008). Comme la myogénine, MRF4 est un facteur de différenciation qui intervient dans les dernières étapes de la myogenèse adulte. MRF4 n'est pas exprimé par les CPM prolifératives, mais seulement dans les myotubes en culture et dans les fibres nouvellement formées lorsque les CPM ont fusionné. MRF4 est également suspecté d'intervenir dans la maturation des fibres musculaires (ZHOU et BORNEMANN 2001). Le rôle important de MRF4 a été mis en évidence dans des souris doubles mutantes MyoD:Myf5 dans lesquelles il y a formation de muscle que lorsque l'expression de MRF4 n'est pas affectée (KASSAR-DUCHOSSOY et al. 2004). L'expression de MRF4 et de la myogénine est donc directement liée à la fusion et la maturation des fibres musculaires. Lorsque le programme de différenciation est complété, les cellules fusionnent et expriment la *myosin heavy chain* (MHC), aboutissant à des fibres musculaires fonctionnelles.

Au niveau histologique, la maturation des fibres musculaires est caractérisée par l'observation de noyaux centraux dans les fibres néoformées, qui sont généralement de calibre plus petit (CHARGE et RUDNICKI 2004) (**Figure 1.8**). De plus, les fibres en maturation sont souvent basophiles, reflétant une synthèse protéique importante, et expriment des formes embryonnaires de la MHC (WHALEN et al. 1990). Une fois la fusion des CPM complétée, la fibre en régénération augmente en taille due à la synthèse des protéines nécessaires à son fonctionnement et les nombreux noyaux qui la constituent migrent en périphérie (**Figure 1.8**).

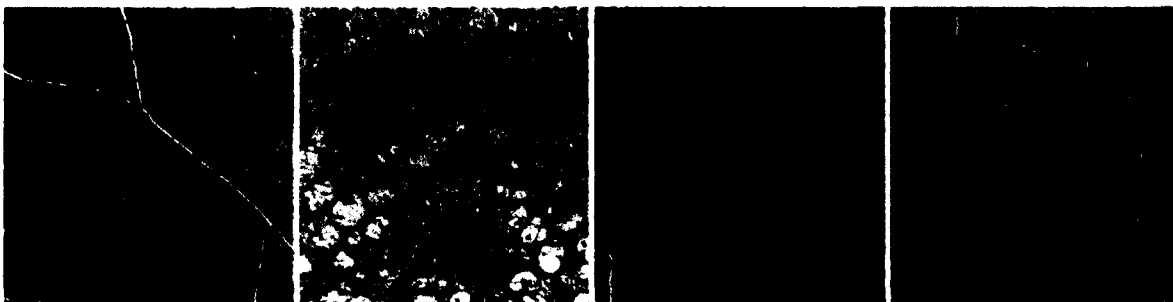


Figure 1.8 Régénération du muscle squelettique adulte

Coupe transversale de muscle squelettique de souris colorée à l'hématoxyline et éosine (H&E). Les images représentent des muscles à 0, 7, 14 et 28 jours suivants un dommage à la CTX. La régénération musculaire est caractérisée par une dégénérescence des fibres musculaires accompagnées d'une forte infiltration de cellules inflammatoires (7j). S'en suit la réparation des fibres musculaires par les CPM qui fusionnent entre elles afin de former des fibres en maturation qui sont caractérisées par un petit diamètre et la présence de noyaux centraux (J14) (flèches). À 28j, la majorité des fibres sont matures et ont retrouvé leur dimension initiale. De plus, les noyaux ont migré du centre vers la périphérie (observations non publiées).

1.3 Principales voies de signalisation impliquées dans la myogenèse adulte

Deux principales voies de signalisation impliquées dans la myogenèse prénatale (cf. section 1.2.1) jouent un rôle critique dans la régénération des fibres musculaires chez l'adulte: la voie Notch et Wnt.

1.3.1 La voie Notch

1.3.1.1 Généralités

La voie Notch joue un rôle crucial dans la régulation du devenir cellulaire par le biais d'interactions cellules-cellules lors de la morphogénèse, l'homéostasie et la régénération tissulaire (KOPAN et ILAGAN 2009). Chez les vertébrés, la signalisation Notch est initiée par des ligands extracellulaires de type Delta et Jag qui, lors de l'interaction avec le récepteur Notch, induisent le clivage de son domaine intracellulaire *Notch Intra Cellular Domain* (NICD). Une fois clivée, NICD transloque au noyau où il interagit avec un complexe nucléaire (CBF1/RBP-J, Lag1

et *Suppressor of Hairless* [Su(H)]) appelé CLS, et active la transcription de gènes cibles tels que Hes et Hey (KOPAN 2012) (**Figure 1.9**).

1.3.1.2 La voie Notch dans la myogenèse adulte

Lors de la myogenèse adulte, il y a une augmentation de l'expression de composants de la voie Notch, notamment Notch-1 et de Delta-1, dans les cellules satellites activées et les fibres musculaires (CONBOY et RANDO 2002; CONBOY et al. 2003). L'augmentation de l'activité Notch cause la transition des cellules satellites activées en CPM prolifératives, empêchant du même coup leur différenciation et leur fusion en myotubes (KURODA et al. 1999; CONBOY et RANDO 2002; CONBOY et al. 2003; BUAS et al. 2010). L'inhibition de la voie Notch dans le muscle squelettique par la perte d'expression de Delta1 ou de RBP-Jk induit une diminution du nombre de cellules satellites et une différenciation prématurée des CPM (SCHUSTER-GOSSLER et al. 2007; VASYUTINA et al. 2007). Le rôle de cette voie de signalisation est de maintenir le réservoir de cellules satellites en inhibant leur différenciation et en favorisant leur auto-renouvellement afin de maintenir l'homéostasie du tissu.

Il a été montré que la signalisation de Notch régule la division asymétrique des cellules satellites (CONBOY et RANDO 2002; SHININ et al. 2006; KUANG et al. 2007). En effet, la cellule fille engagée dans la voie myogénique exprime fortement Delta-2. Cela induit l'activation de la voie Notch de l'autre cellule fille qui retourne alors dans un état quiescent. De manière intéressante, Numb, un inhibiteur de la voie Notch, est exprimé spécifiquement dans la cellule fille qui se différencie empêchant ainsi que les deux cellules filles ne s'engagent dans le processus de différenciation. De plus, le niveau d'expression de Delta-1 est élevé dans les cellules satellites ($Pax7^+Myf5^-$) et faible dans les CPM ($Pax7^+Myf5^+$) (KUANG et al. 2007) (**section 1.1.2.3**). Toutefois, aucun lien direct n'a été fait entre la signalisation de Notch et l'expression de Myf5.

Finalement, une étude récente a montré que l'activation constitutive de Notch dans les cellules satellites favorise leur auto-renouvellement en augmentant l'expression de Pax7 (WEN et al. 2012). D'après les auteurs, la décision des

cellules satellites de se différencier, ou de retourner à l'état quiescent, est sous le contrôle de la voie Notch. Ainsi, l'activation de la voie Notch dans une CPM proliférative causerait l'expression de Pax7 et inhiberait l'expression de MyoD, nécessaire à leur différenciation. Ces travaux ont montré que le rôle de la voie Notch dans l'auto-renouvellement des cellules satellites est direct, est indépendant de Myf5, et n'est pas dû à une simple inhibition de leur différenciation. Par ailleurs, il a récemment été suggéré que la voie Notch serait importante pour le retour des cellules satellites dans leur niche, définie par la présence d'une fibre musculaire d'un côté et d'une lame basale de l'autre (BROHL et al. 2012). En effet, les auteurs ont montré que le positionnement de cellules myogéniques dans un environnement permettant leur retour à l'état quiescent implique la formation d'une lame basale par ces mêmes cellules qui serait dépendante de la voie Notch.

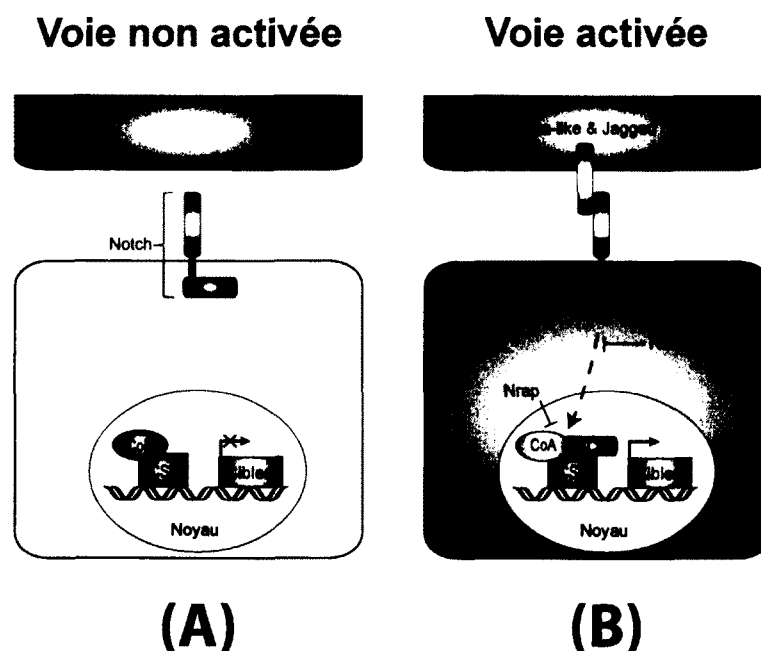


Figure 1.9 La voie de signalisation Delta/Notch

Notch est un récepteur de surface qui transmet des informations cellule-cellule. (A) Lorsqu'aucun ligand de la voie Notch n'est présent, les gènes cibles de cette voie sont réprimés par la présence de co-répresseurs qui interagissent avec le complexe CLS (CBF1/RBP-Jk, Suppressor of Hairless, Lag1). (B) La présence d'agonistes tels que Delta1, 3 et 4 ou Jag1 et 2 induit le clivage de la partie intra cytoplasmique du récepteur Notch (NICD). Une fois transloquée dans le noyau, NICD interagit avec des répresseurs transcriptionnels du complexe CSL. Cela induit la transcription de gènes cibles de la voie Notch, notamment les gènes Hes et Hey. La signalisation Notch peut entre autres être inhibée par les protéines Numb et Nrap. Adapté de (KOPAN 2012).

Fait intéressant, les travaux de Conboy et collaborateurs ont montré une relation directe entre la diminution de l'activité de la voie Notch dans les cellules satellites et la perturbation de la régénération du muscle vieillissant chez la souris (CONBOY et al. 2003). En effet, l'inhibition de la voie Notch dans les cellules satellites de muscles jeunes diminue la régénération musculaire. À l'inverse, l'activation forcée de la voie Notch dans les cellules satellites d'un muscle âgé induit une meilleure régénération musculaire que les individus âgés contrôles (CONBOY et al. 2003). Des expériences de parabioses, technique qui consiste à fusionner deux individus afin qu'ils partagent le même environnement systémique, entre des souris jeunes et âgées ont révélé que les capacités régénératives du muscle âgé pouvaient être rétablies lorsqu'exposées à un environnement systémique jeune. Ces résultats démontrent que la régénération musculaire est liée à des facteurs systémiques se trouvant dans le microenvironnement des cellules progénitrices du muscle qui contribuent à moduler leur comportement.

1.3.2 La voie Wnt

1.3.2.1 Généralités

Les Wnt forment une famille de glycoprotéines sécrétées riches en cystéine qui participent au développement embryonnaire des organismes multicellulaires ainsi qu'à l'homéostasie des tissus adultes (MILLER 2002). À ce jour, 19 ligands Wnt et 10 différents membres de la famille des récepteurs Frizzled ont été répertoriés dans le génome humain ce qui implique de nombreuses interactions Wnt/Frizzled possibles pouvant avoir des propriétés de signalisation distinctes (NUSSE 2008; NUSSE 2012). La complexité des Wnts et des voies de signalisation qu'elles activent est de plus accrue par le fait qu'elles diffèrent selon la nature de la cellule cible et les récepteurs présents à sa surface (MARLOW et al. 2002; SMIT et al. 2004; TAO et al. 2005; MIKELS et NUSSE 2006). Lors de l'embryogenèse, ils sont impliqués dans divers rôles essentiels, tels que la prolifération, la migration, la

polarité, la mort et le devenir cellulaire. Les Wnt sont donc très conservés au cours de l'évolution.

Les voies de signalisation activées par les différents Wnt ont été classées en deux types: la voie canonique et les voies non canoniques, selon que les Wnt induisent respectivement une accumulation intracellulaire de la protéine β -caténine ou non. Les voies non canoniques comprennent la voie *Planar Cell Polarity* (PCP), la voie Wnt/ Ca^{2+} et la cascade de signalisation PI3K/AKT/mTOR. Les voies non canoniques, moins bien caractérisées que la voie canonique, interviennent dans de nombreux processus tels que la polarité des cellules épithéliales, l'organisation du cytosquelette, l'adhésion et la migration cellulaire ainsi que la division symétrique des cellules satellites (LE GRAND et al. 2009; VON MALTZAHN et al. 2012). La voie canonique de Wnt, aussi appelée voie Wnt/ β -caténine, est caractérisée par sa capacité à moduler la quantité de β -caténine intracellulaire. Lorsqu'aucun ligand Wnt n'est présent dans l'environnement de la cellule cible, la β -caténine est continuellement phosphorylée sur ses résidus Sérine (Ser33/37) et Thréonine (Thr41) par un complexe cytoplasmique dans le but d'être dégradée par le protéasome. Ce complexe est composé de l'axine, du suppresseur de tumeur adenomatous polyposis coli (APC), de la glycogène synthétase kinase 3 β (GSK3 β), la caséine kinase 1 α et de la protéine phosphatase 2A (CLEVERS 2006). Si des Wnt sont présents dans l'environnement de la cellule cible, ils se lient à leur récepteur spécifique constitué de deux composants, soit un membre de la famille des Frizzled et un co-récepteur des lipoprotéines de faibles poids moléculaires (LRP5/LRP6). Les récepteurs Frizzled forment une famille de protéines à sept domaines transmembranaires possédant un domaine riche en cystéine (CRD, *Cystein-Rich Domain*) à leur extrémité N-terminale par lesquels les Wnts se lient. L'activation des récepteurs Frizzled par des Wnt cause la phosphorylation du co-récepteur LRP et le recrutement de l'axine. Dishevelled (Dvl-2) est lui aussi phosphorylé et induit l'inhibition du complexe Axine-APC-GSK3 β provoquant ainsi l'accumulation de β -caténine intracellulaire. De cette manière, la β -caténine échappe à sa dégradation sous une forme hypo-phosphorylée et stabilisée, avec une localisation préférentielle au noyau. Dans le noyau, la β -caténine lie l'un des

membres de la famille des facteurs de transcriptions se liant à l'ADN, le *T cell factor/lymphoid enhancer factor* (TCF/LEF) (ARCE et al. 2006). Il y a alors transcription des gènes cibles ou de la voie Wnt canonique avec l'aide de divers co-activateurs (**Figure 1.10**).

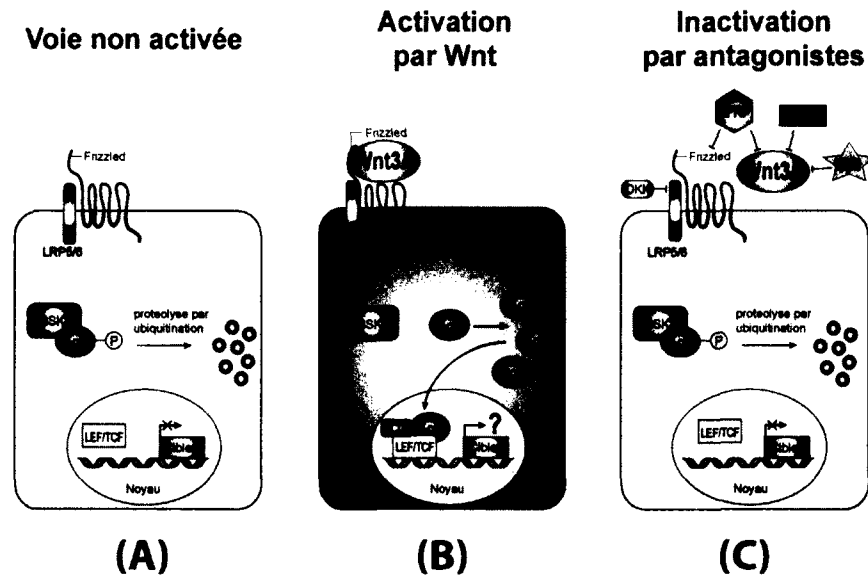


Figure 1.10 Activation et inhibition de la voie Wnt canonique

(A) Lorsqu'aucun ligand Wnt n'est présent dans l'environnement cellulaire, le β -caténine est phosphorylée par la GSK3 afin d'être ubiquitinée et dégradée par le protéasome. (B) Lorsque présent dans l'environnement de la cellule, l'agoniste Wnt se lie avec un récepteur Frizzled et des co-récepteurs LRP5/6. Cette interaction cause l'inhibition du complexe impliquant GSK3 et l'accumulation de β -caténine intra-cytoplasmique. Celle-ci va alors transloquer dans le noyau et induire la transcription des gènes cibles par l'intermédiaire du complexe TCF/LEF. (C) Il existe plusieurs antagonistes capables d'inhiber l'activité de la voie Wnt canonique. Des derniers se distinguent par leur capacité à interagir directement avec les agonistes (Wif-1), les récepteurs (DKK) ou encore les deux à la fois (sFRP). Adaptée de (MILLER 2002).

Les gènes cibles de la voie canonique de Wnt sont très variés, mais sont principalement impliqués dans la structure de la chromatine et la régulation de l'ARN polymérase II telles l'acétylation et la méthylation des histones ou des protéines de liaison à la chromatine. De plus la β -caténine, en association avec les facteurs de transcription précédemment cités, peut activer, mais aussi réprimer la transcription des gènes cibles tels FGF20, DKK1, WISP1, MYC et la cycline D1 (HE et al. 1998; PENNICA et al. 1998; TETSU et McCORMICK 1999; CHAMORRO et al. 2005).

La voie de signalisation des Wnt peut être modulée par la présence de protéines extracellulaires capable de l'inhiber. Parmi elles, on trouve les membres de la famille des *secreted Frizzled-Related Protein* (sFRP) (MOON et al. 1997), *Wnt-inhibitory factor-1* (Wif-1) (HSIEH et al. 1999), Cerebelus (PICCOLO et al. 1999) et la famille des Dickkopf (DKK). Les sFRP ainsi que Wif-1 et Cerebelus peuvent se lier directement aux Wnt secrétés et ainsi empêcher leur interaction avec les récepteurs Frizzled. Les sFRP peuvent aussi interagir avec les Frizzled, inhibant ainsi la voie Wnt en formant un complexe non fonctionnel avec les Frizzled. Il existe chez l'homme cinq gènes sFRP mais leur spécificité pour les différents ligands Wnt ainsi que pour les récepteurs Frizzled reste à déterminer (MILLER 2002). Les inhibiteurs de la famille des DKK, répertoriés au nombre de quatre chez l'homme, ne se lient pas aux Wnt mais empêchent l'activation de la voie Wnt canonique en interagissant avec le domaine extracellulaire des récepteurs LRP (BAFICO et al. 2001).

1.3.2.2 La voie Wnt dans la myogenèse adulte

La voie Wnt canonique intervient dans la formation des cellules myogéniques des somites lors de l'embryogenèse (MUNSTERBERG et al. 1995) en influençant l'expression de Pax3, Pax7 et des MRF dans les cellules pré-myogéniques (TAJBAKHSI et al. 1998; OTTO et al. 2006). Lors de la régénération musculaire adulte, la signalisation Wnt est impliquée dans l'auto-renouvellement des cellules satellites et la différenciation des CPM. Dans la phase précoce de régénération, les agonistes Wnt5a, 5b et 7a sont surexprimés, alors que l'expression de Wnt4 est réprimée. Dans une étape plus tardive, les ligands Wnt 7b et 3a sont exprimés à leur tour (POLESSKAYA et al. 2003; BRACK et al. 2008). Wnt7a est impliqué dans la division d'une sous-population de cellules satellites avec des propriétés de cellules souches par l'intermédiaire de la voie Wnt non canonique PCP. La surexpression de Wnt7a lors de la régénération induit une augmentation du nombre de cellules satellite et à l'inverse, les souris déficientes

pour cette protéine ont un nombre réduit de cellules satellites suite à la régénération (LE GRAND et al. 2009).

Toutefois, il semble que la différenciation des CPM soit principalement contrôlée par la voie Wnt canonique. En effet, il a été montré qu'une transition de la voie Notch vers la voie Wnt canonique est nécessaire à l'initiation de la différenciation des CPM (BRACK et al. 2008). L'induction exogène de la voie canonique par l'intermédiaire de Wnt3a lors de la phase précoce de régénération résulte en une différenciation prématurée des CPM. Ces résultats ont été confirmés *in vitro*, où l'inhibition de GSK3 β ainsi que l'activation pharmacologique de la voie Wnt canonique facilitent la différenciation des CPM (POLESSKAYA et al. 2003; ROCHAT et al. 2004; VAN DER VELDEN et al. 2006). De plus, une étude récente a montré que les co-régulateurs BCL9 et BCL9-2 sont nécessaires à l'activation de la voie Wnt canonique dans la régénération musculaire murine (BRACK et al. 2009).

De manière intéressante, la voie Wnt canonique est impliquée dans le développement de fibrose lors du vieillissement musculaire ainsi que dans la fibrose dans d'autres organes. De forts taux de mutations de la β -caténine ainsi que l'un de ses régulateurs négatifs APC ont été retrouvés dans la fibromatose agressive et la tumeurs desmoïdes associées à la prolifération bénigne de fibroblastes (ALMAN et al. 1997; TEJPAN et al. 1999). De plus, les travaux de Cheon et collaborateurs ont montré que l'activation forcée de la β -caténine est suffisante pour induire une plaie hyperplasique et une surproduction de collagène, mimant la fibromatose agressive chez l'humain (CHEON et al. 2002; CHEON et al. 2006). Une augmentation de l'activité de la voie Wnt induite par une diminution de ses inhibiteurs notamment sFRP1 a aussi été associée à la sclérose systémique du poumon fibrotique et à la fibrose pulmonaire idiopathique (RUSSELL et al. 2010; Hsu et al. 2011). De plus, Salazar et collaborateurs ont montré que les cellules souches mésenchymateuses (CSM) synthétisent entre autres des Wnt impliqués dans la prolifération et la synthèse de collagène par les fibroblastes du poumon (SALAZAR et al. 2009). L'activation de la voie Wnt canonique a un impact sur la prolifération et l'invasion des CSM, mais intervient aussi dans l'induction ou l'inhibition de leur différenciation ostéogénique, chondrogénique et adipogénique.

Ces différenciations dépendent des Wnt, des récepteurs Frizzled impliqués ainsi que le niveau d'activation de la voie Wnt (KAROW et al. 2009; LING et al. 2009).

En résumé, la voie Wnt joue un rôle clé dans l'homéostasie du muscle et lors de sa régénération en modulant le comportement des cellules satellites et des CPM du muscle squelettique. Toutefois, l'impact de cette voie sur les cellules progénitrices stromales du muscle n'a pas encore été exploré. Sachant que la voie Wnt est impliquée dans la fibrose du muscle squelettique vieillissant ainsi que dans la fibrose d'autres organes, il serait intéressant de vérifier si elle pourrait avoir un rôle dans la fibrose du muscle dystrophique, une complication conduisant à la perte des fonctions cardio-respiratoires chez les personnes qui en sont atteintes.

1.4 La niche des cellules satellites

Le comportement des cellules souches est régulé par un ensemble de signaux provenant de son microenvironnement, aussi appelé niche. Dans le muscle squelettique, les cellules satellites sont confinées dans une niche qui consiste en une combinaison spécifique de composants cellulaires, biochimiques et biophysique (**Figure 1.11**) (SCHARNER et ZAMMIT 2011). Cette niche leur permet d'être maintenues dans un état quiescent en condition physiologique normale et également de s'activer et de proliférer de façon optimale au besoin.

L'importance de la niche sur le comportement des cellules satellites peut être mise en évidence lors de leur mise en culture. En effet, une fois en culture, les cellules satellites perdent leur potentiel régénératif. Partridge et collaborateurs ont procédé à la première thérapie cellulaire qui consiste à injecter des CPM dans le muscle de souris dystrophiques (PARTRIDGE et al. 1978; MORGAN et al. 1988; PARTRIDGE et al. 1989). Ils ont alors constaté que les CPM transplantées fusionnent très peu avec les fibres endommagées et seulement quelques myofibres sont positives pour la dystrophine chez des souris *mdx* (*X chromosome-linked Muscular Dystrophy*). Depuis, plusieurs équipes ont tenté le même type

d'expérience. Chez des patients atteints de la DMD, Gussoni et collaborateur ont rapportés que 10 % des cellules injectées était encore présentes 6 mois après la transplantation et que la moitié de celles-ci avaient intégré les fibres du receveur (GUSSONI et al. 1997). L'efficacité des CPM transplantées est modeste puisqu'une très grande majorité est perdue dans la première semaine et n'est pas localisée dans la niche des cellules satellites, aspect essentiel au maintien à long terme des capacités régénératives du muscle. De plus, le potentiel migratoire des CPM est très faible et nécessite de nombreux sites d'injections (SKUK et al. 2007).

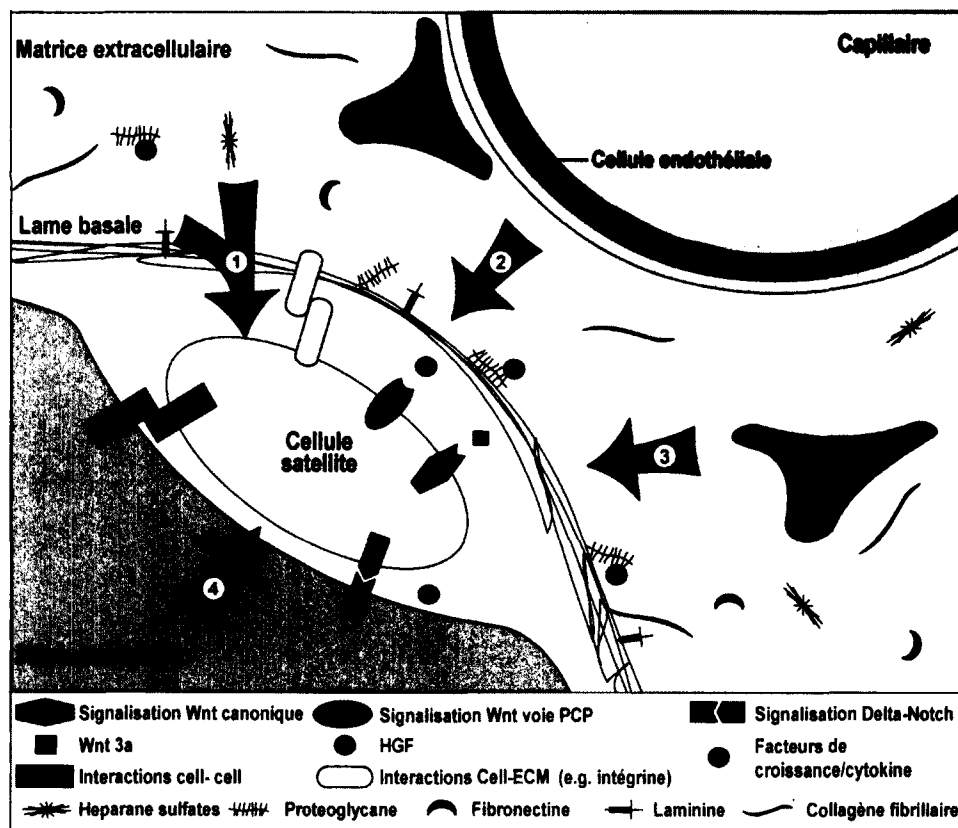


Figure 1.11 La niche des cellules satellites

Les cellules satellites sont localisées dans une niche sous l'influence de signaux provenant de la lame basale (1), de l'environnement systémique (2), des cellules du tissu conjonctif (3) et de la fibre sous-jacente (4). Ces signaux permettent le maintien des cellules satellites dans un état quiescent en condition physiologique, et leur activation et différenciation lorsque la réparation des fibres musculaires est nécessaire. Adaptée de (TRENZ et al. 2011).

Autant les cellules satellites extraites de leur niche ont une capacité d'implantation limitée, autant des fibres contenant des cellules satellites localisées dans leur niche ont une capacité d'intégration remarquable. En effet, Collins et collaborateurs ont montré que la transplantation d'une seule fibre musculaire, possédant de 7 à 22 cellules satellites associées peut, suite à un dommage, générer des milliers de CPM capables de générer des centaines de nouvelles fibres et surtout de coloniser la niche des cellules satellites des fibres nouvellement réparées (COLLINS et al. 2005). La compréhension des facteurs présents dans la niche est un aspect clé dans le maintien de leur potentiel régénératif et pourrait avoir un impact important d'un point de vue de la médecine régénératrice.

1.4.1 L'environnement biochimique des cellules satellites

Les cellules satellites sont exposées à des signaux provenant à la fois de la fibre et de la lame basale. Les interactions entre la cellule satellite et la lame basale se font par l'intermédiaire de jonctions intégrines. Les cellules satellites expriment l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ qui permet la jonction avec divers constituants de la lame basale telle la laminine (BURKIN et KAUFMAN 1999). Les divers protéoglycanes présents dans la lame basale sont capables de séquestrer des facteurs de croissance incluant le *basic fibroblast growth factor* (bFGF), *hepatocyte growth factor* (HGF), *epidermal growth factor* (EGF), *insulin-like growth factor-1* (IGF-1) et divers agonistes de la voie Wnt, provenant de la circulation sanguine, ou encore sécrétés, par les cellules stromales et les cellules satellites elles-mêmes (DIMARIO et al. 1989; TATSUMI et al. 1998; MACHIDA et BOOTH 2004; GOLDING et al. 2007; BRACK et al. 2008; LE GRAND et al. 2009). Ces facteurs sont capables de stimuler la survie, l'activation ou la prolifération des cellules satellites. De plus, les cellules satellites expriment les syndecanes-3/4 (CORNELISON et al. 2004) qui peuvent eux aussi séquestrer les facteurs de croissance précédemment cités et les libérer à la suite d'un dommage (OLWIN et RAPRAEGER 1992; TATSUMI et al. 1998; CORNELISON et al. 2001; JENNISKENS et al. 2006; LANGSDORF et al. 2007).

Du côté apical, la fibre musculaire est aussi une source de signaux ayant une influence sur le comportement des cellules satellites. Cet aspect a été suggéré dès les années 90 par le fait que le traitement de fibres individuelles avec une myotoxine induit la lyse de la fibre, mais pas de sa lame basale, causant l'activation des cellules satellites et la prolifération des CPM (BISCHOFF 1990.). Depuis, plusieurs aspects de l'influence de la fibre sur le comportement des cellules satellites ont été montrés. C'est notamment le cas de la signalisation cellule-cellule delta/notch, qui intervient dans l'activation des cellules satellites et l'inhibition de leur différenciation (CONBOY et RANDO 2002; CONBOY et al. 2003; LUO et al. 2005; KUANG et al. 2007; BRACK et al. 2008). La perte d'expression du ligand Delta-1 ou du médiateur nucléaire RBP/J induit une différenciation prématurée des cellules myogéniques embryonnaires et la disparition des cellules satellites (SCHUSTER-GOSSLER et al. 2007; VASYUTINA et al. 2007). De plus, l'inhibition pharmacologique de la voie Notch réduit la prolifération et l'auto-renouvellement des cellules satellites, alors que l'augmentation de l'activité Notch améliore la régénération musculaire dans le muscle âgé (CONBOY et al. 2003; KUANG et al. 2007).

La cellule satellite et la fibre sous-jacente communiquent aussi par des jonctions impliquant les M-cadhérines (CORNELISON et WOLD 1997; KUANG et al. 2008). La M-cadhérine est impliquée dans l'attachement et la fusion des CPM pour former ou réparer les fibres musculaires (CIFUENTES-DIAZ et al. 1995) ainsi que dans leur différenciation (WROBEL et al. 2007). De plus, la M-cadhérine est surexprimée dans les cellules satellites lors de la régénération musculaire (IRINTCHEV et al. 1994). Toutefois, les souris déficientes pour la M-cadhérine ne présentent pas de perturbation lors de la régénération musculaire, expliquée par un mécanisme de compensation par d'autres cadhérines (HOLLNAGEL et al. 2002). À l'exception de la voie Notch et les jonctions impliquant la M-cadhérine, peu de choses sont connues quant aux interactions entre la fibre musculaire avec la cellule satellite lors de la myogenèse. Il est toutefois admis que l'activation des cellules satellites dépend du HGF libéré par les fibres musculaires endommagées. En effet, des études récentes ont montré que la signalisation de l'oxyde nitrique

(NO) pourrait agir en amont du HGF pour moduler l'activation des cellules satellites (TATSUMI et al. 2006; WOZNIAK et ANDERSON 2007).

Le comportement des cellules satellites est aussi régulé par des signaux provenant de sources plus lointaines. En effet, lors d'un dommage, des monocytes pro-inflammatoires s'accumulent et se différencient en macrophages dans le site de lésion. Cette conversion est accompagnée d'une sécrétion importante de cytokines qui stimulent la myogenèse et la maturation des fibres musculaires (WEHLING et al. 2001; SUELVES et al. 2002; ARNOLD et al. 2007; SUELVES et al. 2007; SEGAWA et al. 2008; TIDBALL et VILLALTA 2010).

Finalement, les cellules satellites sont aussi sous l'influence de signaux provenant de l'environnement systémique. En effet, Christov et ses collaborateurs ont constaté que les cellules satellites sont en étroite association avec les capillaires sanguins, et que les cellules endothéliales favorisent la prolifération des cellules satellites par l'intermédiaire de divers facteurs de croissance tels que IGF, FGF, HGF et VEGF (CHRISTOV et al. 2007). La myostatine, un membre de la famille des TGF- β (*Transforming Growth Factor β*), est un autre facteur connu pour provenir de la circulation sanguine et des cellules interstitielles et pouvant diffuser à travers la lame basale pour moduler la fonction des cellules satellites (MCCROSKERY et al. 2003). L'importance de l'environnement systémique sur les capacités régénératives du muscle a également été remarquablement démontrée par des expériences de parabioses entre souris jeunes et âgées (BRACK et al. 2007). Ici, les auteurs ont montré que l'exposition d'un muscle âgé à un environnement systémique jeune améliorerait la régénération musculaire suite à un dommage. Finalement, les cellules satellites expriment elles-mêmes des facteurs influençant leur comportement de manière autocrine et paracrine. C'est notamment le cas du ligand Delta-1 de la famille des récepteurs Notch impliqué dans la quiescence et l'auto-renouvellement des cellules satellites (CONBOY et RANDO 2002; CONBOY et al. 2003; TSIVITSE 2010). Il est intéressant de noter que de nombreux autres aspects de la niche des cellules satellites sont perturbés dans le muscle vieillissant et sont grandement impliqués dans la diminution du potentiel régénératif des cellules satellites avec l'âge (GOPINATH et RANDO 2008).

1.4.2 L'environnement biomécanique des cellules satellites

Le comportement des cellules souches dépend aussi de facteurs mécaniques. En effet, les cellules sont capables de répondre à des signaux biophysiques par l'intermédiaire de mécanismes de mécanotransduction pouvant être transmis entre autres par les jonctions cellule-cellule, les canaux ioniques activés par étirement de la membrane et/ou par les complexes d'adhésion focaux (LOPEZ et al. 2008; GEIGER et al. 2009; GUILAK et al. 2009). Ces derniers font notamment intervenir les intégrines qui constituent un lien entre les protéines de la lame basale (e.g. laminine) et l'activité transcriptionnelle des cellules. Les cellules satellites, ainsi que les fibres musculaires, expriment spécifiquement l'intégrine $\alpha7\beta1$. Toutefois, son rôle dans la mécanotransduction des cellules satellites n'a jamais été exploré.

Les forces perçues par les senseurs mécaniques de la membrane peuvent réguler le comportement de la cellule soit par interaction directe avec son cytosquelette (e.g. filaments d'actine), lui même couplé au noyau par des protéines telles que les nespines (WANG et al. 2009), soit en modulant de nombreuses voies de signalisation telles la voie de l'oxyde nitrique, du Ca^{2+} , des MAP kinases, de (PI3K)-Akt et des SMAD (**Figure 1.12**). Ils modifient ainsi l'expression de gènes impliqués dans la synthèse et le relargage de facteurs autocrines et paracrines, la prolifération, la migration, la différenciation ou encore l'apoptose (LIEDERT et al. 2006; JAALOUK et LAMMERDING 2009; HOLLE et ENGLER 2011; MENDEZ et JANMEY 2012).

De la même manière, des changements dans la composition de la MEC peuvent également avoir des répercussions sur l'intégrité du tissu, mais aussi sur le potentiel régénératif des cellules satellites. Il a par exemple été montré que le collagène de type VI est nécessaire au maintien de l'auto-renouvellement des cellules satellites et sur la régénération musculaire. En effet, une équipe a récemment montré que la perte d'expression du collagène de type VI diminue la rigidité du muscle affectant son potentiel régénératif. Un phénotype normal a pu être rétabli par greffe de fibroblastes de souris sauvages qui ont synthétisé du collagène de type VI (URCIUOLO et al. 2013).

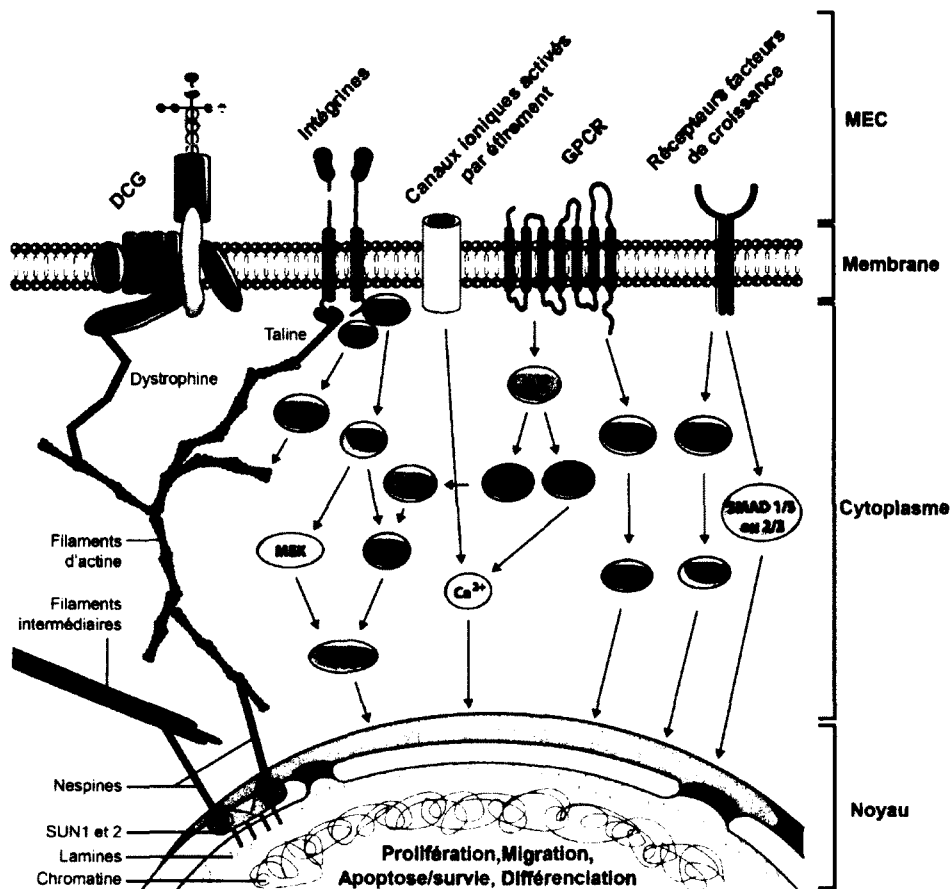


Figure 1.12 Principales voies de signalisation de la mécanotransduction

Les forces de l'environnement de la cellule sont transmises au cytosquelette de la cellule par l'intermédiaire de complexes membranaires tels DGC ou les intégrines. Les modifications mécaniques du microenvironnement de la cellule peuvent être converties en signal biochimique en déclenchant l'activation de nombreuses cascades de signalisation dans le cytoplasme. Ces signaux peuvent alors moduler l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire, l'apoptose, la migration ou la différenciation de la cellule. Le cytosquelette est également couplé au noyau par l'intermédiaire de nespines qui interagissent avec des protéines de la membrane nucléaire telles SUN1 et SUN2, associées aux lamines. Les lamines peuvent se lier à la chromatine et modifier l'activité transcriptionnelle. Ainsi, les altérations mécaniques du microenvironnement peuvent se transmettre de la MEC directement au noyau. Pour la clarté du schéma, toutes les interactions possibles entre les voies de signalisation ne sont pas représentées. Les voies de signalisation indiquées ont été identifiées dans divers types cellulaires. Adapté de (LIEDERT et al. 2006; JAALOUK et LAMMERDING 2009; D'ANGELO et al. 2011).

L'activation, la prolifération et la différenciation des cellules satellites *in vitro* peuvent être modifiées par des changements subtils de la rigidité de leur microenvironnement. La rigidité, définie par le module de Young et exprimée en

Pascal (Pa), peut être quantifiée par microscopie à force atomique (AFM) (**cf. section 2.15**).

Quelques études présentes dans la littérature ont mesuré la rigidité du tissu ou des cellules musculaires sur des coupes longitudinales de muscle, des fibres individuelles et des cellules myogéniques différenciées en myotubes *in vitro*. Ainsi, les travaux du groupe de Engler ont montré pour la première fois que le muscle squelettique de souris sauvages possède une rigidité de 12 kPa (ENGLER et al. 2004b) et augmente à 18 kPa chez les souris dystrophiques. Un autre groupe a obtenu des valeurs de 4 kPa pour le muscle de souris sauvages et de 1,4 kPa pour des souris dystrophiques (PUTTINI et al. 2009). Ces deux publications ont défini la rigidité des muscles squelettiques à partir de tranches fines d'EDL (Extensor Digitorum Longus) et de TA (Tibialis anterior), respectivement. D'autres équipes se sont intéressées à la rigidité de fibres musculaires individuelles de souris et de rats et ont obtenu des valeurs variant de 0,350 à 61 kPa pour des fibres sauvages (DEFRANCHI et al. 2005; CANATO et al. 2010; MARG et al. 2010; OGNEVA et al. 2010).

Contrairement aux études précédentes effectuées sur des tissus ou des cellules *ex vivo*, certaines équipes ont évalué le module de Young de myotubes issus de la fusion de C2C12, une lignée cellulaire murine. Collinsworth et ses collaborateurs ont obtenu une valeur de 45 kPa (COLLINSWORTH et al. 2002) alors que Mathur et ses collaborateurs ont quant à eux obtenu un module de Young de 25 kPa pour le même type d'expérience (MATHUR et al. 2001). Une autre équipe a quant à elle déterminé la rigidité de C2C12 différenciées après seulement trois jours de culture à 8 kPa (ZHANG et al. 2004).

Enfin, il a été démontré que la lignée cellulaire myogénique C2C12 se différencie préférentiellement sur des substrats ayant une rigidité de 12 kPa contrairement à un substrat d'une rigidité inférieure à 5 kPa ou supérieure à 20 kPa (ENGLER et al. 2004b). De la même manière, le taux de prolifération de CPM primaires est optimal sur un substrat de 21 kPa lorsque comparé à un substrat de 3 ou 80 kPa (BOONEN et al. 2009). La perturbation de l'élasticité du muscle pourrait donc altérer les capacités de prolifération et de différenciation des cellules satellites et des CPM ce qui influencerait la régénération du muscle.

Une augmentation de la rigidité de la MEC a été mesurée dans le muscle des souris *mdx* et des souris âgées pour lesquelles la régénérescence et le comportement des cellules satellites sont altérés (STEDMAN et al. 1991; ENGLER et al. 2004b; ROSANT et al. 2007; GAO et al. 2008). De manière intéressante, la culture des CPM primaires sur un substrat d'une rigidité de 12 kPa (correspondant à celle du muscle squelettique d'après les travaux d'Engler) induit une meilleure régénération et une incorporation des CPM dans la niche suite à leur transplantation, que lorsque cultivées sur des substrats de rigidité plus faible (2 kPa) ou plus élevée (42 et 106 kPa) (GILBERT et al. 2010).

La littérature montre donc que l'environnement biomécanique joue un rôle clé dans la fonction des cellules progénitrices du muscle. Ce domaine de recherche en est qu'à ses balbutiements et de nombreux aspects restent à élucider, notamment au niveau du maintien des propriétés régénératives des CPM. De plus, la grande variation des valeurs obtenues indique la nécessité d'une harmonisation des outils, des modèles et des méthodes de mesure afin d'arriver à un consensus.

En résumé, la niche est une combinaison unique de facteurs biophysiques, biochimiques et cellulaires capables de préserver et promouvoir la quiescence, l'activation et la différenciation des cellules satellites. Bien que des progrès importants aient été faits sur son implication dans le maintien de propriétés régénératives des cellules satellites, de nombreux aspects restent encore à élucider. La compréhension des divers aspects de la niche des cellules satellites est d'une importance capitale dans l'élaboration de modèles *in vitro* permettant le maintien de propriétés régénératives des cellules satellites pour la thérapie cellulaire du muscle squelettique.

1.5 Les altérations de la fonction musculaire

1.5.1 Le vieillissement du muscle

Le vieillissement est un processus physiologique qui se manifeste par un déclin progressif de la fonction physiologique de l'ensemble des tissus ainsi qu'une réponse différée suite à un dommage. Le muscle squelettique ne faisant pas exception, son vieillissement est caractérisé par un déclin progressif de la masse et de la force musculaire, aussi appelé sarcopénie (DI LORIO et al. 2006), ainsi que par une diminution de ses capacités régénératives suite à un dommage (CONBOY et al. 2003 ; CARLSON et al. 2009; CAROSIO et al. 2011). Les conséquences de la sarcopénie sont une perte d'autonomie et un risque accru de chutes et de fractures. Chez l'homme, la sarcopénie apparaît entre l'âge de 50 et 80 ans où 30% de la masse musculaire et 35% des fibres musculaires sont perdues (FRONTERA et al. 2000).

1.5.1.1 Caractéristiques du muscle vieillissant

Le vieillissement du muscle est caractérisé par une diminution du nombre et de la taille des fibres musculaires (FAULKNER et al. 2007). L'atrophie musculaire est associée à un déséquilibre entre la synthèse et la dégradation protéique des fibres, avec une diminution de protéines myofibrillaires et de l'expression de la MHC, ainsi qu'une perturbation du fonctionnement du protéasome, de l'autophagie et de la dégradation lysosomale (HASTEN et al. 2000; TAVERNARAKIS 2008; COMBARET et al. 2009). La diminution de la taille des fibres est également accompagnée par une diminution du nombre de noyaux présents dans les fibres musculaires, suggérant un défaut de prolifération des CPM lors de la réparation des fibres musculaires (BRACK et al. 2005).

La diminution du potentiel régénératif du muscle squelettique est principalement attribuée aux cellules satellites. La variation du nombre de cellules satellites a fait l'objet de nombreuses recherches aboutissant à des conclusions variées allant d'un déclin prononcé à une légère augmentation (GIBSON et SCHULTZ 1983; CONBOY et al. 2003; SAJKO et al. 2004; BRACK et al. 2005; SHEFER et al.

2006). Cette variabilité est attribuable aux différences entre les modèles animaux, les types de muscle, l'âge des individus et à la méthode utilisée pour dénombrer les cellules satellites. En général, les travaux ont montré que le muscle âgé présente un délai dans l'activation des cellules satellites, et une diminution de leur prolifération, causant une diminution du nombre de CPM (CAROSIO et al. 2011; JANG et al. 2011). Shefer et collaborateurs ont montré par des cultures de fibres individuelles que la prolifération des CPM âgées est diminuée du tiers lorsque comparé à des CPM de muscle jeunes. Ces auteurs ont de plus mis en évidence un important délai dans la capacité des CPM âgées à former des myotubes en culture (SHEFER et al. 2006). De plus, une diminution du nombre de noyaux par myotube ainsi qu'une diminution de leur taille ont été observées (BECCAFICO et al. 2007).

En ce qui concerne les facteurs de transcription spécifiques à la myogenèse, il semble que l'expression de MyoD, Myf5, de la myogénine soit augmentée dans le muscle âgé (DEDKOV et al. 2003). Le muscle âgé semble donc présenter une perturbation de l'état de différenciation de ses CPM. Toutefois ces observations ont été obtenues par quantification des protéines totales du muscle et n'ont pas été explorées à l'échelle cellulaire.

1.5.1.2 Altérations du microenvironnement du muscle âgé

De nombreuses expériences *in vitro* et *in vivo* suggèrent que la diminution du potentiel régénératif avec l'âge est due à une altération du microenvironnement des cellules progénitrices du muscle. Dès 1989, Carlson et Faulkner ont montré par des transplantations autologues et hétérologues de muscles jeunes et âgés que la force maximum et la masse d'un muscle âgé greffé dans un muscle jeune ne sont pas différentes d'un muscle jeune greffé dans un individu jeune, suggérant que la régénération du muscle ne dépend pas de l'âge du tissu greffé, mais de l'environnement dans lequel il est placé (CARLSON et FAULKNER 1989). Cela a été confirmé par les expériences de parabioses entre des souris jeunes et âgés (CONBOY et al. 2005; BRACK et al. 2007). De plus, des expériences menées *in vitro*

montrent que les CPM de muscle âgé prolifèrent aussi bien que des CPM de muscles jeunes en culture (BARANI et al. 2003; SHEFER et al. 2006) suggérant que la perturbation de leur prolifération n'est pas due à des modifications intrinsèques des CPM mais à une perturbation des facteurs de leur environnement.

Comme décrite précédemment, la voie Notch est une voie de signalisation jouant un rôle majeur dans l'activation et la prolifération des cellules satellites lors de l'embryogenèse (VASYUTINA et al. 2007) et dans le muscle adulte (CONBOY et RANDO 2002). Le déclin de la signalisation Notch avec l'âge, défini par la diminution de l'expression de récepteurs Notch-1 et du ligand Delta-1 (CONBOY et al. 2003; CARLSON et al. 2008), est considéré comme l'une des causes de la diminution du potentiel régénératif des cellules satellites âgées. En effet, des expériences de parabioses entre souris adultes et âgées ont montré que l'exposition d'un muscle âgé à un environnement systémique jeune induit une augmentation de 5 fois de l'expression du ligand Delta par rapport à un muscle âgé exposé à un environnement âgé (CONBOY et al. 2005). De plus, l'activation forcée de la voie Notch dans le muscle endommagé de souris âgées restaure leur potentiel régénératif (CONBOY et al. 2003) (**Figure 1.13**).

La transition temporelle entre la prolifération et la différenciation des CPM, essentielle pour la régénération adéquate des fibres musculaires, nécessite une transition de la voie Notch à la voie Wnt (BRACK et al. 2008). La balance temporelle entre l'activité de la voie Notch et celle de la voie Wnt dirige les précurseurs musculaires vers la lignée myogénique. De manière intéressante, l'activation aberrante de la voie Wnt est impliquée dans la conversion fibrogénique de cellules dans plusieurs tissus. L'activité de la voie Wnt canonique est augmentée dans le muscle de souris âgées ainsi que dans les progéniteurs myogéniques exposés à un sérum âgé (BRACK et al. 2007). Dans ces travaux, les auteurs montrent que l'ajout de Wnt3a, un agoniste de la voie Wnt canonique, à un sérum jeune induit une augmentation de la conversion fibrogénique des CPM *in vitro*. De plus, la conversion fibrogénique induite par l'exposition de CPM à un sérum âgé est réduite par l'ajout d'inhibiteurs de cette voie. *In vivo*, l'ajout exogène de Wnt3a dans un muscle adulte provoque un dépôt de tissu conjonctif comparable à celui

observé dans le muscle âgé suite à une régénération musculaire et une diminution de la prolifération des cellules satellites. A l'inverse, des injections d'un inhibiteur de la voie Wnt canonique, DKK1, diminuent la fibrose du muscle âgé en régénérescence. Finalement, l'exposition d'un muscle âgé à un environnement systémique jeune par des expériences de parabioses permet de réduire la fibrose du muscle âgé suite à un dommage. Ces études suggèrent un antagonisme des voies canoniques et non canoniques de Wnt dans le muscle adulte (BRACK et al. 2007; BRACK et al. 2008; LE GRAND et al. 2009). Par ailleurs, les souris déficientes pour la protéine Klotho, un inhibiteur de la voie Wnt, ont un vieillissement accéléré caractérisé par une diminution du nombre de cellules souches et une augmentation de la sénescence de leurs progéniteurs (LIU et al. 2007).

Le facteur de croissance fibroblastique basique (bFGF) a aussi été récemment impliqué dans les propriétés régénératives du muscle squelettique. Chakkalakal et collaborateurs ont montré que l'un des composants de la niche des cellules satellites, la fibre musculaire, exprime du bFGF dans le muscle âgé, qui induit la sortie de quiescence de certaines cellules satellites menant à la perte de leur capacité régénérative et d'auto-renouvellement (CHAKKALAKAL et al. 2012). À l'inverse, l'inhibition du récepteur du bFGF ou la surexpression de Sprouty-1 (Spry1), un inhibiteur de la voie de signalisation de bFGF, empêche l'épuisement du nombre de cellules satellites. Les auteurs ont ainsi mis en évidence un facteur de l'environnement des cellules satellites modulé lors du vieillissement qui influence directement leur quiescence et leur fonction (CHAKKALAKAL et al. 2012).

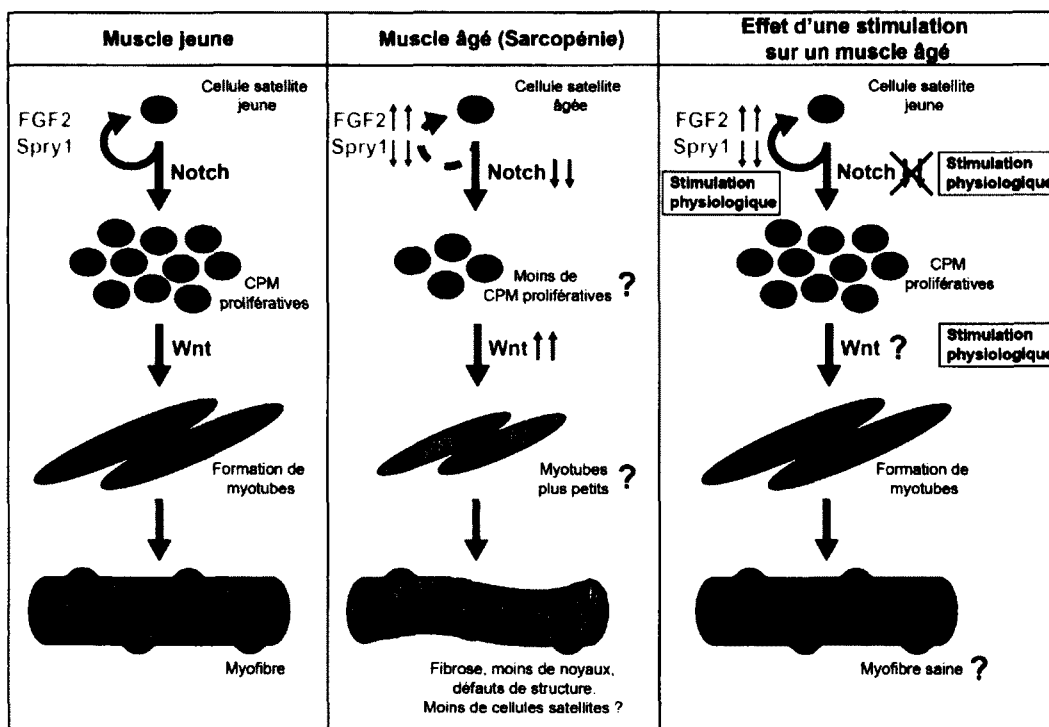


Figure 1.13 Effet du vieillissement et de la stimulation de voies de signalisation sur la myogénèse du muscle âgé

Contrairement aux cellules satellites de muscles jeunes, les cellules satellites de muscles âgés semblent présenter une diminution de leur capacité proliférative et une perturbation de leur différenciation et de leur fusion aboutissant à des fibres musculaires plus petites, moins bien formées, et possédant moins de myonuclei. Leur activation, prolifération et différenciation étant sous le contrôle des voies de signalisation Notch et Wnt, la modulation de ces deux voies permet de restaurer leur potentiel régénératif. Adaptée de (ARTHUR et COOLEY 2012).

Avec l'âge, le muscle présente de plus un remplacement des fibres musculaires par du tissu fibreux (fibrose) et adipeux (dégénérescence graisseuse) contribuant à la diminution des capacités musculaires. Cette augmentation est associée à une augmentation de fibroblastes et d'adipocytes dans la portion stromale (BRACK et al. 2007; NARICI et MAFFULLI 2010; SERRANO et MUNOZ-CANOVES 2010).

La MEC fait partie intégrante de la niche des cellules satellites et joue donc un rôle important dans leurs propriétés régénératives. Lors du vieillissement, la MEC subit des modifications structurelles, biochimiques, cellulaires et fonctionnelles (Figure 1.14). Les modifications structurelles de la MEC ont principalement été appréciées par sa composition en collagène dont il existe 28 sous-types (GORDON et HAHN 2010), largement représentés par le collagène de

type I, III, IV et VI dans le muscle squelettique (Kragstrup et al. 2011). La quantification du collagène des tissus a principalement été effectuée sur des coupes histologiques par des colorations au Sirius Red ou trichrome de Masson (Alnaqeeb et al. 1984; Hindle et al. 2009; Ramaswamy et al. 2011), à l'imprégnation d'argent de Gomori (Kovanen et al. 1987) ou par des méthodes immunohistochimiques (Kovanen et al. 1987; Hindle et al. 2009; Ramaswamy et al. 2011). Ces études ont mis en évidence une augmentation du contenu global en collagène avec l'âge, plus particulièrement, au niveau de l'endomysium et du pérимыsium.

La MEC et ses composants ont des conséquences directes sur le comportement des cellules avoisinantes, par l'intermédiaire de plusieurs voies de signalisation impliquant des récepteurs de surface dont les intégrines (Wang et al. 2009). Ces mécanismes influencent la synthèse et la dégradation des constituants de la matrice par les cellules stromales. Des modifications dans la densité ou le type de récepteur de surface pourraient donc influencer la sensibilité des cellules aux signaux mécaniques et l'efficacité avec laquelle l'information est transmise au noyau (Kragstrup et al. 2011). Il en résulte que les conséquences biochimiques des modifications de la MEC sur le comportement des cellules du muscle restent largement à élucider. L'augmentation des composants de la MEC avec l'âge est en lien direct avec des modifications des propriétés fonctionnelles du muscle squelettique, du fait de son rôle biomécanique.

Plusieurs études ont montré que la rigidité du muscle squelettique augmente avec l'âge (Rodrigues et al. 1996; Gosselin et al. 1998; Gao et al. 2008). Outre une augmentation de la rigidité qui corrèle avec l'augmentation de la quantité en collagène (Alnaqeeb et al. 1984; Zimmerman et al. 1993; Gosselin et al. 1998), des études ont montré que les liaisons croisées (cross link) non induites enzymatiquement «AGE» (Advanced Glycation End-product) augmentent lors du vieillissement (Takahashi et al. 1995; Haus et al. 2007). Ceci peut être expliqué par une exposition plus longue des protéines au glucose, accentuée lors du vieillissement. Cette exposition chronique augmenterait la formation de liaisons croisées AGE par mécanisme de glycation, augmentant ainsi la rigidité du tissu et

perturberait sa fonction (ZIMMERMAN et al. 1993; GOSSELIN et al. 1998; HAUS et al. 2007).

En conclusion, il semble que la diminution du potentiel régénératif du muscle squelettique avec l'âge implique grandement les cellules satellites et les cellules stromales. L'élucidation des facteurs biomécaniques et biochimiques guidant le comportement des cellules, altérés lors du vieillissement musculaire, est donc clé pour une meilleure compréhension de l'altération de leur comportement lors du vieillissement.

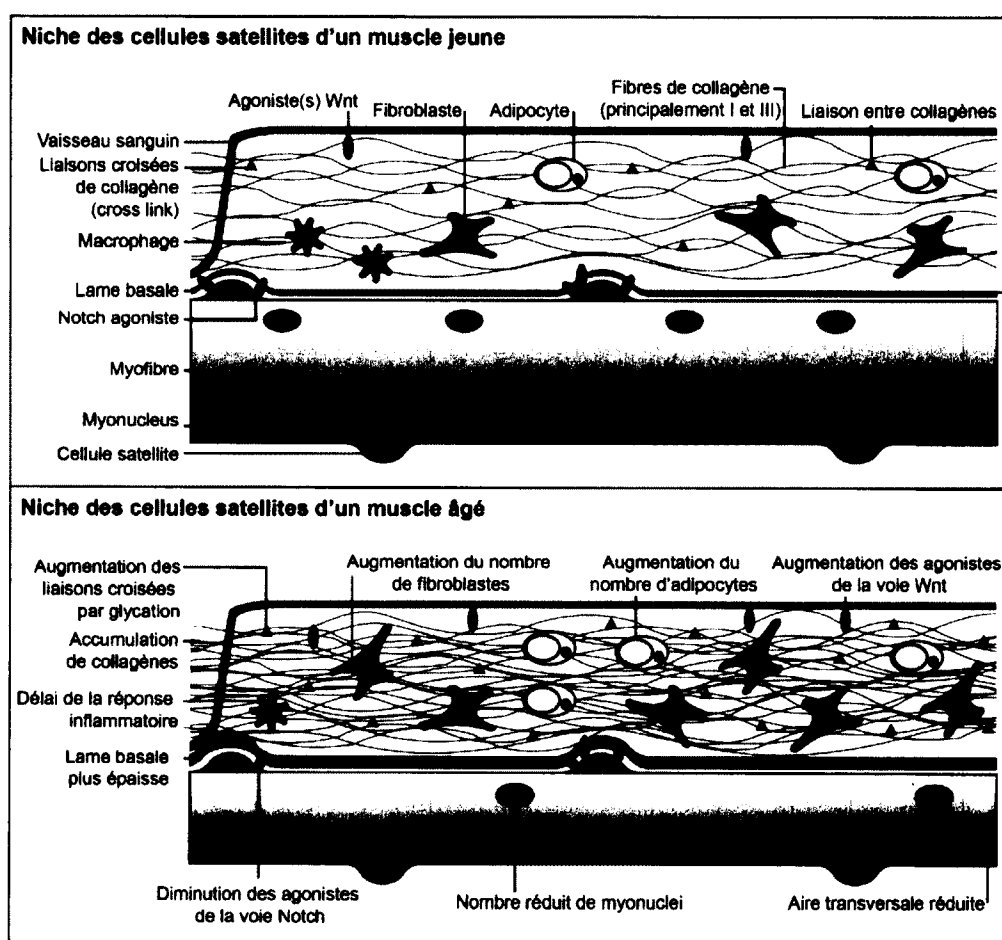


Figure 1.14 Illustration des modifications de la niche des cellules satellites dans le muscle âgé

La niche des cellules satellites du muscle âgé présente des modifications structurales, biochimiques et cellulaires contribuant à la diminution de la fonction musculaire avec l'âge. Adapté de (GOPINATH et RANDO 2008).

1.5.2 Les dystrophies musculaires

Les dystrophies musculaires font référence à un ensemble hétérogène de plus de 40 maladies génétiques caractérisées par une dégénérescence progressive du muscle squelettique (**Annexe 1**). Elles découlent d'une mutation transmise (héréditaire) ou d'une mutation spontanée. L'hérédité de ces pathologies peut être liée au chromosome X comme c'est le cas pour les dystrophies musculaires de Duchenne (DMD, Duchenne Muscular Dystrophy), ou encore autosomales dominantes ou récessives pour d'autres formes plus rares de dystrophies (DURBEEJ et CAMPBELL 2002).

1.5.2.1 Le complexe dystrophine-glycoprotéine

Toutes les dystrophies musculaires sont dues à une mutation dans la séquence d'un gène codant pour une protéine associée au complexe dystrophine-glycoprotéine (DGC) (**Annexe 1**). Ce dernier est un large complexe de protéines associées à la membrane, critique pour l'intégrité structurale des fibres du muscle squelettique. Il est constitué de dystrophines, dystroglycanes (α et β), sarcoglycanes (α , β etc et γ), sarcospanes, d' α -dystrobrevines et de diverses syntrophines (**Figure 1.14**). La dystrophine lie le cytosquelette d'actine à la protéine transmembranaire β -dystroglycane. Le domaine extracellulaire de cette dernière est relié à la protéine membranaire α -dystroglycane elle-même attachée à la laminine-2 de la lame basale. Ce complexe constitue donc un lien entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette sub-sarcolemmique permettant l'harmonisation de la contraction des fibres et du muscle (GUMERSON et MICHELE 2011).

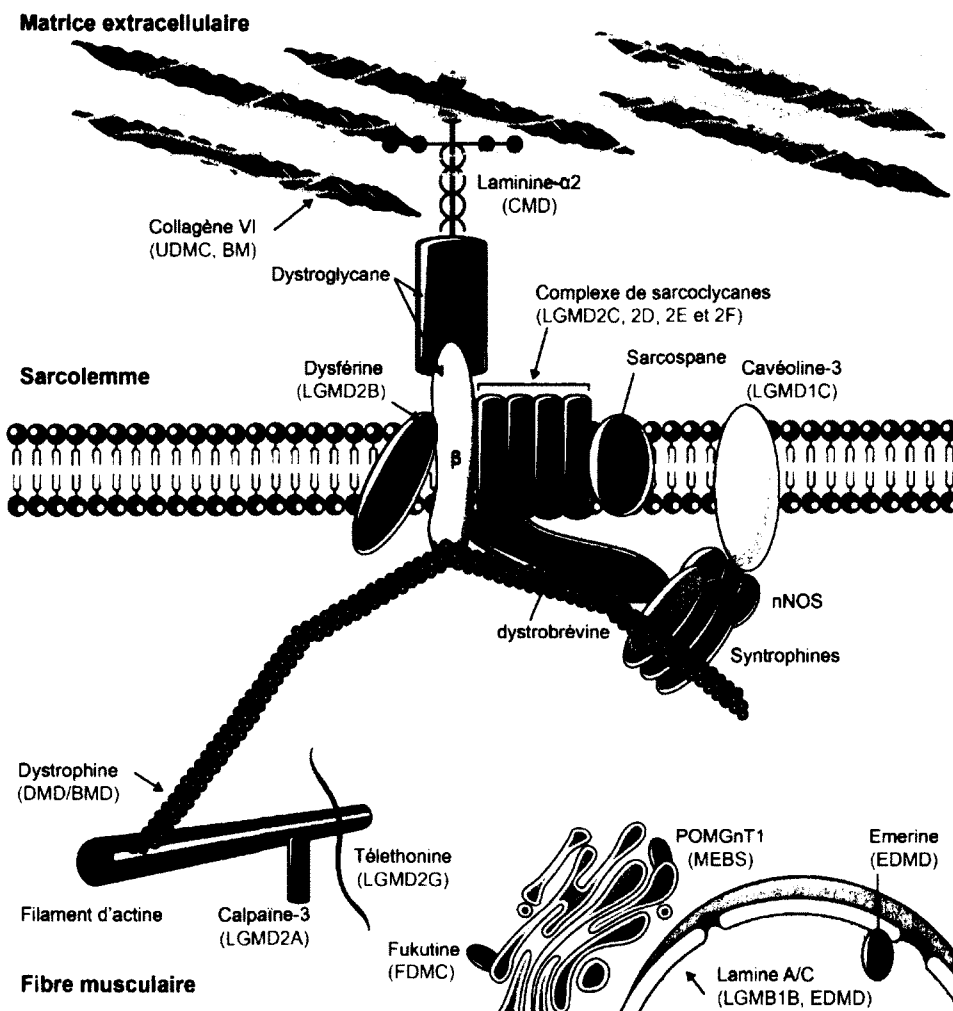


Figure 1.15 Le complexe dystrophine-glycoprotéine et les dystrophies musculaires associées

Les dystrophies musculaires correspondantes à la perte d'expression de la protéine sont indiquées en rouge. LGMD, Limb-Girdle Muscular Dystrophy; DMD, Duchenne Muscular Dystrophy; BMD, Becker Muscular Dystrophy; MEBS, Muscle-Eye-Brain Syndrom; EDMD, dystrophie musculaire d'Emerly-Dreifuss. Adaptée de (GUMERSON et MICHELE 2011) et (DURBEEJ et CAMPBELL 2002).

Lors de la contraction musculaire, les fibres sont soumises à des forces longitudinales transmises par l'intermédiaire des myofibrilles vers les jonctions myotendineuses, mais sont aussi soumises à des forces latérales dont la transmission d'une fibre à l'autre passe par le complexe DGC. La diminution de la transmission des forces latérales induite par l'altération du DGC contribue à la fragilité des fibres musculaires (BLOCH et GONZALEZ-SERRATOS 2003; RAMASWAMY et al. 2011).

Dans le cas de la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), l'absence de la dystrophine résulte en une instabilité membranaire et une déchirure du sarcolemme induisant une entrée de calcium intracellulaire, une activation des protéases calcium dépendantes, l'inhibition de l'activité mitochondriale et l'hypercontraction des fibres musculaires (BLAKE et al. 2002; SALIMENA et al. 2004). Cela provoque des cycles perpétuels de régénération/dégénération des fibres musculaires, impliquant grandement les cellules satellites, et un remplacement progressif des fibres musculaires par du tissu adipeux et fibreux (BIGGAR 2006). La DMD est sans équivoque la plus fréquente et la plus sévère des dystrophies musculaires, affectant près d'un garçon sur 3500 (EMERY 2002). Les premiers symptômes apparaissent très tôt lors de l'enfance et mènent au décès vers l'âge de 20 ans en raison d'une insuffisance cardiaque et/ou respiratoire (DURBEEJ et CAMPBELL 2002).

1.5.2.2 Les souris dystrophiques (*mdx*)

Le modèle murin de la dystrophie musculaire le plus utilisé est la souris *mdx*. Comme pour la DMD chez l'Homme, ces souris ont une mutation causant la perte complète de la dystrophine (VAINZOF et al. 2008). Par contre les souris *mdx* ont un phénotype moins important et peuvent vivre presque normalement comme les souris sauvages. La dégénérescence des fibres musculaires des souris *mdx* débute dès le 21^e jour de vie qui est suivie par une régénération rapide. En effet, 2,2 % et 5 % des fibres sont régénérées au 15^e et 21^e jour suivant le dommage respectivement. Au 30^e jour de vie, on peut observer une altération histologique importante des fibres musculaires. À l'âge de 3 mois, plus de 50 % des fibres sont dans un processus de régénération qui est caractérisé par la présence fibres nécrotiques et de noyaux centraux (TANABE et al. 1986).

Comme mentionné, les muscles des souris *mdx* ne sont pas autant affectés par la perte d'expression de la dystrophine que l'homme. Les différences observées entre la dystrophie humaine et murine sont attribuées au fort potentiel régénératif des CPM des souris ainsi qu'à une compensation de la protéine

déficiente par une protéine homologue telle que l'utrophine qui est fortement exprimé dans le muscle des souris *mdx* (JEJURIKAR et KUZON 2003; ERVASTI 2007).

L'intégrité des fibres musculaires lors de la contraction est assurée par le complexe DCG mais aussi par les intégrines, qui constituent un lien physique entre la fibre et la MEC. Il a été montré que le phénotype modéré des souris *mdx* pourrait être dû à une compensation du complexe DCG par des intégrines (Guo et al. 2006). En effet, une équipe a montré que les souris déficientes pour la dystrophine et l'intégrine $\alpha 7$ ont une pathologie semblable à la DMD.

De nombreux autres modèles murins déficients pour une protéine impliquée dans le complexe DGC ont été développés et présentent une altération plus ou moins sévère de la fonction musculaire (**Annexe 2**). Comme pour les souris *mdx*, les fibres musculaires ont des cycles perpétuels de dégénérescence/régénération. Cela a pour conséquence une inflammation chronique du tissu qui conduit à une accumulation de tissu fibreux et adipeux diminuant la fonction musculaire (NAHIRNEY et al. 1997; MORRISON et al. 2005).

1.5.3 La fibrose musculaire

La fibrose musculaire se définit par l'accumulation excessive de composants de la MEC. Elle est associée à une inflammation chronique. Cette accumulation excessive de MEC peut diminuer la fonction du tissu et des organes (LIEBER et WARD 2013). Dans le muscle squelettique, la fibrose est majoritairement associée aux dystrophies musculaires pouvant, telle la DMD, mener au décès en raison d'une insuffisance cardiaque et respiratoire (EMERY 2002). L'apparition de fibrose est également associée au vieillissement du muscle (SERRANO et al. 2011).

Lors du processus normal de régénération du muscle squelettique, les fibres nécrosées ou endommagées sont dégradées par les cellules inflammatoires et sont remplacées par les CPM en différenciation (**cf. section 1.2.2.1**). Dans les dystrophies musculaires (e.g. DMD), les fibres sont continuellement renouvelées favorisant une inflammation chronique (GROUNDS et al. 2005; WYNN 2008). De nombreuses évidences montrent que la nature, la durée et l'intensité de la réponse

inflammatoire suite à un dommage musculaire influencent la formation du tissu fibrotique (TIDBALL 2005; WYNN 2008; SERRANO et MUNOZ-CANOVES 2010; TIDBALL et VILLALTA 2010).

1.5.3.1 Types cellulaires impliqués dans la fibrose

Outre les cellules satellites, la régénération musculaire nécessite la prolifération et la migration de fibroblastes pour la synthèse transitoire de composants de la MEC comme les collagènes de type I et III, la fibronectine, l'élastine et divers protéoglycanes. La synthèse de ces composants permet de stabiliser le tissu et de constituer un échafaudage pour la réparation des fibres musculaires (SERRANO et al. 2011). À la suite d'un dommage, les fibroblastes sont aussi capables de se différencier en myofibroblastes qui produisent et remodelent la MEC en réponse à des cytokines pro-fibrotiques tel le TGF- β produits par les cellules inflammatoires (HINZ et GABBIANI 2010). Le myofibroblaste est caractérisé par l'expression de l'*alpha-smooth muscle actin* (α -SMA), localisée dans les fibres de stress, qui lui confère sa capacité contractile. Ces cellules sont connues pour participer à la guérison des plaies en créant une tension mécanique de la MEC, notamment par l'intermédiaire de points d'adhésions focaux et de jonctions adhérentes (MOULIN et al. 2000; MOULIN et al. 2010). Par contre, leur persistance dans le tissu lésé a été associée au processus de fibrose dans de nombreux organes, incluant la peau, le foie, le rein, le poumon et le tissu cartilagineux (HINZ et al. 2007). Elles synthétisent aussi des cytokines, des facteurs de croissance et des protéases qui exacerbent l'inflammation et un environnement pro-fibrotique.

Bien que les fibroblastes soient les principales cellules synthétisant le collagène, plusieurs études montrent que les CPM issues des cellules satellites et la lignée immortalisée C2C12 produisent du collagène de type I et III. Alexakis et collaborateurs suggèrent une conversion des CPM issues de muscle *mdx* en myofibroblastes (ALEXAKIS et al. 2007). Cencetti et collaborateurs ont récemment montré que le TGF- β induit la différenciation de cellules C2C12 en myofibroblastes par l'intermédiaire de la sphingosine kinase 1 (CENCETTI et al. 2010). La

surexpression de Notch-2 dans les cellules C2C12 inhibe l'expression de la α -SMA et du collagène de type I induite par le TGF- β . De manière intéressante, l'inhibition de la voie Notch par des siRNA induit l'expression de marqueurs de cellules myofibroblastiques sans traitement préalable avec du TGF- β (ONO et al. 2007). Finalement, Brack et collaborateurs ont montré que l'augmentation de la voie Wnt canonique avec l'âge semble conférer aux CPM un caractère fibroblastique impliqué dans l'accumulation de tissu fibreux (BRACK et al. 2007).

D'autres types cellulaires exprimant des marqueurs mésenchymateux ont été impliqués dans le processus de fibrose. Lorsque le processus de régénération est perturbé, l'apparition de tissu fibreux est accompagnée d'une accumulation de tissu adipeux (dégénérescence graisseuse) (NATARAJAN et al. 2010) impliquant des cellules résidentes du muscle appelées FAP (*Fibro/Adipogenic Progenitors*) (JOE et al. 2010). Ces cellules mésenchymateuses, localisées dans la portion stromale du muscle, semblent être une source de signaux pour la différenciation des CPM lors du processus de régénération (JOE et al. 2010; UEZUMI et al. 2010). Lorsque la régénération musculaire est imparfaite, les FAP persistent dans le tissu et se différencient en cellules pro-fibrotiques, comme les myofibroblastes, et en adipocytes (JOE et al. 2010; UEZUMI et al. 2010).

Finalement, Hidestrand et collaborateurs ont montré chez la souris qu'une population de cellules non myogéniques (MyoD⁻) et non hématopoïétique (CD45⁻) exprimant le marqueur Sca1 favorise la fibrose musculaire de souris âgées (HIDESTRAND et al. 2008). Ces cellules surexpriment des gènes associés à la fibrose possiblement régulés par Wnt-2. De manière intéressante, l'antigène Sca-1 est capable d'influencer la régénération musculaire en modulant le remodelage de la MEC. Les souris déficientes pour Sca-1 présentent des défauts de la régénération musculaire et une fibrose augmentée suite à un dommage, en raison d'une diminution de l'activité des métalloprotéinases de la matrice (MMP) (LONG et al. 2011).

Les MMP et leurs inhibiteurs (*Tissue Inhibitor of Metalloproteinase*, TIMP) ont aussi un impact sur le développement de la fibrose du fait de leur rôle dans la dégradation des constituants de la matrice. Par exemple, MMP-2 et 9 sont

fortement exprimées dans le muscle des souris *mdx*, et l'inhibition de la MMP-9 améliore la régénération musculaire en réduisant la détérioration du muscle, la nécrose, l'inflammation et la fibrose (KHERIF et al. 1999; LI et al. 2009).

1.5.3.2 Voies de signalisation impliquées dans la fibrose musculaire

Le TGF- β est une cytokine intervenant comme régulateur de la guérison des plaies et de la fibrose. Son interaction avec ses récepteurs spécifiques induit la transcription de gènes cibles par l'intermédiaire de diverses protéines SMAD (**Figure 1.15**).

Le TGF- β est fortement exprimé lors de la régénération du muscle suite à un dommage, dans le muscle des patients atteints de la DMD ainsi que dans le muscle des souris *mdx* (ZHOU et al. 2006) où il a le potentiel d'induire la fibrose en stimulant la production de composants de la MEC comme le collagène et la fibronectine. De manière intéressante, l'injection intramusculaire de TGF- β semble stimuler l'expression de TGF- β dans les cellules myogéniques et induit la formation de tissu conjonctif dans la zone d'injection (ZHU et al. 2007). De plus, des CPM transfectées avec un vecteur exprimant le TGF- β peuvent se différencier en myofibroblastes suite à leur transplantation intramusculaire. Finalement, LTBP4 (*latent TGF- β -binding protein 4*), une protéine régulant le relargage et la disponibilité du TGF- β dans la MEC, est capable de moduler la fibrose dans le muscle de souris dystrophiques (HEYDEMANN et al. 2009).

Divers antagonistes de la voie du TGF- β sont capables d'inhiber la fibrose et d'améliorer la régénération musculaire dans plusieurs modèles animaux incluant la décorine (ZHU et al. 2007; BEDAIR et al. 2008), la suramine (CHAN et al. 2003) ou l'halofugione (HUEBNER et al. 2008; ROFFE et al. 2010). C'est aussi le cas du Losartan (COHN et al. 2007), un antagoniste du récepteur de l'angiotensine II de type 1 connu pour inhiber la signalisation du TGF- β dans plusieurs pathologies (LIM et al. 2001; GUO et QIU 2003; LAVOIE et al. 2005). Toutefois, aucun d'entre eux ne semble capable de résorber la fibrose une fois formée.

La myostatine est un membre de la famille du TGF- β exprimé spécifiquement dans le muscle squelettique et principalement connu pour inhiber la myogenèse. Les souris déficientes pour la myostatine ont une augmentation de leur masse musculaire, du diamètre et de la force des fibres musculaires (GLASS 2010). La perte de fonction de la myostatine chez des souris *mdx* diminue la fibrose en réduisant l'accumulation de composants de la MEC et améliore la régénération musculaire (WAGNER et al. 2002; MCCROSKERY et al. 2003).

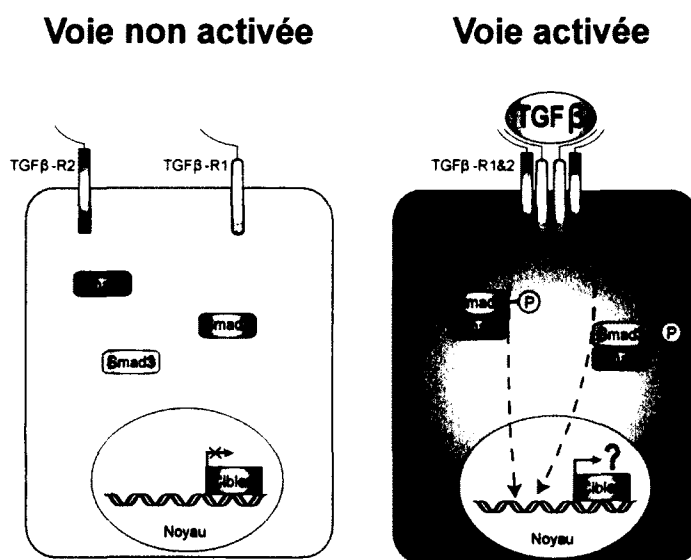


Figure 1.16 La voie de signalisation du TGF- β

La signalisation du TGF- β se fait par l'intermédiaire d'un récepteur transmembranaire hétérodimérique constitué d'un récepteur au TGF- β de type I (activin-linked kinase 5, ALK5) et d'un récepteur au TGF- β de type II. ALK5, par son activité sérine/thréonine kinase, induit la phosphorylation de protéines Smad notamment Smad 2 et 3. Ces dernières se lient à Smad 4 pour former un complexe pouvant transloquer dans le noyau où il régulera l'expression de gènes cibles (BONNIAUD et al. 2005). Il est important de noter que le TGF- β peut interagir avec d'autres voies de signalisation telles les MAP kinases, MEK/ERK et JNK. Adaptée de (SHI et MASSAGUE 2003).

Finalement, Brack et collaborateurs ont montré que la voie canonique de Wnt est impliquée dans la formation de fibrose lors du vieillissement du muscle (BRACK et al. 2007). En effet, les auteurs montrent que l'exposition d'un muscle âgé à un environnement systémique jeune (expérience de parabioses) améliore la régénération des fibres musculaires et réduit le dépôt de tissu fibreux. De plus, les auteurs font un lien entre l'augmentation du dépôt de collagène dans le muscle

âgé en régénérescence avec une augmentation du pourcentage de cellules fibrogéniques provenant de la conversion de cellules myogéniques en cellules non myogéniques. Cette conversion peut être inhibée *in vitro* par l'utilisation de DKK1, un antagoniste de la voie Wnt canonique. De la même façon, une simulation par Wnt3a module de manière négative la régénération du muscle jeune et augmente la fibrose, associant le vieillissement du muscle avec une altération de l'environnement systémique.

De manière intéressante, la voie Wnt canonique est associée au processus de fibrose dans d'autres systèmes et organes (LAM et GOTTARDI 2011). En effet, une étude récente montre une interaction possible entre la voie Wnt canonique et la voie du TGF- β (AKHMETSHINA et al. 2012). Les auteurs montrent que le TGF- β stimule la voie Wnt par l'intermédiaire de p38 en réduisant l'expression de l'antagoniste DKK1.

Bien que de nombreux laboratoires se soient intéressés à l'implication de cellules myogéniques sur la synthèse de constituants de la MEC, le rôle des cellules progénitrices stromales du muscle squelettique sur le processus de fibrose est peu connu. De plus, la voie Wnt semble jouer un rôle clé dans la fibrose du muscle vieillissant ainsi que dans diverses autres pathologies fibrotiques. Il serait donc pertinent d'explorer sa contribution dans la fibrose du muscle dystrophique.

1.6 Techniques d'isolement et d'étude des cellules progénitrices myogéniques

Du fait de l'importance des cellules satellites et des CPM dans la formation et la régénération des fibres musculaires, deux principales méthodes ont été élaborées afin de les isoler et de les cultiver (MUSARO et BARBERI 2010). La première consiste en la digestion enzymatique de l'ensemble du muscle permettant entre autres la libération des cellules satellites et leur culture en myoblastes. Ces dernières sont donc irrémédiablement retirées de leur niche anatomique. La deuxième méthode consiste à isoler des fibres musculaires intactes sur lesquelles on retrouve les cellules satellites en périphérie. Cette

méthode permet de les maintenir dans leur niche et ainsi de préserver les signaux provenant de la lame basale et de la fibre sous-jacente. La mise en culture des fibres induit inévitablement l'activation des cellules satellites.

1.6.1 Isolement des CPM par dissociation enzymatique

La méthode d'isolement des cellules satellites primaires la plus courante consiste en la digestion enzymatique de muscles squelettiques. Celle-ci peut se faire à l'aide de différentes enzymes incluant un mélange de collagénase/dispase, de la pronase ou de la trypsine. Contrairement aux autres, le mélange collagénase/dispase a l'avantage de digérer le collagène retrouvé principalement entre les fibres et, plus spécifiquement, la lame basale de façon à libérer la cellule satellite de sa niche (**Figure 1.17**).

1.6.1.1 La méthode d'enrichissement par adhérence préférentielle (*pre-plating*)

L'isolement des cellules par dissociation enzymatique induit inévitablement l'obtention d'une population hétérogène de CPM, mais également de mrSC, de cellules endothéliales et une grande quantité de débris cellulaires. Cette procédure nécessite donc une étape d'enrichissement des cellules myogéniques basée sur leurs propriétés en culture cellulaire.

La méthode d'enrichissement classique des CPM, appelée technique de *pre-plating* (ou adhérence préférentielle), repose sur leur capacité adhésive (QU et al. 1998; GHARAIBEH et al. 2008). En effet, les CPM adhèrent difficilement au plastique contrairement aux principales cellules contaminantes non myogéniques. Pour cette méthode, les cellules musculaires préalablement isolées sontensemencées dans un Pétri en plastique afin de permettre aux cellules contaminantes d'adhérer au plastique (BURTON et al. 2000). Le surnageant contenant les CPM est alors transféré dans un Pétri traité avec différentes protéines matricielles (e.g. collagène) permettant leur adhésion. Le transfert des cellules d'un Pétri non traité à un Pétri traité est répété fréquemment (environ tous les 4 jours) jusqu'à obtention d'une population pure de CPM. Cette méthode a

permis de cultiver des CPM provenant de nombreuses espèces incluant les rongeurs, le poulet, le mouton, le cheval et le cochon (BURTON et al. 2000).

Par contre, cette méthode présente quelques désavantages. Il est connu que le nombre de passages nécessaire pour obtenir une population pure cause la diminution des capacités prolifératives, de différenciation et du potentiel régénératif des CPM suite à leur transplantation (MACHIDA et al. 2004). De plus, il est fréquent qu'une grande quantité de muscles, voir les muscles de plusieurs souris, soient regroupés ensemble afin d'obtenir un nombre suffisant de cellules, ajoutant un degré de plus dans l'hétérogénéité des cellules d'intérêt (ROSENBLATT et al. 1995).

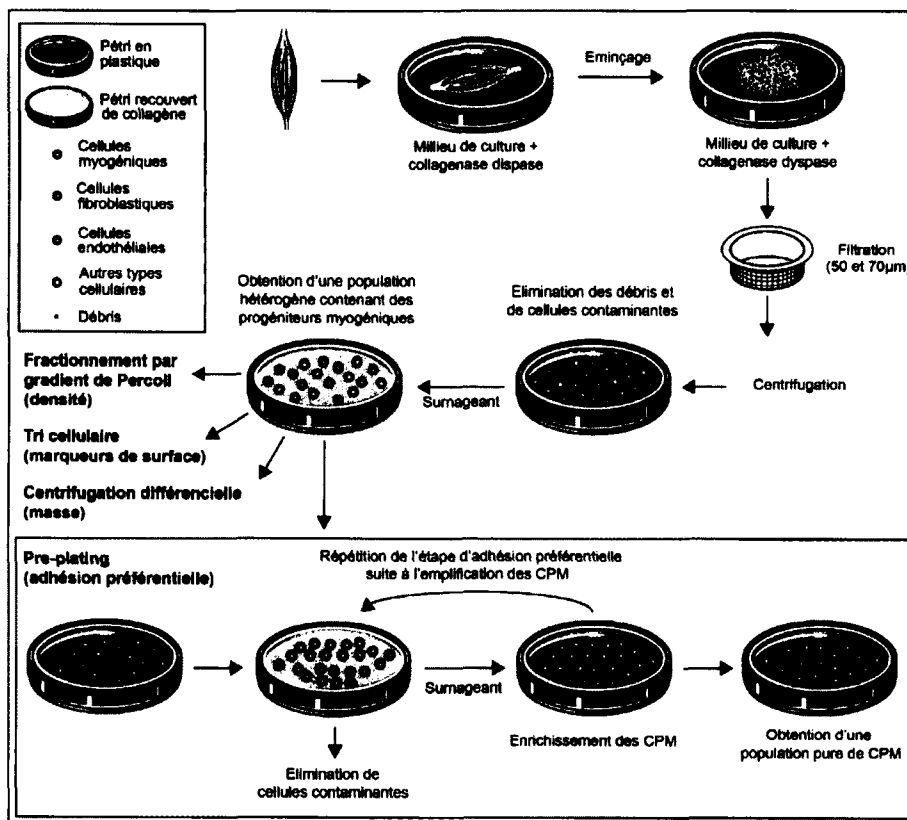


Figure 1.17 Méthode d'isolement et d'enrichissement des CPM par digestion enzymatique (illustration non publiée)

1.6.1.2 Autres méthodes d'enrichissement

Alternativement, les cellules satellites isolées par dissociation enzymatique de muscles entiers peuvent être enrichies par d'autres approches qui nécessitent toutefois des moyens matériels plus importants que la méthode classique. L'une

de ces approches est la cytométrie de flux. Les cellules satellites peuvent être triées sur la base d'une sélection positive pour CD34, M-cadhérine et intégrine- α 7, et négative des antigènes de surface CD45, CD31, et Sca1 (MONTARRAS et al. 2005; SACCO et al. 2008; IERONIMAKIS et al. 2010; YI et ROSSI 2011; PASUT et al. 2012). Les antigènes CXCR4, intégrine- β 1 et syndécan-4 ont aussi été utilisés pour l'isolement des cellules myogéniques (CERLETTI et al. 2008; TANAKA et al. 2009; UEZUMI et al. 2010).

L'utilisation de gènes rapporteurs fluorescents dans des souris génétiquement modifiées a également permis l'isolement des cellules satellites et des CPM. Les cellules satellites ont été notamment isolées de souris contenant un rapporteur GFP (*Green Fluorescent Protein*) sous le contrôle des éléments régulateurs des gènes Pax3, Pax7 ou Myf5 (MONTARRAS et al. 2005; BIRESSI et al. 2007; GAYRAUD-MOREL et al. 2007; BOSNAKOVSKI et al. 2008). Toutefois, certaines stratégies de tri présentent des limitations. En effet, Pax3 n'est pas exprimé par toutes les cellules satellites (MONTARRAS et al. 2005) et l'expression de la GFP dans les cellules satellites des souris Myf5^{GFP} est faible, rendant difficile l'utilisation du FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*) pour l'isolement des cellules satellites de ces souris (BIRESSI et al. 2007; GAYRAUD-MOREL et al. 2007; GAYRAUD-MOREL et al. 2012).

Par ailleurs, des rapporteurs fluorescents peuvent être activés de manière permanente dans des modèles murins Cre-Lox, exprimant la Cre-recombinase sous le contrôle de Pax3, Myf5 ou MyoD (SCHIENDA et al. 2006; KUANG et al. 2007; KANISICAK et al. 2009; JOE et al. 2010). Toutefois, l'expression de Myf5-Cre a été rapportée dans certaines régions non myogéniques lors du développement (SEALE et al. 2008; JINNO et al. 2010). De plus, certaines cellules satellites, notamment des muscles de la tête, n'expriment pas Pax3 (HAREL et al. 2009; BIRESSI et RANDO 2010).

D'autres méthodes de purification ont été utilisées pour l'isolement de CPM, incluant des fractionnements par gradient de Percoll™ (YABLONKA-REUVENI et NAMEROFF 1987; KASTNER et al. 2000; CHE et al. 2011) qui tire parti des différences de densité entre les populations cellulaires du muscle et le tri par billes

magnétiques (LEQUERICA et al. 1999; ASAKURA et RUDNICKI 2002) utilisant les antigènes de surfaces spécifiques aux cellules d'intérêt. Il est intéressant de noter que les méthodes d'isolement qui dépendent des marqueurs de surface sont limitées par le fait que l'expression des marqueurs de surface peut varier, notamment en fonction des conditions de culture (JANKOWSKI et al. 2002).

Bien que la culture classique ait permis d'élucider les mécanismes de prolifération et de différenciation des CPM, ces dernières ont toutefois un faible potentiel d'intégration suite à leur transplantation puisqu'elles sont extraites de leur microenvironnement. Il est donc nécessaire de parvenir à un modèle *in vitro* prenant en compte les différents facteurs impliqués dans cette niche qui permettent le maintien de leurs propriétés régénératives.

1.6.2 Isolement des CPM par culture de fibres individuelles

La principale caractéristique de la culture par fibre individuelle est que les cellules satellites sont maintenues dans leur niche anatomique. Cette méthode permet ainsi l'étude *in vitro* du comportement des cellules satellites, notamment leurs mécanismes d'activation, sous l'influence directe de la fibre et de la lame basale qui l'enveloppe.

1.6.2.1 Isolement des fibres musculaires

L'isolement des fibres musculaires a initialement été décrit à la fin des années 70 par Bekoff et Betz (BEKOFF et BETZ 1977) puis amélioré par Bischoff (BISCHOFF 1986; BISCHOFF 1989). Ces auteurs ont décrit l'isolement de fibres du muscle court fléchisseur des orteils (flexor digitorum brevis, FDB). Du fait de leur petite taille, les fibres de ce muscle sont généralement cultivées en groupe. Cette méthode jusqu'alors peu utilisée a été reprise et améliorée dans le laboratoire de Terence Partridge, permettant l'isolement des fibres individualisées d'autres muscles incluant le TA, le soléus et plus fréquemment du long extenseur des orteils (extensor digitorum longus, EDL) (ROSENBLATT et al. 1995; ROSENBLATT et al. 1996). Pour obtenir des fibres, il est nécessaire d'isoler le muscle de tendon à

tendon afin de maintenir leur intégrité. Elles sont alors dissociées les unes des autres enzymatiquement à l'aide de collagénase, préservant ainsi la lame basale et donc la niche anatomique des cellules satellites. Une fois digérées, les fibres sont délicatement dissociées du muscle et cultivées individuellement (**Figure 1.17**).

1.6.2.2 La culture de fibres individuelles pour l'étude des cellules satellites

Une fois les fibres en culture, les cellules satellites s'activent, prolifèrent et migrent vers le substrat environnant en traversant la lame basale de la fibre. La culture des fibres dans un Pétri traité avec différentes protéines matricielles (e.g. collagène) permet leur adhésion, et les CPM issues des cellules satellites sont alors capables d'adhérer et de proliférer dans le Pétri. Cette méthode a permis d'isoler des fibres individuelles de muscles provenant de plusieurs espèces tels le rat, la chèvre et l'homme ainsi que de souris saines à différents âges et dystrophiques (DI FOGGIA et ROBSON 2012). Elle a aussi permis l'étude des CPM de différents muscles et de différents types de fibres (ROSENBLATT et al. 1996; ZAMMIT 2008). Les CPM isolées de cette manière forment une population plus homogène que la méthode classique puisque les cellules à potentiel myogénique issues du stroma ne sont pas présentes.

L'isolement de fibres individuelles peut aussi être utilisé pour analyser le comportement des cellules satellites dans leur niche anatomique. En effet, certains laboratoires ont introduit une approche où les fibres musculaires restent en suspension dans le milieu de culture. Cette méthode alternative a notamment permis d'élucider le mécanisme de division asymétrique des cellules satellites impliqué dans leur auto-renouvellement (ZAMMIT et al. 2004; KUANG et al. 2007). L'intérêt du maintien des cellules satellites entre la lame basale et la membrane de la fibre sous-jacente pour le maintien de leurs propriétés régénératives a été démontré par Collins et collaborateurs qui ont montré une nette amélioration des capacités régénératives des cellules satellites suite à leurs transplantations dans un muscle hôte en régénération (COLLINS et al. 2005).

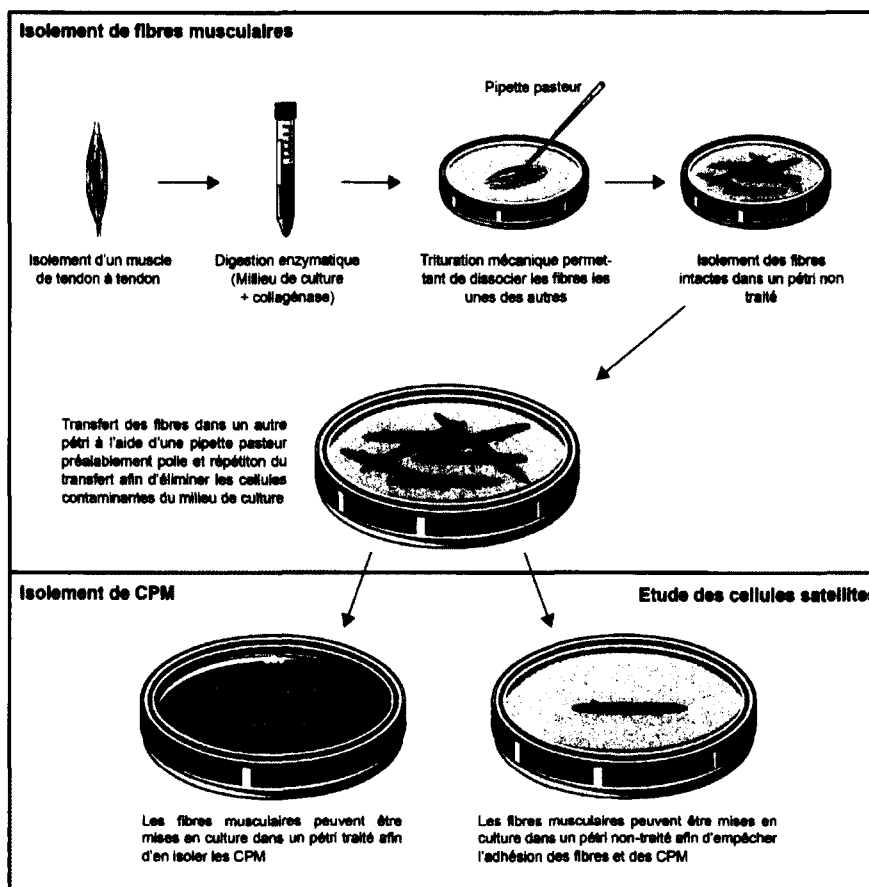


Figure 1.18 Méthode d'isolement des fibres individualisées (illustration non publiée)

L'isolement de fibres individuelles est donc une méthode permettant l'étude *in vitro* du comportement des cellules satellites dans leur niche. Toutefois, l'activation des cellules satellites et la prolifération des CPM y sont faibles. Cela peut être expliqué par le fait que la fibre sous-jacente reste viable. Il n'existe pour le moment qu'un seul modèle mimant la dégénérescence de la fibre *in vitro*, induit par ajout d'un agent myotoxique (BISCHOFF 1990). Il n'a toutefois pas suscité beaucoup d'intérêt dans la communauté scientifique. Par contre, puisque le maintien des cellules satellites près de leur niche anatomique permet aux CPM de préserver leur potentiel régénératif, il serait intéressant de vérifier si les fibres pourraient être utilisées comme « bioréacteurs » pour l'isolement et l'amplification de CPM. Intuitivement, la culture des CPM dans un microenvironnement plus physiologique comme celui de la fibre, permettrait sans doute d'obtenir des CPM possédant un meilleur potentiel régénératif que des cellules cultivées à la surface d'un Pétri.

1.7 Hypothèse de travail et objectifs de recherche

Le vieillissement du muscle et les myopathies ont comme caractéristiques communes l'altération du microenvironnement des cellules progénitrices stromales et myogéniques qui se répercutent sur la fonction du tissu.

Le comportement des cellules progénitrices est finement régulé par les composants biochimiques et biomécaniques de leur microenvironnement. La modulation de leur phénotype (quiescent vs activation/différenciation) est orchestrée par des facteurs provenant de la fibre, de la circulation sanguine, des cellules avoisinantes et de la MEC dans laquelle des facteurs de croissance peuvent être séquestrés (COSGROVE et al. 2009). Le comportement des cellules est également guidé par une composante biomécanique, incluant la tension et la rigidité de la MEC.

En regard des travaux cités précédemment, nous formulons l'**HYPOTHÈSE** selon laquelle les altérations du microenvironnement se répercuteraient sur le comportement des cellules progénitrices et modèleraient leur capacité à régénérer le muscle squelettique. Afin de vérifier notre hypothèse, nous avons défini **quatre objectifs**:

1) Caractériser l'état de différenciation des CPM dans le muscle âgé.

Les modifications de l'environnement pouvant affecter le comportement des cellules progénitrices, nous quantifierons la population des cellules stromales résidentes du muscle (mrSC) ainsi que l'état de différenciation des cellules satellites et des CPM du muscle vieillissant en condition physiologique chez la souris. Nous pourrions ainsi définir l'état phénotypique des cellules progénitrices du muscle vieillissant.

2) Déterminer l'implication de la voie Wnt et des mrSC dans la fibrose des souris dystrophiques.

Il a été montré que l'activité Wnt canonique était augmentée dans de nombreuses pathologies fibrotiques (eg. fibrose pulmonaire) et dans le muscle âgé. Puisque les mrSC constituent une population d'intérêt dans la synthèse des

constituants de la MEC, nous souhaitons caractériser par culture cellulaire et par des études *in vivo* l'implication de cette population et leur réponse à la voie Wnt dans la formation de la fibrose musculaire des souris *mdx*. La démonstration de l'implication des mrSC et de la voie Wnt canonique permettrait d'identifier une cible thérapeutique potentielle pour le traitement de la fibrose musculaire en général, mais également dans le muscle squelettique dans lequel ses effets causent d'importantes limitations fonctionnelles.

3) Déterminer l'influence de la rigidité du microenvironnement sur le comportement des CPM.

Notre laboratoire a constaté que les fibres musculaires individualisées et cultivées en culture tendaient à se réduire, concomitant avec l'activation et la prolifération des CPM. Comme nous observons une compaction de la fibre et de la lame basale, nous déterminerons sa rigidité et tenterons de récapituler ces modifications biomécaniques *in vitro* sur des substrats à rigidité déterminée et *in vivo* dans un modèle de ténotomie chez la souris. Nous montrerons ainsi l'aspect essentiel de l'environnement mécanique pour le maintien des propriétés souches des CPM.

4) Mettre au point une nouvelle méthode d'isolement des CPM

La réduction des fibres musculaires individuelles en culture cause l'activation des cellules satellites et la prolifération des CPM. Nous souhaitons nous servir de ce processus pour mettre au point une nouvelle méthode d'isolement des CPM primaires. Nous comparerons l'efficacité de cette méthode avec la méthode classique d'isolement des CPM (adhérence préférentielle). Nous évaluerons la rapidité d'enrichissement de cette population, le rapport entre le nombre de cellules obtenues et quantité de tissu utilisé et leur potentiel à prévenir une différenciation spontanée selon que les CPM prolifèrent sur fibre réduite ou sur Pétri de culture cellulaire. Cette nouvelle méthode permettrait le maintien des propriétés souches des CPM à court terme et faciliterait l'isolement et l'étude de ces cellules.

CHAPITRE II: Matériel et méthodes

2.1 Animaux

Les expériences ont été réalisées sur des souris mâles C57Bl/10ScSn-dmd/J (mdx) (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME), Myf5-nLacZ (TAJBAKHS et al. 1996), C57Bl6/J (Charles River, St-Constant, Qc) âgées de 3 semaines (jeunes), 12 semaines (adultes) ou 24 mois (âgées). Toutes les procédures impliquant ces animaux ont été approuvées par le comité d'éthique institutionnel de protection des animaux de l'Université de Sherbrooke (Protocole No. 133-06B). Les chirurgies ont été réalisées sous anesthésie par inhalation d'isoflurane (Laboratoires ABBOTT, QC, Canada). Une injection de Buprénorphine (Temgesic, Schering-Plough, USA; sous-cutanée, 0,05-0,1 mg/kg), un narcotique à longue durée, a été faite 30 minutes (min) avant la chirurgie.

2.2 Isolement des muscles

Les muscles utilisés ont été le gastrocnémus (Gas), tibialis antérieur (TA), long extenseur des doigts (EDL) et le diaphragme (Dia). Les muscles ont été prélevés de tendon à tendon en prenant soin de retirer le fascia. Les muscles fraîchement isolés ont été soit digérés pour en isoler les cellules, traités pour des études histologiques, ou encore, immédiatement congelés dans l'azote liquide (flash frozen) pour des études moléculaires. Ces préparations de muscles congelées ont été broyées à l'aide d'un mortier refroidi à l'azote liquide pour en faire une fine poudre dont les protéines et/ou l'ARN ont été extraits.

2.3 Isolement du sérum

Le sang a été prélevé de manière rétro-orbitale sur des souris anesthésiées et déposé dans un tube Eppendorf™. Suite à la formation du coagulum (2 h à température ambiante), le sang a été centrifugé (1200 g pendant 15 min) puis le sérum récolté et congelé à -80 °C jusqu'à utilisation.

2.4 Injections intramusculaires

Des injections en série des protéines recombinantes murines Wnt3a (R&D Systems, USA cat: 1324-WN-010/CF) et DKK1 (5897-DK-010-CF) diluées dans la saline ont été effectuées tous les quatre jours dans le muscle TA de souris C57Bl/6 anesthésiées, en utilisant des seringues à insuline (Becton Dickinson, NJ, USA). Pour étudier l'effet d'une activation de la voie Wnt canonique, trois doses de Wnt3a (250 ng/25 µl) ont été injectées. Huit doses de protéine recombinante DKK1 (300 ng/25 µl) ont été injectées dans le TA de souris adultes *mdx* pour inactiver la voie Wnt canonique. Les muscles ont été récoltés sept jours après la dernière injection. Une solution saline (25 µl) a été injectée dans les muscles controlatéraux.

2.5 Ténotomies

Sur des souris Myf5-nLacZ anesthésiées, les TA ont été dégagés en incisant sur une longueur de 1 cm la peau et son fascia. Le tendon distal du TA droit a été sectionné. Après la procédure, la peau a été refermée par suture. Dix jours après la chirurgie, les souris ont été euthanasiées et les muscles isolés pour études histologiques.

2.6 Isolement et culture des cellules progénitrices du muscle squelettique

2.6.1 Les cellules stromales résidentes du muscle squelettique (mrSC)

Les cellules stromales résidentes du muscle (mrSC) ont été isolées comme décrit antérieurement (SCIME et al. 2005; GRENIER et al. 2007; TRENSZ et al. 2010; LEBLANC et al. 2011). Brièvement, les muscles des pattes postérieures de souris C57Bl/6 adultes et âgées ou *mdx* adultes ont été prélevés, émincés au ciseau chirurgical puis digérés pendant 45 min à 37°C dans une solution de collagénase de type I (1 mg/ml; Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) dilué dans du DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) contenant 10 % FBS (*Fœtal Bovin Serum*) et 1 % d'antibiotiques (Pénicilline-Streptomycine, Wisent Inc, QC Canada). Les débris

ont été retirés par deux étapes de filtration successives (100 µm et 50 µm, Falcon, BD Biosciences) suivies de deux centrifugations à 300 g à 4°C durant lesquelles les culots ont été repris dans un milieu de culture (DMEM-10 % FBS-antibiotique) refroidi sur glace. Les mrSC ont alors été soit mises en culture ou encore immédiatement analysées par cytométrie de flux.

2.6.2 Les cellules progénitrices myogéniques (CPM): méthode classique d'adhésion préférentielle (pre-plating)

Les muscles des pattes postérieures de souris C57Bl6 adultes ont été isolés, émincés au ciseau chirurgical puis digérés dans un solution de collagénase B (1 mg/ml; Roche, Mississauga, ON, Canada) et de dispase grade II (2,4 U/ml; Roche, Mississauga, ON, Canada) dilués dans du PBS (Phosphate Buffer Saline; pH: 7,4). Deux digestions de 12 min chacune ont été effectuées, entrecoupées d'aspiration/refoulement à l'aide d'une pipette 5 ml. La suspension cellulaire a été lavée avec du DMEM contenant 10 % de FBS froid (4°C), filtrée à deux reprises (70 µm puis 50 µm) et centrifugée (300 g, 6 min à 4°C). Le culot cellulaire a été repris dans un milieu de culture pour la prolifération des CPM, constitué de milieu HamF10 (Gibco, Burlington, ON, Canada) supplémenté de 20 % de FBS, 2,5 ng/ml de bFGF (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) et d'antibiotiques.

Les cellules ont étéensemencées dans des Pétris de culture (Falcon, BD Biosciences) afin de favoriser l'adhésion des cellules non-myogéniques (e.g. fibroblastes). Après 4 heures, le surnageant, contenant les cellules non adhérees enrichies en CPM, a été transféré sur des Pétris recouverts de collagène (Rat tail collagen ; cat: 08-115, Millipore, Temecula, CA, USA) afin de favoriser l'adhérence et la prolifération des CPM. Cette technique classique est également appelée « enrichissement par adhésion préférentielle ».

Cette première étape d'enrichissement n'est pas suffisante pour obtenir une population de CPM primaires pure. Il est donc nécessaire de procéder à d'autres étapes d'enrichissements. Ainsi, pour chaque passage, jusqu'à l'obtention d'une lignée pure, les cellules sont incubées 20 min dans un Pétri non traité puis le surnageant contenant la fraction de CPM enrichie est transféré dans un autre Pétri.

Les enrichissements sont ainsi effectués environ tous les 4 jours. Le calcul du pourcentage de CPM et de cellules « contaminantes » (non-myogéniques) lors de l'enrichissement, ou après 6 et 7 jours de culture, a été effectué par leurs différences morphologiques en microscopie à contraste de phase et par immunomarquage avec Pax7.

2.6.3 Les fibres musculaires (myofibres)

Les fibres musculaires ont été isolées à partir du muscle EDL ou du Gas. Pour cette technique, les muscles ont été obligatoirement isolés de tendon à tendon afin de ne pas abimer les fibres. Les muscles ont été digérés dans une solution de collagénase de type I pendant 90 min à 37 °C et agités toutes les 15 min. Les muscles ont été triturés délicatement à l'aide d'une pipette Pasteur dont l'embout a été préalablement poli à la flamme afin de ne pas endommager les fibres. De plus, la paroi interne de la pipette a été enduite de sérum de cheval (HS, *Horse Serum*, Hyclone) afin de réduire l'adhérence des fibres au verre. Pour éliminer un maximum de débris, les fibres intactes individualisées ont été soigneusement transférées dans deux à trois Pétris successifs contenant du HamF10-20 %FBS-bFGF-antibiotiques. Les fibres intactes ont alors subi une dernière digestion à la collagénase de type I (15 min) pour éliminer la présence de cellules contaminantes qui auraient pu se fixer aux fibres. Avec cette méthode, il a été possible d'isoler entre 200 et 600 fibres intactes individualisées vivantes selon les préparations. Ces fibres ont été soit mises en culture (HamF10-20 % FBS-bFGF-antibiotiques) ou encore fixées au paraformaldéhyde (PFA) 4 % (10 min à 4 °C).

2.6.4 Différenciation des CPM en myotubes

L'exposition des CPM à un milieu pauvre en sérum induit leur différenciation et leur fusion en cellules multinucléées appelées myotubes. Ainsi, les CPM prolifératives ont été incubées pendant 4 jours dans un milieu de différenciation constitué de DMEM contenant 5 % HS et 1 % d'antibiotiques. Les cellules

différenciées ont ensuite été fixées au PFA 4% (4°C, 10 min) puis immunomarquées à l'aide d'anticorps dirigés contre la myogénine et la myosine (cf. **section 3.8.2**) ainsi qu'un marquage des noyaux au DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole; 0,5µg/ml ; Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada). Un index de fusion a pu être calculé en dénombrant les myotubes positifs pour MF20 et ayant plus de deux noyaux.

2.6.5 Traitement à la Mitomycine-C

Afin d'arrêter le cycle cellulaire des CPM, ces dernières ont été exposées à 20 µg/ml de mitomycine-C (Cayman Chemical Company, Michigan, USA). Après deux heures d'incubation à 37°C, les cellules ont été rincées au PBS, mises en suspension à l'aide de trypsine, centrifugées, comptées, puisensemencées dans leur milieu de culture à une densité définie selon l'expérience.

2.7 Préparation des coupes histologiques de muscles

Pour leur caractérisation morphologique, les muscles ont été préparés par une technique en congélation dans l'OCT (*Optimal Cutting Temperature*, Tissue-Tek® O.C.T. Compound, Torrance, CA) ou par inclusion en paraffine.

Pour la préparation en congélation, les muscles ont été récoltés et immergés dans des bains successifs de PBS contenant des concentrations croissantes de sucrose (4, 15 et 30 %) à 4°C. Les changements de bain ont été effectués après que les échantillons aient coulé au fond du tube, indiquant le remplacement de l'eau du tissu par la solution de sucrose. Les muscles ont ensuite été enrobés d'un mélange d'OCT/sucrose 30 % (2:1 volume/volume), congelés dans du 2-méthylbutane refroidi à l'azote liquide, puis stockés à -80°C jusqu'à leur utilisation. Une marque à l'encre de chine a été faite au préalable sur la partie médiane du muscle afin de servir de repère lors de la coupe et une étiquette a été déposée lors de la congélation afin de définir l'orientation du tissu. Les muscles ont ensuite été coupés (transversal ou longitudinal) à une épaisseur de 5 ou 10 µm au

cryostat (Leica CM1850, Richmond Hill, ON, Canada) ajusté à une température de -20°C.

Pour la préparation en paraffine, les muscles prélevés ont été fixés dans une solution de formaline (neutral buffered, 10 %; Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) et déposés dans des cassettes pour imprégnation et inclusion en paraffine. Les blocs ont ensuite été coupés à une épaisseur de 4 µm à l'aide d'un microtome (RM2235, Leica Microsystems, Wetzlar, Allemagne).

2.8 Colorations cyto- et histologiques

Les coupes en paraffine ont été réhydratées en procédant à des bains successifs de toluène (2 x 5 min), d'éthanol 100% (2 x 5 min), d'éthanol 70% (2 x 5 min) et d'eau distillée (2 x 5 min). Les coupes congelées ont été décongelées puis fixées 10 min dans la PFA 4 % à 4°C.

2.8.1 Colorations histologiques communes

Les colorations hématoxyline et éosine (H&E) et le trichrome de Masson ont été effectuées à partir de coupes en paraffine. Elles avaient pour but de mettre en évidence la structure du tissu et sa composition en collagène, respectivement. Les colorations Sirius Red et Oil red O ont été effectuées selon des techniques standards sur des coupes congelées et avaient pour but de mettre en évidence les dépôts de collagène et les adipocytes (triglycérides), respectivement (JUNQUEIRA et al. 1979; SCIME et al. 2005).

Après leur coloration, les coupes ont été déshydratées (éthanol et xylène), puis montées entre lame et lamelle dans du milieu de montage permanent (Permount™; Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada). Les coupes colorées à l'Oil red O n'ont pas été déshydratées, mais ont été plutôt montées dans un milieu de montage aqueux.

2.8.2 Marquage au X-gal

Les tissus et les fibres des EDL issus de souris Myf5-nLacZ, ont été fixés à la PFA 4 % (4°C, 10 min). Les préparations ont ensuite été rincées dans un tampon phosphate 0,1 M pH 7,3 contenant 2 mM MgCl₂, et incubées 30 min dans une solution détergente qui est un tampon phosphate contenant 5 mM potassium ferricyanide [K₃Fe(CN)₆], 5 mM potassium ferrocyanide [K₄Fe(CN)₆], 2 mM MgCl₂, 0,01% sodium desoxycholate et 0,02 % Nonidet P40 (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada). Les préparations ont ensuite été transférées dans une solution de coloration qui consiste en la solution de rinçage contenant 1 mg/ml de réactif X-Gal (Wisent Inc, QC, Canada). La coloration a été effectuée toute la nuit à 37°C. Une fois le marquage satisfaisant, les échantillons ont été rincés au PBS.

2.8.3 Immunomarquages en fluorescence

Les immunomarquages ont été réalisés sur des coupes congelées, des fibres musculaires individualisées et des cellules en culture. Dans tous les cas, les préparations ont été fixées dans la PFA 4 % à 4°C pendant 10 min, bloquées et perméabilisées dans du PBS contenant 10 % (v/v) de sérum de chèvre, 1 % (m/v) *Bovin Serum Albumin* (BSA; New England Biolabs, MA, USA) et 0,2 % (v/v) Triton X100 (EMD, NJ, USA) pendant 1 h à la température ambiante. Les préparations ont alors été incubées pendant 90 min en présence d'anticorps primaires dilués dans la solution de blocage. Les anticorps primaires utilisés sont présentés dans le **tableau 2.1**. Après trois rinçages au PBS contenant 1 % de Tween-20 (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada), les préparations ont été incubées 1 h avec des anticorps secondaires de chèvre (1:2000) dans la solution de blocage, tel que décrit dans le **tableau 2.2**, à l'exception de l'anticorps primaire Sca1 et de la toxine Phalloïdine qui sont directement couplés à des fluorochromes. Pour toutes les préparations, les noyaux des cellules ont été marqués avec le DAPI. Comme contrôle négatif, l'anticorps primaire a été omis.

Le dénombrement des cellules a été effectué en contraste de phase en comptant le nombre de cellules et en fluorescence, à partir du nombre de cellules total dont les noyaux ont été marqués avec le DAPI.

Tableau 2.1 Anticorps primaires utilisés en immunofluorescence

Pax7	IgG1 Souris	Poulet (Protéine recombinante <i>E. coli</i>)	Mono	1:3	DSHB (Developmental Studies Hybridoma Bank) PAX7	Cellules satellites quiescentes et CPM prolifératives
MyoD	IgG Lapin	Clone M-318	Poly	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, Cat: sc-360	CPM prolifératives
Myogénine	IgG1 Souris	Rat	Mono	1:3	DSHB (Developmental Studies Hybridoma Bank), F5D	CPM différenciées
Ki67	Lapin	Peptide synthétique Clone SP6	Mono	1:100	Abcam Cat: ab16667	Cellules prolifératives
Laminine α2	Rat	Clone 4H8-2	Mono	1:800	Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada, Cat: L0663	Lame basale
Scat1 (conjugué FITC)	IgG2a Rat	Lignée de cellules-T, Clone D7	Mono	1:400	BD-Bioscience Mississauga, ON, Canada, Cat: 557405	Cellules souches multipotentes, dont les mrSC
Phalloïdine (conjuguée Alexa 488)	Amanite Phalloïde	N/A	N/A	1:100	Invitrogen, Burlington, ON, Canada, Cat: A12379	Filaments d'actine

Tableau 2.2 Anticorps secondaires utilisés en immunofluorescence

Note : Tous les anticorps secondaires proviennent de la compagnie Invitrogen, Burlington, ON, Canada

Alexa-Fluor [®] 488	anti IgG1	souris	cat: A21121
Alexa-Fluor [®] 594	anti IgG H+L	lapin	cat: A11012
Alexa-Fluor [®] 594	anti IgG H+L	souris	cat: A11005
Alexa-Fluor [®] 594	anti IgG H+L	rat	cat: A11007
Alexa-Fluor [®] 647	anti IgG H+L	rat	cat: A21247

2.8.4 Coloration au bleu Evans

Pour tester la viabilité des fibres fraîchement isolées et mises en culture, celles-ci ont été immergées dans une solution de bleu Evans 0,5% pendant 5 min puis rincées au PBS. Le bleu Evans est un colorant qui reste exclu des cellules viables (incolores), mais pénètre la membrane de cellules non viables (bleues). Les fibres ont ensuite été récoltées et mises entre lame et lamelles dans un milieu de montage pour observation au microscope.

2.9 Observations microscopiques

Les tissus et les cellules colorés et/ou immunomarqués ont été examinés à l'aide d'un microscope en contraste de phase/épifluorescence Axioskop 2 (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA) ou un microscope inversé à contraste de phase/épifluorescence (Nikon instrument Inc., Melville, NY, USA). Les microphotographies ont été prises à l'aide d'une caméra numérique Retiga-SRV Fast1394 (QImaging, Surrey, Colombie-Britannique, Canada) contrôlée par les logiciels Image Pro (Media Cybernetics, Silver Springs, MD, USA) ou Simple PCI (Hamamatsu Corporation, Sewickley, USA). Pour les marquages au Sirius Red, la densité de pixels, relative au dépôt de collagène, a été mesurée à l'aide du logiciel Image Pro (Media Cybernetics, Silver Springs, MD, USA) sur 10 champs par muscle, choisis aléatoirement.

2.10 Quantification de l'aire des fibres

L'aire transversale des fibres des souris a été mesurée sur des coupes transversales de TA colorées à l'H&E. Plus de 200 fibres par muscle provenant d'au moins 10 champs choisis aléatoirement (40X) ont été mesurées à l'aide du logiciel ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) (ABRAMOFF et al. 2004).

2.11 Analyse par cytométrie de flux

Les suspensions cellulaires obtenues à la suite de la digestion des muscles ont été centrifugées (300 g, 4°C) et les cellules comptées à l'aide d'un hémacytomètre de type Neubauer. Les cellules ont été reprises dans 200 µl de milieu DMEM contenant 2 % [v/v] de HS puis incubées 20 min sur glace en présence d'anticorps directement couplés à un fluorochrome (**Tableau 2.3**) à raison de 1 µg par 1×10^6 cellules. Les échantillons ont ensuite été centrifugés 5 min à 300 g à 4 °C. Le surnageant jeté, le culot de cellules a été repris dans un volume permettant d'obtenir environ $1,5 \times 10^6$ cellules/ml puis filtrées (50 µm; CellTrics, Partec, Allemagne) afin d'éliminer les agrégats cellulaires.

Sca-1	IgG2a, Souris	Lignée de cellules-T, clone D7	Fluorescéine isothiocyanate (FITC)	BD-Bioscience Mississauga, ON, Canada, Cat: 557405	Cellules souches multipotentes
CD-31	IgG2a, Rat	Lignée de cellules endothéliales, clone MEC 13.3	Phycoérythrine (PE)	BD-Bioscience Mississauga, ON, Canada, Cat: 553373	Cellules endothéliales
CD11b	IgG2b, Rat	Lignée de cellules-T et splénocytes, clone M1/70	Phycoérythrine (PE)	BD-Bioscience Mississauga, ON, Canada, Cat: 557397	Granulocytes, macrophages, cellules dendritiques, cellules NK, et microglies
CD3e	IgG1, Hamster	Lymphocytes T, clone 145-2C11	Phycoérythrine (PE)	BD-Bioscience Mississauga, ON, Canada, Cat: 553063	Thymocytes, lymphocytes T matures et cellules NK-T
CD45/B220	IgG2a, Rat	Tumeur murine Pre-B, clone RA3-6B2	Phycoérythrine (PE)	BD-Bioscience Mississauga, ON, Canada, Cat: 553089	Lymphocytes B

Tableau 2.3 Anticorps directement conjugués à un fluorochrome utilisés en cytométrie de flux

Les analyses ont été effectuées avec un cytomètre de flux FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA) associé au logiciel CellQuest (Becton Dickinson, San Jose, CA). Les données ont été collectées sur un graphique avec une échelle

logarithmique. La population de mrSC a été sélectionnée par la pose graphique d'une fenêtre («gating») afin de ne pas considérer les débris cellulaires et les doublets par l'analyse de la taille (FSC) et la granulosité (SSC) des événements observés. Les préparations cellulaires marquées ont été comparées avec des cellules contrôles non marquées afin de déterminer la population d'intérêt.

2.12 PCR quantitative en temps réel

L'ARN total des muscles de souris a été extrait de poudre provenant de muscles broyés à l'aide d'un mortier, ou encore de cultures de CPM et de mrSC, par l'utilisation de TRIzol (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). La qualité de l'ARN a été déterminée lors de sa quantification par le rapport DO 260/280. Un microgramme d'ARN a été utilisé pour la synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) par la Reverse Transcriptase Superscript II (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) tel que préconisé par le manuel du fabricant. Les produits de réaction ont alors été dilués à une concentration finale de 25 ng/ul d'ADNc par ajout d'eau nanopure stérile. Pour toutes les réactions de PCR quantitative (*quantitative Polymerase Chain Reaction*, qPCR), les amorces ont été élaborées à l'aide du logiciel Primer3 (Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research) à partir des séquences des gènes fournies dans la banque NCBI. Toutes les amorces ont été synthétisées par la compagnie Invitrogen. Les séquences des amorces utilisées apparaissent dans le **tableau 3.4**. Les réactions de qPCR ont été préparées dans un volume final de 20 µl contenant le SYBR green master mix 2X (BioRad, Mississauga, ON, Canada), 50 ng d'ADNc et 50 ng de chaque amorce. Les réactions ont été effectuées et analysées avec l'appareil RotorGene (Corbett, Concorde, Australie). Le programme utilisé est le suivant: 10 min à 95 °C, puis 40 cycles de 40 secondes à 95 °C, 40 secondes à 56 °C et 40 secondes à 72 °C. La courbe de dissociation (melting curve) a été vérifiée à chaque fois pour valider la qualité des amorces utilisées. L'analyse des données a été faite avec la méthode normalisée de quantification $2^{-\Delta\Delta CT}$ en utilisant dans tous les cas les gènes de référence GAPDH ou HPRT.

Tableau 2.4 Amorces utilisées en PCR quantitative en temps réel

Axin2	5'-GGGGGAAAACACAGCTTACA-3'	5'-TTGACTGGGTCGCTTCTCTT-3'	NM_015732.4
Col1a1	5'-GAGCGGAGAGTACTGGATCG-3'	5'-GCTTCTTTTCCTTGGGGTTC-3'	NM_007742.3
Col3a1	5'-GTCCACGAGGTGACAAAGGT-3'	5'-GATGCCCACTTGTCCATCT-3'	NM_009930.2
HPRT	5'-GCAAACCTTTGCTTTCCCTGG-3'	5'-ACTTCGAGAGGTCCCTTTTCACC-3'	NM_013556.2
GAPDH	5'-AACCAGAAGACTGTGGATGG-3'	5'-CACATTGGGGGTAGGAAC-3'	NM_008084.2

2.13 Immunobuvardage de type western

Une petite quantité (~100 mg) de muscles broyés à l'azote liquide a été homogénéisée sur glace dans une solution de RIPA (*Radio-immunoprecipitation assay*) (0,5 % [v/v] NP-40, 0,1 % [m/v] désoxycholate de sodium, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5) contenant des inhibiteurs de protéases (Complete™, Roche Molecular Biochemical, Laval, QC, Canada). L'homogénat a ensuite été centrifugé à 16800 g à 4°C pendant 10 min, et le surnageant contenant la fraction protéique soluble, récupéré. La concentration protéique a été déterminée par la méthode de Bradford (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada) en utilisant une courbe étalon faite de solutions de BSA à concentrations connues. Les extraits protéiques (30 µg) ont été dilués dans le tampon de charge Laemmli 1X (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, 20 % glycérol, 10 % [m/v] SDS, 0,25 % [m/v] bleu de Bromophenol, 10 % [m/v] β-Mercapto-éthanol) puis séparés par SDS-PAGE à voltage constant de 100 V pendant 90 min. Les protéines ont ensuite été transférées sur des membranes de PVDF (Millipore, Etobicoke, ON, Canada) 400 Å pendant 2h30 à 4°C en utilisant du tampon de transfert (150 mM Glycine, 20 mM Tris-base et 10 % [v/v] de méthanol). Les membranes ont alors été incubées pendant 30 min dans le PBS-T (PBS contenant 0,1 % [v/v] de Tween 20) supplémenté de 5 % [m/v] de lait écrémé (Carnation). Après trois lavages au PBS-T, les membranes ont été incubées toute la nuit à 4°C avec l'anticorps anti-β-caténine (1:800; BD Bioscience, Mississauga,

ON, Canada) ou anti-GAPDH (1:1000; Clone FL-335, Santa Cruz, CA, USA). Les membranes ont ensuite été rincées plusieurs fois au PBS-T avant d'être incubées, pendant 1h à température ambiante avec l'anticorps secondaire approprié couplé à l'enzyme HRP (*Horseradish Peroxydase*) (1:5000; Amersham, Oakville, ON, Canada). Après plusieurs lavages au PBS-T, les membranes ont été immergées 1 min dans une solution de chemiluminescence maison [tampon Tris 0,1 M, pH 8,5 (20 ml) dans laquelle est ajoutée 50 µl d'acide coumarique (90 mM dans DMSO), 100 µl de luminol (250 mM dans DMSO) et 6 µl de peroxyde d'hydrogène 30 % (v/v)] puis mise en contact avec un film photographique BioMax ML Film (Kodak, Rochester, NY, USA). Les bandes obtenues lors de l'exposition ont été numérisées et analysées par densitométrie à l'aide du logiciel ImageJ (ABRAMOFF et al. 2004).

2.14 Mesure de l'activité de la voie Wnt/caténine/TCF

Le plasmide Super(8X)TOPFlash (200 ng; Addgene no. 12456) qui traduit l'activité de la protéine TCF, son contrôle muté Super(8X)FOPFlash (200 ng ; Addgene no. 12457) (VEEMAN et al. 2003), ainsi que le plasmide contrôle pRL-CMV (20 ng ; Promega, Madison, WI) ont été incubés avec 1 µl de Fugene 6™ (Roche, Mannheim, Allemagne) dans 800 µl de DMEM sans sérum (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) dans des plaques 24 puits contenant des cellules HEK293 (*Human Embryonic Kidney-293*)(100 000 cellules/puits; ATCC). Après 16 heures, le milieu a été remplacé par du DMEM contenant 10 % de sérum de souris (adulte et âgée). La protéine recombinante murine Wnt3a (R&D Systems, USA) (100 ng/ml) a été utilisée comme contrôle positif pour l'activation de la voie Wnt canonique. L'activité transcriptionnelle a été mesurée par le biais d'un essai luciférase après 24 heures de traitement en exposant les cellules lysées à une solution *Dual-Glo assay* (Promega, Madison, Wisconsin, USA). L'activité luciférase a été mesurée à l'aide d'un luminomètre (Titertek-Berthold, USA). L'activité luciférase a alors été normalisée par rapport à celle de la *Renilla*, tel que recommandé par le manufacturier. La *Renilla* est exprimée sous le contrôle d'un

promoteur constitutivement actif et est communément utilisé comme contrôle interne (SHIFERA et HARDIN 2010).

2.15 Mesure de la rigidité de surface par microscopie à force atomique

La rigidité de fibres isolées ainsi que de C2C12 différenciées a été mesurée à l'aide d'un microscope à force atomique (AFM). Les fibres individuelles isolées d'EDL ont été rincées dans du PBS puis déposées dans une plaque six puits contenant du ruban adhésif double face avec le plus petit volume de liquide possible. Les plaques ont alors été déposées dans des godets adaptés puis centrifugées à 400 g à 4°C pendant 10 min (Hettich Rotina 420R, Newport Pagnell, Royaume-Uni). Le ruban avec les fibres adhérees a alors été placé dans un Pétri dans lequel du PBS a été ajouté avant la prise de mesure.

Pour la quantification des C2C12 différenciées (myotubes), des cellules ont étéensemencées à 13 000 cellules/cm² puis différenciées en myotubes pendant 8 jours dans le milieu de différenciation (DMEM+2 % HS, 1 % antibiotiques). Le milieu a été changé après 4 jours. La rigidité des myotubes a été quantifiée dans le milieu de différenciation.

L'AFM est un microscope composé d'un levier sur lequel un laser est réfléchi. Lors du contact entre le levier et le tissu (ou la cellule), la déflexion du laser est mesurée par une photodiode. Cette déflexion, correspondant à l'indentation du levier dans l'échantillon, permet l'obtention d'une courbe force/distance qui peut alors être traduite en rigidité par des algorithmes mathématiques (KUZNETSOVA et al. 2007).

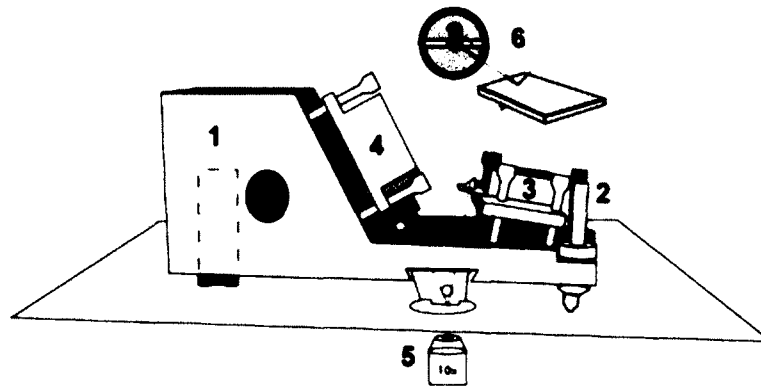


Figure 2.1 Schéma du montage de l'AFM

1) Piezo à axe-z de 12 μm ; 2) micro-vis permettant d'abaisser l'AFM; 3) laser; 4) photodiode segmentée; 5) microscope inversé; 6) effet du mouvement du levier par la réflexion du faisceau laser sur la photodiode (Söllradl *et al.*, non publié).

Les expériences d'indentation ont été faites par le biais d'un AFM équipé d'un piezo (1) à une dimension, permettant un mouvement de profondeur précis et d'un microscope inversé (Carl Zeiss, Germany) pour le positionnement adéquat du levier vis-à-vis de la préparation cellulaire et les micro-vis (2) permettent son l'abaissement. Le contact est indiqué par un mouvement du laser (3) sur la photodiode segmentée (4). Le contact entre le levier et la fibre induit une modification de l'angle du laser sur le levier (6). Un microscope inversé (5), a permis le positionnement du levier sur la fibre (**Figure 2.1**).

Avant chaque expérience, le levier ($k=0.01$ N/m, MLCP, Buker AFM probe, USA) a été calibré d'après sa constante de raideur (k) fournie par le manufacturier. Pour chaque préparation cellulaire, trois mesures ont été effectuées. Chaque mesure permet l'obtention d'une courbe Voltage/distance d'indentation dont le voltage de la photodiode est immédiatement traduit en force, aboutissant à une courbe force/distance (courbe F/D). La pente de la courbe correspond à la rigidité de la préparation cellulaire analysée. Plus la valeur de la pente est élevée, plus la fibre est rigide (**Figure 2.2**).

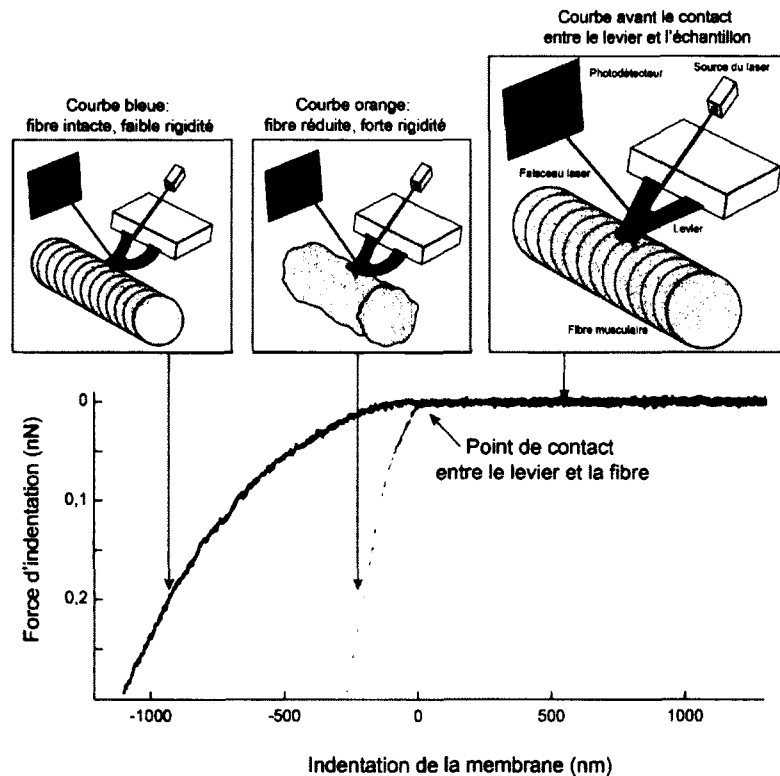


Figure 2.2 Schéma illustrant les types de courbes F/D obtenues en fonction du type d'échantillon

L'analyse des courbes F/D a été effectuée à l'aide du programme Matlab (MathWorks, USA). Un module de Young a été déterminé point par point en utilisant un algorithme semi-automatique pour chaque courbe F/D, à l'aide d'un modèle de Hertz modifié pour un indentateur pyramidal à quatre côtés:

$$F = \frac{E}{1 - \nu^2} \frac{(\tan \alpha)}{\sqrt{2}} \delta^2$$

où F correspond à la force d'indentation, E le module de Young, ν le ratio de Poisson (défini à 0,5 pour les matériaux incompressibles isotropiques), δ l'indentation, et α l'angle de face de la pyramide ($17,5^\circ$ pour le levier utilisé). Pour l'analyse, 65 points d'analyse ont été déterminés avec une taille de 15 nm/point (**Figure 2.3**). Ainsi, plus le nombre de points d'analyse est élevé, plus la résolution sera grande. Le nombre de points d'analyse choisi assure que le point de contact entre le levier et l'échantillon se trouve dans nos points d'analyse et permet l'obtention d'une résolution suffisante dans un temps de calcul raisonnable. La

taille des points et la résolution choisie permettent d'obtenir une profondeur d'indentation maximum de 975 nm. La précision de la force d'indentation est de l'ordre du pico Newton (pN).

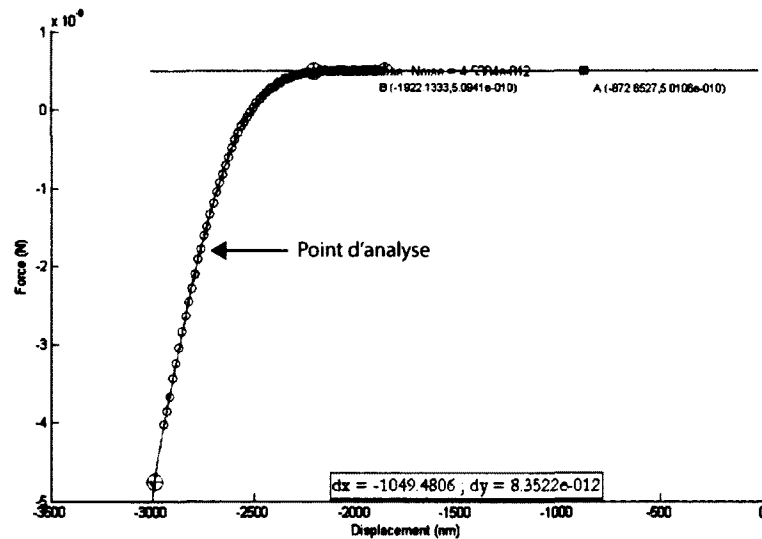


Figure 2.3 Analyse informatisée d'une courbe F/D pour l'obtention d'un Module de Young

L'algorithme permet ainsi d'obtenir un ensemble de courbes (profondeur d'indentation vs. Young's modulus) provenant de chaque point d'analyse, qui correspondent chacune à un module de Young et donc à une rigidité (**Figure 2.4**).

Pour choisir une courbe représentant la valeur absolue de rigidité de la fibre analysée, trois critères ont été pris en compte:

1. La courbe horizontale la plus profonde (module de Young vs. Profondeur d'indentation).
2. Le point de départ de la courbe se situant avant la valeur critique du bruit résiduel.
3. Si deux courbes ou plus partagent la même profondeur d'indentation, celle avec le plus petit RMSD (*root mean square deviation*) est sélectionnée.

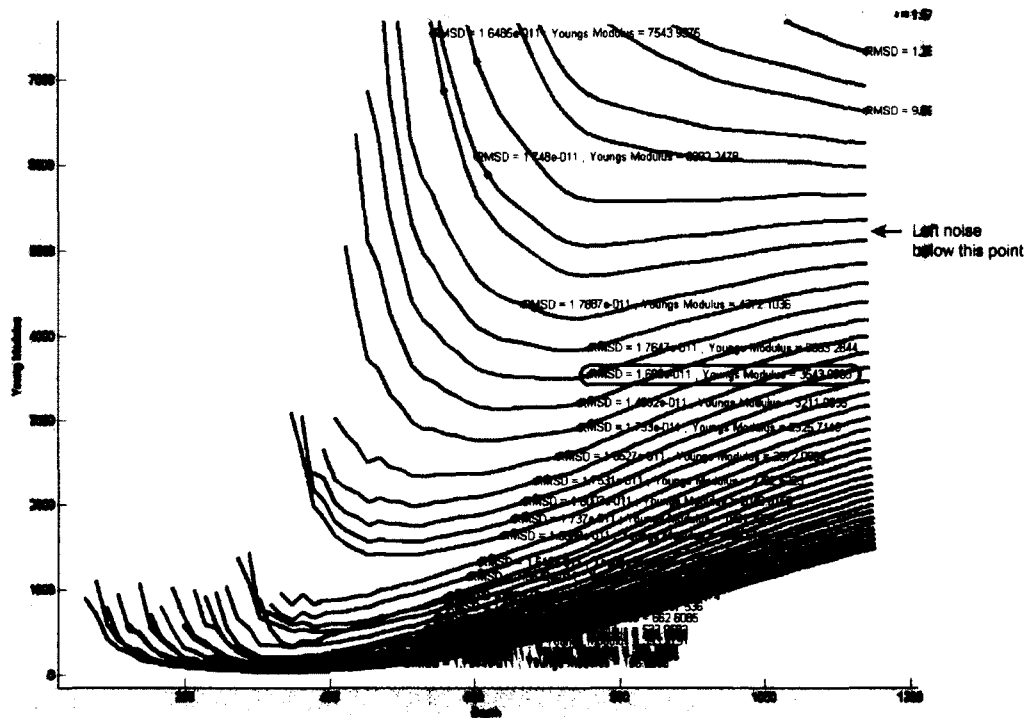


Figure 2.4 Obtention du Module de Young d'une courbe F/D

La courbe sélectionnée correspond à la courbe la plus profonde (vers la droite) se situant en dessous de la valeur critique du bruit résiduel et avec le plus petit RMSD. La valeur retenue pour cette mesure est donc de 3,54 kPa (cercle rouge)

Le premier critère assure que le module de Young obtenu est en accord avec le modèle utilisé. Le deuxième critère permet de s'assurer que le point de contact physique correspond au point de départ. Dans le cas où deux correspondances ou plus sont valides, ont la même valeur d'indentation et sont situées dans le bruit de fond, le RMSD est le dernier critère de sélection utilisé. Ces trois critères permettent de s'assurer qu'un seul module de Young soit obtenu pour chaque courbe F/D. Ce module de Young correspond à la rigidité en Pascal (Pa) de la courbe F/D analysée. Ainsi, au cours d'une expérience, nous avons obtenu 3 mesures/cellule et quantifié un minimum de 20 cellules ou fibres.

2.16 Synthèse de substrats à base de gels d'acrylamide

Des substrats de différentes rigidités ont été synthétisés d'après la méthode décrite par Tse et Engler (TSE et ENGLER 2010). Brièvement, des lamelles rondes

en verre de 25 mm² ont été nettoyées avec une solution de NaOH 0,1M. Dans une chambre d'azote, la surface des lamelles a ensuite été recouverte de 3-Aminopropyltriéthoxysilane (APES) permettant l'adhésion du gel. Les lamelles ont ensuite été rincées à l'eau distillée puis dans une solution 0,5 % de glutaraldéhyde diluée dans du PBS. Parallèlement, des lames de verre ont été traitées avec du Dichlorodiméthylsilane (DCDMS) pendant 5 min afin d'empêcher l'adhésion du gel puis les lames ont été rincées à l'eau distillée. Pour la synthèse des gels, différentes concentrations d'acrylamide et de bis acrylamide ont été mixées dans un volume final de 10 ml d'eau nanopure tel que décrit dans le **tableau 2.5**.

Tableau 2.5 Concentrations d'acrylamide et de bis-acrylamide utilisées pour la synthèse des substrats

3	0,06	0,75	0,3	8,95	0,5
5	0,03	1,25	0,15	8,6	1
4	0,01	1	0,5	8,5	2
10	0,34	2,5	1,68	15,82	4
20	0,23	5	1,14	13,86	12

Avant sa polymérisation, le mélange a été dégazé à l'aide d'un vacuum pendant 15 min. Pour permettre la polymérisation, du persulfate d'ammonium (1:100) et du Temed (1:1000) ont été ajoutés à chaque préparation. Un volume de 25 µl a été déposé immédiatement entre une lame et une lamelle préalablement traitées (**Figure 2.5**). Une fois le gel polymérisé, les lamelles ont été entreposées à 4°C dans une solution d'éthanol 40 %, jusqu'à utilisation. La veille de leur utilisation, les lamelles ont été rincées au PBS puis recouvertes de collagène (Rat tail collagen ; cat: 08-115, Millipore, Temecula, CA, USA) pour permettre l'adhésion des cellules. Le recouvrement des gels d'acrylamide par du collagène est une couche très fine qui n'affecte pas la rigidité du substrat (PELHAM et WANG

1997; FLANAGAN et al. 2002; KHATIWALA et al. 2006; TSE et ENGLER 2010).

Pour l'étude de la prolifération des CPM sur différents substrats, des CPM ont été ensemencées à une confluence de 1750 cellules/cm². Après trois jours, un décompte du nombre de cellules par champs pris aléatoirement (8 champs/puits, 3 puits/préparation) a été effectué, et ce pour trois préparations indépendantes.

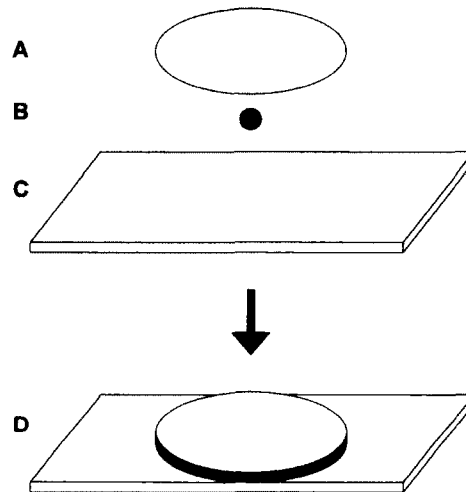


Figure 2.5 Schéma de fabrication des substrats à base d'acrylamide

A) Lamelle de verre amino-silanée. B) Mélange d'acrylamide et de bis-acrylamide en polymérisation. C) Lame de verre chloro-silanée. D) Les différents composants une fois assemblés.

2.17 Analyses statistiques

Les valeurs obtenues ont été présentées comme la moyenne \pm l'erreur-type. Les analyses statistiques ont été faites par des tests-*t* appariés pour les expériences visant à comparer des cellules ou des tissus provenant des mêmes souris. Des tests-*t* non appariés ont été utilisés pour les expériences visant à comparer des tissus ou des cellules provenant de souris différentes. L'analyse statistique des mesures de rigidités comparant plusieurs groupes a été effectuée par un ANOVA suivi d'un test de Tukey. Les calculs de puissance ont été effectués

avec un intervalle de confiance de 95 %. Les valeurs $p < 0,05$ ont été considérées comme statistiquement significatives. Les analyses statistiques et les graphiques ont été réalisés avec le logiciel Prism 5.0. (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

Chapitre III: Résultats

3.1 Modulation de l'environnement et du comportement des cellules progénitrices du muscle squelettique lors du vieillissement

3.1.1 *La structure et la composition du muscle âgé sont différentes du muscle adulte*

Les causes du vieillissement musculaires sont multifactorielles et incluent une dégénérescence neuromotrice, une altération de la production de facteurs hormonaux, une inflammation chronique ou encore un stress oxydatif (DEGENS 2007; GOPINATH et RANDO 2008; MENG et YU 2010).

Nous avons effectué une caractérisation macroscopique et histologique des muscles squelettiques de souris adultes (3 mois) et âgées (24 mois) afin de valider si elles correspondent à ce qui est rapporté dans la littérature (cf. **section 1.5.1**). Ces âges ont été choisis puisqu'à partir de 3 mois, les souris sont matures et n'ont plus de croissance musculaire et osseuse. À l'âge de 24 mois, elles sont considérées physiologiquement âgées (FLURKEY et al. 2007).

Nous avons tout d'abord mesuré le poids de muscles communément utilisés, à savoir le gastrocnémus (Gas) et le tibialis antérieur (TA), provenant de souris adultes (3 mois) et âgées (24 mois). Nos résultats montrent une diminution significative (18 %) de la masse du Gas mais non du TA des souris âgées par rapport aux souris adultes (**Fig. 3.1.1A**). Une étude histologique a par la suite été effectuée par le biais d'observation microscopique de coupes transversales de muscles TA colorés à l'hématoxyline & éosine (H&E). Les résultats montrent une diminution significative de l'aire des fibres dans un muscle âgé par rapport à un muscle adulte (**Fig. 3.1.1B-C**).

La portion stromale du muscle vieillissant montre également d'importantes variations histologiques. En effet, des colorations de coupes transversales de TA au Sirius red et à l'Oil red O révèlent respectivement une accumulation importante de tissu fibreux et de cellules adipocytaires (dégénérescence graisseuse) dans le muscle âgé (**Fig. 3.1.1D**).

La population progénitrice stromale, aussi appelée cellules progénitrices résidentes du muscle squelettique (mrSC), est reconnue pour sa multipotence et son implication dans la production du collagène interstitiel. Nous avons quantifié cette population par cytométrie de flux à l'aide d'anticorps spécifiques. Les mrSC sont positives pour l'antigène Sca1, mais négatives pour le marqueur des cellules endothéliales CD31 et des cellules hématopoïétiques matures (Lineage: CD11b, Gr-1 CD3e et CD45R/B220) ($Sca1^+CD31^-Lin^-$ ou S^+CL^-) (GRENIER et al. 2007; LEBLANC et al. 2011). Nos résultats montrent une augmentation significative de plus de trois fois du nombre de mrSC dans le muscle âgé par rapport au muscle adulte (**Fig. 3.1.1E**) possiblement lié à l'infiltration de tissus adipeux et l'accumulation de tissu fibreux observé dans la portion stromale du muscle âgé (NARICI et MAFFULLI 2010). L'ensemble de ces résultats a permis de valider les différences de composition entre les muscles de souris adultes et âgées utilisées pour nos études.

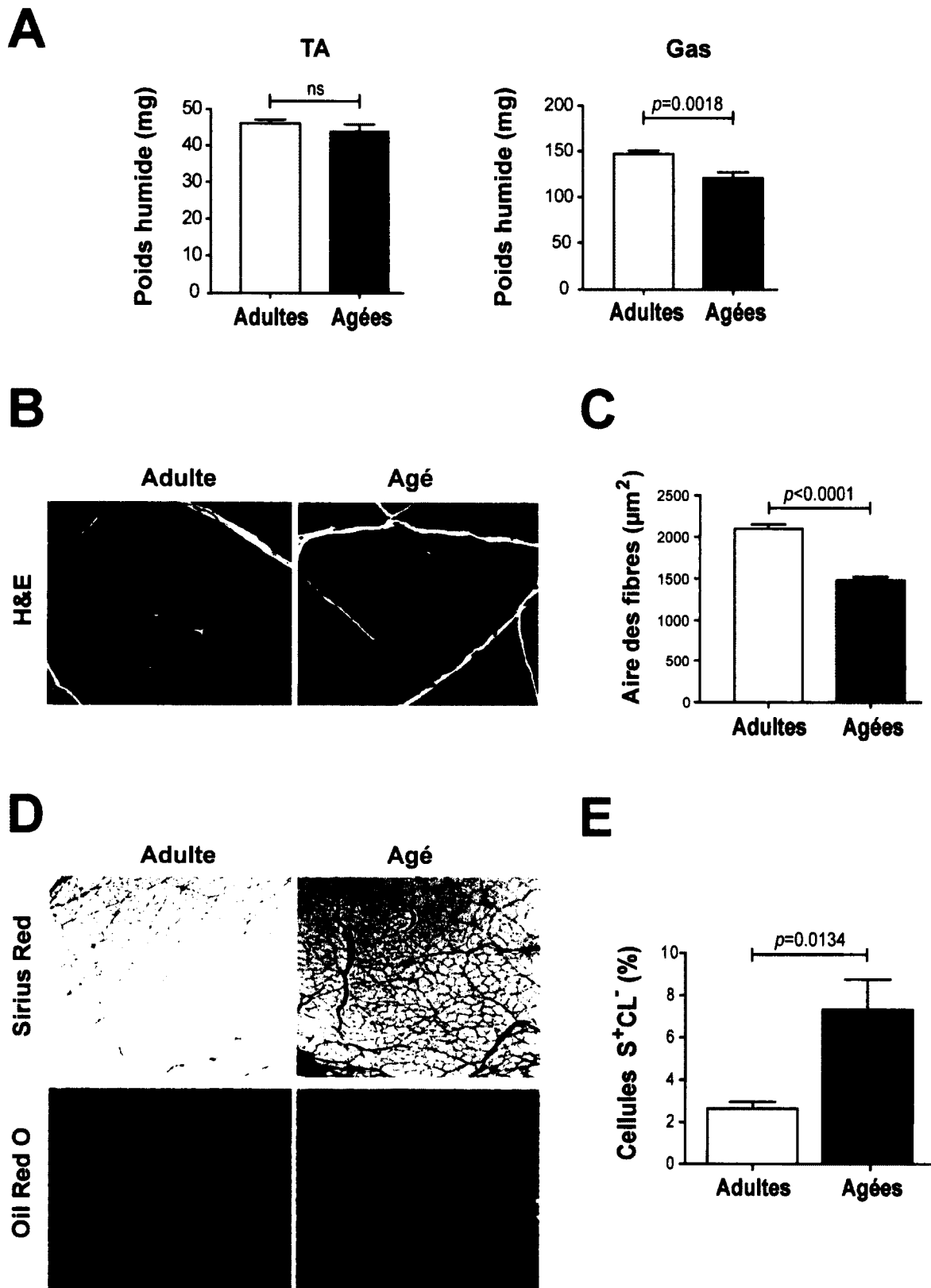


Figure 3.1.1

Figure 3.1.1. Caractérisations macroscopiques, histologiques et de compositions cellulaires entre les muscles de souris adultes et âgées.

(A) Mesure de la masse des muscles tibialis antérieur (TA) et gastrocnémus (Gas) provenant de souris C57Bl/6 adultes (3 mois; n=6) et âgées (24 mois; n=6). **(B)** Coupes transversales (5 µm) représentatives de muscles TA de souris adultes et âgées colorées au H&E. **(C)** Quantification de l'aire des fibres de muscles de souris adultes et âgées. Ces résultats ont été obtenus par la quantification de l'aire de plus de 200 fibres choisies aléatoirement sur des coupes transversales de TA de souris adultes (n=3) et âgées (n=3) colorées au H&E. **(D)** Coupes transversales (5 µm) représentatives de muscles TA de souris jeunes et âgées colorées au Sirius red et à l'Oil red O. **(E)** Histogramme présentant le pourcentage de mrSC (S⁺CL⁻) fraîchement isolées de muscle TA de souris adultes (n=4) et âgées (n=4). Les résultats sont présentés comme la moyenne ± l'erreur-type. La signification statistique a été déterminée par un test t non apparié.

3.1.2 L'état des cellules progénitrices myogéniques est altéré lors du vieillissement

Puisque ce sont les cellules progénitrices myogéniques (CPM) qui assurent le renouvellement des fibres musculaires en condition physiologique ou leur régénération à la suite d'un dommage, il est essentiel de les caractériser dans le muscle vieillissant, connu pour son déclin régénératif.

Des coupes transversales de muscle Gas de souris jeunes (3 semaines), adultes (3 mois), et âgées (24 mois) ont été immunomarquées à l'aide d'anticorps dirigés contre: **1)** le Ki67, un antigène nucléaire exprimé par les cellules prolifératives, **2)** le facteur de transcription Pax7, spécifique aux cellules satellites quiescentes et CPM prolifératives, ainsi que **3)** la laminine, localisée dans la lame basale des fibres musculaires et des vaisseaux sanguins. Les noyaux ont été marqués au DAPI (**Fig. 3.1.2A**). Ces immunomarquages ont permis de localiser et de déterminer le pourcentage de cellules prolifératives totales (Ki67⁺) ainsi que de CPM prolifératives (Pax7⁺Ki67⁺) dans le muscle des souris à différents âges.

Le décompte des cellules prolifératives totales (myogéniques et non myogéniques) sur l'ensemble des noyaux a révélé une diminution significative (2,5 fois) entre les muscles de souris jeunes par rapport à ceux de souris adultes (**Fig. 3.1.2B**). La comparaison entre le muscle de souris adultes et âgées met en évidence une diminution significative (2 fois) du pourcentage de cellules

prolifératives totales. Il est intéressant de mettre ce résultat en relation avec l'augmentation des cellules mésenchymateuses observé avec l'âge (**Fig. 3.1.1D**) suggérant que la diminution totale de cellules prolifératives ($\text{Pax7}^+\text{Ki67}^+$ et $\text{Pax7}^-\text{Ki67}^+$) dans le muscle âgé serait la conséquence d'une réduction importante du nombre de CPM prolifératives ($\text{Pax7}^+\text{Ki67}^+$).

Dans le but de confirmer ce point, nous avons évalué le pourcentage de CPM prolifératives ($\text{Pax7}^+\text{Ki67}^+/\text{Ki67}^+$ totales) sur des coupes de muscles de souris à différents âges. Les résultats montrent une quantité de CPM prolifératives 9 fois plus élevée dans le muscle jeune par rapport à un muscle adulte. Cette forte prolifération est attribuée au processus de maturation du tissu. Les résultats montrent également une importante diminution (>15 fois) des CPM prolifératives dans le muscle âgé ce qui pourrait expliquer en partie la diminution du potentiel régénératif lors du vieillissement (**Fig. 3.1.2C**).

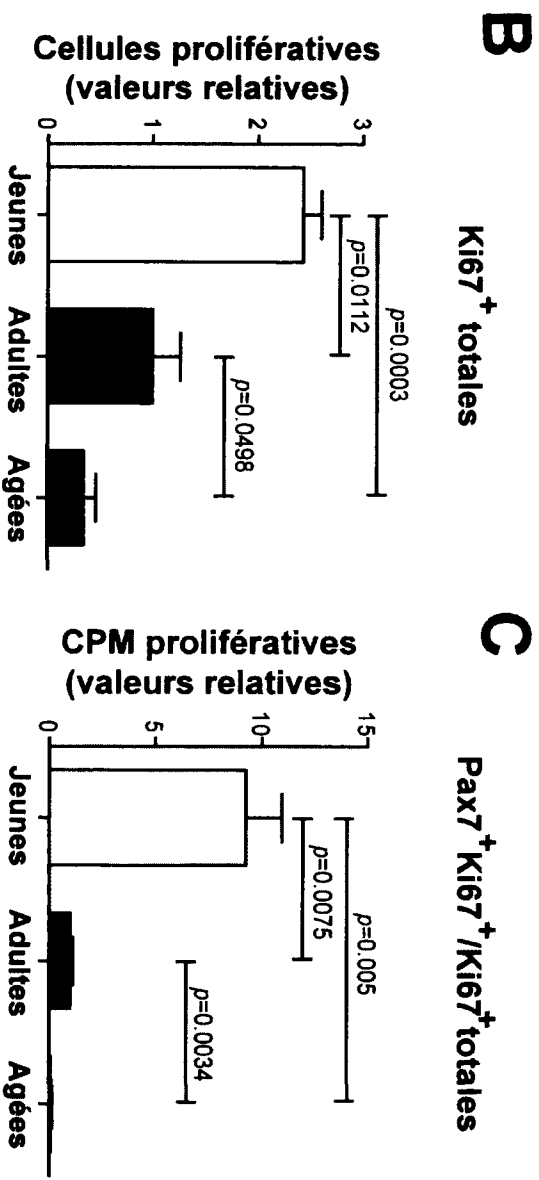
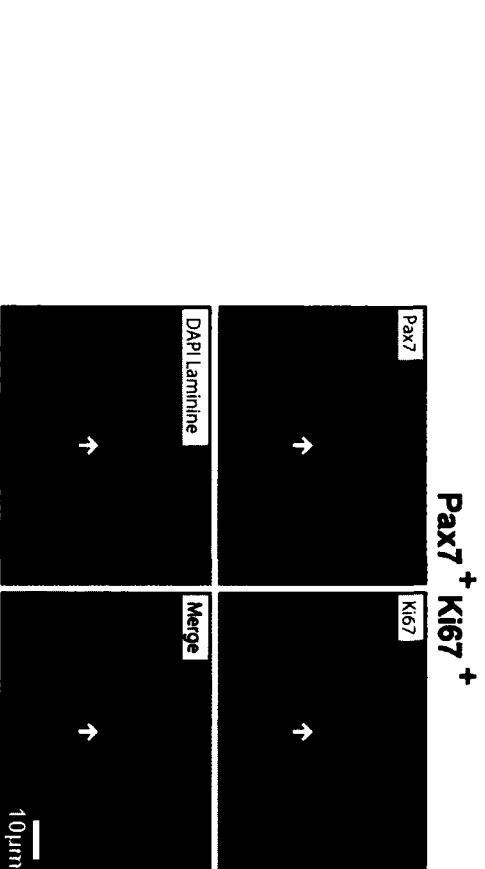
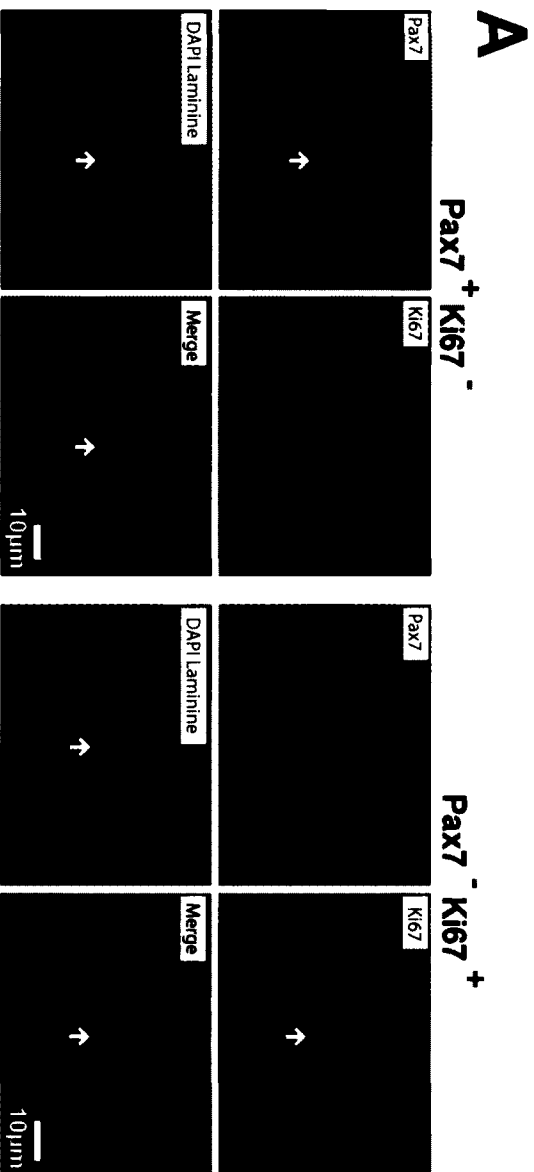


Figure 3.1.2

Figure 3.1.2. L'état prolifératif des CPM est altéré lors du vieillissement.

(A) Immunomarquage sur coupes transversales (5 μm) représentatives de Gas de souris c57Bl/6 adultes à l'aide d'anticorps dirigés contre Pax7 (vert), Ki67 (rouge), laminine (mauve). Les noyaux ont été marqués par le DAPI (bleu). Les flèches indiquent des cellules Pax7⁺Ki67⁻, Pax7⁻Ki67⁺ et Pax7⁺Ki67⁺. (B) et (C) Histogrammes représentant les cellules prolifératives totales (Ki67⁺) et les CPM prolifératives (Pax7⁺Ki67⁺/Ki67⁺ totales), respectivement. Les comptes ont été effectués sur des coupes transversales de muscle Gas provenant de souris jeunes (3 semaines, n=4), adultes (3 mois, n=4) et âgées (24 mois, n=4). (B) et (C) sont représentés en valeurs relatives par rapport aux muscles adultes. Les résultats sont présentés comme la moyenne \pm l'erreur-type. La signification statistique a été déterminée par un test t non apparié.

3.1.3 L'état de différenciation des CPM est altéré dans le muscle vieillissant

Le potentiel régénératif du muscle squelettique est lié à la capacité des CPM à s'activer, proliférer et se différencier (fusionner) afin de reconstituer le pool de noyaux des fibres musculaires endommagées, ou encore, de former de nouvelles fibres suite à un dommage. Il est possible de discerner l'état de différenciation des CPM par l'étude de la co-expression de facteurs de transcription qui leur sont spécifiques, Pax7 et MyoD. Ainsi, les CPM quiescentes sont Pax7⁺MyoD⁻, les CPM activées sont Pax7⁺MyoD⁺, et les CPM compétentes à fusionner, Pax7⁻MyoD⁺ (cf. section 1.3.2.2).

Dans le but de définir quelle(s) étape(s) de la différenciation des CPM pourrai(en)t faire défaut dans le muscle âgé, les pourcentages de CPM quiescentes, activées et compétentes à fusionner ont été quantifiés sur des coupes transversales de muscle Gas de souris jeunes, adultes et âgées. Les valeurs obtenues ont été relativisées par rapport à un muscle adulte. Les résultats montrent une augmentation relative de CPM quiescentes (Pax7⁺MyoD⁻) chez les souris jeunes et âgées (1,6 et 1,8 fois, respectivement) (Fig. 3.1.3A), suggérant que ce n'est pas la quantité de cellules satellites présentes à l'état basal qui est en cause dans le déficit régénératif du muscle vieillissant.

Pour les CPM activées/prolifératives (Pax7⁺MyoD⁺), nos résultats montrent une diminution significative entre les muscles jeunes et adultes (4,7 fois) ainsi qu'entre les muscles âgés et adultes (9,5 fois). (**Fig. 3.1.3B**). De plus, nos résultats révèlent une augmentation du pourcentage de CPM compétentes à fusionner (Pax7⁻MyoD⁺) chez les souris jeunes (6,2 fois) et chez les souris âgées (23,4 fois) (**Fig. 3.1.3C**).

Ensemble, ces résultats suggèrent un défaut sévère de l'activation/prolifération des CPM dans le muscle des souris âgées, pouvant être impliqué dans la diminution du potentiel régénératif du muscle squelettique lors du vieillissement. Aussi, la présence de cellules compétentes à fusionner indique que dans le muscle de souris âgées, les CPM activées ont tendance à fusionner plutôt qu'à proliférer.

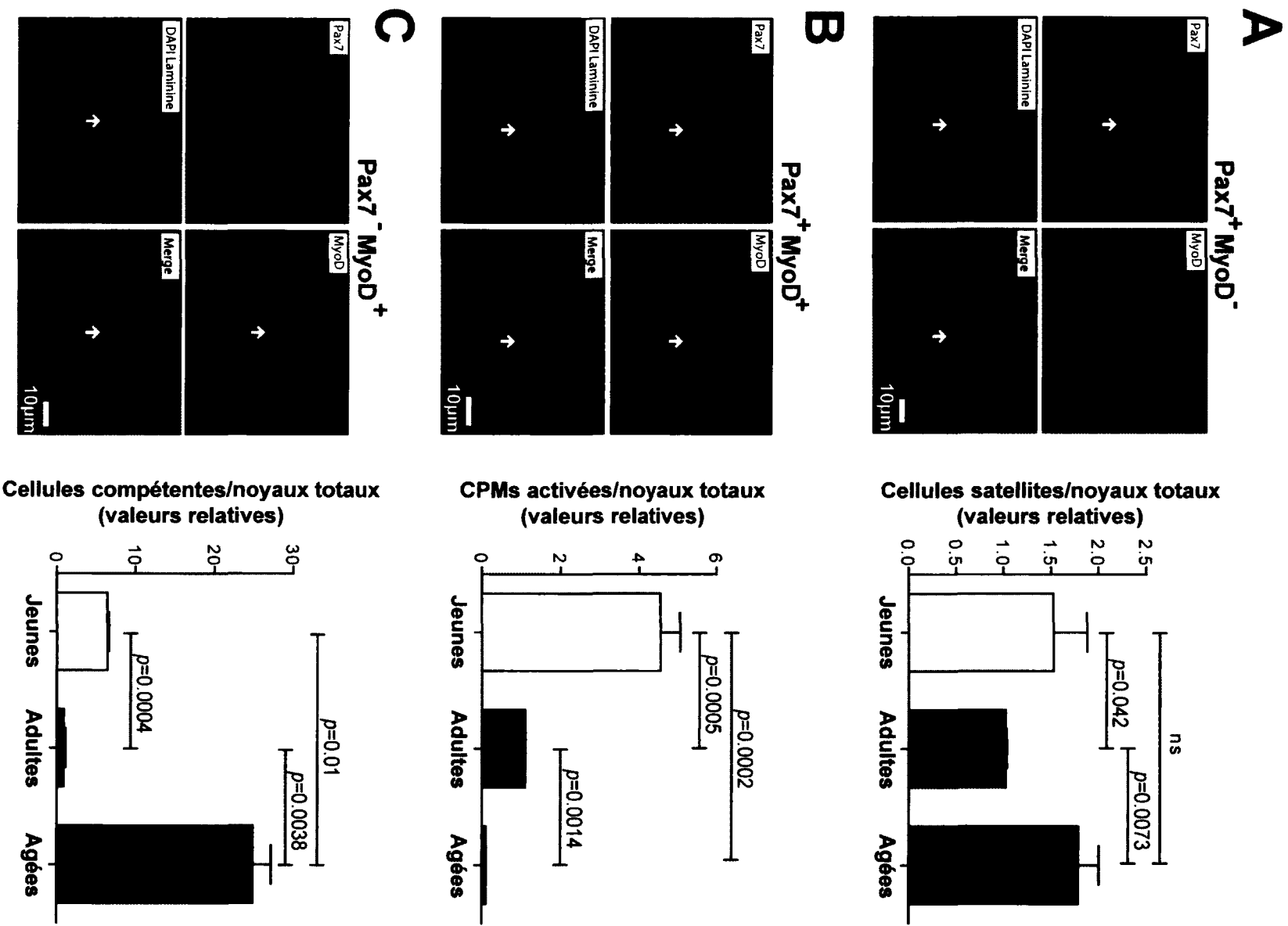


Figure 3.1.3

Figure 3.1.3 L'état de différenciation des CPM est modulé dans le muscle vieillissant.

Immunofluorescence sur coupes congelées (5 μm) de Gas de souris c57Bl/6 adultes à l'aide d'anticorps dirigés contre les protéines Pax7 (vert), MyoD (rouge) et laminine (mauve). Les noyaux ont été marqués au DAPI (bleu). Histogramme représentant le nombre de CPM (A) quiescentes Pax7⁺MyoD⁻, (B) prolifératives (Pax7⁺MyoD⁺) et (C) compétentes à fusionner (Pax7⁻MyoD⁺) sur le nombre de noyaux totaux. La totalité de ces décomptes a été effectuée sur l'ensemble de coupes transversales provenant de la partie médiane du Gas de souris C57Bl/6 jeunes (3 semaines, n=3), adultes (3 mois, n=3) et âgées (24 mois, n=3). Les résultats de cette figure sont représentés en valeurs relatives à partir des valeurs obtenues sur les coupes de muscles adultes. Les résultats sont présentés comme la moyenne \pm l'erreur-type. La signification statistique a été déterminée par un test t non apparié.

En résumé, nous avons montré que l'état de différenciation des CPM du muscle âgé est différent du muscle adulte. En effet, le muscle vieillissant présente une atrophie des fibres musculaires, une augmentation de la population des mrSC et une accumulation de tissu fibreux et adipeux dans sa portion stromale. De plus, le muscle âgé présente une diminution du pourcentage de CPM prolifératives et une augmentation du pourcentage de CPM compétentes à fusionner en condition physiologique. Ces résultats pourraient expliquer le délai de régénération suite à un dommage, caractéristique du muscle vieillissant.

3.2 La voie Wnt canonique contribue à la formation de la fibrose du muscle squelettique de souris *mdx*

3.2.1 La population des mrSC est augmentée dans le muscle des souris *mdx*

Les muscles du modèle de souris dystrophiques *mdx* sont caractérisés à l'âge adulte (>3 mois) par une forte accumulation de tissu fibreux (cf. **section 1.5.2.2**). Cette fibrose est également une caractéristique commune au vieillissement du muscle.

La fibrose a été mise en évidence par le biais d'une coloration au trichrome de Masson (TM) sur des coupes transversales de TA, Gas et Dia de souris *mdx* et sauvages âgées de trois mois (**Figs. 3.2.1A et S1**). Outre la fibrose (coloration bleue), on constate également la présence de fibres de diamètre variés, dont certaines nécrotiques, caractéristiques du muscle dystrophique. Puisqu'il présente les caractéristiques des souris dystrophiques, les expériences qui suivent ont été menées dans le TA.

Afin de confirmer l'accumulation de collagène dans le muscle des souris *mdx*, nous avons procédé à la quantification par PCR quantitative (PCR en temps réel) de l'expression des gènes codants pour le collagène de type I et III, principaux types de collagènes fibrillaires présents dans le tissu fibrotique (LIGHT et CHAMPION 1984; GILLIES et LIEBER 2011). Nos résultats montrent une augmentation significative de l'expression du collagène de type I (4 fois) et de type III (18 fois) dans le muscle des souris *mdx* par rapport aux souris sauvages (**Fig. 3.2.1B**). Les mrSC étant connues pour leur capacité à produire de la MEC (GRENIER et al. 2007; JOE et al. 2010; LEBLANC et al. 2011), nous avons évalué la proportion de cette population dans le muscle des souris *mdx*. Pour ce faire, nous avons effectué un immunomarquage des mrSC à l'aide de l'antigène Sca1 sur des coupes transversales. Cette expérience a permis de mettre en évidence une augmentation importante et significative du nombre de cellules Sca1 positives au pourtour des fibres musculaires immunomarquées par la laminine, dans le muscle de souris dystrophiques par rapport aux muscles de souris sauvages. (**Fig. 3.2.1C**).

La population de mrSC a été également quantifiée par cytométrie en flux par le biais d'un immunomarquage des cellules totales provenant de la digestion

des tissus, à l'aide d'anticorps dirigés contre Sca1 et CD31 ainsi que contre les différentes lignées hématopoïétiques matures (lineage). Les résultats montrent que le pourcentage de mrSC (ou S^+CL^-), par rapport à la population cellulaire totale, est augmenté de façon significative (2,1 fois) dans les muscles des souris *mdx* par rapport à ceux des souris sauvages (**Fig. 3.2.1D**).

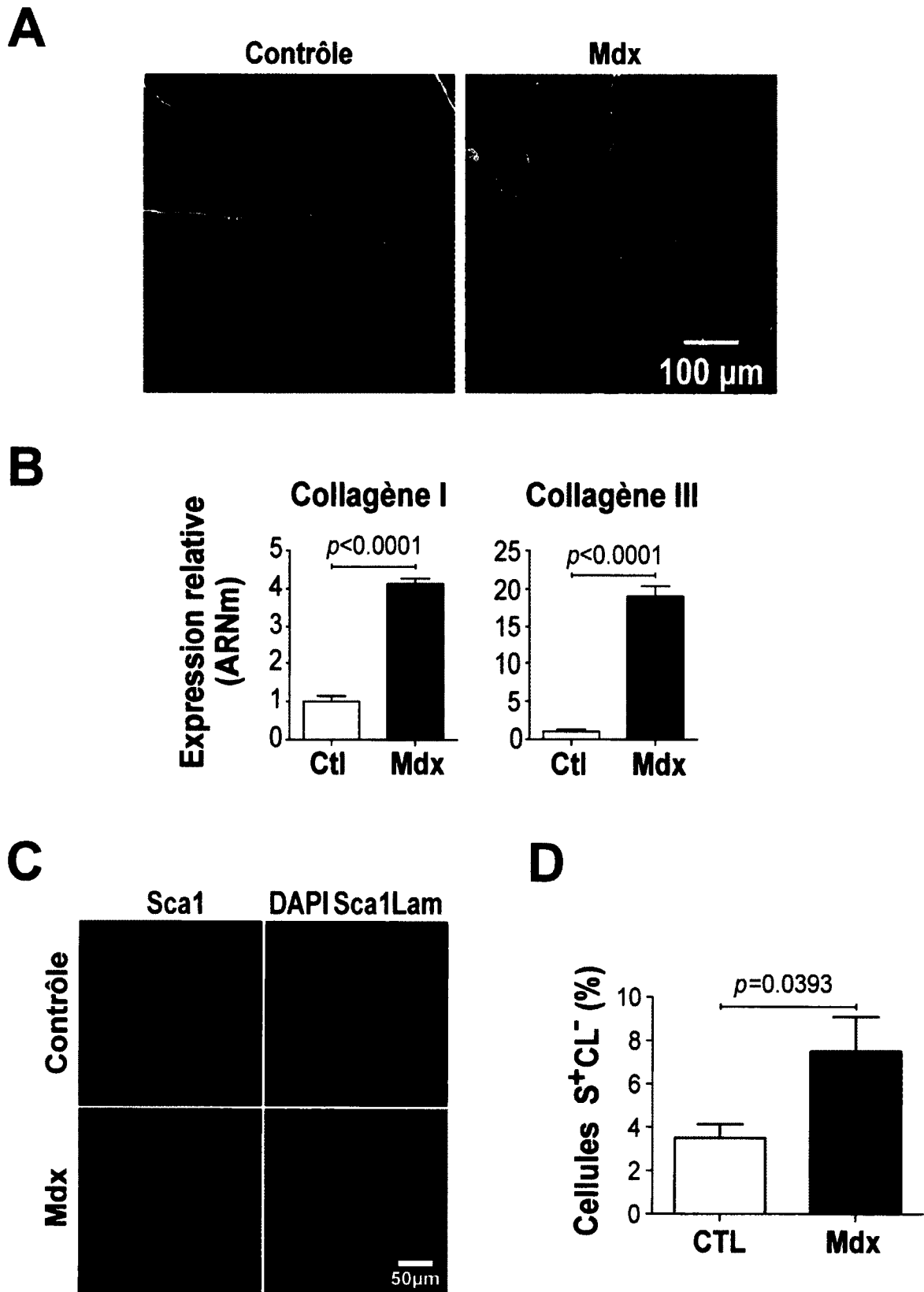


Figure 3.2.1

Figure 3.2.1 Les muscles des souris *mdx* sont fibrotiques et ont une population de mrSC augmentée.

(A) Coupes transversales (5 μ m) représentatives de muscles Tibialis Antérieur (TA) provenant de souris sauvages (CTL) et dystrophiques (*mdx*) adultes colorées au trichrome de Masson. Cette coloration permet de localiser le collagène en bleu et les fibres musculaires en rouge. (B) Expression relative par qPCR des gènes collagènes type I et III dans les TA de souris *mdx* par rapport aux souris sauvages (n=6). (C) Immunofluorescence sur coupes congelées transversales (5 μ m) représentatives de TA de souris sauvages et *mdx* à l'aide d'anticorps dirigés contre Sca1 (vert) et laminine (rouge). Les noyaux ont été colorés au DAPI (en bleu). (D) Pourcentage de mrSC (S⁺CL⁻) dans le muscle de souris sauvages et *mdx*, déterminé par cytométrie de flux (n=5). Les résultats sont présentés comme la moyenne \pm l'erreur-type. La signification statistique a été déterminée par un test t non apparié.

3.2.2 L'activité de la voie Wnt canonique est augmentée chez les souris *mdx* et stimule la prolifération des mrSC et leur synthèse de collagène *in vitro*

Dans le but de voir si l'activité de la voie Wnt canonique est augmentée dans l'environnement des cellules progénitrices du muscle des souris *mdx*, nous avons mesuré par des essais luciférase l'activité transcriptionnelle du complexe Wnt/ β -caténine/T cell factor (TCF). Les résultats montrent une augmentation significative (1,8 fois) de l'activité TCF/LEF en présence de sérum provenant de souris *mdx* par rapport au sérum de souris sauvages, traduisant ainsi une augmentation de l'activité de la voie Wnt canonique dans l'environnement systémique des souris dystrophiques (**Fig. 3.2.2.A**).

Afin de confirmer l'augmentation de l'activité de la voie Wnt canonique, nous avons procédé à la quantification de l'expression de la β -caténine, protéine pivot et principale effectrice de cette voie de signalisation, dans des extraits de muscles Gas de souris *mdx* et sauvages. Une activité de la voie Wnt canonique prévient la dégradation de la β -caténine favorisant son accumulation. Les immunobuvardages de Gas révèlent une augmentation significative (1,5 fois) de l'expression de la β -caténine dans les muscles de souris dystrophiques par rapport aux souris sauvages (**Fig. 3.2.2.B**).

Le muscle des souris *mdx* présentant une augmentation de l'activité de la voie Wnt canonique, nous avons isolé puis mis en culture les mrSC en présence de Wnt3a un agoniste reconnu pour activé la voie Wnt canonique (SHIMIZU et al. 1997; BRACK et al. 2008; MACDONALD et al. 2009). Nous avons observé une augmentation significative de leur prolifération par rapport aux cellules non traitées (**Fig. 3.2.2.C**). L'augmentation du nombre de mrSC dans le muscle des souris *mdx* pourrait donc être directement liée à une augmentation de l'activité de la voie Wnt canonique observée dans le muscle et dans l'environnement systémique.

Afin de confirmer l'activation de la voie Wnt canonique dans les mrSC traitées avec la protéine recombinante Wnt3a, nous avons procédé à la quantification de l'expression de la β -caténine par immunobuvardage sur des mrSC mises en présence de Wnt3a avec ou sans ajout de DKK1, un antagoniste de la voie Wnt canonique (NIEHRS 2006; BRACK et al. 2007; MACDONALD et al. 2009) (**Fig. 3.2.2.D**). Les cellules traitées avec Wnt3a présentent une accumulation significative de β -caténine contrairement aux cellules traitées avec Wnt3a et DKK1 dont l'expression de la β -caténine correspond à celle des cellules non traitées. Ces résultats ont été confirmés en mesurant par qPCR le niveau d'expression de l'Axine 2, un gène cible de la voie Wnt canonique (NUSSE 2012), et le collagène de type I, reconnu pour être le composant majeur du dépôt matriciel dans la fibrose. Les niveaux d'expression du collagène de type I et de l'axine 2 étaient significativement augmentés (1,4 et 12 fois, respectivement) dans les cellules traitées avec Wnt3a par rapport aux cellules non traitées (**Fig. 3.2.2.E**). Dans les deux cas, leur expression a été inhibée par l'ajout de DKK1.

Ensemble, ces résultats montrent que l'augmentation de l'activité de la voie Wnt canonique observée dans le muscle de souris dystrophiques favorise la prolifération des mrSC ainsi que l'expression du gène codant pour le collagène de type I.

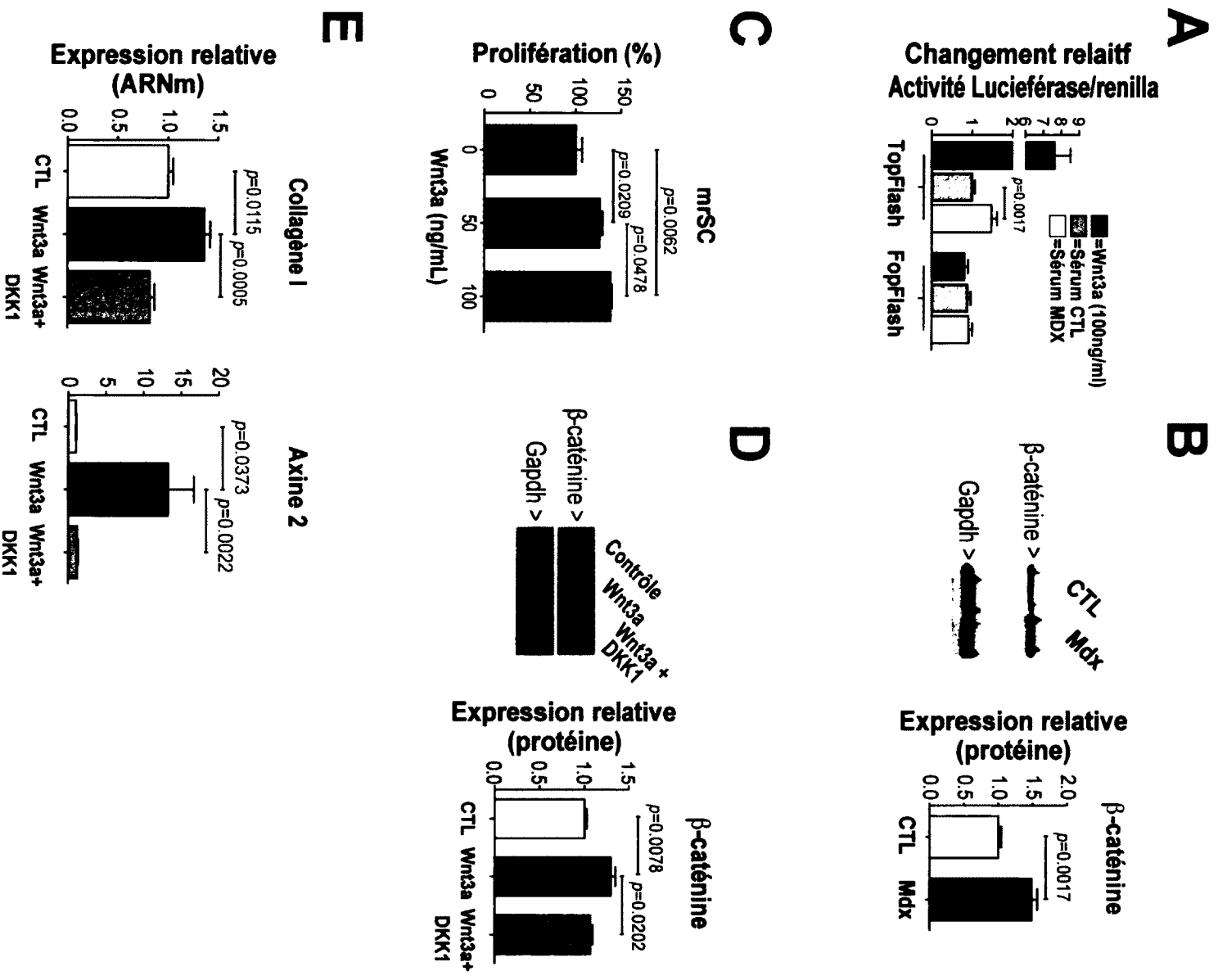


Figure 3.2.2

Figure 3.2.2 L'activité de la voie Wnt canonique est augmentée chez les souris *mdx* et stimule la prolifération des mrSC et la synthèse de collagène *in vitro*.

(A) Mesure de l'activité luciférase relative à l'activité transcriptionnelle de la voie Wnt/ β -caténine/Tcell factor (TCF) à l'aide de plasmides rapporteurs (8xTOPFlash et son contrôle muté 8xFOPFlash) transfectés dans les cellules HEK293. Les cellules ont été traitées avec 10 % du sérum provenant de souris *mdx* (n=6) ou sauvages (n=6) pendant 24 h. La protéine recombinante Wnt3a (100 ng/ml) a servi de contrôle positif. Quatre expériences indépendantes ont été réalisées. (B) Immunobuvardage pour la β -caténine sur des extraits protéiques de muscles TA provenant de souris sauvages et *mdx*. La protéine GAPDH a été utilisée comme contrôle de chargement. Le graphique montre l'expression relative de la β -caténine mesurée à partir des données densitométriques provenant de quatre TA de chaque groupe. (C) Pourcentage de prolifération des mrSC exposées pendant quatre jours à 0, 50 ou 100 ng/ml de protéines recombinantes murines Wnt3a (n=6). Les décomptes ont été effectués à l'aide d'un hemacytomètre (D) Immunobuvardage pour la β -caténine sur des extraits protéiques de mrSC en culture exposées pendant quatre jours à de la protéine recombinante murine Wnt3a (100 ng/ml) seule ou avec DKK1 (250 ng/ml). GAPDH a été utilisé comme contrôle de chargement. Le graphique montre l'expression relative de la β -caténine mesurée à partir des données densitométriques provenant de quatre préparations cellulaires. (E) Expression relative mesurée par qPCR des gènes codants pour l'axine 2 et le collagène de type I dans des mrSC non traitées (CTL), traitées avec Wnt3a (100 ng/ml) seul, ou en combinaison avec DKK1 (250 ng/ml) (n=6). Les résultats sont présentés comme la moyenne \pm l'erreur-type. La signification statistique a été déterminée par un test t non apparié.

3.2.3 L'activation de la voie Wnt canonique réduit la prolifération des CPM *in vitro*, mais n'a pas d'effet sur leur synthèse de collagène

Afin de déterminer si les CPM pourraient causer l'accumulation de tissu fibreux dans les muscles dystrophiques, nous avons stimulé les CPM avec un agoniste de la voie Wnt canonique. Des cultures de fibres individuelles ont été traitées, ou non, pendant quatre jours en présence de 100 ng/ml de Wnt3a. Les CPM ont été quantifié par décompte du nombre de cellules Pax7⁺ par fibre. Les résultats montrent une réduction significative (1,6 fois) de l'activation/prolifération des CPM (cellules Pax7⁺) par rapport aux fibres non traitées (Fig. 3.2.3A). Le traitement des CPM en culture avec Wnt3a inhibe de façon dose dépendante leur prolifération (Fig. 3.2.3B). Une réduction de la prolifération de plus de 50 % a été

atteinte avec une concentration de 100 ng/ml de Wnt3a. Dans le but de vérifier si l'exposition des CPM à un agoniste de la voie Wnt canonique pouvait moduler l'expression de gènes cibles, l'expression de l'Axine 2 et du collagène de type I ont été quantifiées par qPCR. L'exposition des CPM à Wnt3a pendant quatre jours induit une augmentation significative (environ 13.5 fois) de l'expression de l'Axine2 indiquant la capacité des CPM à transduire la signalisation de la voie Wnt canonique, mais sans toutefois moduler l'expression du collagène de type I (**Fig. 3.2.3C**). Ensemble, ces résultats montrent que l'activation de la voie Wnt canonique inhibe la prolifération des CPM en culture et ces dernières ne semblent pas être impliquées dans la synthèse de collagène de type I du muscle squelettique.

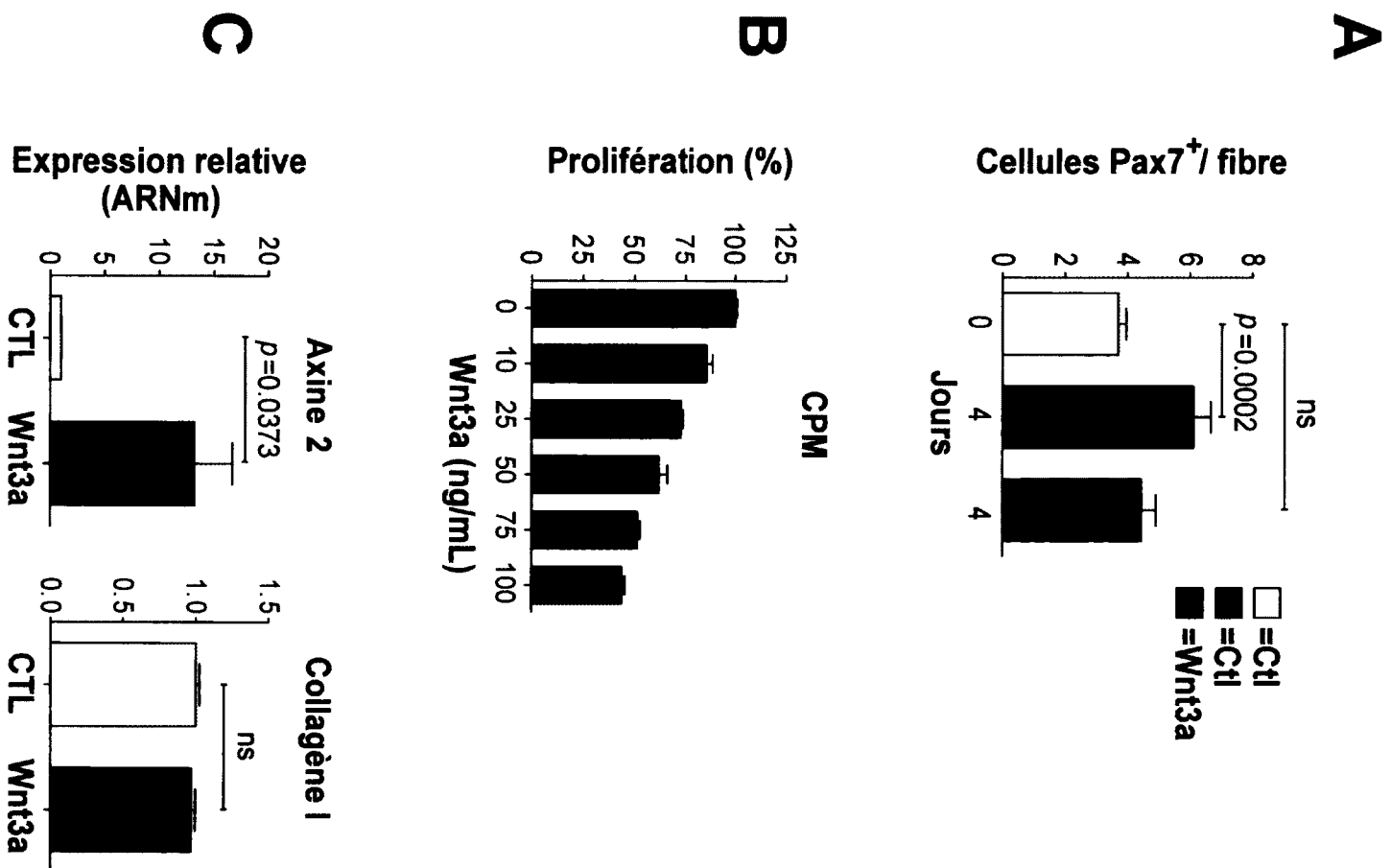


Figure 3.2.3

Figure 3.2.3 L'activation de la voie Wnt canonique réduit la prolifération des CPM mais n'a pas d'effet sur l'expression du collagène de type I.

(A) Nombre de cellules Pax7⁺ en fonction du nombre de fibres musculaires individuelles fraîchement isolées (jour 0, CTL) ou cultivées pendant quatre jours en présence ou en absence (CTL) de la protéine recombinante Wnt3a (100 ng/ml) (50 fibres). (B) Pourcentage de CPM prolifératives cultivées en présence de concentrations croissantes de Wnt3a (10, 25, 50, 75 et 100 ng/ml) (n=6). Le comptage a été effectué à l'aide d'un hémocytomètre (C) Expression relative de l'Axine 2 et du collagène de type I par qPCR, dans des cultures primaires de CPM contrôle (CTL) (n=6) ou traitées avec Wnt3a (100 ng/ml) (n=6). Les résultats sont présentés comme la moyenne \pm l'erreur-type. La signification statistique a été déterminée par un test t non apparié.

3.2.4 Wnt3a stimule la prolifération et l'expression de collagène des mrSC in vivo

Nos résultats précédents ont montré que l'activation de la voie Wnt canonique induit une augmentation de la prolifération des mrSC et la synthèse de collagène *in vitro*. Afin de confirmer ces résultats *in vivo*, des injections répétées de Wnt3a ont été effectuées dans le TA de souris sauvages. Une solution saline a été injectée aux mêmes temps dans le muscle controlatéral.

L'activation de la voie Wnt canonique a été vérifiée par la quantification protéique de l'expression de la β -caténine. L'immunobuvardage sur les extraits protéiques révèle une accumulation significative de la β -caténine (1,3 fois) dans les TA traités par rapport aux TA contrôles (**Fig. 3.2.4A**). Dans le but de voir si le traitement avait influencé la population des mrSC, une quantification des cellules S⁺CL⁻ a été effectuée par cytométrie en flux. Les résultats montrent une augmentation significative (1,3 fois) de la proportion des mrSC dans les muscles traités (**Fig. 3.2.4B**). Ce résultat a été confirmé par un immunomarquage des cellules Sca1⁺ (vert) sur des coupes transversales de TA où l'on a pu observer une augmentation du nombre de cellules Sca1⁺ dans les TA traités avec Wnt3a (**Fig. 3.2.4C**).

Nous avons ensuite mesuré par qPCR l'expression des gènes codants pour les collagènes de type I et III. Les injections de Wnt3a ont induit une augmentation significative (1,4 et 1,3 fois, respectivement) des deux types de collagène

fibrillaires (**Fig. 3.2.4D**). Ce résultat a été confirmé *in situ* sur des coupes transversales de TA traitées ou non avec Wnt3a et colorées au Sirius Red. Les résultats montrent une augmentation de la coloration dans les TA traités avec du Wnt3a (**Fig. 3.2.4E**). L'intensité de la coloration, quantifiée par la mesure de la densité des pixels, révèle une augmentation significative et constante du collagène entre les TA contrôle et traités de plusieurs souris (**Fig. 3.2.4F**).

Ces résultats indiquent que la présence d'agonistes de la voie Wnt canonique dans le muscle de souris sauvages est suffisante pour induire une augmentation de la prolifération et de la synthèse de collagène par les mrSC *in vivo*.

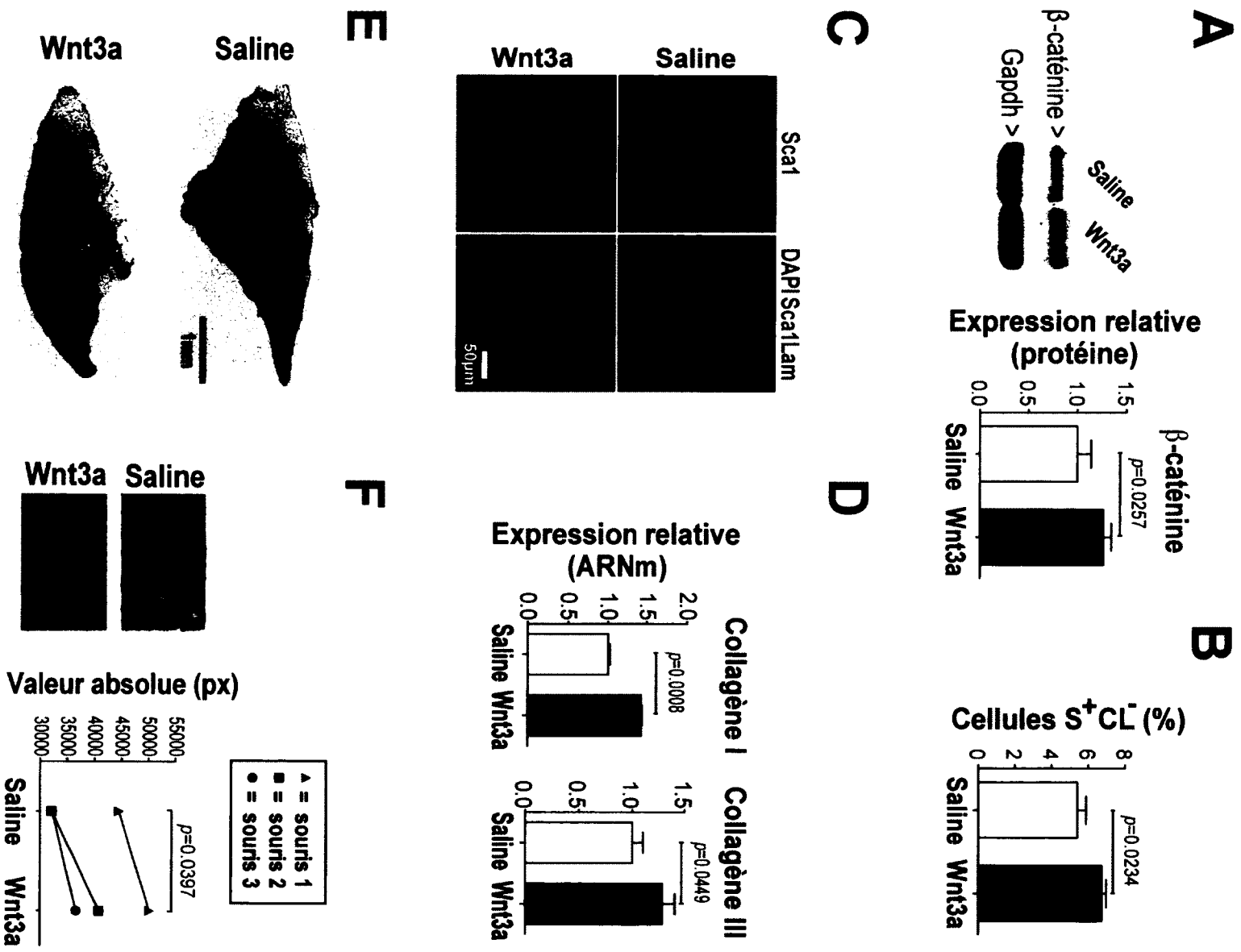


Figure 3.2.4

Figure 3.2.4 Wnt3a stimule la prolifération et l'expression de collagène des mrSC *in vivo*.

(A) Immunobuvardage pour la β -caténine à partir d'extraits protéiques de TA suite à 3 injections intramusculaires à quatre jours d'intervalle de la protéine recombinante Wnt3a (250 ng/ml) et de solution saline (25 μ l) dans le TA controlatéral de souris sauvages (C57BL/6). La protéine GAPDH a été utilisée comme contrôle de charge. Graphique présentant l'expression relative de la β -caténine mesurée à partir des données densitométriques (n=5). (B) Pourcentage de cellules S⁺CL⁻ dans les TA traités ou non avec Wnt3a (250ng/ml) (C) Immunomarquage représentatif de coupes transversales de TA traités avec Wnt3a (250 ng/ml) ou de solution saline (25 μ l) dans le TA controlatéral. Les coupes congelées (5 μ m) ont été mises en présence d'anticorps dirigés contre Sca1 (vert) et la laminine (rouge). Les noyaux ont été marqués par le DAPI (bleu) (D) Expression relative, mesurée par qPCR, des gènes codants pour les collagènes de type I et III dans les TA traités ou non avec Wnt3a (250 ng/ml) (n=5). (E) Reconstitution représentative de coupe transversale de TA traités, ou non, avec Wnt3a et colorés au Sirius Red. (F) Représentation graphique de la quantification du marquage au Sirius Red observée en (E) (n=3). Les résultats sont présentés comme la moyenne \pm l'erreur-type. La signification statistique a été déterminée par un test t apparié.

3.2.5 L'antagoniste Dickkopf 1 (DKK1) inhibe l'effet de la voie Wnt canonique dans le muscle de souris *mdx*

Afin de vérifier si l'inhibition de la voie Wnt dans le muscle de souris *mdx* permettrait de réduire la fibrose, des injections intramusculaires répétées de l'antagoniste DKK1 ont été effectuées dans le Gas de souris *mdx* jeunes adultes (8 semaines). Comme contrôle, une solution saline a été injectée dans le muscle controlatéral. La diminution de l'activation de la voie Wnt canonique a été vérifiée par quantification de l'expression de la β -caténine. L'immunobuvardage de type Western sur les extraits protéiques provenant des muscles contrôles et traités montre une diminution de plus de 40 %, du niveau d'expression de la β -caténine suite aux injections de DKK1 par rapport aux muscles controlatéraux (Fig. 3.2.5A). Cette diminution était accompagnée d'une réduction importante de l'expression du collagène de type I, déterminée par qPCR (Fig. 3.2.5B).

Afin de vérifier si l'inhibition de la voie Wnt réduit la population des mrSC *in vivo*, un immunomarquage des cellules Sca1⁺ (vert) a été effectué sur des coupes

transversales de Gas de souris *mdx*, traitées avec DKK1 ou de la solution saline (controlatéraux) (**Fig. 3.2.5.C**). Les résultats montrent une diminution du nombre de cellules positives pour Sca1 dans les Gas traités avec DKK1 par rapport aux Gas contrôles. Finalement, nous avons procédé à une coloration au Sirius Red des coupes transversales de Gas traités, ou non, avec DKK1 (**Figs. 3.2.5D et S2**). L'intensité de la coloration, quantifiée par la mesure de la densité des pixels, révèle une diminution significative et constante du marquage du collagène des Gas traités avec DKK1 par rapport aux Gas controlatéraux de plusieurs souris (**Figs. 3.2.5E et S2**).

Ensemble, ces résultats suggèrent que la diminution de l'activité Wnt canonique dans le muscle de souris dystrophique, par le biais d'injections répétées d'un antagoniste, permet de réduire de manière significative la population des mrSC, leur synthèse de collagène et surtout la fibrose musculaire des souris *mdx*.

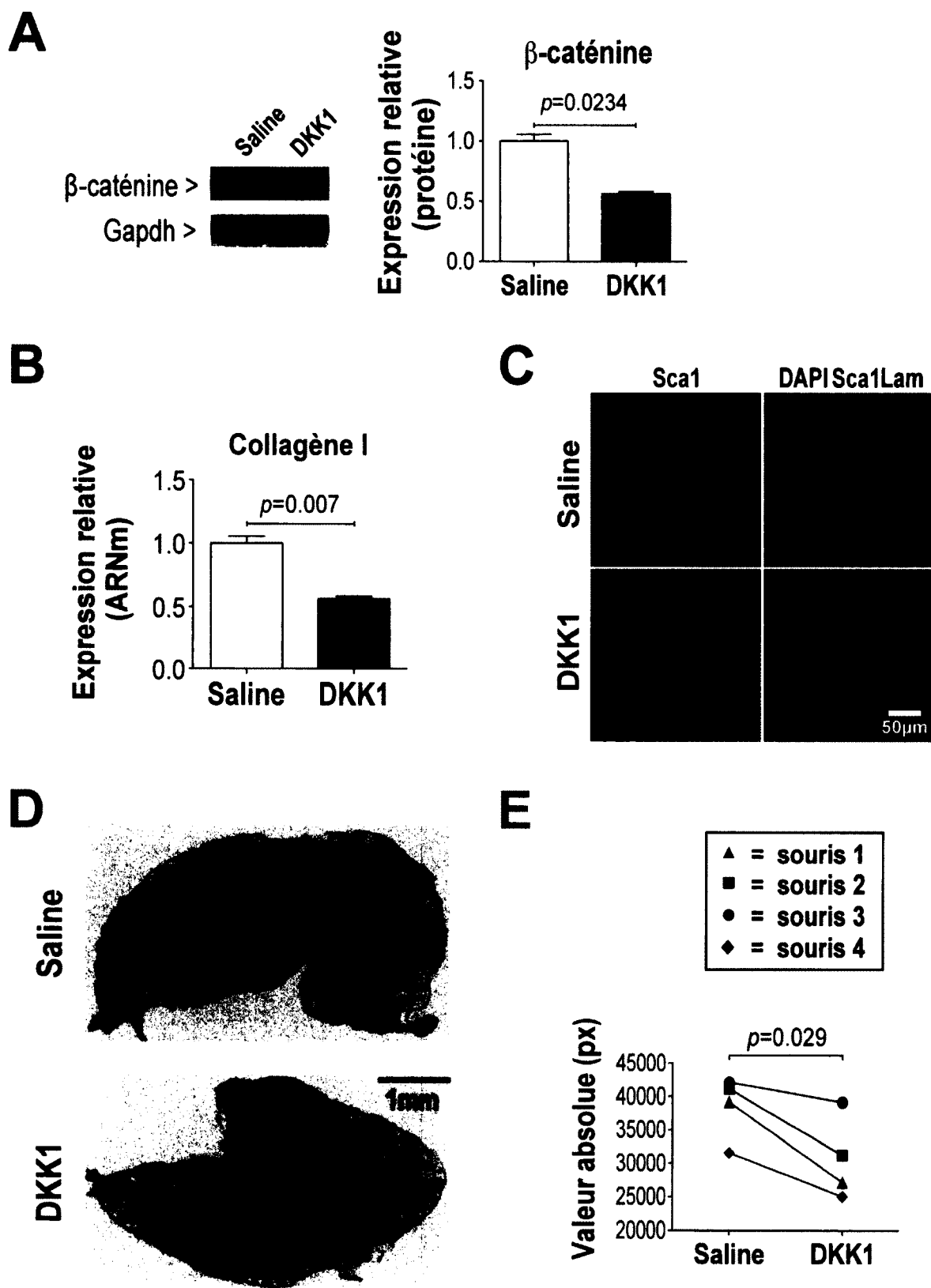


Figure 3.2.5

Figure 3.2.5 L'antagoniste Dickkopf 1 (DKK1) inhibe l'effet profibrotique de la voie Wnt canonique dans le muscle de souris *mdx*.

(A) Immunobuvardage pour la β -caténine à partir d'extraits protéiques de muscles Gas provenant de souris dystrophiques ayant subi une série de huit injections à quatre jours d'intervalle de DKK1 (300 ng/25 μ l) ou de solution saline (25 μ l) dans le muscle controlatéral. La protéine GAPDH a été utilisée comme contrôle de charge. Graphique montrant l'expression relative de β -caténine à partir des données densitométriques (n=4). (B) Expression relative du gène codant pour le collagène de type I dans les muscles Gas traités par huit injections de DKK1 (300 ng/25 μ l) et de solution saline (25 μ l) dans le muscle controlatéral mesuré par qPCR. (C) Immunofluorescence sur des coupes transversales (5 μ m) de muscle Gas de souris ayant subi des injections de DKK1 (300 ng/25 μ l) ou de solution saline. Les coupes ont été mises en présence d'anticorps dirigés contre Sca1 (vert) et la laminine (rouge). Les noyaux ont été marqués par le DAPI (bleu). (D) Reconstructions représentatives de muscles colorés au Sirius red. (E) Représentation graphique de la quantification informatique du marquage au Sirius red observé en (D). Les quantifications ont été faites à partir de quatre souris *mdx*. Les résultats sont présentés comme la moyenne \pm l'erreur-type. La signification statistique a été déterminée par un test t apparié.

En résumé, nos résultats montrent une augmentation de la population mrSC dans le muscle des souris *mdx*. Nous avons également montré que l'activation de la voie Wnt canonique, augmentée chez les souris *mdx*, stimule la prolifération des mrSC et leur synthèse de collagène *in vitro*. L'activation de la voie Wnt dans le muscle de souris sauvages induit une accumulation de collagène et l'augmentation de la population de mrSC. À l'inverse, l'inhibition de cette voie chez la souris *mdx* par injection de DKK1 induit une diminution de la population de mrSC et de la fibrose musculaire.

3.3 La modulation mécanique du microenvironnement favorise la prolifération des CPM

3.3.1 La perte de tension interne des fibres individuelles en culture induit la prolifération des CPM

Lors de la culture de fibres musculaires, nous avons noté qu'une proportion d'entre elles se « réduisent », c'est-à-dire qu'elles perdent leur tonus, mais sans se casser. Afin de définir à quel moment ce phénomène se produit, un décompte des fibres intactes et réduites en culture a été effectué quotidiennement pendant six jours (**Fig. 3.3.1A**). Vingt-quatre heures après l'isolement et la mise en culture de fibres intactes, près de la moitié d'entre elles se sont réduites. Ce chiffre a atteint plus de 80% après six jours. Fait intéressant, ces fibres réduites ont comme caractéristique un fort bourgeonnement cellulaire à leur périphérie.

Afin de déterminer la nature des cellules bourgeonnantes, nous avons cultivé pendant six jours des fibres isolées de souris Myf5-nLacZ. Ces souris ont la particularité d'exprimer la β -galactosidase (β -gal) nucléaire des cellules myogéniques qui expriment Myf5 et permet donc de distinguer les CPM des autres cellules non-myogéniques (TAJBAKHSI et al. 1996). Comme l'indique la **figure 3.3.1B**, un nombre important de CPM (bleues) a été observé sur les fibres réduites après six jours en culture par rapport aux fibres non réduites, suggérant une grande prolifération des CPM. La nature myogénique de ces cellules a été confirmée par un immunomarquage contre Pax7 (**Fig. 3.3.1C**). Nos résultats montrent que la réduction des fibres entraîne l'activation et la prolifération d'un grand nombre de CPM (cellules Pax7⁺) à leur surface par rapport aux fibres intactes.

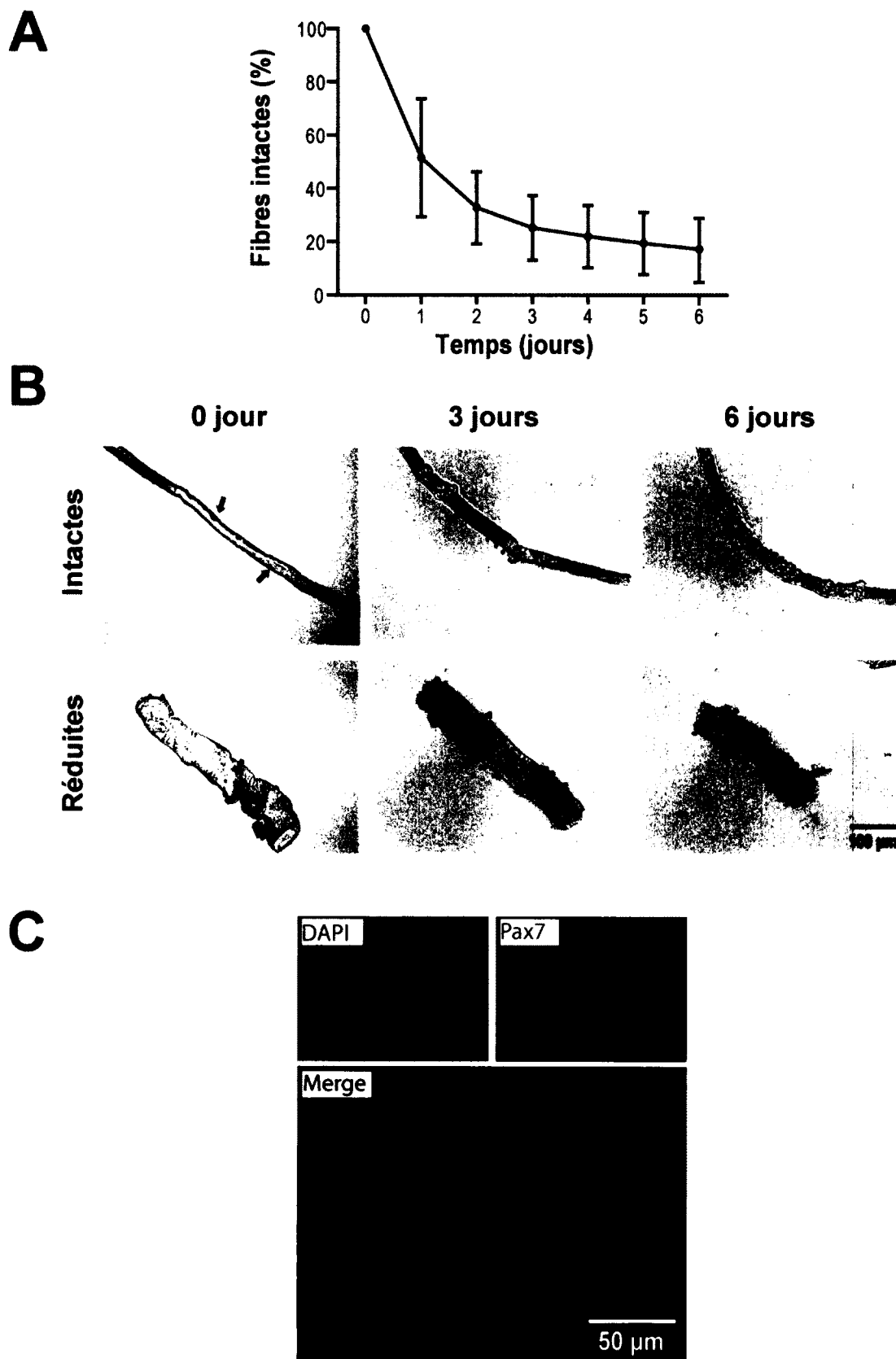


Figure 3.3.1

Figure 3.3.1 La perte de tension interne des fibres individuelles en culture induit la prolifération des CPM.

(A) Pourcentage de fibres restées intactes en culture en fonction du temps (n=5 ; 100 fibres/préparation) **(B)** Marquage au X-gal sur des fibres intactes et réduites isolées de muscles EDL de souris Myf5-nLacZ, après 1, 3 ou six jours de culture. Les flèches indiquent des cellules Myf5⁺. **(C)** Immunofluorescence représentative d'une fibre réduite après six jours de culture, marquée à l'aide d'anticorps dirigés contre Pax7 (vert). Les noyaux ont été marqués par le DAPI (bleu).

3.3.2 La réduction des fibres constitue un environnement favorable à la prolifération des CPM

Afin de quantifier la prolifération des CPM sur les fibres réduites par rapport aux fibres intactes, un décompte du nombre de CPM a été effectué après six jours de culture par le biais d'un immunomarquage à l'aide d'anticorps dirigés contre Pax7. Les résultats montrent que le nombre de CPM (cellules Pax7⁺) est significativement augmenté (3,5 fois) sur les fibres réduites par rapport aux fibres intactes (**Fig. 3.3.2A**). De plus, nous avons constaté une grande variabilité dans le nombre de CPM sur les fibres réduites d'un même individu allant de zéro à plus de 500 cellules myogéniques par fibre après six jours. En effet, 26,5 % des fibres réduites avaient plus de 100 cellules Pax7⁺ après six jours de culture alors qu'aucune fibre intacte avec plus de 100 CPM n'a été observée (**Fig. 3.3.2B**). Ainsi, il semble que la réduction des fibres constitue un microenvironnement favorable à la prolifération des CPM,

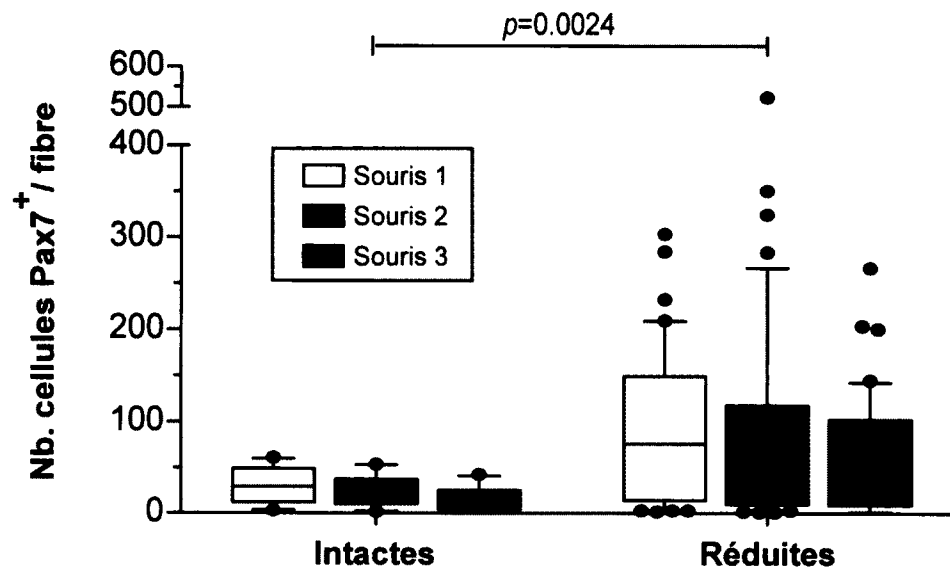
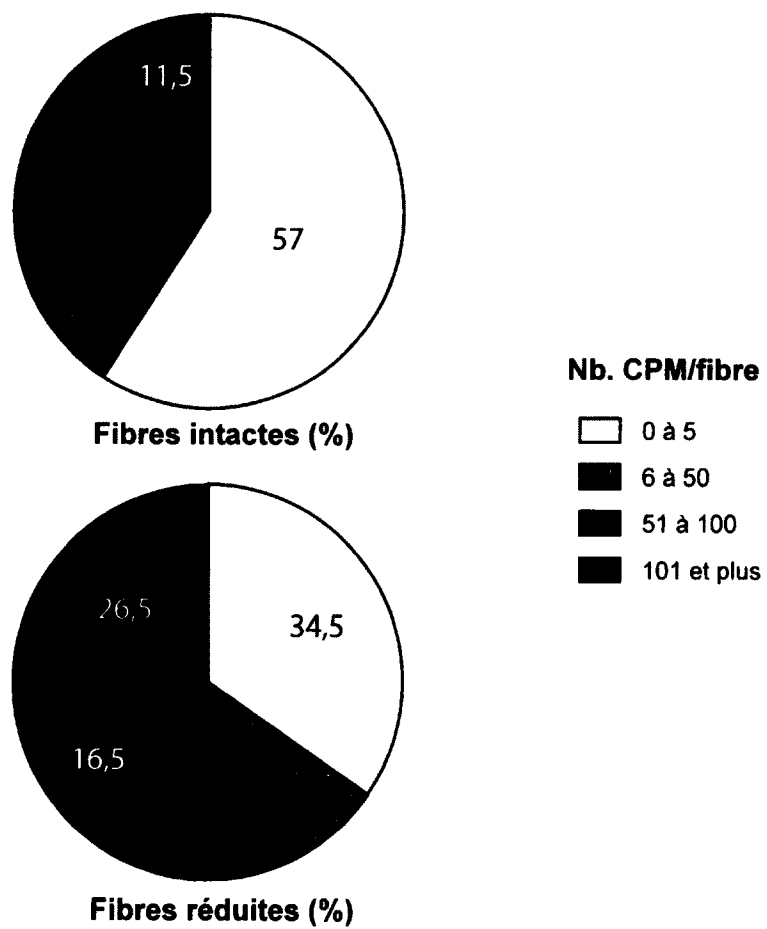
A**B****Figure 3.3.2**

Figure 3.3.2 La réduction des fibres constitue un environnement favorable à la prolifération des CPM.

(A) Graphique en boîte à moustache (90^{ième} percentile) présentant le nombre de cellules Pax7⁺ après six jours de culture. Les fibres (entre 10 et 43 fibres) provenant de l'EDL de trois souris ont été immunomarquées à l'aide d'un anticorps dirigé contre Pax7. Les noyaux ont été colorés par le DAPI (bleu). (B) Distribution du nombre de cellules Pax7⁺ par fibres réduites et intactes après six jours de culture. Les résultats sont présentés comme la moyenne \pm l'erreur-type. La signification statistique a été déterminée par un test t non apparié.

3.3.3 La réduction des fibres est induite par la perte de leur viabilité

Pour expliquer la réduction des fibres, nous avons posé l'hypothèse qu'une perte de viabilité de la fibre pourrait l'empêcher de maintenir sa structure et conduire à sa réduction. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons exposé les fibres au bleu Evans, un colorant qui reste exclu des cellules viables (incolores), mais pénètre la membrane de cellules non viables (bleues). Alors que les fibres intactes sont incolores même après six jours de culture, les fibres réduites sont quant à elles colorées en bleue dès leur réduction (**Fig. 3.3.3A**).

Afin de montrer le lien entre la viabilité et la perte de tension interne, nous avons effectué un marquage à la phalloïdine (vert), une toxine extraite de l'amanite phalloïde qui se lie de manière spécifique aux filaments d'actine (actine F) permettant d'apprécier la structure striée caractéristique des fibres musculaires (BARDEN et al. 1987; COOPER 1987). Les fibres ont également été immunomarquées à l'aide d'anticorps dirigés contre Pax7 (rouge) ainsi qu'un marquage des noyaux au DAPI (bleu). Les résultats montrent que les fibres intactes ont une structure striée typique d'une organisation des filaments d'actine, et ce même après six jours de culture, indiquant le maintien de leur structure interne (**Fig. 3.3.3A**). Par contre, les filaments d'actine des fibres réduites sont complètement désorganisés. L'immunofluorescence à l'aide d'anticorps dirigés contre Pax7 a permis de mettre en évidence une forte dégradation des noyaux internes de la fibre musculaire (flèches) contrairement aux noyaux des CPM Pax7⁺ (pointes de flèches) qui ont maintenu une taille et une apparence normale (**Fig. 3.3.3B**). Cette observation appuie la notion de dégénérescence des fibres réduites, qui perdent leur viabilité, leur tension interne et l'organisation de leur cytosquelette.

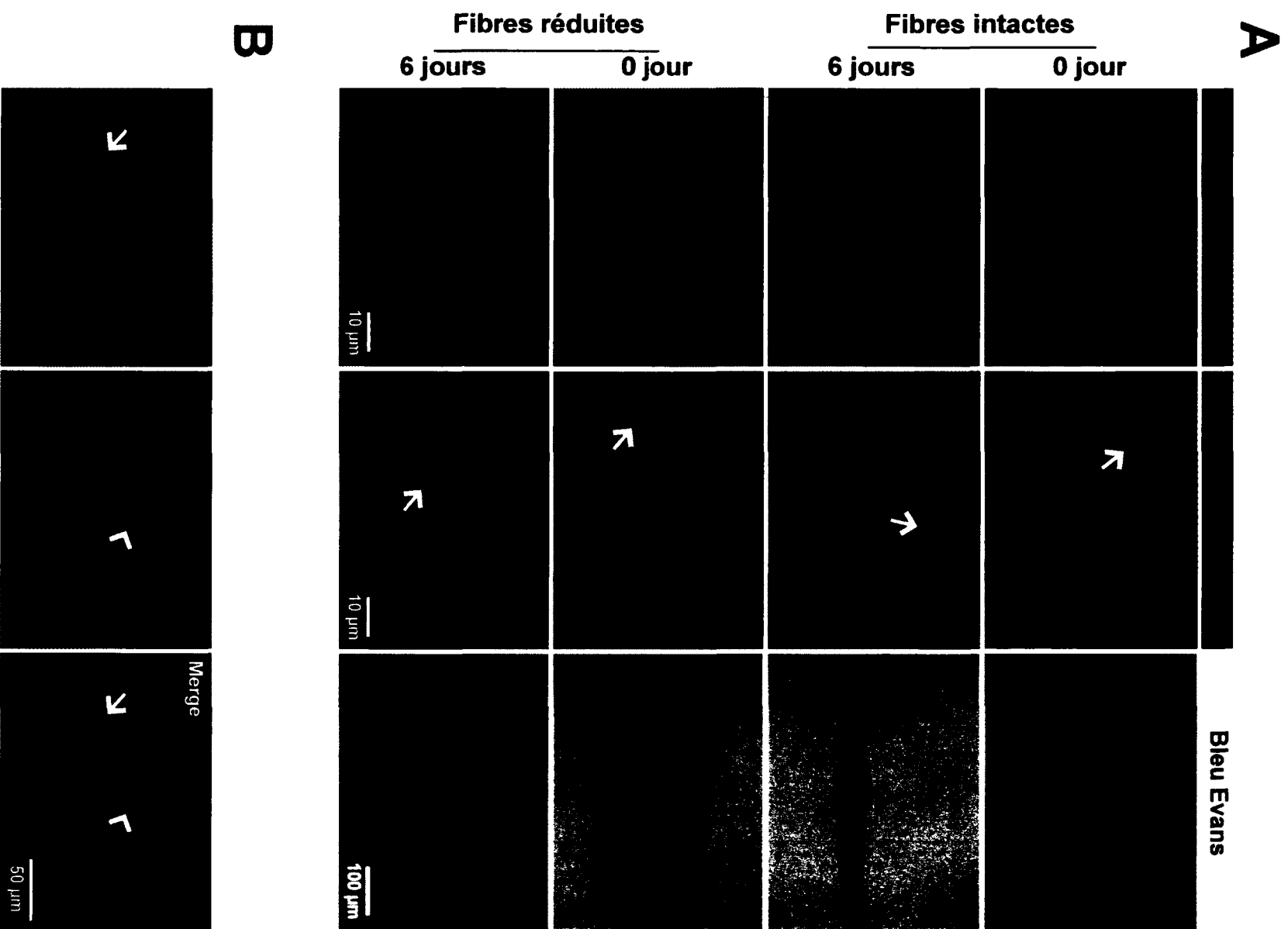


Figure 3.3.3

Figure 3.3.3 La perte de viabilité cause la réduction de la fibre et une désorganisation de son cytosquelette.

(A) Microphotographies en microscopie à fluorescence représentatives de fibres intactes et réduites mises en culture pendant 0 et 6 jours à l'aide d'anticorps dirigés contre Pax7 (rouge) ainsi qu'un marquage à la phalloïdine (vert) et au DAPI (bleu). Les flèches indiquent la localisation de CPM. À droite, images représentatives de fibres musculaires intactes et réduites mises en culture pendant 0 ou 6 jours et colorées au bleu d'Evans. **(B)** Immunofluorescence représentative d'une fibre musculaire réduite mise en culture pendant quatre jours à l'aide d'anticorps dirigés contre Pax7 (vert). Les noyaux ont été marqués par le DAPI (bleu). La flèche indique la localisation d'un noyau de la fibre et la tête de flèche une CPM sur cette même fibre.

3.3.4 La perte de tension des fibres musculaires induit une augmentation de la rigidité de l'environnement des CPM

Des travaux récents ont montré l'importance du microenvironnement mécanique sur le comportement des cellules souches (ENGLER et al. 2006; LUTOLF et BLAU 2009; LEE et al. 2011; LI et al. 2011) incluant les cellules satellites (BOONEN et al. 2009; GILBERT et al. 2010). Comme la réduction de la fibre cause une rétraction de la lame basale et possiblement sa compression, nous avons vérifié si l'environnement mécanique des CPM associées à celle-ci était modifié. La rigidité de fibres intactes et réduites a été mesurée par microscopie à force atomique (AFM) (**Fig. 3.3.4A**). Les résultats montrent une augmentation significative (4 fois) de la rigidité des fibres réduites après 0 et six jours de culture, par rapport à des fibres intactes fraîchement isolées, passant de 0,5 à 2 kPa. Nous avons également mesuré la rigidité de cellules C2C12 différenciées en myotubes (**Fig. 3.3.4A**). Aucune différence significative n'a été observée entre les fibres intactes et les cellules C2C12 différenciées.

La **Fig. 3.3.4B** permet d'observer le levier de l'AFM qui a permis de quantifier la rigidité sur les différentes préparations à l'étude: les fibres adultes intactes et réduites et les C2C12 différenciées (myotubes).

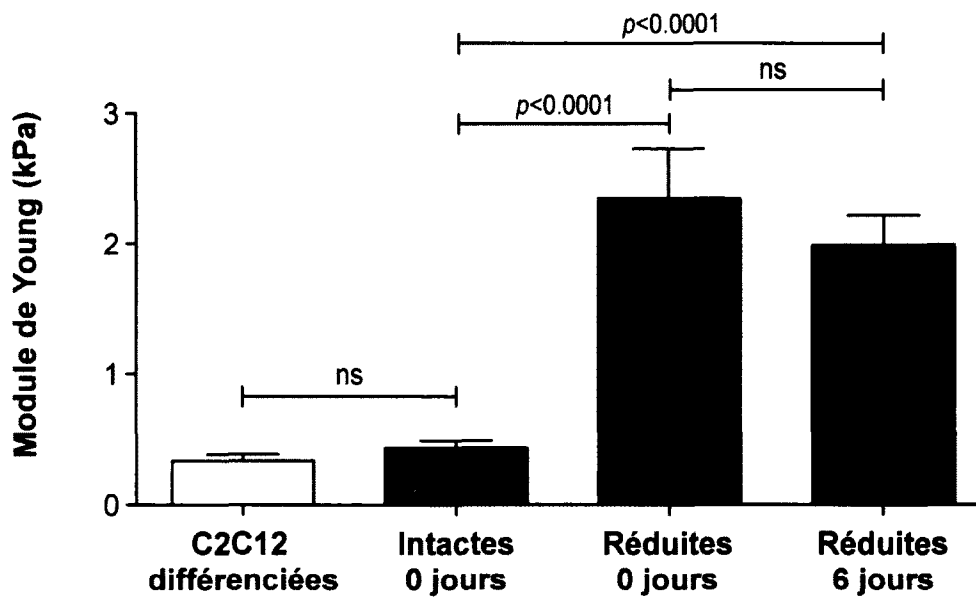
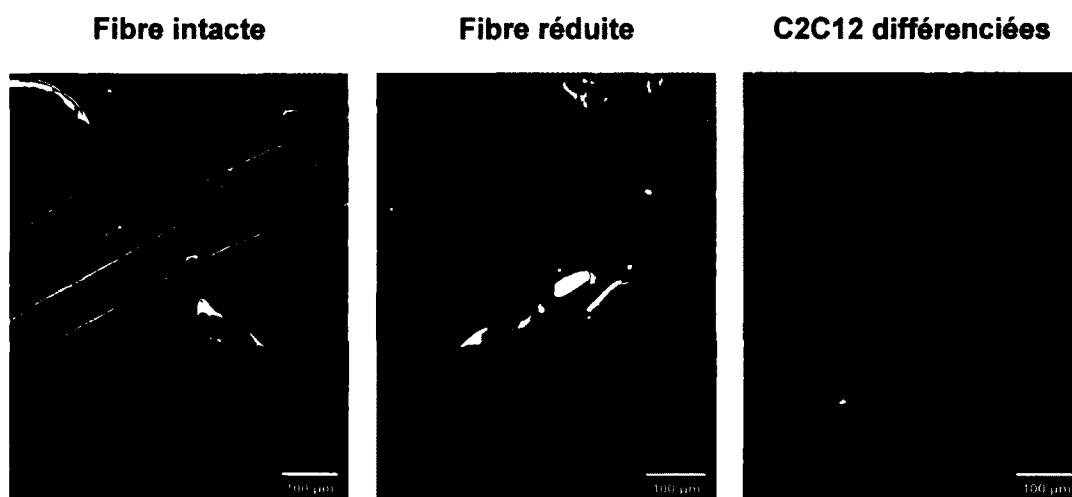
A**B****Figure 3.3.4**

Figure 3.3.4 La perte de tension des fibres musculaires induit une augmentation de la rigidité de l'environnement des CPM.

(A) Rigidité en kPa mesurée à l'aide d'un microscope à force atomique (AFM) de différentes préparations: cellules C2C12 différenciées pendant 8 jours dans un milieu de différenciation (20 myotubes), fibres intactes adultes fraîchement isolées (27 fibres), fibres réduites après 0 jours de culture (26 fibres) et de fibres réduites après six jours de culture (22 fibres). Les expériences ont été effectuées sur 3 préparations cellulaires indépendantes. **(B)** Images en contraste de phase représentatives d'une fibre intacte fraîchement isolée, d'une fibre réduite après six jours de culture, et de cellules C2C12 différenciées lors de la quantification de leur rigidité par le levier de l'AFM (triangle). Les résultats sont présentés comme la moyenne \pm l'erreur-type. La signification statistique a été déterminée par un ANOVA suivi d'un test de Tukey.

3.3.5 L'augmentation de la rigidité du microenvironnement des CPM favorise leur prolifération

Afin de confirmer la différence de prolifération des CPM observée entre les fibres intactes et réduites, nous avons cultivé des CPM isolées d'EDL de souris sauvages adultes par la méthode de fibre (cf. **section 3.4**) sur des substrats de polyacrylamide de 0,5 et 2 kPa, correspondant aux rigidités mesurées par AFM de fibres intactes et réduites, respectivement. Ces substrats enduits de collagène ont été fabriqués selon un protocole décrit à la **section 2.16**.

Nos résultats montrent que les CPM cultivées sur un substrat d'une rigidité de 2 kPa ont une prolifération significativement supérieure (1,5 fois) à celle des CPM cultivées à 0,5 kPa (**Fig. 3.3.5A**). Afin de s'assurer que les différences obtenues n'étaient pas dues à un problème d'adhérence lors de la mise en culture, des CPM ont préalablement été traitées à la mitomycine, qui empêche la prolifération cellulaire, puis ensemencées sur des substrats de 0,5 et 2 kPa (**Fig. 3.3.5B**). Après deux jours de culture, le décompte du nombre de CPM n'a révélé aucune différence significative, indiquant que l'augmentation de la prolifération sur un substrat d'une rigidité de 2 kPa n'est pas due à un attachement ou à un décollement plus important des cellules.

Dans le but de confirmer l'augmentation de prolifération, des CPM cultivées sur des substrats (0,5 et 2 kPa) puis immunomarquées en fluorescence à l'aide d'anticorps dirigés contre le Ki67, marqueur nucléaire de prolifération (SCHOLZEN et GERDES 2000) et contre la myogénine (Myog), un marqueur de différenciation des CPM, ainsi qu'un marquage au DAPI. Nous avons constaté une augmentation significative (2,4 fois) du nombre de cellules prolifératives (cellules Ki67⁺) sur le nombre de noyaux totaux sur des substrats de 2 kPa par rapport à des substrats de 0,5 kPa (**Fig. 3.3.5C**). Le décompte des cellules en différenciation (cellules Myog⁺) a quant à lui révélé une diminution de près de deux fois du nombre de CPM en différenciation sur des substrats de 2 kPa (**Fig. 3.3.5D**).

Ensemble, ces résultats indiquent qu'une rigidité correspondant à la rigidité des fibres réduites (2 kPa) est favorable à la prolifération des CPM et à leur maintien dans un état prolifératif, par rapport à un environnement correspondant à la rigidité de fibres intactes (0,5 kPa).

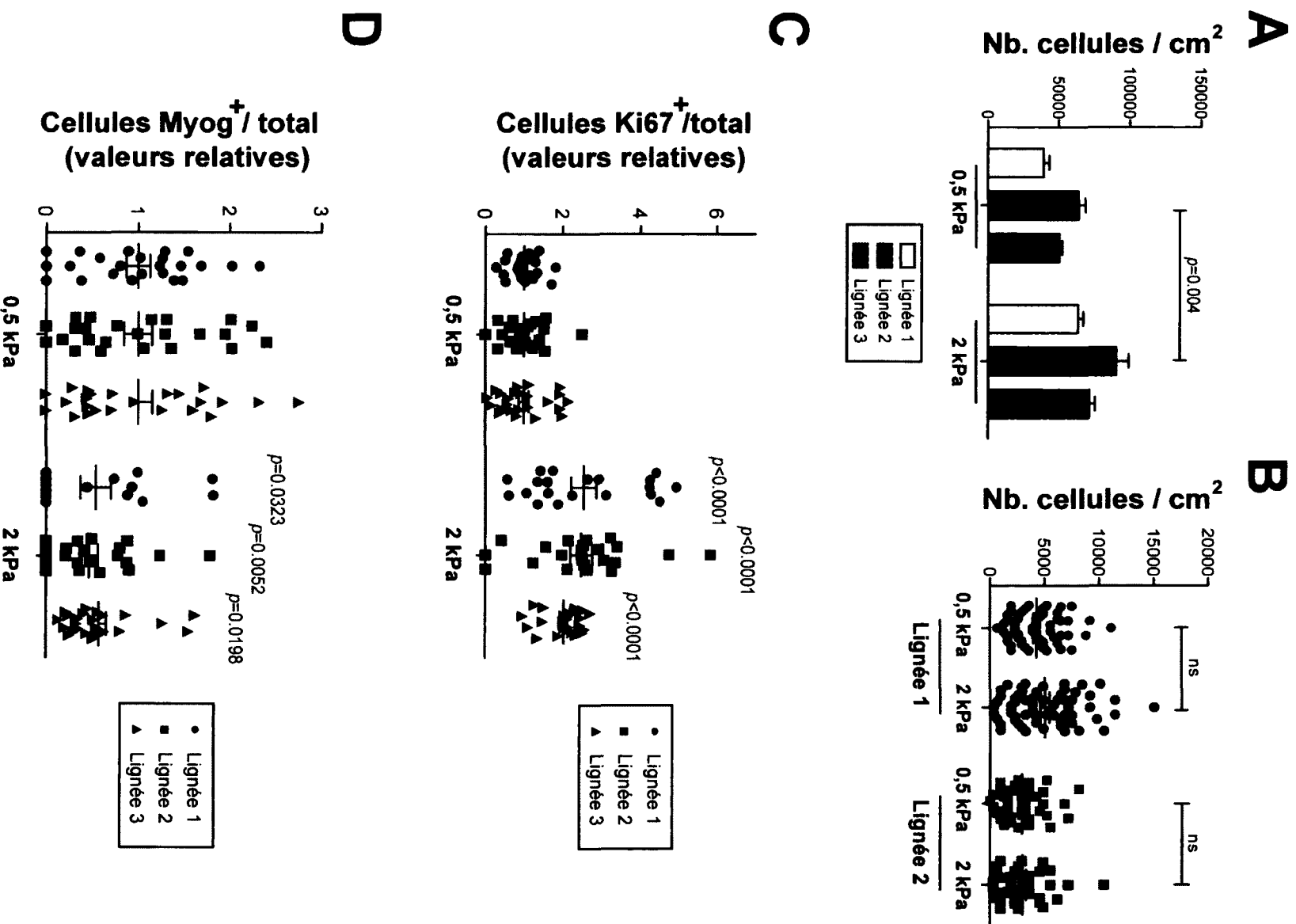


Figure 3.3.5

Figure 3.3.5 L'augmentation de la rigidité de l'environnement maintient les CPM dans un état prolifératif.

(A) Nombre de CPM/cm², après trois jours de culture dans un milieu prolifératif, sur des substrats de rigidité de 0,5, et 2 kPa. **(B)** Variation relative de CPM/cm² après trois jours de culture sur des substrats de rigidité de 0,5, et 2 kPa, préalablement traités à la mitomycine. **(C)** Nombre de CPM positives pour le marqueur de prolifération Ki67 (Ki67⁺) sur le nombre de noyaux totaux, après trois jours de culture dans un milieu prolifératif, sur des substrats de rigidité de 0,5, et 2 kPa. **(D)** Nombre de CPM positives pour le marqueur d'entrée en différenciation Myogénine (Myog⁺) sur le nombre de noyaux totaux, après trois jours de culture dans un milieu prolifératif, sur des substrats de rigidité de 0,5, et 2 kPa. Les valeurs en **(C)** et **(D)** sont représentées en valeurs relatives par rapport à une rigidité de 0,5 kPa. Les résultats ont été obtenus par décompte de huit champs (10x, 600 μm²)/puit, sur trois puits par préparation pour chacune des trois lignées (n=3). Les lignées de CPM primaires provenaient de 3 souris. Les résultats sont présentés comme la moyenne ± l'erreur-type. La signification statistique a été déterminée par un test t non apparié.

3.3.6 La perte de tension du muscle induit la prolifération des CPM *in vivo*

Nous avons souhaité déterminer si la perte de tension des fibres musculaires pouvait induire la prolifération des CPM *in vivo*. Pour cela, nous avons procédé à des ténotomies du tendon distal du TA de souris Myf5-nLacZ. Les TA controlatéraux respectifs ont été utilisés comme contrôle. Après 10 jours, les TA ténotomisés et controlatéraux ont été isolés puis colorés au X-gal (**Fig. S3**). Un décompte du nombre de CPM par champ (0,95 mm²), a été effectué sur la même zone du muscle, sur trois coupes par muscle et pour chacune des souris (**Fig. 3.3.6A**). Nous avons constaté une augmentation significative (3 à 20 fois) du nombre de CPM quiescentes et prolifératives suite à une ténotomie par rapport aux muscles controlatéraux (**Fig. 3.3.6B**). Ces résultats indiquent que la perte de tension des fibres musculaires *in vivo* induit la prolifération des CPM.

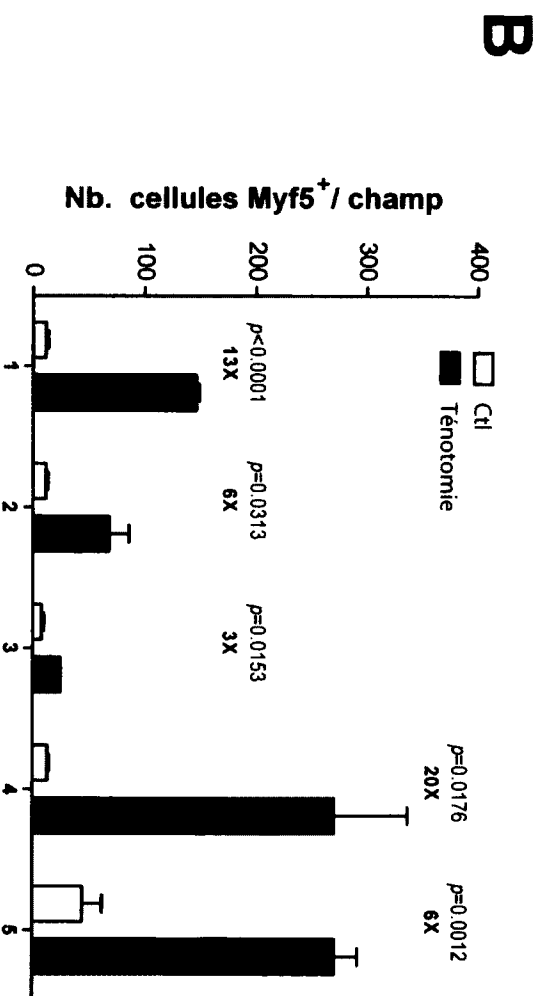
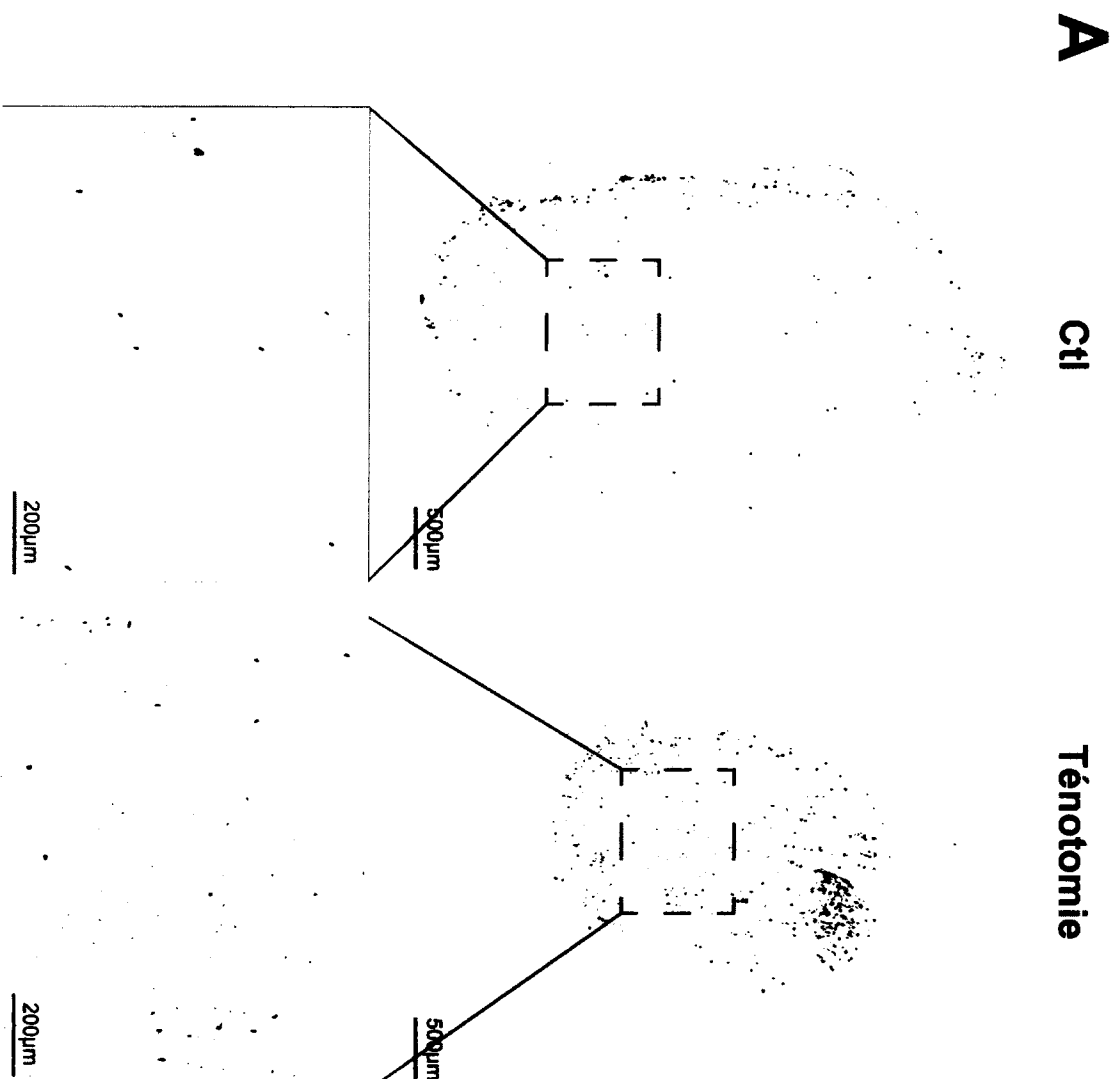


Figure 3.3.6

Figure 3.3.6 La perte de tension des fibres *in vivo* induit la prolifération des CPM.

(A) Images représentatives de coupes longitudinales de TA de souris Myf5-nLacZ ayant subi ou non une ténotomie 10 jours auparavant. Les CPM apparaissent en bleue suite à une coloration X-gal. Les champs ayant été utilisés pour le décompte du nombre de CPM/champs ($0,95 \text{ mm}^2$) sont représentés. **(B)** Graphique en colonnes présentant le nombre de CPM (cellules Myf5⁺)/champ. Ces résultats ont été obtenus par décompte du nombre de cellules Myf5⁺ sur un champ pris dans la même région du muscle, trois lames par muscle (n=5). Les résultats sont présentés comme la moyenne \pm l'erreur-type. La signification statistique a été déterminée par un test t apparié.

En résumé, nous avons montré que la formation de fibres réduites en culture était due à leur perte de tension interne induite par la perte de leur viabilité. Cette perte de tension cause une augmentation de la rigidité de l'environnement des CPM qui favorise leur maintien dans un état prolifératif. Finalement, nous avons montré que la perte de tension des fibres *in vivo* entraînait également la prolifération des CPM.

3.4 Technique originale d'isolement des CPM à partir des fibres réduites

3.4.1 L'isolement de CPM par culture de fibres permet d'éliminer les cellules contaminantes

Puisque la réduction des fibres musculaires favorise l'obtention d'un grand nombre de CPM après quelques jours de culture (**cf. Fig. 3.3.2**), nous avons mis à profit cette observation pour mettre au point une nouvelle méthode d'isolement des CPM.

Des fibres musculaires d'EDL de souris sauvages ont été mises en culture pendant six jours afin de permettre aux CPM de proliférer en périphérie des fibres (**Fig. 3.4.1A**). Il est intéressant d'observer que les fibres mises en culture n'adhèrent pas au fond du Pétri contrairement aux cellules contaminantes. Bien qu'un certain nombre de CPM se sont détachées de la fibre et ont adhéré au Pétri, le nombre de cellules contaminantes (e.g. fibroblastes, mrSC) ayant adhéré au Pétri en plastique est supérieur à 80 % (**Fig. 3.4.1B**). Le dénombrement des CPM (flèches) et des cellules contaminantes (tête de flèches) a été effectué d'après leurs différences morphologiques au microscope à contraste de phase. En effet, par rapport aux autres cellules présentes dans le muscle, les CPM ont une apparence sphérique caractéristique et poussent en colonie.

Une simple trituration mécanique a permis de séparer la quasi-totalité des CPM de leur fibre qui ont pu ainsi adhérer à un Pétri recouvert de collagène (**Fig. 3.4.1C**). Cette méthode a permis d'obtenir un Pétri dont la pureté de CPM avoisinait les 95 % après seulement 6 jours de culture (**Fig. 3.4.1D**).

Afin de définir si la réduction des fibres constitue un microenvironnement permettant de maintenir les CPM dans un état moins différencié, des CPM obtenues par isolement de fibres et par méthode classique (ou adhérence préférentielle) ont été mises en culture (aucun passage; P0), puis immunomarquées à l'aide d'anticorps dirigés contre le Ki67 et la myogénine (Myog). Après six jours, les CPM cultivées sur fibres réduites présentent un pourcentage de cellules prolifératives (cellules Ki67⁺) significativement supérieur (près de 30 %) aux CPM cultivées dans des Pétris enduits de collagène (**Fig.**

3.4.1E). Fait intéressant, la proportion de CPM ayant entamé le processus de différenciation (Myog⁺) est nettement réduite (61,6 %) lorsque cultivées sur fibres par rapport à la méthode classique (**Fig. 3.4.1E**).

Parce que les CPM prolifèrent sur leurs fibres et que leur séparation est aisée, la culture de fibres réduites permet d'obtenir rapidement et facilement des CPM avec un haut niveau de pureté. De plus, la fibre constitue un environnement favorable au maintien des CPM dans un état prolifératif en prévenant leur différenciation.

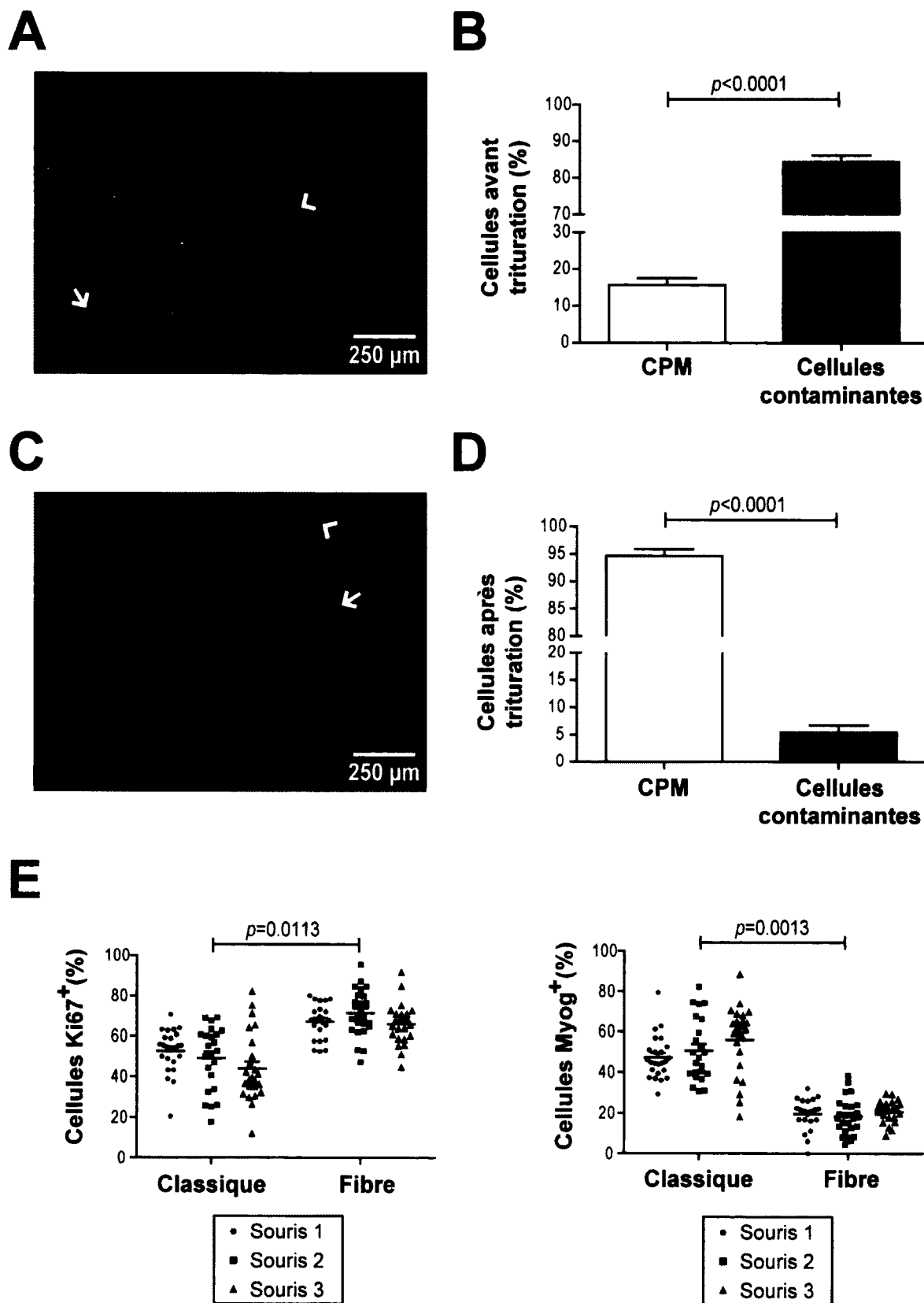


Figure 3.4.1

Figure 3.4.1 L'isolement de CPM par culture de fibres permet d'éliminer les cellules contaminantes et de prévenir leur différenciation.

(A) Image en contraste de phase représentative d'une fibre réduite isolée d'un muscle EDL de souris adulte sauvage et cultivées pendant six jours. La flèche indique une CPM adhérente au Pétri, la pointe de flèche indique une cellule contaminante adhérente au Pétri. **(B)** Pourcentage de CPM et de cellules contaminantes adhérentes au Pétri en plastique après six jours de culture dans un milieu prolifératif (n=6). **(C)** Image en contraste de phase représentative d'une fibre réduite cultivée pendant six jours, triturée afin de libérer les CPM. La flèche indique une CPM, la pointe de flèche indique une cellule contaminante 24 h post-trituration. Les cellules myogéniques et non myogéniques ont des particularités morphologiques permettant de les distinguer au microscope en contraste de phase. **(D)** Pourcentage de CPM et de cellules contaminantes après six jours de culture dans un Pétri en plastique et 24h dans un Pétri recouvert de collagène suite à l'étape de trituration (n=7). **(E)** Pourcentages de cellules Ki67⁺ ou Myogénine⁺ sur le nombre de cellules totales, après six jours de culture de CPM par la méthode classique d'adhérence préférentielle ou par isolement de fibres. Les noyaux ont été marqués au DAPI. Le pourcentage de cellules Ki67⁺ et Myog⁺ a été quantifié sur des lignées primaires issues de 3 souris. Les résultats sont présentés comme la moyenne \pm l'erreur-type. La signification statistique a été déterminée par un test t non apparié.

3.4.2 Les fibres réduites permettent l'enrichissement des CPM indépendamment de la qualité du sérum utilisé

Dans le but de montrer que la qualité du sérum dans le milieu de culture a des conséquences sur les capacités prolifératives des CPM *in vitro*, un essai de prolifération a été effectué sur des CPM primaires isolées de trois souris adultes sauvages. Les CPM ont été cultivées dans un milieu prolifératif contenant soit 20 % d'un lot de sérum provenant de la compagnie Wisent™, soit 20 % d'un lot de sérum provenant de la compagnie Hyclone™. Le décompte des cellules a montré que la prolifération des CPM était significativement augmentée (1,5 fois) lorsque cultivées avec du FBS Hyclone™ par rapport à du FBS Wisent™ (**Fig. 3.4.2A**). Cela indique que la qualité du sérum module les capacités prolifératives des CPM cultivées sur plastique. Pour la suite des expériences, les sérums provenant des compagnies Hyclone™ et Wisent™ ont donc été considéré comme riche et pauvre

respectivement, d'après leur capacité à favoriser la prolifération des CPM. Afin de vérifier si des CPM sur les fibres se comporteraient comme celles sur plastique, des fibres ont été mises en culture pendant six jours dans les mêmes milieux. Le décompte des cellules Pax7⁺ par fibre n'a révélé aucune différence significative de prolifération entre les deux types de sérum (**Fig. 3.4.2B**). Ces résultats indiquent que la fibre constitue un microenvironnement qui supporte la prolifération des CPM indépendamment de la qualité du sérum.

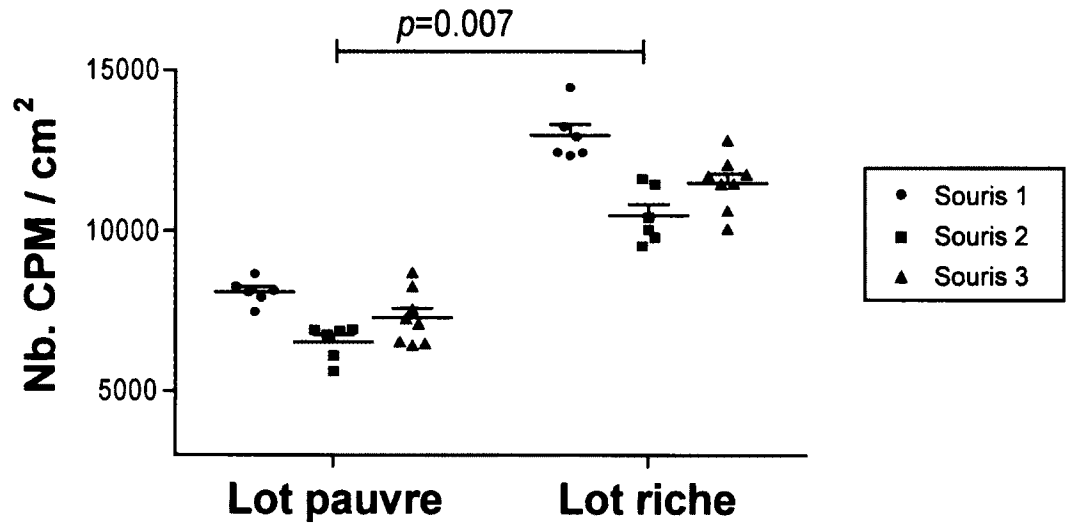
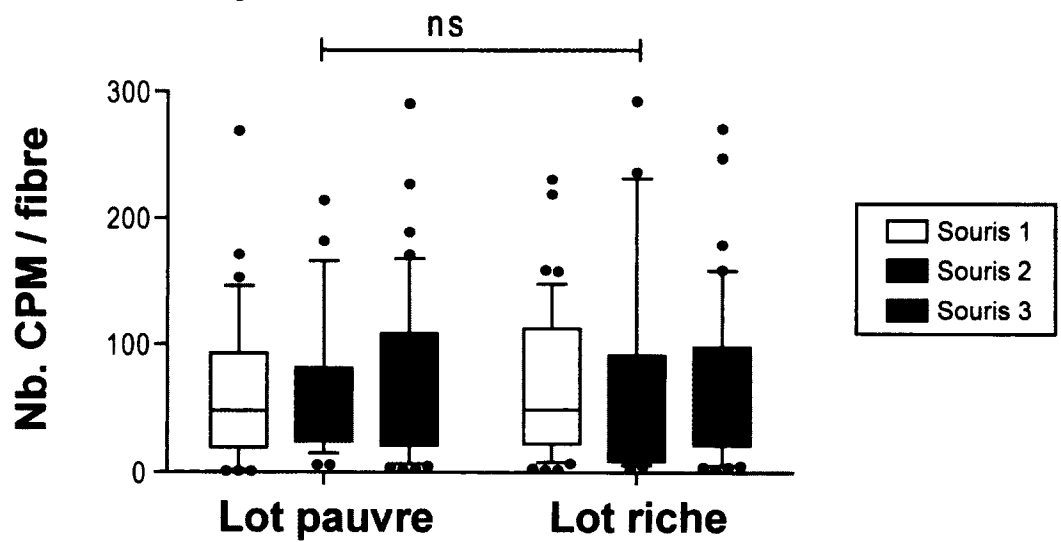
A**B****Figure 3.4.2**

Figure 3.4.2 Les fibres réduites constituent un environnement permettant l'enrichissement des CPM indépendamment de la qualité du sérum utilisé.

(A) Graphique en nuage de points présentant le nombre de CPM par cm^2 provenant de trois souris adultes sauvages, ensemencées à 1500 cellules par cm^2 et mises en culture pendant quatre jours dans un Pétri recouvert de collagène avec un milieu prolifératif (Ham's F10, 1 % d'antibiotiques, 2,5 ng/ml de bFGF) contenant soit 20 % de sérum pauvre « Wisent™ », soit 20 % de sérum riche « Hyclone™ » (n=3). **(B)** Graphique en boîte à moustache présentant le nombre de cellules Pax7⁺ par fibre provenant de trois souris adultes sauvages et mises en culture pendant six jours dans les milieux contenant du sérum « pauvre » et « riche » (n=3). Les résultats sont présentés comme la moyenne \pm l'erreur-type. La signification statistique a été déterminée par un test t non apparié.

3.4.3 La qualité du sérum influence la vitesse d'enrichissement des CPM isolées par la méthode classique contrairement aux fibres réduites

Nous avons comparé l'enrichissement des CPM isolées par la culture de fibres avec la méthode classique (adhérence préférentielle). Les CPM isolées par les deux méthodes ont été enrichies dans un milieu prolifératif contenant 20 % de sérum « riche » (Hyclone™). Les résultats montrent que sept jours après isolement, les CPM issues des fibres avaient un niveau d'enrichissement supérieur à celles isolées par la méthode classique (**Fig. 3.4.3A**). De plus, le temps nécessaire à l'obtention d'une pureté de près de 100 % avec l'isolement de fibres a été réduit de plus d'une semaine.

Afin de vérifier si la qualité du sérum dans le milieu de culture pouvait affecter l'enrichissement des CPM, nous avons procédé à la même expérience, mais en les cultivant en présence d'un sérum pauvre (Wisent™). Nous avons constaté qu'un sérum pauvre n'affecte pas l'enrichissement des CPM isolées à partir de fibres réduites (**Fig. 3.4.3B**). En effet, après sept jours, le niveau d'enrichissement des CPM isolées par culture de fibres qui était de 94,9 % pour un sérum « riche », est de 92,5 % avec un sérum « pauvre ».

La qualité du sérum pour la culture ne semble donc pas influencer l'isolement des CPM obtenues par culture de fibres. Par contre, il est intéressant de constater que la méthode classique est quant à elle fortement affectée par la

richesse du sérum utilisé. En effet, sept jours après isolement, les CPM isolées par la méthode classique avaient un niveau d'enrichissement de 53,5 %, ce qui fait une diminution de 34 %. De plus, le pourcentage de cellules myogéniques a chuté au douzième jour indiquant que la population de CPM prolifère moins rapidement que les cellules contaminantes, ces dernières ayant mieux toléré une diminution de la richesse du sérum du milieu de culture. Finalement, le temps nécessaire à l'obtention de CPM ayant un enrichissement de 100 % avec un sérum pauvre est allongé de 12 jours par rapport aux cellules issues de fibres dans les mêmes conditions de culture et de cinq jours par rapport aux cellules isolées par adhérence préférentielle, mais cultivées dans un sérum « riche ».

Ensemble, ces résultats indiquent que la qualité du sérum n'influence pas l'enrichissement des CPM par la méthode de fibres réduites, contrairement à la méthode classique d'adhérence préférentielle.

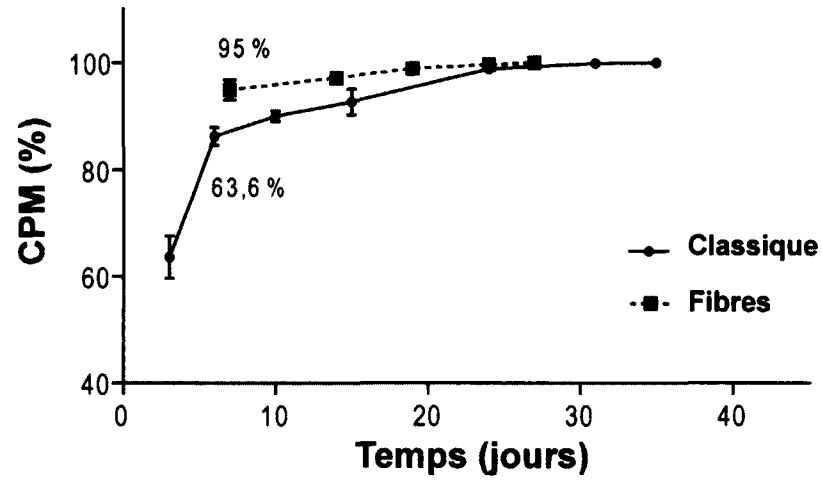
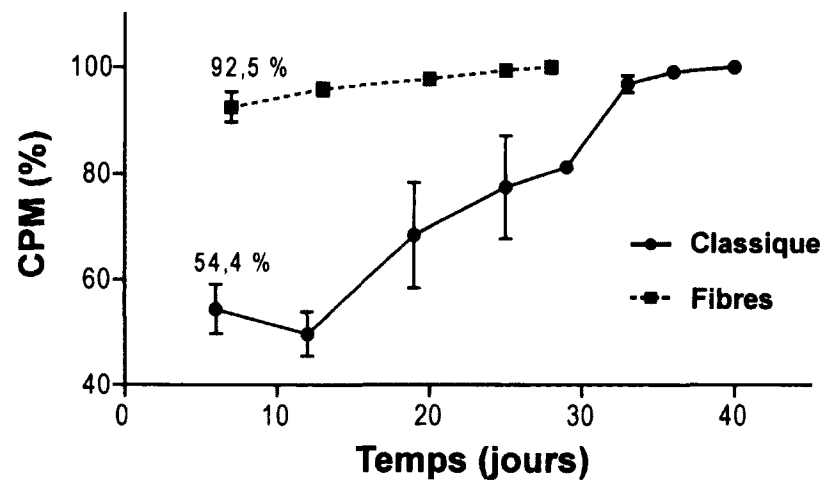
A**Sérum Riche****B****Sérum Pauvre****Figure 3.4.3**

Figure 3.4.3 L'enrichissement des CPM à partir des fibres n'est pas influencé par la qualité du sérum.

(A) Histogramme présentant le pourcentage de CPM issues de l'isolement de fibres ou de l'isolement par la méthode classique (adhérence préférentielle) en fonction du temps. (B) Histogramme présentant le pourcentage de CPM issues de l'isolement de fibres ou de l'isolement par la méthode classique en fonction du temps. Les cellules issues de fibres ont été isolées à partir d'EDL de quatre souris adultes sauvages et les cellules isolées par la méthode classique ont été obtenues à partir des TA, Gas et quadriceps des quatre mêmes souris par digestion enzymatique. Les CPM ont été cultivées dans un milieu prolifératif contenant 20% de sérum « riche » (A) ou « pauvre » (B).

3.4.4 L'isolement de CPM par culture de fibres réduites nécessite peu de tissu et ne diminue pas leur potentiel prolifératif et de différenciation

La quantité de tissu nécessaire à l'isolement de fibres étant nettement inférieure à celle nécessaire pour les isoler avec la méthode classique nous avons souhaité quantifier le rapport entre la quantité de tissu utilisé et le nombre de CPM obtenues. Pour cela, 100 fibres musculaires ont été isolées à partir des EDL de cinq souris adultes et mises en culture dans un milieu prolifératif pendant six jours. Les CPM ont alors été séparées des fibres etensemencées dans un Pétri recouvert de collagène. Parallèlement, des CPM ont été isolées par la méthode classique à partir des TA, Gas et Quad de ces mêmes souris (environ 1g de tissu/souris). Après sept jours, un décompte du nombre de CPM a été effectué. Les décomptes ont ensuite été rapportés à la masse de tissu utilisé. Pour obtenir le même nombre de CPM, la méthode d'isolement par fibres nécessite 37 fois moins de tissu que l'isolement par la méthode classique lorsque l'on considère le poids d'une fibre, estimé dans la littérature à 8 μg (ROSENBLATT et al. 1995) (**Fig. 3.4.4A**).

Les potentiels de prolifération et de fusion des CPM peuvent être observés et quantifiés en culture, donnant des indices sur la qualité des cellules isolées. Nous avons donc souhaité vérifier si les propriétés prolifératives des CPM issues de culture de fibres sont comparables à celles isolées par la méthode classique. Pour cela, des CPM isolées par les deux méthodes ont étéensemencées au

même passage et à la même confluence, et cultivées pendant quatre jours suivis d'un décompte. Il en résulte que les cellules issues des deux méthodes d'isolation ont un potentiel prolifératif comparable et n'ont donc pas de différences significatives (**Fig. 3.4.4B**).

Lorsque les CPM sont exposées à un milieu de différenciation, celles-ci sont capables de fusionner entre elles pour former des myotubes s'apparentant à des fibres musculaires. Le dénombrement des cellules ayant fusionné avec au moins une autre cellule permet d'estimer la compétence des cellules à fusionner. Ainsi, des CPM provenant des deux méthodes d'isolement ont été mises en présence d'un milieu de différenciation pendant trois jours. Les cellules ont ensuite été fixées puis immunomarquées pour la chaîne lourde de la myosine (MHC) ainsi qu'un marquage des noyaux au DAPI. Le dénombrement des cellules ayant fusionné avec au moins une autre cellule a permis de calculer un index de fusion. Les résultats montrent que les CPM ont une capacité à fusionner similaire, peu importe la méthode d'isolement choisie (**Fig. 3.4.4C**).

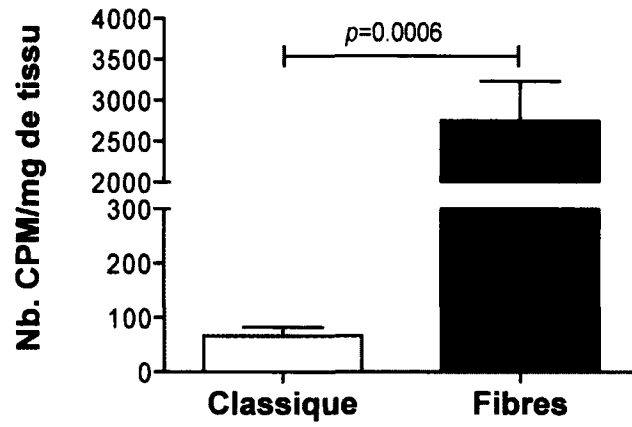
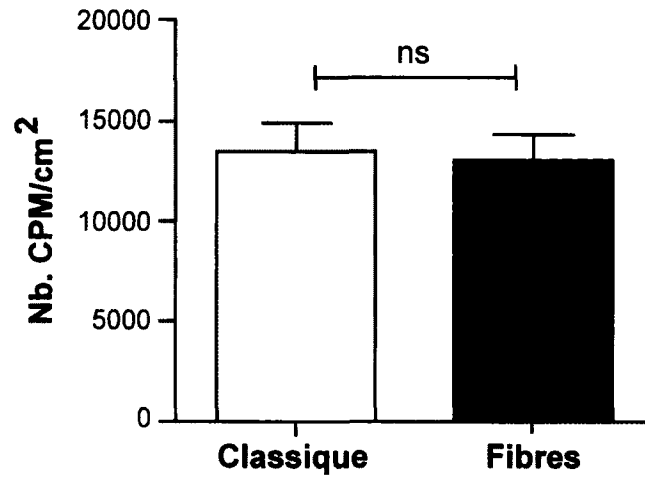
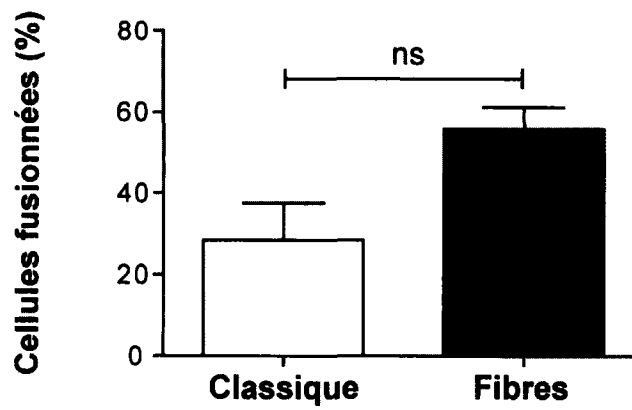
A**B****C****Figure 3.4.4**

Figure 3.4.4 La culture de fibres musculaires nécessite peu de tissu et aboutit à l'obtention de CPM avec des caractéristiques similaires à celles isolées par la méthode classique.

(A) Nombre de CPM isolées par culture de fibres et par adhésion préférentielle en fonction de la quantité de tissu initiale, après 6 jours de culture. Les CPM isolées par adhésion préférentielle sont issues des TA, Gas et Quad de cinq souris. Les CPM isolées par culture de fibres sont issues des EDL de ces cinq mêmes souris. Les CPM ont été discernées des cellules non-myogéniques selon leur morphologie et leur nombre a été déterminé par l'utilisation d'un hémacytomètre. **(B)** Nombre de CPM/cm² obtenu après quatre jours de culture dans un milieu prolifératif. Les CPM ont étéensemencées à 2000 cellules/cm² et comptées à l'aide d'un hémacytomètre (six puits/lignée; n=3). **(C)** Pourcentage de cellules ayant fusionné (plus de deux noyaux) en fonction du type d'isolement. Les CPM ont étéensemencées à 13 000 cellules/cm². Après trois jours de culture dans un milieu de différenciation les cellules ont été fixées puis marquées à l'aide d'un anticorps dirigé contre MHC. Les noyaux ont été marqués par le DAPI (bleu). Le décompte des cellules fusionnées a été effectué sur cinq champs par lignée, choisis aléatoirement (n=3). Les résultats sont présentés comme la moyenne \pm l'erreur-type. La signification statistique a été déterminée par un test t non apparié.

En résumé, nous avons montré que l'isolement des CPM par fibres était plus efficace que la méthode classique. Tout d'abord, nos résultats indiquent que l'isolement par la culture de fibres individuelles permet d'obtenir plus rapidement des CPM avec un niveau d'enrichissement très élevé, et ce à partir d'une quantité de tissu initiale très réduite. Ensuite, nous avons montré que la prolifération des CPM sur fibre, ainsi que leur enrichissement ultérieur, se faisait de manière indépendante de la qualité du sérum utilisé, contrairement à la méthode classique. Enfin, les résultats indiquent que quelle que soit la méthode d'isolement, les CPM obtenues ont des potentiels de prolifération et de fusion comparables.

CHAPITRE IV: Discussion, perspectives & conclusions

4.1 Les cellules progénitrices du muscle des souris âgées

Le vieillissement du muscle est caractérisé par une accumulation excessive de composants de la MEC ainsi qu'une infiltration de tissu adipeux. Cette diminution de la masse et de la force musculaire est aussi appelée sarcopénie (NARICI et MAFFULLI 2010). Pour la personne âgée, ces modifications entraînent des difficultés à effectuer ses activités quotidiennes, donc une perte d'autonomie, et augmentent le risque de chute et de fracture (TRAPPE 2009).

4.1.1. Le phénotype des cellules satellites et les CPM sont altérés dans le muscle des souris âgées

De nombreuses études mettent en évidence un déclin du potentiel régénératif du muscle vieillissant (BROOKS et FAULKNER 1990; GROUNDS 1998; WELLE et al. 2002; BRACK et RANDO 2007; SMYTHE et al. 2008; JANG et al. 2011). En effet, la régénération du muscle âgé à la suite d'une activité physique intense ou d'un dommage est ralentie, voire incomplète. Ces études mettent en cause les cellules satellites, principales sources de cellules nécessaires à la régénération des fibres musculaires.

Les cellules satellites représentent de 3 à 6 % des noyaux totaux des fibres adultes, et certaines équipes ont montré une diminution du nombre de cellules satellites alors que d'autres montrent que ce nombre ne varie pas ou encore augmente (GIBSON et SCHULTZ 1983; CONBOY et al. 2003; SAJKO et al. 2004; BRACK et al. 2005; SHEFER et al. 2006; BRACK et RANDO 2007). Nos résultats indiquent que le nombre de cellules satellites est augmenté dans le muscle des souris âgées par rapport aux souris adultes. Ainsi, il ne semble pas que la perturbation de la régénération observée dans le muscle âgé soit liée à un manque de cellules satellites comme stipulé dans d'autres études (SHEFER et al. 2006). Compte tenu

des différences de résultats, nous avons caractérisé l'état phénotypique des CPM à l'aide de facteurs de transcription spécifiques.

Nos résultats montrent une diminution du pourcentage de cellules prolifératives totale, une forte diminution du nombre de CPM prolifératives ($Pax7^+Ki67^+$) et activées ($Pax7^+MyoD^+$), et une augmentation du pourcentage de cellules compétentes à fusionner dans le muscle de souris âgées. Ces résultats tendent à montrer que dans le muscle vieillissant, les CPM ont une forte tendance à se différencier plutôt qu'à proliférer. Cette observation est en accord avec la diminution du nombre de noyaux par fibres décrite dans la littérature (BRACK et al. 2005). De plus, elles confirment d'autres études ayant montré un défaut d'activation et de prolifération des cellules satellites résultant en une diminution des CPM du muscle âgé à la suite d'un dommage (MCGEACHIE et GROUNDS 1995; CARLSON et al. 2001; CONBOY et al. 2003).

Les différentes étapes menant à la régénération de fibres musculaires par les cellules satellites sont guidées par la modulation de facteurs présents dans leur microenvironnement. Des perturbations de facteurs de la niche des cellules satellites pourraient donc être à l'origine du défaut de régénération observé dans le muscle vieillissant. En effet, les progéniteurs de muscle âgé prolifèrent aussi bien que des progéniteurs de muscle jeune en culture (BARANI et al. 2003; SHEFER et al. 2006) indiquant que la perturbation de leur prolifération n'est pas due à des modifications intrinsèques des CPM. La mise en évidence de facteurs de la niche modulés dans le muscle âgé est donc un aspect clé dans la compréhension de la diminution des capacités régénératives du muscle vieillissant.

Un certain nombre de signaux ont déjà été mis en évidence notamment la voie Notch, connue pour intervenir dans l'activation et la prolifération des cellules satellites ainsi que dans la progression du cycle cellulaire (CONBOY et RANDO 2002; CONBOY et al. 2003; SARMENTO et al. 2005). L'inhibition de l'activité Notch entraîne l'inhibition de la régénération du muscle. Dans le muscle âgé, une détérioration de la signalisation Notch diminue les capacités prolifératives des CPM et leur potentiel régénératif. Finalement, l'activation forcée de la voie Notch dans un muscle âgé améliore le potentiel régénératif des CPM (CONBOY et al. 2003; CONBOY et al.

2005). La modulation de cette voie de signalisation semble donc être fortement impliquée dans la diminution des capacités régénératives du muscle âgé et donne une explication à la perturbation de l'activation que nous avons observée.

La voie Wnt canonique intervient dans la formation du muscle squelettique lors de l'embryogenèse (COSSU et BORELLO 1999) en jouant un rôle essentiel dans la différenciation myogénique (PETROPOULOS et SKERJANC 2002; ANAKWE et al. 2003). Lors de la myogenèse adulte, la voie Wnt canonique contrôle la transition des CPM d'un état prolifératif à un état différencié. Cette étape implique une transition de la voie Notch à la voie Wnt (BRACK et al. 2008). L'activation de cette voie de signalisation dans les CPM réduit leurs capacités prolifératives, favorisant leur différenciation et leur fusion. Nous avons aussi montré que l'activation de la voie Wnt canonique dans des CPM en culture par ajout de Wnt3a diminue leur prolifération.

Fait intéressant, la comparaison de l'expression génique par puce à ADN entre le muscle jeune et âgé effectué dans le laboratoire a mis en évidence une diminution de l'expression de gènes codants pour un agoniste de la voie Notch (Dner) et pour des antagonistes de la voie Wnt (Wif-1 et sFRP2) dans le muscle de souris âgées, suggérant une augmentation de l'activité de ces voies de signalisation avec l'âge (SCIME et al. 2010). Ces résultats sont en accord avec les travaux de Brack et ses collaborateurs qui ont montré une augmentation de l'activité de la voie Wnt canonique associée à une augmentation de la fibrose et une diminution du potentiel régénératif avec l'âge (BRACK et al. 2007). Finalement les souris déficientes pour la protéine Klotho, un inhibiteur de la voie Wnt, présentent un vieillissement accéléré se traduisant par des modifications liées à l'âge plus précoce, une augmentation de la sénescence et une altération du nombre de cellules souches (LIU et al. 2007). La modulation de la voie Wnt canonique pourrait donc être fortement impliquée dans l'altération de l'état de différenciation des CPM que nous avons décrit ainsi que dans la diminution du potentiel régénératif du muscle vieillissant.

Les Wnt non canoniques ont aussi été décrits pour pouvoir influencer le comportement des CPM. Les cellules satellites quiescentes expriment le récepteur

Fzd7. Les travaux de Legrand et collaborateurs ont montré que la liaison de Wnt7a au récepteur Fzd7 dans la phase précoce de la régénération musculaire stimule la division symétrique des cellules satellites (LE GRAND et al. 2009). De plus, la surexpression de Wnt7a suite à un dommage améliore la régénération musculaire et augmente le nombre de cellules satellites. L'importance de la signalisation de Wnt non canonique dans l'étape précoce de la régénération musculaire est appuyée par le fait que les souris déficientes pour cette protéine présentent un nombre réduit de cellules satellites suite à la régénération musculaire (LE GRAND et al. 2009).

Wnt7a peut aussi agir sur les fibres musculaires par l'intermédiaire de la voie Akt/mTOR, une autre voie Wnt non canonique. En effet, la liaison de Wnt7a sur le récepteur Fzd7 exprimé par les fibres musculaires induit leur hypertrophie (VON MALTZAHN et al. 2012). Il est donc possible que l'activité des voies non canoniques de Wnt soit aussi perturbée dans le muscle vieillissant. Elles pourraient notamment être impliquées dans la sarcopénie et le délai de régénération caractéristiques du muscle âgé.

4.1.2. Directions futures et résultats anticipés

L'augmentation de la voie canonique de Wnt dans le muscle âgé (BRACK et al. 2007) pourrait être responsable de la diminution du nombre de CPM prolifératives et l'augmentation du nombre de CPM en voie de différenciation observé dans notre laboratoire. L'analyse des CPM prolifératives et en différenciation suite à des injections en série d'agoniste de Wnt dans le muscle de souris sauvages adultes permettrait de valider si cette voie de signalisation est responsable de l'altération de l'état de différenciation des CPM observées dans le muscle des souris âgées. Si l'augmentation de la voie canonique de Wnt dans le muscle âgé est responsable de la perturbation de la différenciation des CPM en condition physiologique, l'inhibition chronique de l'activité de la voie Wnt dans le muscle âgé devrait favoriser la prolifération et inhiber la différenciation des CPM et ainsi rétablir la proportion de cellules prolifératives et différenciées.

Le double rôle de Wnt7a en fait un candidat prometteur pour le traitement de la dystrophie musculaire et la sarcopénie. Von Maltzahn et collaborateurs ont récemment montré que le traitement local de muscle de souris *mdx* avec Wnt7a induit l'expansion des cellules satellites et l'hypertrophie des fibres, aboutissant à une augmentation de la force musculaire et une réduction des dommages induit par la contraction musculaire (VON MALTZAHN et al. 2012). Il serait donc intéressant de déterminer, dans un premier temps, si les voies PCP et Akt/mTOR sont également altérées dans le muscle vieillissant. Il serait alors pertinent d'explorer l'impact de la stimulation de ces voies de signalisation sur le muscle âgé, par des injections de Wnt7a. Si l'hypothèse est exacte, on devrait s'attendre à ce que les muscles âgés traités présentent une diminution de l'atrophie musculaire ainsi qu'une meilleure régénération suite à un dommage. Si tel est le cas, un traitement par Wnt7a pourrait améliorer la force musculaire des souris âgées.

4.2 L'activité de la voie Wnt canonique dans le microenvironnement des mrSC contribue à la fibrose dans le muscle de souris *mdx*

La MEC joue un rôle critique dans la répartition des forces lors de la contraction en permettant le maintien de la structure du tissu (GILLIES et LIEBER 2011). Elle sert aussi d'échafaudage pour la réparation des fibres par les CPM à la suite d'un dommage (SERRANO et al. 2011). La MEC joue de plus un rôle biochimique par la séquestration de facteurs de croissance, synthétisés par les cellules résidentes. La fibrose du muscle squelettique est secondaire à une inflammation chronique suivant un trauma ou à de nombreuses pathologies du muscle telles les dystrophies musculaires (ENGELUND et KJERSGAARD 1991; DECONINCK et DAN 2007). Elle est aussi associée à l'atrophie musculaire induite par non-utilisation, par dénervation ainsi que dans le processus physiologique du vieillissement. La récurrence de la fibrose dans les pathologies musculaires et les conséquences qu'elle a sur la fonction musculaire, et *in fine* sur la qualité de vie des individus, en fait un sujet de recherche intensif.

4.2.1 L'activité de la voie Wnt canonique est augmentée dans le muscle fibrotique des souris *mdx*

La communauté scientifique s'intéresse de plus en plus aux populations de cellules progénitrices de la portion stromale pouvant être impliquées dans la myogenèse adulte et le remodelage des constituants de la matrice. L'antigène Stem Cell Antigen-1 (Sca-1) a permis d'identifier et d'enrichir des populations de cellules stromales dans plusieurs tissus, dont le muscle squelettique (GRENIER et al. 2007; JOE et al. 2010) (SCIME et al. 2005; LEBLANC et al. 2011). Les cellules stromales Sca1⁺ ont une localisation périvasculaire et semblent être étroitement associées aux cellules satellites (CHRISTOV et al. 2007; GRENIER et al. 2007; CRISAN et al. 2008; JOE et al. 2010; LEBLANC et al. 2011). Les mrSC se distinguent des cellules vasculaires et hématopoïétiques par l'absence des antigènes CD31 et Lineage, respectivement. Il s'agit d'une population de cellules mésenchymateuses du muscle, qui comme d'autres sous populations sont capable de se différencier en de nombreuses lignées mésodermiques dont en adipocytes, chondrocytes, ostéocytes et en cellules endothéliales (ASAKURA et RUDNICKI 2002; SHERWOOD et al. 2004; GRENIER et al. 2007; JOE et al. 2010; MITCHELL et al. 2010). Bien que controversé, les CSM ont été décrites comme capable de différenciation myogénique par diverses méthodes (GANG et al. 2004; LIU et al. 2007; GANG et al. 2008). Toutefois, cela n'a jamais été montré pour les mrSC.

D'autres sous-populations de cellules progénitrices mésenchymateuses provenant du muscle peuvent être enrichies à l'aide de Sca1⁺. Il y a notamment les progéniteurs fibro/adipogéniques (FAP) qui peuvent se différencier en adipocytes *in vitro* et suite à un dommage (JOE et al. 2010) ainsi que les cellules interstitielles PW1⁺Pax7⁻ (PICs) qui possèdent un fort potentiel myogénique (MITCHELL et al. 2010). De par leur localisation périvasculaire, leur multipotence et l'expression de l'antigène Sca1, il est possible que ces sous-populations soient liées par une origine commune. Dans tous les cas, nos résultats montrent que la proportion de cellules Sca1⁺ générale, dont fait partie la population de mrSC, est augmentée dans le muscle des souris dystrophiques. En raison de leur multipotence, ces différentes populations cellulaires pourraient être impliquées dans la surproduction

de MEC observée dans le muscle des souris dystrophiques ainsi que dans la formation de tissu adipeux.

Notre laboratoire a mis en évidence dans le muscle âgé une diminution de l'expression de sFRP2 et de Wif1 (SCIME et al. 2010), deux inhibiteurs de la voie Wnt canonique (NUSSE 2008; ANASTAS et MOON 2013). Cette diminution d'antagonistes de la voie Wnt suggère une augmentation de l'activité Wnt canonique dans le muscle squelettique vieillissant, ce qui a été confirmé par d'autres équipes (BRACK et al. 2007). Pour ces raisons, nous nous sommes intéressés au rôle que pouvait jouer la voie Wnt canonique dans les muscles dystrophiques. Nos résultats montrent une augmentation systémique de l'activité Wnt canonique ainsi que la surexpression de la β -caténine dans le muscle des souris *mdx*. Cette augmentation systémique et locale de l'activité Wnt canonique pourrait donc, comme dans le muscle vieillissant (BRACK et al. 2007), être impliquée dans la fibrose des muscles de souris dystrophiques. L'ensemble de ces observations tendent à montrer que la voie Wnt canonique pourrait être une voie de signalisation centrale dans la fibrose quelque soit la cause ou le type d'organe. En effet, elle a été associée à la fibrose de nombreux organes, dont le poumon (SALAZAR et al. 2009; HSU et al. 2011). Dans tous les cas, la population cible présumée pour être activée et contribuer à la fibrose sont les cellules souches mésenchymateuses. Or dans le muscle, la contribution des mrSC et leur réponse suite à l'activation de la voie Wnt canonique n'avait pas été montrée.

4.2.2 Les mrSC sont sensibles à une modulation de l'activité Wnt dans leur environnement

En culture, la stimulation de la voie Wnt canonique maintient les MSC dans un état indifférencié et permet leur auto-renouvellement (BOLAND et al. 2004; CHO et al. 2006; BAKSH et al. 2007). Cette voie de signalisation est aussi impliquée dans la différenciation des MSC en ostéocytes, chondrocytes et adipocytes (LING et al. 2009). Nos résultats montrent que l'ajout d'un agoniste de la voie Wnt canonique dans des cultures de mrSC cause leur prolifération ainsi que l'augmentation de l'expression du collagène de type I, suggérant qu'elles pourraient être impliquées

dans la fibrose des muscles de souris *mdx*. D'après leur recherche, Brack et collaborateurs suggèrent que l'augmentation de la fibrose avec l'âge serait due à une conversion des cellules myogéniques en cellules non myogéniques du fait d'une augmentation du pourcentage de cellules fibroblastiques dans des cultures de CPM isolées de muscles âgés comparées à des muscles jeunes (BRACK et al. 2007). Dans le but de valider si les CPM pouvaient jouer un rôle dans la synthèse de collagène *in vitro*, nous avons cultivé des fibres musculaires ainsi que des CPM en présence de Wnt3a. Nos résultats montrent que l'activation de la voie Wnt induit une diminution de la prolifération des CPM en culture. De plus, elle n'a aucun effet sur leur synthèse de collagène. Ces résultats suggèrent que les CPM ne sont pas impliquées dans la formation de collagène et de ce fait dans la fibrose musculaire des souris *mdx*.

Selon nos résultats, l'augmentation du pourcentage de cellules non myogéniques en culture observée par Brack et collaborateurs (BRACK et al. 2007) ne serait pas due à une conversion des CPM en cellules à caractère fibroblastique, mais plutôt à une augmentation de la prolifération des cellules non myogéniques contaminantes et une diminution de la prolifération des CPM, induite par la voie Wnt canonique. Ainsi, l'accumulation des constituants de la MEC dans le muscle impliquerait principalement les mrSC. Nos résultats *in vitro* montrent que la voie Wnt a un effet opposé sur la prolifération des mrSC et des CPM. Or, le vieillissement et la dystrophie ont en commun un déséquilibre entre la portion myogénique et la portion stromale. La perturbation de la voie Wnt pourrait donc être directement impliquée dans ce processus en favorisant la prolifération des mrSC et leur synthèse de constituants de la MEC, et en inhibant la prolifération des CPM.

Dans le but de définir l'impact d'une stimulation chronique de la voie Wnt canonique dans le muscle, nous avons procédé à une série d'injections de Wnt3a dans les muscles TA et/ou Gas de souris sauvages. Cette stimulation a induit une accumulation de β -caténine dans le TA des souris sauvages qui s'est traduite par une augmentation de l'activité de la voie Wnt canonique dans les muscles

squelettiques. Celle-ci causa l'augmentation de la population Sca1⁺ ainsi qu'une hausse de l'expression des collagènes de type I et III. De plus, un marquage au *Sirius Red* a mis en évidence une augmentation de la fibrose dans les muscles traités au Wnt3a.

Le but de la recherche des mécanismes de fibrose étant de l'induire chez des individus sains, mais également de la réduire en condition pathologique, nous avons procédé à des injections chroniques de DKK1 dans le muscle de souris *mdx*. L'inhibition chronique de l'activité Wnt canonique dans le muscle des souris *mdx* a permis de réduire l'expression de collagène de type I, la population des cellules Sca1⁺ et l'accumulation de tissu fibreux (**Figure 4.1**). Ces recherches ont permis de montrer l'importance de l'environnement systémique pour les cellules progénitrices et les conséquences de la perturbation de leur environnement sur leur activité et les propriétés régénératives du muscle.

L'utilisation d'inhibiteurs de la voie Wnt tel DKK1, ou de molécules qui les ciblent, sont actuellement à l'étude pour le traitement d'autres pathologies telles que l'arthrite rhumatoïde ou le myélome (SCHETT et al. 2008; GAVRIATOPOULOU et al. 2009). La fibrose étant aussi observée suite à une immobilisation prolongée et à un dommage musculaire important (KAARIAINEN et al. 2000; JARVINEN et al. 2002) il est fort probable que la voie Wnt soit aussi augmentée dans ces cas-ci, ce qui appuierait le rôle pivot de la voie Wnt dans le processus de fibrose dans le muscle squelettique, mais également d'autres organes dont le poumon (SALAZAR et al. 2009; RUSSELL et al. 2010; Hsu et al. 2011).

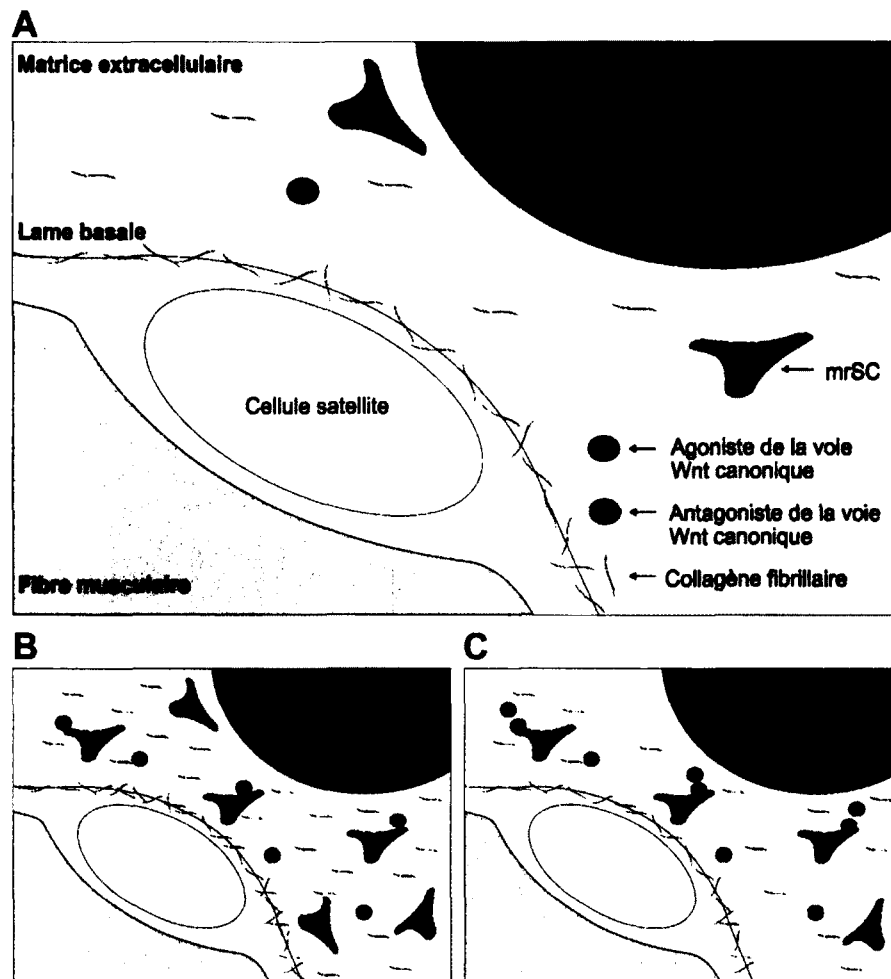


Figure 4.1 Schéma récapitulatif l'impact de la voie Wnt sur la fibrose musculaire par l'intermédiaire des mrSC

(A) La portion stromale du muscle squelettique contient des mrSC impliquées dans le remodelage de la MEC, et plus particulièrement des collagènes de type I et III. (B) Le muscle des souris dystrophiques ainsi que le muscle sain soumis à des injections de Wnt3a présente une augmentation de l'activité de la voie Wnt canonique, de la population des mrSC, du dépôt de collagène de type I et III et une fibrose. (C) Le muscle dystrophique soumis à des injections de DKK1, un inhibiteur de la voie Wnt, présente une diminution de l'activité de la voie Wnt canonique, de la population des mrSC, du dépôt de collagène de type I et III et un ralentissement de la fibrose.

La majorité des recherches mettent en avant le rôle de l'inflammation et plus particulièrement du TGF- β , connu pour ses propriétés pro-fibrotiques dans de nombreux organes, dont le poumon, le rein ou le foie (VERRECCHIA et MAUVIEL 2007; BIERNACKA et al. 2011). Dans le muscle squelettique, le TGF- β est principalement synthétisé par les monocytes et les macrophages qui apparaissent

dans les premiers jours suivant un dommage musculaire. Comme la voie Wnt canonique, il a un effet opposé sur la portion stromale et la portion myogénique. En effet, le TGF- β est capable d'inhiber la différenciation myogénique ainsi que l'expression de plusieurs protéines spécifiques du muscle (FLORINI et al. 1991 ; LIU et al. 2001). De plus, il favorise le dépôt de collagène et de tissu fibreux dans le muscle dystrophique (GOSSELIN et al. 2004; SERRANO et al. 2011).

Fait intéressant, il semble exister un cross-talk entre la voie du TGF- β et la voie Wnt. En effet, Akhmetshina et ses collaborateurs ont récemment montré que la voie du TGF- β stimule la voie Wnt canonique de manière p-38 dépendante, en inhibant l'expression de l'antagoniste de la voie Wnt, DKK-1 (AKHMETSHINA et al. 2012). De plus, l'inhibition de la voie Wnt par surexpression de DKK-1 réduit l'effet pro-fibrotique du TGF- β (AKHMETSHINA et al. 2012). À l'inverse, Carthy et ses collaborateurs ont montré que Wnt3a, un agoniste de la voie canonique, induit la différenciation de fibroblastes en myofibroblastes par le biais de l'augmentation de l'expression du TGF- β via SMAD2 (CARTHY et al. 2011). Bien qu'il soit difficile pour le moment d'établir quelle est la voie de signalisation en amont de l'autre, il semble clair qu'il existe des interactions entre ces deux voies et qu'elles jouent un rôle central probablement synergique dans la fibrose.

4.2.3 Implication possible des mrSC dans la fibrose du muscle vieillissant

D'un point de vue mécanique, la MEC joue un rôle critique dans la répartition des forces lors de la contraction permettant le maintien de la structure du tissu (GILLIES et LIEBER 2011). Elle sert de plus d'échafaudage pour la réparation des fibres par les CPM à la suite d'un dommage (SERRANO et al. 2011). La MEC joue aussi un rôle biochimique par la séquestration de facteurs de croissance circulants, synthétisés par les cellules résidentes. La modification des composants de la MEC lors du processus de vieillissement a donc des conséquences directes sur le comportement des cellules progénitrices et sur la fonction musculaire (KRAGSTRUP et al. 2011). Bien que les cellules myogéniques

soient largement étudiées, les cellules présentes dans la portion stromale le sont moins.

Nos résultats montrent que la population des mrSC des souris âgées est augmentée. L'augmentation de cette population pourrait être en lien avec l'accumulation de tissu fibreux et la dégénérescence graisseuse observées dans le muscle âgé. Cette fibrose affecte finalement les capacités régénératives des cellules satellites. En effet, Urciolo et collaborateurs ont récemment montré que la perte d'expression du collagène de type VI, augmenté dans le muscle vieillissant, diminue la rigidité de l'environnement des cellules satellites affectant négativement leur auto-renouvellement et leur potentiel régénératif (URCIUOLO et al. 2013). L'augmentation de rigidité dans le muscle âgé semble donc avoir un impact direct sur le potentiel régénératif des cellules satellites. La voie Wnt canonique semble impliquée dans la formation de fibrose dans d'autres organes (CHILOSI et al. 2003; JIANG et al. 2006; HE et al. 2009; WEI et al. 2011). Les résultats obtenus dans le laboratoire (SCIME et al. 2010) ainsi que les travaux de Brack et ses collaborateurs ont montré que l'activité de la voie Wnt canonique est augmentée lors du vieillissement musculaire et pourrait être en cause dans la fibrose du muscle vieillissant (BRACK et al. 2007). Les travaux présentés dans cette thèse ont montré que l'activation de cette voie induit la prolifération des mrSC ainsi que leur production de collagène *in vitro* et *in vivo* dans le muscle de souris dystrophiques. Il est donc fort probable que l'augmentation de l'activité Wnt canonique puisse avoir les mêmes effets sur les mrSC du muscle vieillissant que dans le muscle de souris dystrophiques.

4.2.4 Directions futures et résultats anticipés

Certains travaux suggèrent que la fibrose musculaire serait causée par une augmentation dans l'environnement systémique d'agonistes de la voie Wnt canonique (BRACK et al. 2007). Notre laboratoire a plutôt montré que l'augmentation de l'activité Wnt canonique lors du vieillissement était plutôt due à la diminution des agonistes naturels comme sFRP2. Des travaux sont en cours

dans le laboratoire pour déterminer l'effet de la délétion de sFRP2 (souris sFRP2 KO) sur le comportement des mrSC et leur impact dans la composition du muscle squelettique par rapport à une souris sauvage. Si il n'y a pas de phénomène de compensation, la perte d'expression de sFRP2 pourrait induire une augmentation de l'activité de la voie Wnt canonique et pourrait se traduire par une augmentation de la population des mrSC et un déséquilibre entre la portion myogénique et stromale, tel que nous l'avons observé dans le muscle dystrophique. Un résultat obtenu dans notre laboratoire montre que les souris déficientes pour sFRP2 ont un retard de réparation caractérisé par un plus grand nombre de noyaux centraux ainsi qu'une plus grande quantité d'adipocytes suite à un dommage (**Figure 4.2**). Ces résultats abondent donc dans le sens qu'une augmentation de la voie Wnt canonique, due à la perte d'un antagoniste naturel, diminue la capacité régénérative du muscle squelettique.

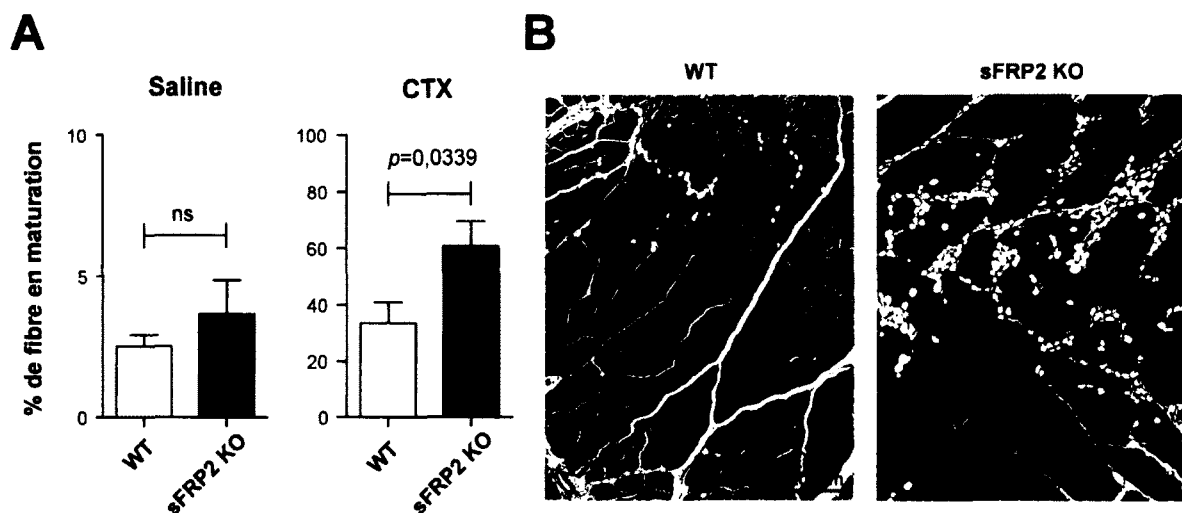


Figure 4.2 Caractéristiques histologiques des muscles de souris sFRP2 KO

(A) Histogrammes représentant le pourcentage de fibres ayant au moins un noyau central (fibres en maturation) sur des coupes transversales de TA (4 µm) de souris sauvages (WT) et sFRP2 KO, 28 jours après injection de solution saline ou de CTX dans le muscle controlatéral. **(B)** Images représentatives de coupes transversales de TA (4µm, 10X) de souris sauvages et sFRP2 KO, colorées au H&E, 28 jours après dommage à la CTX.

Enfin, nos résultats mettent en évidence le rôle des mrSC dans la fibrose musculaire des souris dystrophiques (mdx) impliquant une augmentation locale et systémique de la voie canonique de Wnt. La population des mrSC étant

augmentée dans le muscle âgé, il serait intéressant de déterminer le degré d'implication des mrSC dans la fibrose musculaire lors du vieillissement.

D'un point de vue thérapeutique, il serait finalement intéressant de mesurer la contribution réelle de l'activité de la voie Wnt canonique sur la perte de fonction du tissu par rapport au TGF- β . Cela pourrait être effectué par des injections à long terme d'agoniste de la voie Wnt canonique et de TGF- β dans le muscle de souris adultes sauvages. Le dépôt fibreux serait alors mesuré par des méthodes histologiques et la fonction musculaire pourrait être quantifiée par des tests d'aptitudes physiques.

4.3 La rigidité du microenvironnement module le phénotype des CPM

Les cellules satellites sont considérées comme la principale source de cellules pour la croissance et la réparation du muscle squelettique adulte (RUDNICKI et al. 2008; WANG et RUDNICKI 2012). Elles sont localisées dans un microenvironnement appelé niche dont les multiples signaux permettent de les maintenir dans un état quiescent ou encore, à la suite d'un dommage, d'orchestrer leur activation (et auto-renouvellement), prolifération et différenciation afin de reconstituer des fibres endommagées ou en créer de nouvelles. Ces signaux sont la plupart du temps de nature biochimique ou cellulaire. Plus récemment, il a été montré que la composante mécanique, provenant des composants de la MEC, de la lame basale et du tissu interstitiel, pouvait également moduler le phénotype des cellules progénitrices (KUANG et al. 2007; BOONEN et POST 2008; COSGROVE et al. 2009; GILBERT et al. 2010; PANNEREC et al. 2012).

4.3.1 La réduction des fibres *in vitro* induit l'activation et la prolifération des CPM

Lors de la mise en culture de fibres individuelles, un certain nombre de myofibres se « réduisent » lors des premiers jours de culture. Bien que s'apparentant à première vue à des fragments de fibres, leur observation quotidienne nous a permis de confirmer que ces bouts de fibres sont en fait des

fibres entières semblant s'être «hypercontractées» ou «réduites ». Nous avons également observé qu'après six jours de culture, un grand nombre de cellules bourgeonnait au pourtour de ces fibres et que ce nombre est bien supérieur à celui des fibres demeurées intactes. Ce phénomène de bourgeonnement a été observé et brièvement décrit par Bischoff (BISCHOFF 1990), mais n'a toutefois pas été investigué davantage.

L'utilisation de gène rapporteur (Myf5/nLacZ) et l'immunomarquage des cellules Pax7⁺ montrent que la grande majorité des cellules bourgeonnant sur les fibres réduites sont en fait des CPM. Les autres étant certainement des cellules myogéniques ayant perdu l'expression de ce facteur de transcription et pourraient donc correspondre à des CPM en voie de différenciation. L'augmentation importante du nombre de cellules myogéniques sur les fibres réduites suggère une modification du microenvironnement des cellules satellites.

L'isolement et la culture de cellules satellites par la méthode classique entraînent irrémédiablement leur activation et la sortie de leur quiescence. De plus, le maintien des CPM en culture impliquant leur passage régulier provoque inévitablement la diminution de leur potentiel prolifératif, leur potentiel de fusion (MACHIDA et al. 2004) et surtout leur compétence à participer à la régénération musculaire suite à leur transplantation (BEAUCHAMP et al. 1999; CAO et al. 2005; COLLINS et al. 2005; MONTARRAS et al. 2005; SACCO et al. 2008). Ainsi, le maintien des cellules satellites dans leur niche anatomique permet de préserver de meilleures propriétés régénératives que la culture de CPM sur Pétri. En procédant à des transplantations intramusculaires de fibres uniques intactes, Collins et ses collaborateurs ont mis en évidence un potentiel d'intégration et de régénération robuste des cellules satellites, montrant ainsi l'importance d'un microenvironnement approprié sur leur potentiel régénératif (COLLINS et al. 2005; BOLDRIN et al. 2012). Les signaux provenant du microenvironnement des cellules satellites sont donc nécessaires au maintien de leur caractère souche (KUANG et al. 2008).

La comparaison de CPM proliférant sur fibres et de CPM cultivées de manière classique nous a permis de montrer que l'expansion des CPM sur fibres

réduites favorise leur maintien dans un état prolifératif. En effet, les CPM semblent moins enclines à exprimer la myogénine, et donc à se différencier, que les CPM cultivées en Pétri. Les signaux provenant de la fibre réduite sont donc favorables au maintien des CPM dans un état prolifératif et indifférencié.

La lame basale entourant les myofibres est un réseau de composants de la MEC fait principalement de collagène de type IV, laminine, fibronectine, entactine et autres protéoglycanes et glycoprotéines (SANES 2003). Les protéoglycanes de la lame basale peuvent également séquestrer des facteurs de croissance provenant de la circulation sanguine, des fibres musculaires ainsi que des cellules satellites elles-mêmes. Ces facteurs incluent le bFGF, le HGF, EGF, IGF et les protéines de la famille des Wnts. Ces divers facteurs sont capables de stimuler la survie, l'activation et/ou la prolifération des cellules satellites (DIMARIO et al. 1989; TATSUMI et al. 1998; MACHIDA et BOOTH 2004; GOLDING et al. 2007; BRACK et al. 2008). Il est donc possible que la réduction des fibres et de la lame basale puisse libérer ces facteurs et/ou augmenter leur accès par les cellules satellites contribuant ainsi à leur forte prolifération et leur maintien dans un état prolifératif.

In vivo, les cellules satellites sont aussi sous l'influence de signaux provenant des cellules du tissu interstitiel notamment les mrSC et les cellules endothéliales ainsi que de facteurs provenant de la circulation sanguine (CHRISTOV et al. 2007) (MACHIDA et BOOTH 2004) (BRACK et al. 2007). Il est important d'ajouter à cela les facteurs produits par les cellules hématopoïétiques/inflammatoires (TIDBALL et VILLALTA 2010). De nombreux facteurs de croissance sont capables de moduler le comportement des CPM *in vitro*. Toutefois, leurs origines, contributions et degrés d'implication *in vivo* restent encore largement à définir.

Le modèle de culture de fibres individualisées est habituellement utilisé pour décortiquer les mécanismes impliqués dans la polarité et l'auto-renouvellement, guidés par les signaux de la fibre dans la partie apicale et de la lame basale dans la partie basale (FUCHS et al. 2004; KUANG et al. 2008). Dans notre cas, les fibres réduites pourraient constituer un modèle de dommage *in vitro* à l'échelle de fibres individuelles puisqu'elles favorisent une forte prolifération des CPM telle qu'observée *in vivo* dans un muscle endommagé. Ce modèle pourrait permettre de

décortiquer le rôle de la fibre sous-jacente et de la lame basale dans l'activation et la prolifération des cellules satellite de manière spécifique puisque les autres composants de leur niche à savoir l'environnement systémique, les cellules de la MEC, les cellules inflammatoires et la MEC elle-même sont absents. La forte prolifération de CPM observée sur des fibres en culture laisse supposer que, contrairement aux composants de la niche précédemment cités, la fibre et la lame basale semblent fortement impliquées dans l'activation et la prolifération des CPM.

4.3.2 La réduction des fibres en culture entraîne leur dégénérescence

Un marquage à la phalloïdine montre que la fibre réduite a un cytosquelette désorganisé. De plus, les noyaux qui composent la fibre se dégradent et tendent à disparaître. Un test de viabilité a confirmé la dégénérescence des fibres dès leur réduction, contrairement aux fibres intactes qui restent viables en culture. Il est donc probable que la dégénérescence de la fibre soit impliquée dans l'activation et la prolifération des CPM, et ce par la perte des jonctions entre les cellules satellites et la fibre.

Les cellules satellites et la fibre sous-jacente communiquent via des jonctions faisant intervenir les M-cadhérines (CORNELISON et WOLD 1997; KUANG et al. 2008). La M-cadhérine joue un rôle dans l'attachement et la fusion des CPM lors de la myogenèse prénatale (CIFUENTES-DIAZ et al. 1995) et est surexprimée dans les cellules satellites lors de la régénération musculaire adulte (IRINTCHEV et al. 1994). Toutefois, les souris déficientes pour la M-cadhérine possèdent une régénération musculaire normale, probablement due à une compensation par d'autres cadhérines (HOLLNAGEL et al. 2002). Il a de plus été montré que la fibre endommagée libère du HGF qui participerait dans l'activation des cellules satellites (TATSUMI et al. 2006; WOZNIAK et ANDERSON 2007). Le traitement de fibres individuelles avec une drogue myotoxique (marcaïne), cause la mort de la fibre, mais sans affecter la lame basale, induit la prolifération des CPM et la réparation de fibres endommagées (BISCHOFF 1990). La fibre sous-jacente semble donc être impliquée dans le maintien des cellules satellites à l'état quiescent. Ainsi, la perte

des interactions entre la fibre et la cellule satellite ainsi que le relargage possible de HGF par les fibres en dégénérescence pourrait favoriser l'activation des cellules satellites et la prolifération des CPM.

4.3.3 La réduction des fibres en culture induit la modification de la rigidité du microenvironnement des CPM favorable à leur prolifération

Des études récentes montrent que les cellules sont capables de répondre à une modification de la rigidité de leur microenvironnement par des mécanismes de mécanotransduction (BUTCHER et al. 2009; WANG et al. 2009). La quantification de la rigidité d'un tissu ou d'une cellule est désormais possible depuis une dizaine d'années grâce à l'avènement du microscope à force atomique (AFM) en biologie.

Plusieurs laboratoires ont mesuré la rigidité des muscles squelettiques, des fibres musculaires et des cellules myogéniques prolifératives et différenciées. La rigidité de tranches longitudinales de muscle squelettique au repos ainsi que pour une lignée de cellules myogéniques immortalisées (C2C12) et différenciées en culture a été estimée à 12 kPa (COLLINSWORTH et al. 2002; ENGLER et al. 2004b). Cette valeur est généralement utilisée comme référence pour la rigidité du muscle squelettique. Plusieurs autres équipes se sont par ailleurs intéressées à la rigidité de fibres musculaires individuelles de souris et de rats, et ont obtenu des résultats très variables allant de 350 Pa à 61 kPa (DEFRANCHI et al. 2005; CANATO et al. 2010; MARG et al. 2010; OGNEVA et al. 2010). L'ensemble de la littérature met en évidence une certaine discordance dans l'estimation des valeurs absolues de module de Young obtenu (KUZNETSOVA et al. 2007), que ce soit pour des muscles entiers, des fibres individuelles ou des C2C12 différenciées. Cela peut être expliqué par la variation de nombreux paramètres incluant: les conditions d'isolement des tissus ou des fibres, le milieu dans lesquelles ils ont été mesurés, le type de levier utilisé, le microscope à force atomique, et surtout le modèle mécanique utilisé pour traduire les valeurs de forces en module de Young (KUZNETSOVA et al. 2007).

La quantification de l'environnement biomécanique (rigidité) des fibres en culture nous a permis de montrer une augmentation de quatre fois de la rigidité

des fibres réduites (2 kPa) par rapport aux fibres intactes (0,5 kPa). La rigidité des fibres réduites n'a pas varié entre les jours 0 et 6 indiquant que les fibres réduites acquièrent leur rigidité dès leur réduction.

Par la suite, nous avons tenté de récapituler les rigidités des fibres intactes et réduites *in vitro* en cultivant des cellules sur des substrats à rigidité contrôlée. La rigidité correspondant aux fibres réduites augmente la prolifération des CPM (Ki67⁺) et, de manière intéressante, diminue le nombre de cellules en voie de différenciation (Myog⁺). Un environnement d'une rigidité de 2 kPa est donc favorable à la prolifération des CPM et diminue leur différenciation spontanée. Fait intéressant, il a récemment été montré que l'environnement biomécanique des CPM a un impact direct sur le maintien des propriétés régénératives des CPM lors de transplantations musculaires (GILBERT et al. 2010). En effet, les auteurs ont montré que le taux d'intégration des CPM préalablement cultivées sur un substrat de rigidité de 12 kPa pendant une semaine est significativement supérieur à des CPM préalablement cultivées sur des substrats de rigidités de 2, 42 ou 10⁶ kPa correspondants à la rigidité du cerveau, du cartilage et d'un Pétri en plastique, respectivement.

Dans le but de comparer nos résultats avec ceux de la littérature, nous avons aussi quantifié la rigidité de myotubes issus de la fusion de C2C12 après huit jours de culture dans un milieu de différenciation. Ces résultats montrent qu'avec la méthode de mesure utilisée, le module de Young de C2C12 différenciées est de 0,5 kPa, ce qui est bien inférieur à la valeur obtenue par Collisworth et collaborateurs (12 kPa) (COLLINSWORTH et al. 2002), mais correspond parfaitement avec la rigidité de nos fibres individuelles intactes. Il est en effet fort probable que la rigidité de myotubes soit égale ou inférieure à celle de fibres individuelles.

De manière intéressante, Meyer et Lieber ont comparé la rigidité de faisceaux de fibres avec des fibres individuelles qui ont par la suite été « regroupées », permettant ainsi d'estimer l'implication du tissu conjonctif dans la rigidité du muscle (MEYER et LIEBER 2011). Ils ont constaté une augmentation importante de la rigidité des faisceaux de fibres comparées aux fibres regroupées

dont la rigidité était identique à celle de fibres individuelles. Ces résultats suggèrent que la rigidité du muscle squelettique est principalement définie par la MEC. De ce fait, la lame basale qui enveloppe chaque fibre individuelle pourrait être fortement responsable des valeurs de rigidités obtenues.

Bien que n'ayant jamais été quantifié par AFM, plusieurs études tendent à montrer que la rigidité du muscle squelettique augmente lors du vieillissement (RODRIGUES et al. 1996; GOSSELIN et al. 1998; GAO et al. 2008), en lien avec un déséquilibre de la portion stromale (KRAGSTRUP et al. 2011). Une expérience effectuée dans le laboratoire a montré que la rigidité de fibres individuelles provenant d'EDL de souris âgées de 24 mois était augmentée de plus de 4 et 8 fois, lorsque comparée à des fibres de souris adultes âgées de 3 mois (Figure 4.3).

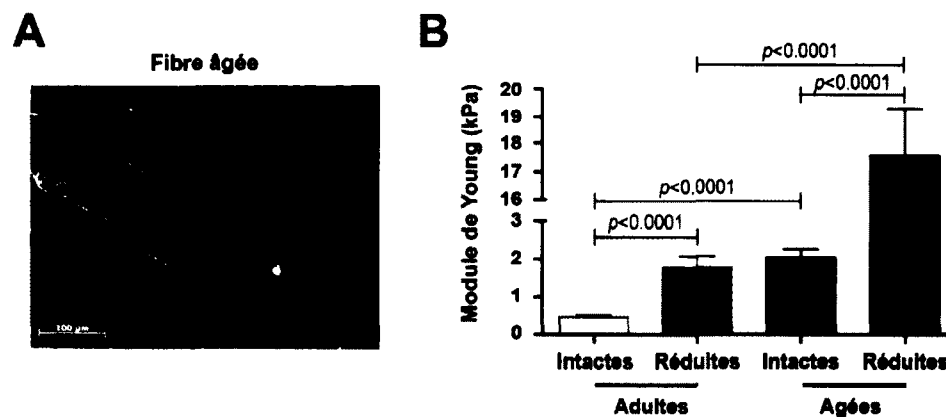


Figure 4.3 Rigidité de fibres individuelles provenant d'EDL de souris adultes et âgées

(A) Image en contraste de phase représentative d'une fibre intacte fraîchement isolée d'un EDL d'une souris âgée (24 mois) lors des mesures par AFM (triangle). (B) Histogramme présentant la rigidité (kPa) des fibres intactes fraîchement isolées et réduites après 6 jours de culture de fibres provenant de souris adultes (<27 fibres) et âgées de 24 mois (<24 fibres). Ces expériences ont été réalisées à partir de 3 souris différentes pour chaque groupe.

Il est donc possible que l'augmentation de la rigidité de l'environnement des cellules satellites du muscle âgé soit impliquée dans la perturbation de leur état de différenciation en condition physiologique normale ainsi que dans la diminution de leur potentiel régénératif suite à un dommage. Ces résultats suggèrent de plus que

la lame basale est une partie de la MEC fortement affectée par la fibrose lors du vieillissement musculaire.

Par ailleurs, une expérience effectuée dans notre laboratoire visant à explorer le potentiel régénératif des CPM sur des substrats de rigidités allant de 0,5 à 12 kPa, a révélé un effet «cloche» avec un pic de prolifération à 2 kPa suivi d'une perte de prolifération avec l'augmentation de la rigidité (**Figure 4.4**). Cela tend à montrer qu'une rigidité élevée, comme observé dans le muscle dystrophique dont la rigidité mesurée par d'autres équipes se situe à 12 kPa (ENGLER et al. 2004b), nuit au potentiel régénératif des CPM. La forte rigidité du muscle dystrophique, en lien avec l'accumulation de tissu conjonctif pourrait donc être impliquée dans la diminution de ses capacités régénératives.

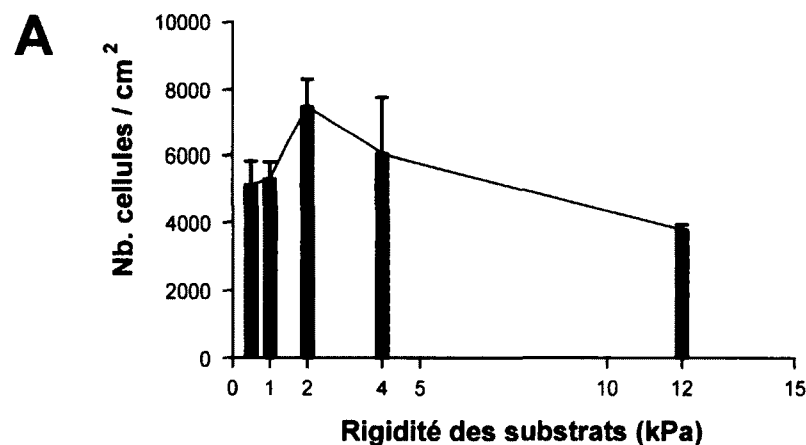


Figure 4.4 Capacités prolifératives de CPM sur des substrats de différentes rigidités (A) Histogramme présentant le nombre de CPM par cm² après 3 jours de culture sur des substrats de 0,5, 1, 2, 4 et 12 kPa. Ces résultats ont été obtenus par décompte de 8 champs/puits, trois puits par condition et sur 3 lignées primaires.

4.3.4. Directions futures et résultats anticipés

Collins et collaborateurs ont montré que la transplantation de fibres intactes provenant d'EDL de souris adultes donne de bien meilleurs résultats que la transplantation de CPM préalablement cultivées (COLLINS et al. 2005). Comparer l'efficacité de transplantations de fibres individuelles provenant d'EDL de souris adultes et âgées permettrait de définir le degré d'implication de la lame basale et

de la fibre sous-jacente dans la diminution des propriétés régénératives des cellules satellites du muscle âgé. Cela pourrait être effectué en transplantant des fibres individuelles isolées de souris Myf5-nLacZ adultes et âgées dans le muscle de jeunes adultes, précédé d'un dommage à la cardiotoxine. En parallèle, des transplantations de CPM primaires adultes et âgées dans des souris adultes permettraient de s'assurer qu'il n'y a pas de modifications intrinsèques dans les CPM âgées, comme le suggère la littérature (CARLSON et FAULKNER 1989; BARANI et al. 2003; SHEFER et al. 2006).

L'importance de la rigidité du microenvironnement des cellules souches du muscle n'a été montrée que très récemment (BOONEN et al. 2009; GILBERT et al. 2010). Il y a donc de nombreux aspects à étudier quant à son impact sur les modulations phénotypiques des mrSC et des CPM du muscle squelettique. Le comportement des CPM étant modulé par une variation de la rigidité de leur environnement, il paraît important de quantifier l'évolution de la rigidité lors du processus de régénération musculaire à la suite d'un dommage. Il est en effet connu que la MEC subit un remodelage de ses constituants lors du processus de régénération (CHEN et LI 2009; MANN et al. 2011; CALVE et SIMON 2012). Nos résultats suggèrent que la modification de la rigidité de l'environnement des CPM lors de ce processus fasse partie intégrante des signaux impliqués dans l'activation, la prolifération et/ou la différenciation des cellules satellites. De la même manière, la quantification de la rigidité de muscles de fibres âgés permettrait de vérifier *in vitro* si une modulation du microenvironnement biomécanique pourrait expliquer la diminution du potentiel régénératif du muscle âgé.

Bien que n'ayant pas été étudiées dans les cellules myogéniques, de nombreuses voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire ont été associées à la mécanotransduction dans d'autres types cellulaires. C'est notamment le cas des voies Wnt canonique, PI3K/Akt MAPK et MEK/ERK impliqués dans la prolifération des ostéoblastes (LIEDERT et al. 2006) et des voies Rho/ROCK, MAPK et Ras/ERK dans la prolifération des cellules cancéreuses (JAALOUK et LAMMERDING 2009; D'ANGELO et al. 2011). Il serait donc intéressant de

déterminer le degré d'activité de ces voies de signalisation dans des CPM cultivées sur des substrats de différentes rigidités par la quantification de l'activation de protéines et de facteurs de transcription et la quantification de l'activité transcriptionnelle des gènes cibles de ces voies.

Enfin, les mrSC étant impliquées dans la synthèse et le remodelage des constituants de la MEC, il est probable que leur comportement (phénotype) soit fortement affecté par une modulation de la rigidité de leur environnement. Il serait donc intéressant d'étudier *in vitro* les conséquences d'une modulation de la rigidité sur le phénotype des mrSC. Chez l'adulte, les mrSC ont une activité faible. Par contre, lors du développement ou dans le muscle âgé, les mrSC prolifèrent et synthétisent activement de la matrice. Il pourrait donc y avoir un effet cloche où une rigidité physiologique n'induirait qu'une faible prolifération des mrSC et de leur synthèse de collagène. À l'inverse, un environnement moins (e.g. développement) ou plus rigide (e.g. vieillissement) entrainerait leur prolifération et la synthèse de composants de la matrice et de métalloprotéinases (MMP), respectivement.

De plus, les mrSC étant des cellules multipotentes, il serait pertinent de vérifier si la rigidité de leur microenvironnement pourrait influencer leur différenciation. Outre le processus de fibrose, il a été montré que les mrSC contribuent à d'autres pathologies musculaires telle l'ossification hétérotopique (LEBLANC et al. 2011) et pourraient être impliquées dans l'apparition de tissu graisseux dans le muscle vieillissant (TAAFFE et al. 2009; JOE et al. 2010; UEZUMI et al. 2010). Ainsi, nous postulons que l'augmentation de la rigidité pourrait être liée à l'accumulation de tissu fibreux, caractéristique du muscle dystrophique et du muscle vieillissant.

Une perturbation de la rigidité du microenvironnement du muscle vieillissant, ou encore à la suite d'un traumatisme, pourrait donc avoir un impact direct sur la différenciation des mrSC en ostéoblaste ou en adipocyte. Il serait donc important d'évaluer la rigidité d'un muscle endommagé et âgé et de vérifier son effet sur le potentiel de différenciation des mrSC.

4.4 La culture de fibres réduites: une approche originale pour isoler les CPM

L'étude des mécanismes intervenant dans la prolifération et la différenciation des CPM a été possible grâce à leur culture *in vitro*. La méthode classique consiste en l'isolement par digestion enzymatique des cellules du muscle squelettique. L'obtention d'une lignée pure de CPM nécessite ensuite une étape d'enrichissement qui peut être faite par différentes méthodes telles que le tri cellulaire (billes magnétiques ou cytométrie de flux), par des gradients de Percoll™ et par la méthode classique d'adhérence préférentielle (ou *pre-plating*) (MEGENEY et al. 1996; JANKOWSKI et al. 2001; PARK et al. 2006; CHE et al. 2011; PASUT et al. 2012). Cette dernière consiste à enrichir les CPM au fil des passages en utilisant leurs propriétés adhésives qui diffèrent des cellules non myogéniques (MEGENEY et al. 1996; BURTON et al. 2000).

L'isolement des fibres permet d'éliminer d'emblée les cellules non myogéniques provenant du tissu interstitiel et de maintenir les cellules dans leur niche. Nos résultats montrent que le fait de maintenir les fibres en suspension permet l'expansion *ex vivo* des CPM sur la fibre dans un environnement proche de leur niche. La trituration mécanique des fibres permet par la suite d'isoler aisément les CPM avec une grande pureté. Cet avantage constitue d'une part un gain de temps et de travail non négligeable, mais aussi une réduction du nombre de passages nécessaires à l'obtention d'une lignée pure qui est délétère pour les propriétés régénératives des CPM (**Figure 4.5**).

La prolifération d'une population pure de CPM sur Pétri dépend de la qualité du sérum. Par contre, la prolifération des CPM sur fibre y est insensible. Il est possible que la lame basale des fibres réduites, dans laquelle sont séquestrés des facteurs de croissance, apporte les facteurs nécessaires à la bonne prolifération des CPM en présence d'un sérum pauvre (OLWIN et RAPRAEGER 1992; JENNISKENS et al. 2006; LANGSDORF et al. 2007). Par ailleurs, la présence de la lame basale semble constituer un substrat idéal au maintien des propriétés souches, comme l'indique la plus faible proportion de cellules Myog⁺ après 6 jours de culture par rapport à leur culture sur plastique (méthode classique). La présence de la lame

basale est donc un atout majeur pour la prolifération des CPM par culture de fibres.

L'efficacité et la rapidité de l'enrichissement des CPM par méthode classique dépendent de la qualité du sérum contrairement à l'enrichissement des CPM issues de fibres. Lorsque les CPM sont hautement purifiées, c'est la méthode de fibre, la qualité du sérum n'influence pas. Par contre, l'enrichissement d'une population impure de CPM, tel qu'obtenue par la méthode classique, favorise la prolifération des cellules fibroblastiques contaminantes qui s'accommodent facilement d'un sérum de moins bonne qualité. La méthode d'isolement des CPM que nous avons décrite a donc l'avantage d'apporter une plus grande reproductibilité intra- et inter-laboratoires.

Enfin, nous avons montré que les CPM isolées par l'intermédiaire de fibres réduites puis purifiées en culture présentent des potentiels de différenciation comparable aux CPM isolées par la méthode classique. Ce résultat est très intéressant puisque, comme dit précédemment, la qualité de différenciation des CPM varie en fonction des passages. Dans ce cas-ci, il est clair que le doublement de population des CPM isolées par la méthode des fibres réduites est nettement plus élevé, considérant le fait que les cellules proviennent de seulement quelques myofibres. Malgré cela le phénotype des CPM isolées par cette méthode ne s'en ressent guère. Ainsi, il est permis de croire que la matrice des fibres réduites constitue un microenvironnement bénéfique pour le maintien des propriétés souches des CPM.

Nos résultats montrent que le rapport quantité tissu/nombre cellules obtenues par notre méthode est très supérieur à la méthode classique bien que le nombre initial de cellules obtenu par la méthode classique reste quand même supérieur. Cela s'explique par le fait que la quantité de tissu nécessaire pour isoler les fibres (deux EDL par souris) est bien inférieure à la quantité de tissu nécessaire à l'isolement par digestion enzymatique complète du muscle et enrichissement par adhérence préférentielle pour laquelle la majorité des muscles des pattes postérieures sont utilisés, incluant les TA, les Gas et les Quad. Cette nouvelle méthode a donc l'avantage d'obtenir des CPM à partir d'une faible quantité de tissu, ce qui

constitue un atout de taille lorsque les travaux se font sur des muscles spécifiques et de surcroît sur de petits animaux comme la souris. Elle permet de plus d'isoler et d'étudier les cellules satellites provenant d'un seul muscle, réduisant ainsi l'hétérogénéité de la population d'intérêt. Il est intéressant de noter que les différents muscles ne possèdent pas le même nombre de cellules satellites ce qui pourrait influencer les résultats de rendements obtenus. Toutefois la littérature montre que l'EDL semble posséder moins de cellules satellites par fibre que le TA, le Gas ou le Soleus (HAWKE et GARRY 2001; COLLINS et al. 2005). Par ailleurs, il aurait été possible d'isoler les CPM par la méthode classique mais aurait nécessité de combiner les EDL de nombreuses souris, réduisant ainsi la puissance du test statistique (indépendant vs apparié).

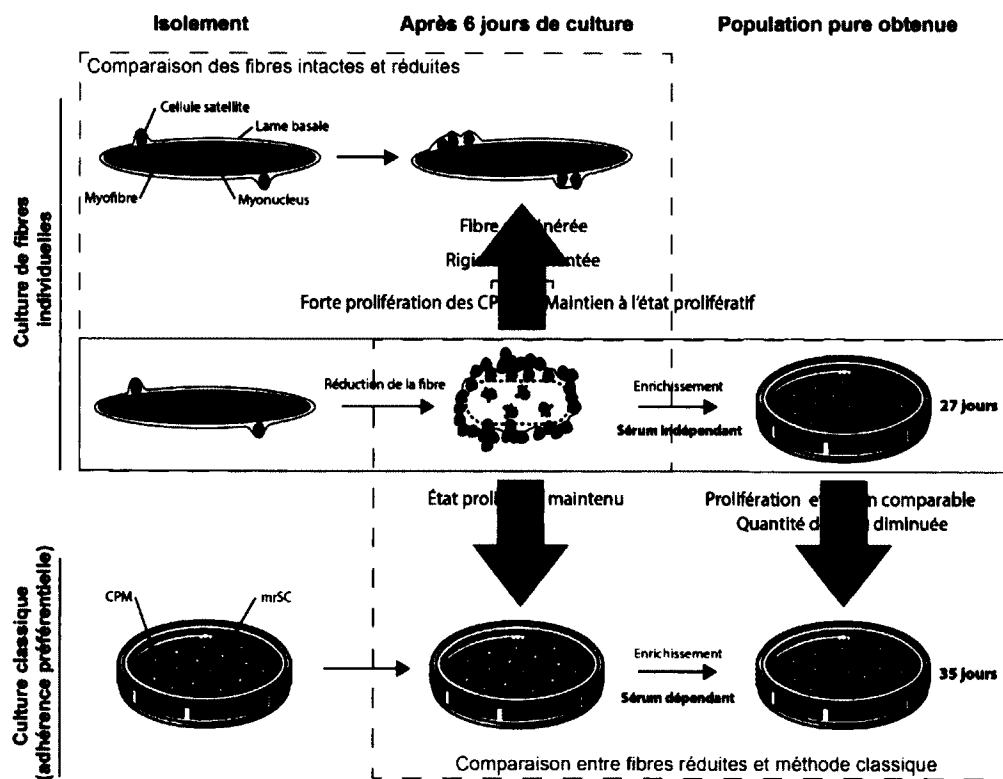


Figure 4.5 Récapitulatif des effets de la réduction des fibres individuelles en culture
La réduction de la fibre entraîne une augmentation de la rigidité de l'environnement des CPM qui contribue à leur prolifération tout en inhibant leur différenciation par rapport à une fibre intacte. L'isolement des CPM par la culture de fibres réduites permet d'obtenir une lignée pure de CPM plus rapidement et avec peu de tissu. Les CPM obtenues par les deux méthodes d'enrichissement ont un potentiel de prolifération et de différenciation comparables.

L'isolement des fibres musculaires individuelles nécessite de récupérer un muscle de tendon à tendon. C'est pour cette raison que les fibres utilisées dans ces expériences proviennent des EDL dont les tendons sont bien visibles et assez longs pour être sûr de ne pas couper dans les fibres. Toutefois, il est possible d'isoler les fibres provenant d'autres muscles. En effet, nous avons été capables d'isoler des fibres de Gas, de TA, de diaphragme et du muscle masséter de la mâchoire. Les muscles de la tête, tels le masséter de la mâchoire ou adducteur de la mandibule, ont la particularité de ne pas avoir la même origine embryonnaire que les muscles des pattes ou du tronc (NODEN et FRANCIS-WEST 2006; HAREL et al. 2009). Cette méthode pourrait donc permettre d'isoler des CPM provenant de muscle ayant des origines embryonnaires différentes. Dans le but d'être concordants avec la littérature, nous avons choisi de faire nos expériences avec le muscle EDL qui est classiquement utilisé pour l'isolement des fibres musculaires.

4.1.1 Directions futures et résultats anticipés

Afin de déterminer si la culture des CPM sur fibres lors de leur isolement permet réellement de maintenir leur caractère souche, il serait pertinent d'effectuer des expériences de transplantation avec des CPM isolées par les deux méthodes. Pour cela, des CPM cultivées sur des fibres et des CPM isolées de manière classique issues de souris *Myf5nLacZ* pourraient être transplantées dans le muscle TA de souris (*mdx*). La participation à la régénération musculaire des cellules injectées pourrait alors être déterminée en dénombrant les fibres issues des cellules transplantées par le biais d'un marquage en immunofluorescence pour la dystrophine. Une révélation des cellules *Myf5⁺* au X-gal permettrait de plus de déterminer si les cellules transplantées sont capables d'intégrer la niche des cellules satellites, aspect essentiel au renouvellement musculaire à long terme. Ceci pourrait être fait en isolant les fibres. D'après nos résultats, la culture des CPM dans un environnement favorable au maintien de leurs propriétés souches devrait améliorer leur potentiel de transplantation (engraftment) par rapport à des CPM isolées de manière classique.

4.5 Conclusion

Les cellules progénitrices du muscle squelettique jouent un rôle essentiel dans le renouvellement des fibres musculaires ainsi que le remodelage de la matrice suite à un traumatisme, mais également pour maintenir l'intégrité du tissu au cours de la vie. Leur comportement est intimement lié aux signaux provenant de leur environnement (local ou systémique). La connaissance des facteurs biochimiques, biomécaniques ou cellulaires guidant leur comportement est donc un aspect clé pour une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la physiopathologie du muscle squelettique.

Les travaux présentés montrent pour la première fois une altération de l'état de différenciation des cellules satellites du muscle âgé en condition physiologique qui pourrait expliquer la diminution du potentiel régénératif du muscle vieillissant. Par ailleurs, nous avons également montré une modulation de la population mrSC dans le muscle âgé qui pourrait être impliquée dans la formation de tissu adipeux et de la fibrose du muscle vieillissant et de ce fait, dans l'augmentation de la rigidité du muscle âgé.

Nos travaux ont aussi mis en évidence une augmentation de l'activité de la voie Wnt canonique dans l'environnement musculaire et systémique des souris dystrophiques modulant le comportement des mrSC. Ces observations ont permis de mieux comprendre l'effet global d'une voie de signalisation sur les modifications du comportement cellulaire et *in fine* sur la composition du muscle squelettique. Ces travaux complètent les découvertes d'autres équipes qui ont montré un lien entre Wnt et la formation de fibrose dans le muscle âgé, mais se distinguent quant au type cellulaire impliqué, dans ce cas-ci, les mrSC.

L'aspect biomécanique de la niche et la préservation du caractère souche des cellules progénitrices est un thème de recherche qui ne s'est développé que très récemment. Nos résultats montrent pour la première fois qu'une légère augmentation de la rigidité du microenvironnement des cellules satellites favorise leur prolifération. Nous avons corrélé nos résultats obtenus *in vitro* avec une approche *in vivo* où l'on a causé avec pertes de tensions dans le muscle squelettique. Ensemble, ces résultats suggèrent que la perte de tension

mécanique peut moduler l'activation des cellules satellites et la prolifération des CPM, deux étapes essentielles à la réparation du tissu.

Finalement, nous avons mis à profit l'importante prolifération des CPM sur fibres réduites pour mettre au point une technique originale d'isolement des CPM. Cette nouvelle approche permet d'obtenir rapidement, à partir d'une faible quantité de tissus des CPM d'une grande pureté. Notre méthode d'isolement des CPM se distingue de plus de la méthode classique par le fait qu'elle est indépendante de la qualité du sérum, démontrant par le fait même l'importance du substrat de la niche par rapport aux facteurs biochimiques environnants.

Les cellules progénitrices du muscle possèdent un potentiel de régénération extraordinaire comme en fait foi la régénération du muscle au cours de la vie et à la suite d'un trauma. Par contre, l'utilisation thérapeutique des cellules progénitrices du muscle est limitée par la perte de leur caractère souche lorsque mises en culture. La caractérisation des facteurs constituant leur niche permettrait de conserver leur plein potentiel régénératif, ce qui permettrait d'utiliser cette source de cellules en médecine régénératrice afin de contrer ou prévenir les myopathies débilitantes ou encore, les effets de la sarcopénie (CONBOY et al. 2005; SCIME et al. 2010; LEBLANC et al. 2011; TRENZ et al. 2011; VON MALTZAHN et al. 2012). Les travaux présentés dans cette thèse ont donc permis d'apporter une pierre à l'édifice pour une meilleure compréhension des fondements de l'environnement complexe des cellules progénitrices du muscle squelettique.

Remerciements

Je souhaite en premier lieu remercier le professeur François Boudreau pour la codirection de ma thèse ainsi que les professeurs Julie Fradette, Pedro Miguel Geraldès et Fernand-Pierre Gendron pour avoir accepté d'être président et rapporteurs du jury de ma thèse

Mes remerciements vont également à tous les membres passés et présents du laboratoire : Sonia, Geneviève, Jennifer, Élisabeth, Marie-Soleil, Annabelle, Vanessa, André-Jean et Maxime. Chacun à votre façon m'avez permis d'évoluer, aussi bien dans mon cheminement scientifique que personnel. Je n'oublierais jamais cette merveilleuse ambiance de travail, ainsi que toutes nos discussions scientifiques stimulantes. Des remerciements particuliers vont à Vanessa, A-J et Maxime, pour m'avoir aidé à la réalisation des travaux présentés dans cette thèse.

Je tiens à remercier chaleureusement le professeur Michel Grandbois et son étudiant à la maîtrise, Thomas Söllrald, pour leur contribution dans les mesures de rigidité des fibres par AFM et l'interprétation des résultats. Mes remerciements vont aussi au professeur Martin Richter et à Alexandre Cloutier pour leur collaboration, ainsi qu'à Antony Scimè pour les révisions pertinentes de mes travaux.

Je tiens à saluer toutes les personnes que j'ai rencontrées durant mon expérience québécoise. Tous les membres du Chacaloux Crew: Ben, Mike, Foued, Dom, Vince, Seb, David, Dom, Simon, Pascal, Fab, Toun, Arno, Pierrick, pour toutes nos sorties, soirées poker et Call of ... Marie, Sonia, Laetitia, que de bons barbecues et coucous en votre compagnie. L'équipe de Volley « Les importés » avec Ben, Gen et JF. Sans vous tous, les rudes hivers québécois n'auraient pas eu la même saveur. J'espère sincèrement vous revoir !

Une pensée va évidemment à ma famille qui, malgré la distance, a toujours été présente pour m'encourager et me soutenir dans l'avancement de ma thèse.

Je pense tout particulièrement à ma douce moitié, Myriam, qui m'a suivi dans cette aventure lointaine et m'a toujours soutenu et encouragé, ainsi qu'à mon fils Lucas, petit Québécois, qui a donné un nouveau sens à ma vie.

Mes derniers remerciements, non pas les moindres, vont à mon directeur de recherche Guillaume Grenier qui fût non seulement un excellent mentor, mais aussi un véritable ami. Guillaume, les directeurs de recherche comme toi sont rares. Tu as été d'un grand soutien, tant au niveau professionnel que personnel, n'hésitant pas à venir « booster mon char » tôt le matin dans les hivers rigoureux ou à me monter des manip. Tu as instauré une excellente ambiance de travail dans le laboratoire et as su te montrer d'une très grande disponibilité (ce qui est plutôt rare), soucieux du bien-être de tes étudiants et employés. J'espère avoir la chance de travailler avec quelqu'un comme toi à l'avenir.

Liste des références

- ABRAMOFF, M. D., MAGELHAES, P. J. et RAM, S. J. (2004). "Image Processing with ImageJ." *Biophotonics International* 11(7): 36-42.
- AKHMETSHINA, A., PALUMBO, K., DEES, C., BERGMANN, C., VENALIS, P., ZERR, P., HORN, A., KIREVA, T., BEYER, C., ZWERINA, J., SCHNEIDER, H., SADOWSKI, A., RIENER, M. O., MACDOUGALD, O. A., DISTLER, O., SCHETT, G. et DISTLER, J. H. (2012). "Activation of canonical Wnt signalling is required for TGF-beta-mediated fibrosis." *Nat Commun* 3: 735.
- ALEXAKIS, C., PARTRIDGE, T. et BOU-GHARIOS, G. (2007). "Implication of the satellite cell in dystrophic muscle fibrosis: a self-perpetuating mechanism of collagen overproduction." *Am J Physiol Cell Physiol* 293(2): C661-9.
- ALMAN, B. A., LI, C., PAJERSKI, M. E., DIAZ-CANO, S. et WOLFE, H. J. (1997). "Increased beta-catenin protein and somatic APC mutations in sporadic aggressive fibromatoses (desmoid tumors)." *Am J Pathol* 151(2): 329-34.
- ALNAQEEB, M. A., AL ZAID, N. S. et GOLDSPINK, G. (1984). "Connective tissue changes and physical properties of developing and ageing skeletal muscle." *J Anat* 139 (Pt 4): 677-89.
- ANAKWE, K., ROBSON, L., HADLEY, J., BUXTON, P., CHURCH, V., ALLEN, S., HARTMANN, C., HARFE, B., NOHNO, T., BROWN, A. M., EVANS, D. J. et FRANCIS-WEST, P. (2003). "Wnt signalling regulates myogenic differentiation in the developing avian wing." *Development* 130(15): 3503-14.
- ANASTAS, J. N. et MOON, R. T. (2013). "WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer." *Nat Rev Cancer* 13(1): 11-26.
- ARCE, L., YOKOYAMA, N. N. et WATERMAN, M. L. (2006). "Diversity of LEF/TCF action in development and disease." *Oncogene* 25(57): 7492-504.
- ARNOLD, L., HENRY, A., PORON, F., BABA-AMER, Y., VAN ROOIJEN, N., PLONQUET, A., GHERARDI, R. K. et CHAZAUD, B. (2007). "Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis." *J Exp Med* 204(5): 1057-69.
- ARTHUR, S. T. et COOLEY, I. D. (2012). "The effect of physiological stimuli on sarcopenia; impact of Notch and Wnt signaling on impaired aged skeletal muscle repair." *Int J Biol Sci* 8(5): 731-60.
- ASAKURA, A. et RUDNICKI, M. A. (2002). "Side population cells from diverse adult tissues are capable of in vitro hematopoietic differentiation." *Exp Hematol* 30(11): 1339-45.
- ASAKURA, A., SEALE, P., GIRGIS-GABARDO, A. et RUDNICKI, M. A. (2002). "Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle." *J Cell Biol* 159(1): 123-34.
- BAFICO, A., LIU, G., YANIV, A., GAZIT, A. et AARONSON, S. A. (2001). "Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow." *Nat Cell Biol* 3(7): 683-6.

- BAKSH, D., BOLAND, G. M. et TUAN, R. S. (2007). "Cross-talk between Wnt signaling pathways in human mesenchymal stem cells leads to functional antagonism during osteogenic differentiation." *J Cell Biochem* 101(5): 1109-24.
- BARANI, A. E., DURIEUX, A. C., SABIDO, O. et FREYSSENET, D. (2003). "Age-related changes in the mitotic and metabolic characteristics of muscle-derived cells." *J Appl Physiol* 95(5): 2089-98.
- BARDEN, J. A., MIKI, M., HAMBLY, B. D. et DOS REMEDIOS, C. G. (1987). "Localization of the phalloidin and nucleotide-binding sites on actin." *Eur J Biochem* 162(3): 583-8.
- BEAUCHAMP, J. R., HESLOP, L., YU, D. S., TAJBAKHS, S., KELLY, R. G., WERNIG, A., BUCKINGHAM, M. E., PARTRIDGE, T. A. et ZAMMIT, P. S. (2000). "Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells." *J Cell Biol* 151(6): 1221-34.
- BEAUCHAMP, J. R., MORGAN, J. E., PAGEL, C. N. et PARTRIDGE, T. A. (1999). "Dynamics of myoblast transplantation reveal a discrete minority of precursors with stem cell-like properties as the myogenic source." *J Cell Biol* 144(6): 1113-22.
- BECCAFICO, S., PUGLIELLI, C., PIETRANGELO, T., BELLOMO, R., FANO, G. et FULLE, S. (2007). "Age-dependent effects on functional aspects in human satellite cells." *Ann N Y Acad Sci* 1100: 345-52.
- BEDAIR, H. S., KARTHIKEYAN, T., QUINTERO, A., LI, Y. et HUARD, J. (2008). "Angiotensin II receptor blockade administered after injury improves muscle regeneration and decreases fibrosis in normal skeletal muscle." *Am J Sports Med* 36(8): 1548-54.
- BEINER, J. M. et JOKL, P. (2001). "Muscle contusion injuries: current treatment options." *J Am Acad Orthop Surg* 9(4): 227-37.
- BEKOFF, A. et BETZ, W. (1977). "Properties of isolated adult rat muscle fibres maintained in tissue culture." *J Physiol* 271(2): 537-47.
- BENTZINGER, C. F., WANG, Y. X. et RUDNICKI, M. A. (2012). "Building muscle: molecular regulation of myogenesis." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(2).
- BERRY, S. E., LIU, J., CHANEY, E. J. et KAUFMAN, S. J. (2007). "Multipotential mesoangioblast stem cell therapy in the mdx/utrn^{-/-} mouse model for Duchenne muscular dystrophy." *Regen Med* 2(3): 275-88.
- BIERNACKA, A., DOBACZEWSKI, M. et FRANGOGIANNIS, N. G. (2011). "TGF-beta signaling in fibrosis." *Growth Factors* 29(5): 196-202.
- BIGGAR, W. D. (2006). "Duchenne muscular dystrophy." *Pediatr Rev* 27(3): 83-8.
- BIRESSI, S. et RANDO, T. A. (2010). "Heterogeneity in the muscle satellite cell population." *Semin Cell Dev Biol* 21(8): 845-54.
- BIRESSI, S., TAGLIAFICO, E., LAMORTE, G., MONTEVERDE, S., TENEDINI, E., RONCAGLIA, E., FERRARI, S., CUSELLA-DE ANGELIS, M. G., TAJBAKHS, S. et COSSU, G. (2007). "Intrinsic phenotypic diversity of embryonic and fetal myoblasts is revealed by genome-wide gene expression analysis on purified cells." *Dev Biol* 304(2): 633-51.
- BISCHOFF, R. (1986). "Proliferation of muscle satellite cells on intact myofibers in culture." *Dev Biol* 115(1): 129-39.

- BISCHOFF, R. (1989). "Analysis of muscle regeneration using single myofibers in culture." *Med Sci Sports Exerc* 21(5 Suppl): S164-72.
- BISCHOFF, R. (1990). "Interaction between satellite cells and skeletal muscle fibers." *Development* 109(4): 943-52.
- BLAKE, D. J., WEIR, A., NEWAY, S. E. et DAVIES, K. E. (2002). "Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle." *Physiol Rev* 82(2): 291-329.
- BLOCH, R. J. et GONZALEZ-SERRATOS, H. (2003). "Lateral force transmission across costameres in skeletal muscle." *Exerc Sport Sci Rev* 31(2): 73-8.
- BOLAND, G. M., PERKINS, G., HALL, D. J. et TUAN, R. S. (2004). "Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells." *J Cell Biochem* 93(6): 1210-30.
- BOLDRIN, L., NEAL, A., ZAMMIT, P. S., MUNTONI, F. et MORGAN, J. E. (2012). "Donor satellite cell engraftment is significantly augmented when the host niche is preserved and endogenous satellite cells are incapacitated." *Stem Cells* 30(9): 1971-84.
- BONNIAUD, P., MARGETTS, P. J., ASK, K., FLANDERS, K., GAULDIE, J. et KOLB, M. (2005). "TGF-beta and Smad3 signaling link inflammation to chronic fibrogenesis." *J Immunol* 175(8): 5390-5.
- BOONEN, K. J. et POST, M. J. (2008). "The muscle stem cell niche: regulation of satellite cells during regeneration." *Tissue Eng Part B Rev* 14(4): 419-31.
- BOONEN, K. J., ROSARIA-CHAK, K. Y., BAAIJENS, F. P., VAN DER SCHAFT, D. W. et POST, M. J. (2009). "Essential environmental cues from the satellite cell niche: optimizing proliferation and differentiation." *Am J Physiol Cell Physiol* 296(6): C1338-45.
- BOSNAKOVSKI, D., XU, Z., LI, W., THET, S., CLEAVER, O., PERLINGEIRO, R. C. et KYBA, M. (2008). "Prospective isolation of skeletal muscle stem cells with a Pax7 reporter." *Stem Cells* 26(12): 3194-204.
- BOURIN, P., BUNNELL, B. A., CASTEILLA, L., DOMINICI, M., KATZ, A. J., MARCH, K. L., REDL, H., RUBIN, J. P., YOSHIMURA, K. et GIMBLE, J. M. (2013). "Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT)." *Cytotherapy* 15(6): 641-8.
- BRACK, A. S., BILDSE, H. et HUGHES, S. M. (2005). "Evidence that satellite cell decrement contributes to preferential decline in nuclear number from large fibres during murine age-related muscle atrophy." *J Cell Sci* 118(Pt 20): 4813-21.
- BRACK, A. S., CONBOY, I. M., CONBOY, M. J., SHEN, J. et RANDO, T. A. (2008). "A temporal switch from notch to Wnt signaling in muscle stem cells is necessary for normal adult myogenesis." *Cell Stem Cell* 2(1): 50-9.
- BRACK, A. S., CONBOY, M. J., ROY, S., LEE, M., KUO, C. J., KELLER, C. et RANDO, T. A. (2007). "Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis." *Science* 317(5839): 807-10.

- BRACK, A. S., MURPHY-SEILER, F., HANIFI, J., DEKA, J., EYCKERMAN, S., KELLER, C., AGUET, M. et RANDO, T. A. (2009). "BCL9 is an essential component of canonical Wnt signaling that mediates the differentiation of myogenic progenitors during muscle regeneration." *Dev Biol* 335(1): 93-105.
- BRACK, A. S. et RANDO, T. A. (2007). "Intrinsic changes and extrinsic influences of myogenic stem cell function during aging." *Stem Cell Rev* 3(3): 226-37.
- BRAUN, T., RUDNICKI, M. A., ARNOLD, H. H. et JAENISCH, R. (1992). "Targeted inactivation of the muscle regulatory gene Myf-5 results in abnormal rib development and perinatal death." *Cell* 71(3): 369-82.
- BROHL, D., VASYUTINA, E., CZAJKOWSKI, M. T., GRIGER, J., RASSEK, C., RAHN, H. P., PURFURST, B., WENDE, H. et BIRCHMEIER, C. (2012). "Colonization of the satellite cell niche by skeletal muscle progenitor cells depends on Notch signals." *Dev Cell* 23(3): 469-81.
- BROOKS, S. V. et FAULKNER, J. A. (1990). "Contraction-induced injury: recovery of skeletal muscles in young and old mice." *Am J Physiol* 258(3 Pt 1): C436-42.
- BUAS, M. F., KABAK, S. et KADESCH, T. (2010). "The Notch effector Hey1 associates with myogenic target genes to repress myogenesis." *J Biol Chem* 285(2): 1249-58.
- BURKIN, D. J. et KAUFMAN, S. J. (1999). "The alpha7beta1 integrin in muscle development and disease." *Cell Tissue Res* 296(1): 183-90.
- BURTON, N. M., VIERCK, J., KRABbenhOFT, L., BRYNE, K. et DODSON, M. V. (2000). "Methods for animal satellite cell culture under a variety of conditions." *Methods Cell Sci* 22(1): 51-61.
- BUTCHER, D. T., ALLISTON, T. et WEAVER, V. M. (2009). "A tense situation: forcing tumour progression." *Nat Rev Cancer* 9(2): 108-22.
- CALVE, S. et SIMON, H. G. (2012). "Biochemical and mechanical environment cooperatively regulate skeletal muscle regeneration." *FASEB J* 26(6): 2538-45.
- CAN, A. et BALCI, D. (2011). "Isolation, culture, and characterization of human umbilical cord stroma-derived mesenchymal stem cells." *Methods Mol Biol* 698: 51-62.
- CANATO, M., DAL MASCHIO, M., SBRANA, F., RAITERI, R., REGGIANI, C., VASSANELLI, S. et MEGIGHIAN, A. (2010). "Mechanical and electrophysiological properties of the sarcolemma of muscle fibers in two murine models of muscle dystrophy: col6a1^{-/-} and mdx." *J Biomed Biotechnol* 2010: 981945.
- CAO, B., DEASY, B. M., POLLETT, J. et HUARD, J. (2005). "Cell therapy for muscle regeneration and repair." *Phys Med Rehabil Clin N Am* 16(4): 889-907, viii.
- CARLSON, B. M., DEDKOV, E. I., BORISOV, A. B. et FAULKNER, J. A. (2001). "Skeletal muscle regeneration in very old rats." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 56(5): B224-33.
- CARLSON, B. M. et FAULKNER, J. A. (1989). "Muscle transplantation between young and old rats: age of host determines recovery." *Am J Physiol* 256(6 Pt 1): C1262-6.

- CARLSON, M. E., HSU, M. et CONBOY, I. M. (2008). "Imbalance between pSmad3 and Notch induces CDK inhibitors in old muscle stem cells." *Nature* 454(7203): 528-32.
- CARLSON, M. E., SUETTA, C., CONBOY, M. J., AAGAARD, P., MACKEY, A., KJAER, M. et CONBOY, I. (2009). "Molecular aging and rejuvenation of human muscle stem cells." *EMBO Mol Med* 1(8-9): 381-91.
- CAROSIO, S., BERARDINELLI, M. G., AUCELLO, M. et MUSARO, A. (2011). "Impact of ageing on muscle cell regeneration." *Ageing Res Rev* 10(1): 35-42.
- CARTHY, J. M., GARMAROUDI, F. S., LUO, Z. et MCMANUS, B. M. (2011). "Wnt3a induces myofibroblast differentiation by upregulating TGF-beta signaling through SMAD2 in a beta-catenin-dependent manner." *PLoS One* 6(5): e19809.
- CENCETTI, F., BERNACCHIONI, C., NINCHERI, P., DONATI, C. et BRUNI, P. (2010). "Transforming growth factor-beta1 induces transdifferentiation of myoblasts into myofibroblasts via up-regulation of sphingosine kinase-1/S1P3 axis." *Mol Biol Cell* 21(6): 1111-24.
- CERLETTI, M., JURGA, S., WITCZAK, C. A., HIRSHMAN, M. F., SHADRACH, J. L., GOODYEAR, L. J. et WAGERS, A. J. (2008). "Highly efficient, functional engraftment of skeletal muscle stem cells in dystrophic muscles." *Cell* 134(1): 37-47.
- CHAKKALAKAL, J. V., JONES, K. M., BASSON, M. A. et BRACK, A. S. (2012). "The aged niche disrupts muscle stem cell quiescence." *Nature* 490(7420): 355-60.
- CHAMORRO, M. N., SCHWARTZ, D. R., VONICA, A., BRIVANLOU, A. H., CHO, K. R. et VARMUS, H. E. (2005). "FGF-20 and DKK1 are transcriptional targets of beta-catenin and FGF-20 is implicated in cancer and development." *EMBO J* 24(1): 73-84.
- CHAN, Y. S., LI, Y., FOSTER, W., HORAGUCHI, T., SOMOGYI, G., FU, F. H. et HUARD, J. (2003). "Antifibrotic effects of suramin in injured skeletal muscle after laceration." *J Appl Physiol* 95(2): 771-80.
- CHARGE, S. B. et RUDNICKI, M. A. (2004). "Cellular and molecular regulation of muscle regeneration." *Physiol Rev* 84(1): 209-38.
- CHAZAUD, B., SONNET, C., LAFUSTE, P., BASSEZ, G., RIMANIOL, A. C., PORON, F., AUTHIER, F. J., DREYFUS, P. A. et GHERARDI, R. K. (2003). "Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth." *J Cell Biol* 163(5): 1133-43.
- CHE, X., GUO, J., WANG, B. et BAI, Y. (2011). "Rapid isolation of muscle-derived stem cells by discontinuous Percoll density gradient centrifugation." *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 47(7): 454-8.
- CHEN, X. et LI, Y. (2009). "Role of matrix metalloproteinases in skeletal muscle: migration, differentiation, regeneration and fibrosis." *Cell Adh Migr* 3(4): 337-41.
- CHEON, S. S., CHEAH, A. Y., TURLEY, S., NADESAN, P., POON, R., CLEVERS, H. et ALMAN, B. A. (2002). "beta-Catenin stabilization dysregulates mesenchymal cell proliferation, motility, and invasiveness and causes aggressive

- fibromatosis and hyperplastic cutaneous wounds." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(10): 6973-8.
- CHEON, S. S., WEI, Q., GURUNG, A., YOUN, A., BRIGHT, T., POON, R., WHETSTONE, H., GUHA, A. et ALMAN, B. A. (2006). "Beta-catenin regulates wound size and mediates the effect of TGF-beta in cutaneous healing." *FASEB J* 20(6): 692-701.
- CHIANG, C., LITINGTUNG, Y., LEE, E., YOUNG, K. E., CORDEN, J. L., WESTPHAL, H. et BEACHY, P. A. (1996). "Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function." *Nature* 383(6599): 407-13.
- CHILOSI, M., POLETTI, V., ZAMO, A., LESTANI, M., MONTAGNA, L., PICCOLI, P., PEDRON, S., BERTASO, M., SCARPA, A., MURER, B., CANCELLIERI, A., MAESTRO, R., SEMENZATO, G. et DOGLIONI, C. (2003). "Aberrant Wnt/beta-catenin pathway activation in idiopathic pulmonary fibrosis." *Am J Pathol* 162(5): 1495-502.
- CHIQUET, M. (1999). "Regulation of extracellular matrix gene expression by mechanical stress." *Matrix Biol* 18(5): 417-26.
- CHIQUET, M., GELMAN, L., LUTZ, R. et MAIER, S. (2009). "From mechanotransduction to extracellular matrix gene expression in fibroblasts." *Biochim Biophys Acta* 1793(5): 911-20.
- CHO, H. H., KIM, Y. J., KIM, S. J., KIM, J. H., BAE, Y. C., BA, B. et JUNG, J. S. (2006). "Endogenous Wnt signaling promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation in human adipose derived stromal cells." *Tissue Eng* 12(1): 111-21.
- CHRISTOV, C., CHRETIEN, F., ABOU-KHALIL, R., BASSEZ, G., VALLET, G., AUTHIER, F. J., BASSAGLIA, Y., SHININ, V., TAJBAKHS, S., CHAZAUD, B. et GHERARDI, R. K. (2007). "Muscle satellite cells and endothelial cells: close neighbors and privileged partners." *Mol Biol Cell* 18(4): 1397-409.
- CIFUENTES-DIAZ, C., NICOLET, M., ALAMEDDINE, H., GOUDOU, D., DEHAUPAS, M., RIEGER, F. et MEGE, R. M. (1995). "M-cadherin localization in developing adult and regenerating mouse skeletal muscle: possible involvement in secondary myogenesis." *Mech Dev* 50(1): 85-97.
- CLEVERS, H. (2006). "Wnt/beta-catenin signaling in development and disease." *Cell* 127(3): 469-80.
- COHN, R. D., VAN ERP, C., HABASHI, J. P., SOLEIMANI, A. A., KLEIN, E. C., LISI, M. T., GAMRADT, M., AP RHYS, C. M., HOLM, T. M., LOEYS, B. L., RAMIREZ, F., JUDGE, D. P., WARD, C. W. et DIETZ, H. C. (2007). "Angiotensin II type 1 receptor blockade attenuates TGF-beta-induced failure of muscle regeneration in multiple myopathic states." *Nat Med* 13(2): 204-10.
- COLLINS, C. A., OLSEN, I., ZAMMIT, P. S., HESLOP, L., PETRIE, A., PARTRIDGE, T. A. et MORGAN, J. E. (2005). "Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche." *Cell* 122(2): 289-301.
- COLLINSWORTH, A. M., ZHANG, S., KRAUS, W. E. et TRUSKEY, G. A. (2002). "Apparent elastic modulus and hysteresis of skeletal muscle cells throughout differentiation." *Am J Physiol Cell Physiol* 283(4): C1219-27.

- COMBARET, L., DARDEVET, D., BECHET, D., TAILLANDIER, D., MOSONI, L. et ATTAIX, D. (2009). "Skeletal muscle proteolysis in aging." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 12(1): 37-41.
- CONBOY, I. M., CONBOY, M. J., SMYTHE, G. M. et RANDO, T. A. (2003). "Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle." *Science* 302(5650): 1575-7.
- CONBOY, I. M., CONBOY, M. J., WAGERS, A. J., GIRMA, E. R., WEISSMAN, I. L. et RANDO, T. A. (2005). "Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment." *Nature* 433(7027): 760-4.
- CONBOY, I. M. et RANDO, T. A. (2002). "The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis." *Dev Cell* 3(3): 397-409.
- COOPER, J. A. (1987). "Effects of cytochalasin and phalloidin on actin." *J Cell Biol* 105(4): 1473-8.
- CORNELISON, D. D., FILLA, M. S., STANLEY, H. M., RAPRAEGER, A. C. et OLWIN, B. B. (2001). "Syndecan-3 and syndecan-4 specifically mark skeletal muscle satellite cells and are implicated in satellite cell maintenance and muscle regeneration." *Dev Biol* 239(1): 79-94.
- CORNELISON, D. D., WILCOX-ADELMAN, S. A., GOETINCK, P. F., RAUVALA, H., RAPRAEGER, A. C. et OLWIN, B. B. (2004). "Essential and separable roles for Syndecan-3 and Syndecan-4 in skeletal muscle development and regeneration." *Genes Dev* 18(18): 2231-6.
- CORNELISON, D. D. et WOLD, B. J. (1997). "Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells." *Dev Biol* 191(2): 270-83.
- COSGROVE, B. D., SACCO, A., GILBERT, P. M. et BLAU, H. M. (2009). "A home away from home: challenges and opportunities in engineering in vitro muscle satellite cell niches." *Differentiation* 78(2-3): 185-94.
- COSSU, G. et BIANCO, P. (2003). "Mesoangioblasts--vascular progenitors for extravascular mesodermal tissues." *Curr Opin Genet Dev* 13(5): 537-42.
- COSSU, G. et BORELLO, U. (1999). "Wnt signaling and the activation of myogenesis in mammals." *EMBO J* 18(24): 6867-72.
- COUTEAUX, R., MIRA, J. C. et D'ALBIS, A. (1988). "Regeneration of muscles after cardiotoxin injury. I. Cytological aspects." *Biol Cell* 62(2): 171-82.
- CRISAN, M., YAP, S., CASTEILLA, L., CHEN, C. W., CORSELLI, M., PARK, T. S., ANDRIOLO, G., SUN, B., ZHENG, B., ZHANG, L., NOROTTE, C., TENG, P. N., TRAAS, J., SCHUGAR, R., DEASY, B. M., BADYLAK, S., BUHRING, H. J., GIACOBINO, J. P., LAZZARI, L., HUARD, J. et PEAULT, B. (2008). "A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs." *Cell Stem Cell* 3(3): 301-13.
- D'ALBIS, A., COUTEAUX, R., JANMOT, C., ROULET, A. et MIRA, J. C. (1988). "Regeneration after cardiotoxin injury of innervated and denervated slow and fast muscles of mammals. Myosin isoform analysis." *Eur J Biochem* 174(1): 103-10.

- D'ANGELO, F., TIRIBUZI, R., ARMENTANO, I., KENNY, J. M., MARTINO, S. et ORLACCHIO, A. (2011). "Mechanotransduction: Tuning Stem Cells Fate." *Journal of Functional Biomaterials* 2(2): 67-87.
- DAY, K., SHEFER, G., RICHARDSON, J. B., ENIKOLOPOV, G. et YABLONKA-REUVENI, Z. (2007). "Nestin-GFP reporter expression defines the quiescent state of skeletal muscle satellite cells." *Dev Biol* 304(1): 246-59.
- DAY, K., SHEFER, G., SHEARER, A. et YABLONKA-REUVENI, Z. (2010). "The depletion of skeletal muscle satellite cells with age is concomitant with reduced capacity of single progenitors to produce reserve progeny." *Dev Biol* 340(2): 330-43.
- DECONINCK, N. et DAN, B. (2007). "Pathophysiology of duchenne muscular dystrophy: current hypotheses." *Pediatr Neurol* 36(1): 1-7.
- DEDKOV, E. I., KOSTROMINOVA, T. Y., BORISOV, A. B. et CARLSON, B. M. (2003). "MyoD and myogenin protein expression in skeletal muscles of senile rats." *Cell Tissue Res* 311(3): 401-16.
- DEFRANCHI, E., BONACCURSO, E., TEDESCO, M., CANATO, M., PAVAN, E., RAITERI, R. et REGGIANI, C. (2005). "Imaging and elasticity measurements of the sarcolemma of fully differentiated skeletal muscle fibres." *Microsc Res Tech* 67(1): 27-35.
- DEGENS, H. (2007). "Age-related skeletal muscle dysfunction: causes and mechanisms." *J Musculoskelet Neuronal Interact* 7(3): 246-52.
- DEKEL, B., ZANGI, L., SHEZEN, E., REICH-ZELIGER, S., EVENTOV-FRIEDMAN, S., KATCHMAN, H., JACOB-HIRSCH, J., AMARIGLIO, N., REHAVI, G., MARGALIT, R. et REISNER, Y. (2006). "Isolation and characterization of nontubular sca-1+lin- multipotent stem/progenitor cells from adult mouse kidney." *J Am Soc Nephrol* 17(12): 3300-14.
- DELLAVALLE, A., SAMPAOLESI, M., TONLORENZI, R., TAGLIAFICO, E., SACCHETTI, B., PERANI, L., INNOCENZI, A., GALVEZ, B. G., MESSINA, G., MOROSETTI, R., LI, S., BELICCHI, M., PERETTI, G., CHAMBERLAIN, J. S., WRIGHT, W. E., TORRENTE, Y., FERRARI, S., BIANCO, P. et COSSU, G. (2007). "Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells." *Nat Cell Biol* 9(3): 255-67.
- DI FOGGIA, V. et ROBSON, L. (2012). "Isolation of satellite cells from single muscle fibers from young, aged, or dystrophic muscles." *Methods Mol Biol* 916: 3-14.
- DI IORIO, A., ABATE, M., DI RENZO, D., RUSSOLILLO, A., BATTAGLINI, C., RIPARI, P., SAGGINI, R., PAGANELLI, R. et ABATE, G. (2006). "Sarcopenia: age-related skeletal muscle changes from determinants to physical disability." *Int J Immunopathol Pharmacol* 19(4): 703-19.
- DIMARIO, J., BUFFINGER, N., YAMADA, S. et STROHMAN, R. C. (1989). "Fibroblast growth factor in the extracellular matrix of dystrophic (mdx) mouse muscle." *Science* 244(4905): 688-90.
- DOMINICI, M., LE BLANC, K., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F., KRAUSE, D., DEANS, R., KEATING, A., PROCKOP, D. et HORWITZ, E. (2006). "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The

- International Society for Cellular Therapy position statement." *Cytotherapy* 8(4): 315-7.
- DURBEEJ, M. et CAMPBELL, K. P. (2002). "Muscular dystrophies involving the dystrophin-glycoprotein complex: an overview of current mouse models." *Curr Opin Genet Dev* 12(3): 349-61.
- EMERY, A. E. (2002). "The muscular dystrophies." *Lancet* 359(9307): 687-95.
- ENGELUND, D. et KJERSGAARD, A. G. (1991). "[Acute compartment syndrome]." *Ugeskr Laeger* 153(16): 1110-3.
- ENGLER, A., BACAKOVA, L., NEWMAN, C., HATEGAN, A., GRIFFIN, M. et DISCHER, D. (2004)a. "Substrate compliance versus ligand density in cell on gel responses." *Biophys J* 86(1 Pt 1): 617-28.
- ENGLER, A. J., GRIFFIN, M. A., SEN, S., BONNEMANN, C. G., SWEENEY, H. L. et DISCHER, D. E. (2004)b. "Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: pathological implications for soft or stiff microenvironments." *J Cell Biol* 166(6): 877-87.
- ENGLER, A. J., SEN, S., SWEENEY, H. L. et DISCHER, D. E. (2006). "Matrix elasticity directs stem cell lineage specification." *Cell* 126(4): 677-89.
- ERVASTI, J. M. (2007). "Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy." *Biochim Biophys Acta* 1772(2): 108-17.
- FAN, J., VARSHNEY, R. R., REN, L., CAI, D. et WANG, D. A. (2009). "Synovium-derived mesenchymal stem cells: a new cell source for musculoskeletal regeneration." *Tissue Eng Part B Rev* 15(1): 75-86.
- FAULKNER, J. A., LARKIN, L. M., CLAFLIN, D. R. et BROOKS, S. V. (2007). "Age-related changes in the structure and function of skeletal muscles." *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34(11): 1091-6.
- FENG, X., ADIARTE, E. G. et DEVOTO, S. H. (2006). "Hedgehog acts directly on the zebrafish dermomyotome to promote myogenic differentiation." *Dev Biol* 300(2): 736-46.
- FLANAGAN, L. A., JU, Y. E., MARG, B., OSTERFIELD, M. et JANMEY, P. A. (2002). "Neurite branching on deformable substrates." *Neuroreport* 13(18): 2411-5.
- FLORINI, J. R., EWTON, D. Z. et MAGRI, K. A. (1991). "Hormones, growth factors, and myogenic differentiation." *Annu Rev Physiol* 53: 201-16.
- FLURKEY, K., CURRER, J. M. et D.E., H. (2007). Mouse Models in Aging Research. *The Mouse in Biomedical Research*. J. G. Fox, S.W., B., M.T., D. et al, Elsevier. 3: 639-668.
- FRIEDENSTEIN, A. J., CHAILAKHJAN, R. K. et LALYKINA, K. S. (1970). "The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells." *Cell Tissue Kinet* 3(4): 393-403.
- FRIEDENSTEIN, A. J., GORSKAJA, J. F. et KULAGINA, N. N. (1976). "Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs." *Exp Hematol* 4(5): 267-74.
- FRONTERA, W. R., HUGHES, V. A., FIELDING, R. A., FIATARONE, M. A., EVANS, W. J. et ROUBENOFF, R. (2000). "Aging of skeletal muscle: a 12-yr longitudinal study." *J Appl Physiol* 88(4): 1321-6.

- FUCHS, E., TUMBAR, T. et GUASCH, G. (2004). "Socializing with the neighbors: stem cells and their niche." *Cell* 116(6): 769-78.
- GANG, E. J., BOSNAKOVSKI, D., SIMSEK, T., TO, K. et PERLINGEIRO, R. C. (2008). "Pax3 activation promotes the differentiation of mesenchymal stem cells toward the myogenic lineage." *Exp Cell Res* 314(8): 1721-33.
- GANG, E. J., JEONG, J. A., HONG, S. H., HWANG, S. H., KIM, S. W., YANG, I. H., AHN, C., HAN, H. et KIM, H. (2004). "Skeletal myogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from human umbilical cord blood." *Stem Cells* 22(4): 617-24.
- GAO, Y., KOSTROMINOVA, T. Y., FAULKNER, J. A. et WINEMAN, A. S. (2008). "Age-related changes in the mechanical properties of the epimysium in skeletal muscles of rats." *J Biomech* 41(2): 465-9.
- GAVRIATOPOULOU, M., DIMOPOULOS, M. A., CHRISTOULAS, D., MIGKOU, M., IAKOVAKI, M., GKOTZAMANIDOU, M. et TERPOS, E. (2009). "Dickkopf-1: a suitable target for the management of myeloma bone disease." *Expert Opin Ther Targets* 13(7): 839-48.
- GAYRAUD-MOREL, B., CHRETIEN, F., FLAMANT, P., GOMES, D., ZAMMIT, P. S. et TAJBAKSH, S. (2007). "A role for the myogenic determination gene Myf5 in adult regenerative myogenesis." *Dev Biol* 312(1): 13-28.
- GAYRAUD-MOREL, B., CHRETIEN, F., JORY, A., SAMBASIVAN, R., NEGRONI, E., FLAMANT, P., SOUBIGOU, G., COPPEE, J. Y., DI SANTO, J., CUMANO, A., MOULY, V. et TAJBAKSH, S. (2012). "Myf5 haploinsufficiency reveals distinct cell fate potentials for adult skeletal muscle stem cells." *J Cell Sci* 125(Pt 7): 1738-49.
- GEIGER, B., SPATZ, J. P. et BERSHADSKY, A. D. (2009). "Environmental sensing through focal adhesions." *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(1): 21-33.
- GHARAIBEH, B., LU, A., TEBBETS, J., ZHENG, B., FEDUSKA, J., CRISAN, M., PEULT, B., CUMMINS, J. et HUARD, J. (2008). "Isolation of a slowly adhering cell fraction containing stem cells from murine skeletal muscle by the preplate technique." *Nat Protoc* 3(9): 1501-9.
- GIBSON, M. C. et SCHULTZ, E. (1983). "Age-related differences in absolute numbers of skeletal muscle satellite cells." *Muscle Nerve* 6(8): 574-80.
- GILBERT, P. M., HAVENSTRITE, K. L., MAGNUSSON, K. E., SACCO, A., LEONARDI, N. A., KRAFT, P., NGUYEN, N. K., THRUN, S., LUTOLF, M. P. et BLAU, H. M. (2010). "Substrate elasticity regulates skeletal muscle stem cell self-renewal in culture." *Science* 329(5995): 1078-81.
- GILLIES, A. R. et LIEBER, R. L. (2011). "Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix." *Muscle Nerve* 44(3): 318-31.
- GLASS, D. J. (2010). "Signaling pathways perturbing muscle mass." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 13(3): 225-9.
- GNOCCHI, V. F., WHITE, R. B., ONO, Y., ELLIS, J. A. et ZAMMIT, P. S. (2009). "Further characterisation of the molecular signature of quiescent and activated mouse muscle satellite cells." *PLoS One* 4(4): e5205.

- GOLDING, J. P., CALDERBANK, E., PARTRIDGE, T. A. et BEAUCHAMP, J. R. (2007). "Skeletal muscle stem cells express anti-apoptotic ErbB receptors during activation from quiescence." *Exp Cell Res* 313(2): 341-56.
- GOPINATH, S. D. et RANDO, T. A. (2008). "Stem cell review series: aging of the skeletal muscle stem cell niche." *Aging Cell* 7(4): 590-8.
- GORDON, M. K. et HAHN, R. A. (2010). "Collagens." *Cell Tissue Res* 339(1): 247-57.
- GOSSELIN, L. E., ADAMS, C., COTTER, T. A., McCORMICK, R. J. et THOMAS, D. P. (1998). "Effect of exercise training on passive stiffness in locomotor skeletal muscle: role of extracellular matrix." *J Appl Physiol* 85(3): 1011-6.
- GOSSELIN, L. E., WILLIAMS, J. E., DEERING, M., BRAZEAU, D., KOURY, S. et MARTINEZ, D. A. (2004). "Localization and early time course of TGF-beta 1 mRNA expression in dystrophic muscle." *Muscle Nerve* 30(5): 645-53.
- GRENIER, G., SCIME, A., LE GRAND, F., ASAKURA, A., PEREZ-IRATXETA, C., ANDRADE-NAVARRO, M. A., LABOSKY, P. A. et RUDNICKI, M. A. (2007). "Resident endothelial precursors in muscle, adipose, and dermis contribute to postnatal vasculogenesis." *Stem Cells* 25(12): 3101-10.
- GRONTHOS, S., MANKANI, M., BRAHIM, J., ROBEY, P. G. et SHI, S. (2000). "Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(25): 13625-30.
- GROUNDS, M. D. (1998). "Age-associated changes in the response of skeletal muscle cells to exercise and regeneration." *Ann N Y Acad Sci* 854: 78-91.
- GROUNDS, M. D., SOROKIN, L. et WHITE, J. (2005). "Strength at the extracellular matrix-muscle interface." *Scand J Med Sci Sports* 15(6): 381-91.
- GUILAK, F., COHEN, D. M., ESTES, B. T., GIMBLE, J. M., LIEDTKE, W. et CHEN, C. S. (2009). "Control of stem cell fate by physical interactions with the extracellular matrix." *Cell Stem Cell* 5(1): 17-26.
- GUMERSON, J. D. et MICHELE, D. E. (2011). "The dystrophin-glycoprotein complex in the prevention of muscle damage." *J Biomed Biotechnol* 2011: 210797.
- GUO, C., WILLEM, M., WERNER, A., RAIVICH, G., EMERSON, M., NEYSES, L. et MAYER, U. (2006). "Absence of alpha 7 integrin in dystrophin-deficient mice causes a myopathy similar to Duchenne muscular dystrophy." *Hum Mol Genet* 15(6): 989-98.
- GUO, K., WANG, J., ANDRES, V., SMITH, R. C. et WALSH, K. (1995). "MyoD-induced expression of p21 inhibits cyclin-dependent kinase activity upon myocyte terminal differentiation." *Mol Cell Biol* 15(7): 3823-9.
- GUO, Z. X. et QIU, M. C. (2003). "[Losartan downregulates the expression of transforming growth factor beta type I and type II receptors in kidney of diabetic rat]." *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 42(6): 403-8.
- GUSSONI, E., BLAU, H. M. et KUNKEL, L. M. (1997). "The fate of individual myoblasts after transplantation into muscles of DMD patients." *Nat Med* 3(9): 970-7.
- HALEVY, O., NOVITCH, B. G., SPICER, D. B., SKAPEK, S. X., RHEE, J., HANNON, G. J., BEACH, D. et LASSAR, A. B. (1995). "Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD." *Science* 267(5200): 1018-21.

- HALL-CRAGGS, E. C. (1974). "Rapid degeneration and regeneration of a whole skeletal muscle following treatment with bupivacaine (Marcain)." *Exp Neurol* 43(2): 349-58.
- HAREL, I., NATHAN, E., TIROSH-FINKEL, L., ZIGDON, H., GUIMARAES-CAMBOA, N., EVANS, S. M. et TZAHOR, E. (2009). "Distinct origins and genetic programs of head muscle satellite cells." *Dev Cell* 16(6): 822-32.
- HARRIS, J. B. et JOHNSON, M. A. (1978). "Further observations on the pathological responses of rat skeletal muscle to toxins isolated from the venom of the Australian tiger snake, *Notechis scutatus scutatus*." *Clin Exp Pharmacol Physiol* 5(6): 587-600.
- HASTEN, D. L., PAK-LODUCA, J., OBERT, K. A. et YARASHESKI, K. E. (2000). "Resistance exercise acutely increases MHC and mixed muscle protein synthesis rates in 78-84 and 23-32 yr olds." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278(4): E620-6.
- HAUS, J. M., CARRITHERS, J. A., TRAPPE, S. W. et TRAPPE, T. A. (2007). "Collagen, cross-linking, and advanced glycation end products in aging human skeletal muscle." *J Appl Physiol* 103(6): 2068-76.
- HAWKE, T. J. et GARRY, D. J. (2001). "Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology." *J Appl Physiol* 91(2): 534-51.
- HAYDEN, M. S. et GHOSH, S. (2008). "Shared principles in NF-kappaB signaling." *Cell* 132(3): 344-62.
- HE, T. C., SPARKS, A. B., RAGO, C., HERMEKING, H., ZAWEL, L., DA COSTA, L. T., MORIN, P. J., VOGELSTEIN, B. et KINZLER, K. W. (1998). "Identification of c-MYC as a target of the APC pathway." *Science* 281(5382): 1509-12.
- HE, W., DAI, C., LI, Y., ZENG, G., MONGA, S. P. et LIU, Y. (2009). "Wnt/beta-catenin signaling promotes renal interstitial fibrosis." *J Am Soc Nephrol* 20(4): 765-76.
- HEYDEMANN, A., CECO, E., LIM, J. E., HADHAZY, M., RYDER, P., MORAN, J. L., BEIER, D. R., PALMER, A. A. et MCNALLY, E. M. (2009). "Latent TGF-beta-binding protein 4 modifies muscular dystrophy in mice." *J Clin Invest* 119(12): 3703-12.
- HIDESTRAND, M., RICHARDS-MALCOLM, S., GURLEY, C. M., NOLEN, G., GRIMES, B., WATERSTRAT, A., ZANT, G. V. et PETERSON, C. A. (2008). "Sca-1-expressing nonmyogenic cells contribute to fibrosis in aged skeletal muscle." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 63(6): 566-79.
- HINDLE, A. G., HORNING, M., MELLISH, J. A. et LAWLER, J. M. (2009). "Diving into old age: muscular senescence in a large-bodied, long-lived mammal, the Weddell seal (*Leptonychotes weddellii*)." *J Exp Biol* 212(Pt 6): 790-6.
- HINZ, B. et GABBIANI, G. (2010). "Fibrosis: recent advances in myofibroblast biology and new therapeutic perspectives." *F1000 Biol Rep* 2: 78.
- HINZ, B., PHAN, S. H., THANNICKAL, V. J., GALLI, A., BOCHATON-PIALLAT, M. L. et GABBIANI, G. (2007). "The myofibroblast: one function, multiple origins." *Am J Pathol* 170(6): 1807-16.
- HIRATA, A., MASUDA, S., TAMURA, T., KAI, K., OJIMA, K., FUKASE, A., MOTOYOSHI, K., KAMAKURA, K., MIYAGOE-SUZUKI, Y. et TAKEDA, S. (2003). "Expression

- profiling of cytokines and related genes in regenerating skeletal muscle after cardiotoxin injection: a role for osteopontin." *Am J Pathol* 163(1): 203-15.
- HOFFMAN, E. P., BROWN, R. H., JR.et KUNKEL, L. M. (1987). "Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus." *Cell* 51(6): 919-28.
- HOLLE, A. W.et ENGLER, A. J. (2011). "More than a feeling: discovering, understanding, and influencing mechanosensing pathways." *Curr Opin Biotechnol* 22(5): 648-54.
- HOLLENBERG, S. M., CHENG, P. F.et WEINTRAUB, H. (1993). "Use of a conditional MyoD transcription factor in studies of MyoD trans-activation and muscle determination." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(17): 8028-32.
- HOLLNAGEL, A., GRUND, C., FRANKE, W. W.et ARNOLD, H. H. (2002). "The cell adhesion molecule M-cadherin is not essential for muscle development and regeneration." *Mol Cell Biol* 22(13): 4760-70.
- HOULIHAN, D. D., MABUCHI, Y., MORIKAWA, S., NIIBE, K., ARAKI, D., SUZUKI, S., OKANO, H.et MATSUZAKI, Y. (2012). "Isolation of mouse mesenchymal stem cells on the basis of expression of Sca-1 and PDGFR-alpha." *Nat Protoc* 7(12): 2103-11.
- HSIEH, J. C., KODJABACHIAN, L., REBBERT, M. L., RATTNER, A., SMALLWOOD, P. M., SAMOS, C. H., NUSSE, R., DAWID, I. B.et NATHANS, J. (1999). "A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities." *Nature* 398(6726): 431-6.
- HSU, E., SHI, H., JORDAN, R. M., LYONS-WEILER, J., PILEWSKI, J. M.et FEGHALI-BOSTWICK, C. A. (2011). "Lung tissues in patients with systemic sclerosis have gene expression patterns unique to pulmonary fibrosis and pulmonary hypertension." *Arthritis Rheum* 63(3): 783-94.
- HUEBNER, K. D., JASSAL, D. S., HALEVY, O., PINES, M.et ANDERSON, J. E. (2008). "Functional resolution of fibrosis in mdx mouse dystrophic heart and skeletal muscle by halofuginone." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294(4): H1550-61.
- IERONIMAKIS, N., BALASUNDARAM, G., RAINEY, S., SRIRANGAM, K., YABLONKA-REUVENI, Z.et REYES, M. (2010). "Absence of CD34 on murine skeletal muscle satellite cells marks a reversible state of activation during acute injury." *PLoS One* 5(6): e10920.
- IKEYA, M.et TAKADA, S. (1998). "Wnt signaling from the dorsal neural tube is required for the formation of the medial dermomyotome." *Development* 125(24): 4969-76.
- IRINTCHEV, A., ZESCHNIGK, M., STARZINSKI-POWITZ, A.et WERNIG, A. (1994). "Expression pattern of M-cadherin in normal, denervated, and regenerating mouse muscles." *Dev Dyn* 199(4): 326-37.
- JAALOUK, D. E.et LAMMERDING, J. (2009). "Mechanotransduction gone awry." *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(1): 63-73.
- JANG, Y. C., SINHA, M., CERLETTI, M., DALL'OSSO, C.et WAGERS, A. J. (2011). "Skeletal muscle stem cells: effects of aging and metabolism on muscle regenerative function." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 76: 101-11.

- JANKOWSKI, R. J., DEASY, B. M. et HUARD, J. (2002). "Muscle-derived stem cells." *Gene Ther* 9(10): 642-7.
- JANKOWSKI, R. J., HALUSZCZAK, C., TRUCCO, M. et HUARD, J. (2001). "Flow cytometric characterization of myogenic cell populations obtained via the preplate technique: potential for rapid isolation of muscle-derived stem cells." *Hum Gene Ther* 12(6): 619-28.
- JARVINEN, T. A., JOZSA, L., KANNUS, P., JARVINEN, T. L. et JARVINEN, M. (2002). "Organization and distribution of intramuscular connective tissue in normal and immobilized skeletal muscles. An immunohistochemical, polarization and scanning electron microscopic study." *J Muscle Res Cell Motil* 23(3): 245-54.
- JEJURIKAR, S. S. et KUZON, W. M., JR. (2003). "Satellite cell depletion in degenerative skeletal muscle." *Apoptosis* 8(6): 573-8.
- JENNISKENS, G. J., VEERKAMP, J. H. et VAN KUPPEVELT, T. H. (2006). "Heparan sulfates in skeletal muscle development and physiology." *J Cell Physiol* 206(2): 283-94.
- JIANG, F., PARSONS, C. J. et STEFANOVIC, B. (2006). "Gene expression profile of quiescent and activated rat hepatic stellate cells implicates Wnt signaling pathway in activation." *J Hepatol* 45(3): 401-9.
- JINNO, H., MOROZOVA, O., JONES, K. L., BIERNASKIE, J. A., PARIS, M., HOSOKAWA, R., RUDNICKI, M. A., CHAI, Y., ROSSI, F., MARRA, M. A. et MILLER, F. D. (2010). "Convergent genesis of an adult neural crest-like dermal stem cell from distinct developmental origins." *Stem Cells* 28(11): 2027-40.
- JOE, A. W., YI, L., NATARAJAN, A., LE GRAND, F., SO, L., WANG, J., RUDNICKI, M. A. et ROSSI, F. M. (2010). "Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis." *Nat Cell Biol* 12(2): 153-63.
- JUNQUEIRA, L. C., BIGNOLAS, G. et BRENTANI, R. R. (1979). "Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections." *Histochem J* 11(4): 447-55.
- KAARIAINEN, M., JARVINEN, T., JARVINEN, M., RANTANEN, J. et KALIMO, H. (2000). "Relation between myofibers and connective tissue during muscle injury repair." *Scand J Med Sci Sports* 10(6): 332-7.
- KANISICAK, O., MENDEZ, J. J., YAMAMOTO, S., YAMAMOTO, M. et GOLDHAMER, D. J. (2009). "Progenitors of skeletal muscle satellite cells express the muscle determination gene, MyoD." *Dev Biol* 332(1): 131-41.
- KAROW, M., POPP, T., EGEA, V., RIES, C., JOCHUM, M. et NETH, P. (2009). "Wnt signalling in mouse mesenchymal stem cells: impact on proliferation, invasion and MMP expression." *J Cell Mol Med* 13(8B): 2506-20.
- KASSAR-DUCHOSSOY, L., GAYRAUD-MOREL, B., GOMES, D., ROCANCOURT, D., BUCKINGHAM, M., SHININ, V. et TAJBAKHS, S. (2004). "Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:Myod double-mutant mice." *Nature* 431(7007): 466-71.
- KASTNER, S., ELIAS, M. C., RIVERA, A. J. et YABLONKA-REUVENI, Z. (2000). "Gene expression patterns of the fibroblast growth factors and their receptors

- during myogenesis of rat satellite cells." *J Histochem Cytochem* 48(8): 1079-96.
- KEATING, A. (2012). "Mesenchymal stromal cells: new directions." *Cell Stem Cell* 10(6): 709-16.
- KHATIWALA, C. B., PEYTON, S. R. et PUTNAM, A. J. (2006). "Intrinsic mechanical properties of the extracellular matrix affect the behavior of pre-osteoblastic MC3T3-E1 cells." *Am J Physiol Cell Physiol* 290(6): C1640-50.
- KHERIF, S., LAFUMA, C., DEHAUPAS, M., LACHKAR, S., FOURNIER, J. G., VERDIERE-SAHUQUE, M., FARDEAU, M. et ALAMEDDINE, H. S. (1999). "Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in regenerating skeletal muscle: a study in experimentally injured and mdx muscles." *Dev Biol* 205(1): 158-70.
- KITZMANN, M., CARNAC, G., VANDROMME, M., PRIMIG, M., LAMB, N. J. et FERNANDEZ, A. (1998). "The muscle regulatory factors MyoD and myf-5 undergo distinct cell cycle-specific expression in muscle cells." *J Cell Biol* 142(6): 1447-59.
- KJAER, M. (2004). "Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading." *Physiol Rev* 84(2): 649-98.
- KNAPP, J. R., DAVIE, J. K., MYER, A., MEADOWS, E., OLSON, E. N. et KLEIN, W. H. (2006). "Loss of myogenin in postnatal life leads to normal skeletal muscle but reduced body size." *Development* 133(4): 601-10.
- KONDO, M., WAGERS, A. J., MANZ, M. G., PROHASKA, S. S., SCHERER, D. C., BEILHACK, G. F., SHIZURU, J. A. et WEISSMAN, I. L. (2003). "Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application." *Annu Rev Immunol* 21: 759-806.
- KOPAN, R. (2012). "Notch signaling." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(10).
- KOPAN, R. et ILAGAN, M. X. (2009). "The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism." *Cell* 137(2): 216-33.
- KOVANEN, V., SUOMINEN, H. et PELTONEN, L. (1987). "Effects of aging and life-long physical training on collagen in slow and fast skeletal muscle in rats. A morphometric and immuno-histochemical study." *Cell Tissue Res* 248(2): 247-55.
- KRAGSTRUP, T. W., KJAER, M. et MACKEY, A. L. (2011). "Structural, biochemical, cellular, and functional changes in skeletal muscle extracellular matrix with aging." *Scand J Med Sci Sports* 21(6): 749-57.
- KUANG, S., GILLESPIE, M. A. et RUDNICKI, M. A. (2008). "Niche regulation of muscle satellite cell self-renewal and differentiation." *Cell Stem Cell* 2(1): 22-31.
- KUANG, S., KURODA, K., LE GRAND, F. et RUDNICKI, M. A. (2007). "Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle." *Cell* 129(5): 999-1010.
- KURODA, K., TANI, S., TAMURA, K., MINOGUCHI, S., KUROOKA, H. et HONJO, T. (1999). "Delta-induced Notch signaling mediated by RBP-J inhibits MyoD expression and myogenesis." *J Biol Chem* 274(11): 7238-44.
- KUZNETSOVA, T. G., STARODUBTSEVA, M. N., YEGORENKOV, N. I., CHIZHIK, S. A. et ZHDANOV, R. I. (2007). "Atomic force microscopy probing of cell elasticity." *Micron* 38(8): 824-33.

- LAGORD, C., SOULET, L., BONAUAUD, S., BASSAGLIA, Y., REY, C., BARLOVATZ-MEIMON, G., GAUTRON, J. et MARTELLY, I. (1998). "Differential myogenicity of satellite cells isolated from extensor digitorum longus (EDL) and soleus rat muscles revealed in vitro." *Cell Tissue Res* 291(3): 455-68.
- LAM, A. P. et GOTTARDI, C. J. (2011). "beta-catenin signaling: a novel mediator of fibrosis and potential therapeutic target." *Curr Opin Rheumatol* 23(6): 562-7.
- LANGSDORF, A., DO, A. T., KUSCHE-GULLBERG, M., EMERSON, C. P., JR. et AI, X. (2007). "Sulfs are regulators of growth factor signaling for satellite cell differentiation and muscle regeneration." *Dev Biol* 311(2): 464-77.
- LASSAR, A. B., DAVIS, R. L., WRIGHT, W. E., KADESCH, T., MURRE, C., VORONOVA, A., BALTIMORE, D. et WEINTRAUB, H. (1991). "Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo." *Cell* 66(2): 305-15.
- LAVOIE, P., ROBITAILLE, G., AGHARAZII, M., LEDBETTER, S., LABEL, M. et LARIVIERE, R. (2005). "Neutralization of transforming growth factor-beta attenuates hypertension and prevents renal injury in uremic rats." *J Hypertens* 23(10): 1895-903.
- LE GRAND, F., JONES, A. E., SEALE, V., SCIME, A. et RUDNICKI, M. A. (2009). "Wnt7a activates the planar cell polarity pathway to drive the symmetric expansion of satellite stem cells." *Cell Stem Cell* 4(6): 535-47.
- LEBLANC, E., TRENSZ, F., HAROUN, S., DROUIN, G., BERGERON, E., PENTON, C. M., MONTANARO, F., ROUX, S., FAUCHEUX, N. et GRENIER, G. (2011). "BMP-9-induced muscle heterotopic ossification requires changes to the skeletal muscle microenvironment." *J Bone Miner Res* 26(6): 1166-77.
- LEE, D. A., KNIGHT, M. M., CAMPBELL, J. J. et BADER, D. L. (2011). "Stem cell mechanobiology." *J Cell Biochem* 112(1): 1-9.
- LEQUERICA, J. L., MIRABET, V., MONTERO, J. A., HURTADO, C., PIQUER, S. et CARBONELL, F. (1999). "In vitro proliferation, differentiation and immunomagnetic bead purification of human myoblasts." *Ann Transplant* 4(3-4): 103-8.
- LI, D., ZHOU, J., CHOWDHURY, F., CHENG, J., WANG, N. et WANG, F. (2011). "Role of mechanical factors in fate decisions of stem cells." *Regen Med* 6(2): 229-40.
- LI, H., MITTAL, A., MAKONCHUK, D. Y., BHATNAGAR, S. et KUMAR, A. (2009). "Matrix metalloproteinase-9 inhibition ameliorates pathogenesis and improves skeletal muscle regeneration in muscular dystrophy." *Hum Mol Genet* 18(14): 2584-98.
- LIEBER, R. L. et WARD, S. R. (2013). "Cellular Mechanisms of Tissue Fibrosis. 4. Structural and functional consequences of skeletal muscle fibrosis." *Am J Physiol Cell Physiol*.
- LIEDERT, A., KASPAR, D., BLAKYTYN, R., CLAES, L. et IGNATIUS, A. (2006). "Signal transduction pathways involved in mechanotransduction in bone cells." *Biochem Biophys Res Commun* 349(1): 1-5.
- LIGHT, N. et CHAMPION, A. E. (1984). "Characterization of muscle epimysium, perimysium and endomysium collagens." *Biochem J* 219(3): 1017-26.

- LIM, D. S., LUTUCUTA, S., BACHIREDDY, P., YOUKER, K., EVANS, A., ENTMAN, M., ROBERTS, R. et MARIAN, A. J. (2001). "Angiotensin II blockade reverses myocardial fibrosis in a transgenic mouse model of human hypertrophic cardiomyopathy." *Circulation* 103(6): 789-91.
- LING, L., NURCOMBE, V. et COOL, S. M. (2009). "Wnt signaling controls the fate of mesenchymal stem cells." *Gene* 433(1-2): 1-7.
- LIU, D., BLACK, B. L. et DERYNCK, R. (2001). "TGF-beta inhibits muscle differentiation through functional repression of myogenic transcription factors by Smad3." *Genes Dev* 15(22): 2950-66.
- LIU, H., FERGUSSON, M. M., CASTILHO, R. M., LIU, J., CAO, L., CHEN, J., MALIDE, D., ROVIRA, II, SCHIMEL, D., KUO, C. J., GUTKIND, J. S., HWANG, P. M. et FINKEL, T. (2007). "Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging." *Science* 317(5839): 803-6.
- LIU, Y., YAN, X., SUN, Z., CHEN, B., HAN, Q., LI, J. et ZHAO, R. C. (2007). "Flk-1+ adipose-derived mesenchymal stem cells differentiate into skeletal muscle satellite cells and ameliorate muscular dystrophy in mdx mice." *Stem Cells Dev* 16(5): 695-706.
- LONG, K. K., PAVLATH, G. K. et MONTANO, M. (2011). "Sca-1 influences the innate immune response during skeletal muscle regeneration." *Am J Physiol Cell Physiol* 300(2): C287-94.
- LOPEZ, J. I., MOUW, J. K. et WEAVER, V. M. (2008). "Biomechanical regulation of cell orientation and fate." *Oncogene* 27(55): 6981-93.
- LU, J. R., BASSEL-DUBY, R., HAWKINS, A., CHANG, P., VALDEZ, R., WU, H., GAN, L., SHELTON, J. M., RICHARDSON, J. A. et OLSON, E. N. (2002). "Control of facial muscle development by MyoR and capsulin." *Science* 298(5602): 2378-81.
- LUO, D., RENAULT, V. M. et RANDO, T. A. (2005). "The regulation of Notch signaling in muscle stem cell activation and postnatal myogenesis." *Semin Cell Dev Biol* 16(4-5): 612-22.
- LUTOLF, M. P. et BLAU, H. M. (2009). "Artificial stem cell niches." *Adv Mater* 21(32-33): 3255-68.
- LUZ, M. A., MARQUES, M. J. et SANTO NETO, H. (2002). "Impaired regeneration of dystrophin-deficient muscle fibers is caused by exhaustion of myogenic cells." *Braz J Med Biol Res* 35(6): 691-5.
- MABUCHI, Y., HOULIHAN, D. D., AKAZAWA, C., OKANO, H. et MATSUZAKI, Y. (2013). "Prospective isolation of murine and human bone marrow mesenchymal stem cells based on surface markers." *Stem Cells Int* 2013: 507301.
- MACDONALD, B. T., TAMAI, K. et HE, X. (2009). "Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases." *Dev Cell* 17(1): 9-26.
- MACHIDA, S. et BOOTH, F. W. (2004). "Insulin-like growth factor 1 and muscle growth: implication for satellite cell proliferation." *Proc Nutr Soc* 63(2): 337-40.
- MACHIDA, S., SPANGENBURG, E. E. et BOOTH, F. W. (2004). "Primary rat muscle progenitor cells have decreased proliferation and myotube formation during passages." *Cell Prolif* 37(4): 267-77.

- MANN, C. J., PERDIGUERO, E., KHARRAZ, Y., AGUILAR, S., PESSINA, P., SERRANO, A. L. et MUNOZ-CANOVES, P. (2011). "Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle." *Skelet Muscle* 1(1): 21.
- MANSOURI, A., STOYKOVA, A., TORRES, M. et GRUSS, P. (1996). "Dysgenesis of cephalic neural crest derivatives in Pax7^{-/-} mutant mice." *Development* 122(3): 831-8.
- MARG, A., HAASE, H., NEUMANN, T., KOUNO, M. et MORANO, I. (2010). "AHNAK1 and AHNAK2 are costameric proteins: AHNAK1 affects transverse skeletal muscle fiber stiffness." *Biochem Biophys Res Commun* 401(1): 143-8.
- MARLOW, F., TOPCZEWSKI, J., SEPICH, D. et SOLNICA-KREZEL, L. (2002). "Zebrafish Rho kinase 2 acts downstream of Wnt11 to mediate cell polarity and effective convergence and extension movements." *Curr Biol* 12(11): 876-84.
- MARTIN, J. F., LI, L. et OLSON, E. N. (1992). "Repression of myogenin function by TGF-beta 1 is targeted at the basic helix-loop-helix motif and is independent of E2A products." *J Biol Chem* 267(16): 10956-60.
- MATHUR, A. B., COLLINSWORTH, A. M., REICHERT, W. M., KRAUS, W. E. et TRUSKEY, G. A. (2001). "Endothelial, cardiac muscle and skeletal muscle exhibit different viscous and elastic properties as determined by atomic force microscopy." *J Biomech* 34(12): 1545-53.
- MAURO, A. (1961). "Satellite cell of skeletal muscle fibers." *J Biophys Biochem Cytol* 9: 493-5.
- MCCROSKERY, S., THOMAS, M., MAXWELL, L., SHARMA, M. et KAMBADUR, R. (2003). "Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal." *J Cell Biol* 162(6): 1135-47.
- MCGEACHIE, J. K. et GROUNDS, M. D. (1995). "Retarded myogenic cell replication in regenerating skeletal muscles of old mice: an autoradiographic study in young and old BALBc and SJL/J mice." *Cell Tissue Res* 280(2): 277-82.
- MEADOWS, E., CHO, J. H., FLYNN, J. M. et KLEIN, W. H. (2008). "Myogenin regulates a distinct genetic program in adult muscle stem cells." *Dev Biol* 322(2): 406-14.
- MEGENEY, L. A., KABLAR, B., GARRETT, K., ANDERSON, J. E. et RUDNICKI, M. A. (1996). "MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle." *Genes Dev* 10(10): 1173-83.
- MENDEZ, M. G. et JANMEY, P. A. (2012). "Transcription factor regulation by mechanical stress." *Int J Biochem Cell Biol* 44(5): 728-32.
- MENG, S. J. et YU, L. J. (2010). "Oxidative stress, molecular inflammation and sarcopenia." *Int J Mol Sci* 11(4): 1509-26.
- MEYER, G. A. et LIEBER, R. L. (2011). "Elucidation of extracellular matrix mechanics from muscle fibers and fiber bundles." *J Biomech* 44(4): 771-3.
- MIKELS, A. J. et NUSSE, R. (2006). "Wnts as ligands: processing, secretion and reception." *Oncogene* 25(57): 7461-8.
- MILLER, J. R. (2002). "The Wnts." *Genome Biol* 3(1): REVIEWS3001.
- MINASI, M. G., RIMINUCCI, M., DE ANGELIS, L., BORELLO, U., BERARDUCCI, B., INNOCENZI, A., CAPRIOLI, A., SIRABELLA, D., BAIOCCHI, M., DE MARIA, R., BORATTO, R., JAFFREDO, T., BROCCOLI, V., BIANCO, P. et COSSU, G. (2002).

- "The meso-angioblast: a multipotent, self-renewing cell that originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues." *Development* 129(11): 2773-83.
- MITCHELL, K. J., PANNEREC, A., CADOT, B., PARLAKIAN, A., BESSON, V., GOMES, E. R., MARAZZI, G. et SASSOON, D. A. (2010). "Identification and characterization of a non-satellite cell muscle resident progenitor during postnatal development." *Nat Cell Biol* 12(3): 257-66.
- MIURA, T., KISHIOKA, Y., WAKAMATSU, J., HATTORI, A., HENNEBRY, A., BERRY, C. J., SHARMA, M., KAMBADUR, R. et NISHIMURA, T. (2006). "Decorin binds myostatin and modulates its activity to muscle cells." *Biochem Biophys Res Commun* 340(2): 675-80.
- MONTARRAS, D., MORGAN, J., COLLINS, C., RELAIX, F., ZAFFRAN, S., CUMANO, A., PARTRIDGE, T. et BUCKINGHAM, M. (2005). "Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration." *Science* 309(5743): 2064-7.
- MOON, R. T., BROWN, J. D., YANG-SNYDER, J. A. et MILLER, J. R. (1997). "Structurally related receptors and antagonists compete for secreted Wnt ligands." *Cell* 88(6): 725-8.
- MORGAN, J. E., WATT, D. J., SLOPER, J. C. et PARTRIDGE, T. A. (1988). "Partial correction of an inherited biochemical defect of skeletal muscle by grafts of normal muscle precursor cells." *J Neurol Sci* 86(2-3): 137-47.
- MORIKAWA, S., MABUCHI, Y., KUBOTA, Y., NAGAI, Y., NIIBE, K., HIRATSU, E., SUZUKI, S., MIYAUCHI-HARA, C., NAGOSHI, N., SUNABORI, T., SHIMMURA, S., MIYAWAKI, A., NAKAGAWA, T., SUDA, T., OKANO, H. et MATSUZAKI, Y. (2009). "Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow." *J Exp Med* 206(11): 2483-96.
- MORRISON, J., PALMER, D. B., COBBOLD, S., PARTRIDGE, T. et BOU-GHARIOS, G. (2005). "Effects of T-lymphocyte depletion on muscle fibrosis in the mdx mouse." *Am J Pathol* 166(6): 1701-10.
- MORRISON, J. I., LOOF, S., HE, P. et SIMON, A. (2006). "Salamander limb regeneration involves the activation of a multipotent skeletal muscle satellite cell population." *J Cell Biol* 172(3): 433-40.
- MORRISON, S. J. et KIMBLE, J. (2006). "Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer." *Nature* 441(7097): 1068-74.
- MOULIN, V., AUGER, F. A., GARREL, D. et GERMAIN, L. (2000). "Role of wound healing myofibroblasts on re-epithelialization of human skin." *Burns* 26(1): 3-12.
- MOULIN, V. J., MAYRAND, D., MESSIER, H., MARTINEZ, M. C., LOPEZ-VALLE, C. A. et GENEST, H. (2010). "Shedding of microparticles by myofibroblasts as mediator of cellular cross-talk during normal wound healing." *J Cell Physiol* 225(3): 734-40.
- MUNSTERBERG, A. E., KITAJEWSKI, J., BUMCROT, D. A., MCMAHON, A. P. et LASSAR, A. B. (1995). "Combinatorial signaling by Sonic hedgehog and Wnt family members induces myogenic bHLH gene expression in the somite." *Genes Dev* 9(23): 2911-22.

- MUSARO, A. et BARBERI, L. (2010). "Isolation and culture of mouse satellite cells." *Methods Mol Biol* 633: 101-11.
- NAHIRNEY, P. C., DOW, P. R. et OVALLE, W. K. (1997). "Quantitative morphology of mast cells in skeletal muscle of normal and genetically dystrophic mice." *Anat Rec* 247(3): 341-9.
- NARICI, M. V. et MAFFULLI, N. (2010). "Sarcopenia: characteristics, mechanisms and functional significance." *Br Med Bull* 95: 139-59.
- NATARAJAN, A., LEMOS, D. R. et ROSSI, F. M. (2010). "Fibro/adipogenic progenitors: a double-edged sword in skeletal muscle regeneration." *Cell Cycle* 9(11): 2045-6.
- NIEHRS, C. (2006). "Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators." *Oncogene* 25(57): 7469-81.
- NODEN, D. M. et FRANCIS-WEST, P. (2006). "The differentiation and morphogenesis of craniofacial muscles." *Dev Dyn* 235(5): 1194-218.
- NOMBELA-ARRIETA, C., RITZ, J. et SILBERSTEIN, L. E. (2011). "The elusive nature and function of mesenchymal stem cells." *Nat Rev Mol Cell Biol* 12(2): 126-31.
- NUSSE, R. (2008). "Wnt signaling and stem cell control." *Cell Res* 18(5): 523-7.
- NUSSE, R. (2012). "The Wnt Homepage." from <http://www.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/>.
- OGNEVA, I. V., LEBEDEV, D. V. et SHENKMAN, B. S. (2010). "Transversal stiffness and Young's modulus of single fibers from rat soleus muscle probed by atomic force microscopy." *Biophys J* 98(3): 418-24.
- OLWIN, B. B. et RAPRAEGER, A. (1992). "Repression of myogenic differentiation by aFGF, bFGF, and K-FGF is dependent on cellular heparan sulfate." *J Cell Biol* 118(3): 631-9.
- ONO, Y., BOLDRIN, L., KNOPP, P., MORGAN, J. E. et ZAMMIT, P. S. (2010). "Muscle satellite cells are a functionally heterogeneous population in both somite-derived and branchiomic muscles." *Dev Biol* 337(1): 29-41.
- ONO, Y., MASUDA, S., NAM, H. S., BENEZRA, R., MIYAGOE-SUZUKI, Y. et TAKEDA, S. (2012). "Slow-dividing satellite cells retain long-term self-renewal ability in adult muscle." *J Cell Sci* 125(Pt 5): 1309-17.
- ONO, Y., SENSUI, H., OKUTSU, S. et NAGATOMI, R. (2007). "Notch2 negatively regulates myofibroblastic differentiation of myoblasts." *J Cell Physiol* 210(2): 358-69.
- OTTO, A., SCHMIDT, C. et PATEL, K. (2006). "Pax3 and Pax7 expression and regulation in the avian embryo." *Anat Embryol (Berl)* 211(4): 293-310.
- OUSTANINA, S., HAUSE, G. et BRAUN, T. (2004). "Pax7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells but not their specification." *Embo J* 23(16): 3430-9.
- PANNEREC, A., MARAZZI, G. et SASSOON, D. (2012). "Stem cells in the hood: the skeletal muscle niche." *Trends Mol Med* 18(10): 599-606.
- PARK, Y. G., MOON, J. H. et KIM, J. (2006). "A comparative study of magnetic-activated cell sorting, cytotoxicity and preplating for the purification of human myoblasts." *Yonsei Med J* 47(2): 179-83.

- PARKER, M. H., SEALE, P. et RUDNICKI, M. A. (2003). "Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis." *Nat Rev Genet* 4(7): 497-507.
- PARKER, M. H., VON MALTZAHN, J., BAKKAR, N., AL-JOUBORI, B., ISHIBASHI, J., GUTTRIDGE, D. et RUDNICKI, M. A. (2012). "MyoD-dependent regulation of NF-kappaB activity couples cell-cycle withdrawal to myogenic differentiation." *Skelet Muscle* 2(1): 6.
- PARR, B. A., SHEA, M. J., VASSILEVA, G. et MCMAHON, A. P. (1993). "Mouse Wnt genes exhibit discrete domains of expression in the early embryonic CNS and limb buds." *Development* 119(1): 247-61.
- PARTRIDGE, T. A., GROUNDS, M. et SLOPER, J. C. (1978). "Evidence of fusion between host and donor myoblasts in skeletal muscle grafts." *Nature* 273(5660): 306-8.
- PARTRIDGE, T. A., MORGAN, J. E., COULTON, G. R., HOFFMAN, E. P. et KUNKEL, L. M. (1989). "Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts." *Nature* 337(6203): 176-9.
- PASUT, A., OLEJNIK, P. et RUDNICKI, M. A. (2012). "Isolation of muscle stem cells by fluorescence activated cell sorting cytometry." *Methods Mol Biol* 798: 53-64.
- PELHAM, R. J., JR. et WANG, Y. (1997). "Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(25): 13661-5.
- PENNICA, D., SWANSON, T. A., WELSH, J. W., ROY, M. A., LAWRENCE, D. A., LEE, J., BRUSH, J., TANEYHILL, L. A., DEUEL, B., LEW, M., WATANABE, C., COHEN, R. L., MELHEM, M. F., FINLEY, G. G., QUIRKE, P., GODDARD, A. D., HILLAN, K. J., GURNEY, A. L., BOTSTEIN, D. et LEVINE, A. J. (1998). "WISP genes are members of the connective tissue growth factor family that are up-regulated in wnt-1-transformed cells and aberrantly expressed in human colon tumors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(25): 14717-22.
- PETROPOULOS, H. et SKERJANC, I. S. (2002). "Beta-catenin is essential and sufficient for skeletal myogenesis in P19 cells." *J Biol Chem* 277(18): 15393-9.
- PICCOLO, S., AGIUS, E., LEYNS, L., BHATTACHARYYA, S., GRUNZ, H., BOUWMEESTER, T. et DE ROBERTIS, E. M. (1999). "The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals." *Nature* 397(6721): 707-10.
- POLESSKAYA, A., SEALE, P. et RUDNICKI, M. A. (2003). "Wnt signaling induces the myogenic specification of resident CD45+ adult stem cells during muscle regeneration." *Cell* 113(7): 841-52.
- PUKLIN-FAUCHER, E. et SHEETZ, M. P. (2009). "The mechanical integrin cycle." *J Cell Sci* 122(Pt 2): 179-86.
- PURSLOW, P. P. (2002). "The structure and functional significance of variations in the connective tissue within muscle." *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 133(4): 947-66.
- PUTTINI, S., LEKKA, M., DORCHIES, O. M., SAUGY, D., INCITTI, T., RUEGG, U. T., BOZZONI, I., KULIK, A. J. et MERMED, N. (2009). "Gene-mediated restoration of normal myofiber elasticity in dystrophic muscles." *Mol Ther* 17(1): 19-25.

- QU, Z., BALKIR, L., VAN DEUTEKOM, J. C., ROBBINS, P. D., PRUCHNIC, R. et HUARD, J. (1998). "Development of approaches to improve cell survival in myoblast transfer therapy." *J Cell Biol* 142(5): 1257-67.
- QUINTERO, A. J., WRIGHT, V. J., FU, F. H. et HUARD, J. (2009). "Stem cells for the treatment of skeletal muscle injury." *Clin Sports Med* 28(1): 1-11.
- RAMASWAMY, K. S., PALMER, M. L., VAN DER MEULEN, J. H., RENOUX, A., KOSTROMINOVA, T. Y., MICHELE, D. E. et FAULKNER, J. A. (2011). "Lateral transmission of force is impaired in skeletal muscles of dystrophic mice and very old rats." *J Physiol* 589(Pt 5): 1195-208.
- RAPPOLEE, D. A. et WERB, Z. (1992). "Macrophage-derived growth factors." *Curr Top Microbiol Immunol* 181: 87-140.
- RELAIX, F., MONTARRAS, D., ZAFFRAN, S., GAYRAUD-MOREL, B., ROCANCOURT, D., TAJBAKSH, S., MANSOURI, A., CUMANO, A. et BUCKINGHAM, M. (2006). "Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells." *J Cell Biol* 172(1): 91-102.
- RELAIX, F., ROCANCOURT, D., MANSOURI, A. et BUCKINGHAM, M. (2004). "Divergent functions of murine Pax3 and Pax7 in limb muscle development." *Genes Dev* 18(9): 1088-105.
- ROCHAT, A., FERNANDEZ, A., VANDROMME, M., MOLES, J. P., BOUSCHET, T., CARNAC, G. et LAMB, N. J. (2004). "Insulin and wnt1 pathways cooperate to induce reserve cell activation in differentiation and myotube hypertrophy." *Mol Biol Cell* 15(10): 4544-55.
- RODRIGUES, C. J., RODRIGUES JUNIOR, A. J. et BOHM, G. M. (1996). "Effects of aging on muscle fibers and collagen content of the diaphragm: a comparison with the rectus abdominis muscle." *Gerontology* 42(4): 218-28.
- ROFFE, S., HAGAI, Y., PINES, M. et HALEVY, O. (2010). "Halofuginone inhibits Smad3 phosphorylation via the PI3K/Akt and MAPK/ERK pathways in muscle cells: effect on myotube fusion." *Exp Cell Res* 316(6): 1061-9.
- ROSANT, C., NAGEL, M. D. et PEROT, C. (2007). "Aging affects passive stiffness and spindle function of the rat soleus muscle." *Exp Gerontol* 42(4): 301-8.
- ROSENBLATT, J. D., LUNT, A. I., PARRY, D. J. et PARTRIDGE, T. A. (1995). "Culturing satellite cells from living single muscle fiber explants." *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 31(10): 773-9.
- ROSENBLATT, J. D., PARRY, D. J. et PARTRIDGE, T. A. (1996). "Phenotype of adult mouse muscle myoblasts reflects their fiber type of origin." *Differentiation* 60(1): 39-45.
- ROTTER, N., ODER, J., SCHLENKE, P., LINDNER, U., BOHRNSEN, F., KRAMER, J., ROHWEDDEL, J., HUSS, R., BRANDAU, S., WOLLENBERG, B. et LANG, S. (2008). "Isolation and characterization of adult stem cells from human salivary glands." *Stem Cells Dev* 17(3): 509-18.
- RUDNICKI, M. A., BRAUN, T., HINUMA, S. et JAENISCH, R. (1992). "Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development." *Cell* 71(3): 383-90.

- RUDNICKI, M. A., LE GRAND, F., MCKINNELL, I. et KUANG, S. (2008). "The molecular regulation of muscle stem cell function." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 73: 323-31.
- RUDNICKI, M. A., SCHNEGELSBERG, P. N., STEAD, R. H., BRAUN, T., ARNOLD, H. H. et JAENISCH, R. (1993). "MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle." *Cell* 75(7): 1351-9.
- RUSSELL, S. B., RUSSELL, J. D., TRUPIN, K. M., GAYDEN, A. E., OPALENIK, S. R., NANNEY, L. B., BROQUIST, A. H., RAJU, L. et WILLIAMS, S. M. (2010). "Epigenetically altered wound healing in keloid fibroblasts." *J Invest Dermatol* 130(10): 2489-96.
- SACCO, A., DOYONNAS, R., KRAFT, P., VITOROVIC, S. et BLAU, H. M. (2008). "Self-renewal and expansion of single transplanted muscle stem cells." *Nature* 456(7221): 502-6.
- SAJKO, S., KUBINOVA, L., CVETKO, E., KREFT, M., WERNIG, A. et ERZEN, I. (2004). "Frequency of M-cadherin-stained satellite cells declines in human muscles during aging." *J Histochem Cytochem* 52(2): 179-85.
- SALAZAR, K. D., LANKFORD, S. M. et BRODY, A. R. (2009). "Mesenchymal stem cells produce Wnt isoforms and TGF-beta1 that mediate proliferation and procollagen expression by lung fibroblasts." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297(5): L1002-11.
- SALIMENA, M. C., LAGROTA-CANDIDO, J. et QUIRICO-SANTOS, T. (2004). "Gender dimorphism influences extracellular matrix expression and regeneration of muscular tissue in mdx dystrophic mice." *Histochem Cell Biol* 122(5): 435-44.
- SAMBASIVAN, R., YAO, R., KISSENPENNIG, A., VAN WITTENBERGHE, L., PALDI, A., GAYRAUD-MOREL, B., GUENOU, H., MALISSEN, B., TAJBAKSH, S. et GALY, A. (2011). "Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration." *Development* 138(17): 3647-56.
- SAMPAOLESI, M., BLOT, S., D'ANTONA, G., GRANGER, N., TONLORENZI, R., INNOCENZI, A., MOGNOL, P., THIBAUD, J. L., GALVEZ, B. G., BARTHELEMY, I., PERANI, L., MANTERO, S., GUTTINGER, M., PANSARASA, O., RINALDI, C., CUSELLA DE ANGELIS, M. G., TORRENTE, Y., BORDIGNON, C., BOTTINELLI, R. et COSSU, G. (2006). "Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs." *Nature* 444(7119): 574-9.
- SANES, J. R. (2003). "The basement membrane/basal lamina of skeletal muscle." *J Biol Chem* 278(15): 12601-4.
- SARMENTO, L. M., HUANG, H., LIMON, A., GORDON, W., FERNANDES, J., TAVARES, M. J., MIELE, L., CARDOSO, A. A., CLASSON, M. et CARLESSO, N. (2005). "Notch1 modulates timing of G1-S progression by inducing SKP2 transcription and p27 Kip1 degradation." *J Exp Med* 202(1): 157-68.
- SASSOON, D., LYONS, G., WRIGHT, W. E., LIN, V., LASSAR, A., WEINTRAUB, H. et BUCKINGHAM, M. (1989). "Expression of two myogenic regulatory factors myogenin and MyoD1 during mouse embryogenesis." *Nature* 341(6240): 303-7.

- SCHARNER, J. et ZAMMIT, P. S. (2011). "The muscle satellite cell at 50: the formative years." *Skelet Muscle* 1(1): 28.
- SCHETT, G., ZWERINA, J. et DAVID, J. P. (2008). "The role of Wnt proteins in arthritis." *Nat Clin Pract Rheumatol* 4(9): 473-80.
- SCHIENDA, J., ENGLEKA, K. A., JUN, S., HANSEN, M. S., EPSTEIN, J. A., TABIN, C. J., KUNKEL, L. M. et KARDON, G. (2006). "Somitic origin of limb muscle satellite and side population cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(4): 945-50.
- SCHMALBRUCH, H. et LEWIS, D. M. (2000). "Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles." *Muscle Nerve* 23(4): 617-26.
- SCHOLZEN, T. et GERDES, J. (2000). "The Ki-67 protein: from the known and the unknown." *J Cell Physiol* 182(3): 311-22.
- SCHUSTER-GOSSLER, K., CORDES, R. et GOSSLER, A. (2007). "Premature myogenic differentiation and depletion of progenitor cells cause severe muscle hypotrophy in Delta1 mutants." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(2): 537-42.
- SCIME, A., DESROSIER, J., TRENSZ, F., PALIDWOR, G. A., CARON, A. Z., ANDRADE-NAVARRO, M. A. et GRENIER, G. (2010). "Transcriptional profiling of skeletal muscle reveals factors that are necessary to maintain satellite cell integrity during ageing." *Mech Ageing Dev* 131(1): 9-20.
- SCIME, A., GRENIER, G., HUH, M. S., GILLESPIE, M. A., BEVILACQUA, L., HARPER, M. E. et RUDNICKI, M. A. (2005). "Rb and p107 regulate preadipocyte differentiation into white versus brown fat through repression of PGC-1alpha." *Cell Metab* 2(5): 283-95.
- SEALE, P., BJORK, B., YANG, W., KAJIMURA, S., CHIN, S., KUANG, S., SCIME, A., DEVARAKONDA, S., CONROE, H. M., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P., RUDNICKI, M. A., BEIER, D. R. et SPIEGELMAN, B. M. (2008). "PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch." *Nature* 454(7207): 961-7.
- SEALE, P., SABOURIN, L. A., GIRGIS-GABARDO, A., MANSOURI, A., GRUSS, P. et RUDNICKI, M. A. (2000). "Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells." *Cell* 102(6): 777-86.
- SEGAWA, M., FUKADA, S., YAMAMOTO, Y., YAHAGI, H., KANEMATSU, M., SATO, M., ITO, T., UEZUMI, A., HAYASHI, S., MIYAGOE-SUZUKI, Y., TAKEDA, S., TSUJIKAWA, K. et YAMAMOTO, H. (2008). "Suppression of macrophage functions impairs skeletal muscle regeneration with severe fibrosis." *Exp Cell Res* 314(17): 3232-44.
- SERRANO, A. L., MANN, C. J., VIDAL, B., ARDITE, E., PERDIGUERO, E. et MUNOZ-CANOVES, P. (2011). "Cellular and molecular mechanisms regulating fibrosis in skeletal muscle repair and disease." *Curr Top Dev Biol* 96: 167-201.
- SERRANO, A. L. et MUNOZ-CANOVES, P. (2010). "Regulation and dysregulation of fibrosis in skeletal muscle." *Exp Cell Res* 316(18): 3050-8.
- SERVIER. (2010). "Servier Medical Art." from <http://www.servier.fr/servier-medical-art>.
- SHEFER, G., VAN DE MARK, D. P., RICHARDSON, J. B. et YABLONKA-REUVENI, Z. (2006). "Satellite-cell pool size does matter: defining the myogenic potency of aging skeletal muscle." *Dev Biol* 294(1): 50-66.

- SHERWOOD, R. I., CHRISTENSEN, J. L., CONBOY, I. M., CONBOY, M. J., RANDO, T. A., WEISSMAN, I. L. et WAGERS, A. J. (2004). "Isolation of adult mouse myogenic progenitors: functional heterogeneity of cells within and engrafting skeletal muscle." *Cell* 119(4): 543-54.
- SHI, X. et GARRY, D. J. (2006). "Muscle stem cells in development, regeneration, and disease." *Genes Dev* 20(13): 1692-708.
- SHI, Y. et MASSAGUE, J. (2003). "Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus." *Cell* 113(6): 685-700.
- SHIFERA, A. S. et HARDIN, J. A. (2010). "Factors modulating expression of Renilla luciferase from control plasmids used in luciferase reporter gene assays." *Anal Biochem* 396(2): 167-72.
- SHIH, Y. R., KUO, T. K., YANG, A. H., LEE, O. K. et LEE, C. H. (2009). "Isolation and characterization of stem cells from the human parathyroid gland." *Cell Prolif* 42(4): 461-70.
- SHIMIZU, H., JULIUS, M. A., GIARRE, M., ZHENG, Z., BROWN, A. M. et KITAJEWSKI, J. (1997). "Transformation by Wnt family proteins correlates with regulation of beta-catenin." *Cell Growth Differ* 8(12): 1349-58.
- SHININ, V., GAYRAUD-MOREL, B., GOMES, D. et TAJBAKHS, S. (2006). "Asymmetric division and cosegregation of template DNA strands in adult muscle satellite cells." *Nat Cell Biol* 8(7): 677-87.
- SKUK, D., GOULET, M., ROY, B., PIETTE, V., COTE, C. H., CHAPDELAIN, P., HOGREL, J. Y., PARADIS, M., BOUCHARD, J. P., SYLVAIN, M., LACHANCE, J. G. et TREMBLAY, J. P. (2007). "First test of a "high-density injection" protocol for myogenic cell transplantation throughout large volumes of muscles in a Duchenne muscular dystrophy patient: eighteen months follow-up." *Neuromuscul Disord* 17(1): 38-46.
- SMIT, L., BAAS, A., KUIPERS, J., KORSWAGEN, H., VAN DE WETERING, M. et CLEVERS, H. (2004). "Wnt activates the Tak1/Nemo-like kinase pathway." *J Biol Chem* 279(17): 17232-40.
- SMYTHE, G. M., SHAVLAKADZE, T., ROBERTS, P., DAVIES, M. J., MCGEACHIE, J. K. et GROUNDS, M. D. (2008). "Age influences the early events of skeletal muscle regeneration: studies of whole muscle grafts transplanted between young (8 weeks) and old (13-21 months) mice." *Exp Gerontol* 43(6): 550-62.
- SOLEIMANI, V. D., PUNCH, V. G., KAWABE, Y., JONES, A. E., PALIDWOR, G. A., PORTER, C. J., CROSS, J. W., CARVAJAL, J. J., KOCKX, C. E., VAN, I. W. F., PERKINS, T. J., RIGBY, P. W., GROSVELD, F. et RUDNICKI, M. A. (2012). "Transcriptional dominance of Pax7 in adult myogenesis is due to high-affinity recognition of homeodomain motifs." *Dev Cell* 22(6): 1208-20.
- STEDMAN, H. H., SWEENEY, H. L., SHRAGER, J. B., MAGUIRE, H. C., PANETTIERI, R. A., PETROF, B., NARUSAWA, M., LEFEROVICH, J. M., SLADKY, J. T. et KELLY, A. M. (1991). "The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy." *Nature* 352(6335): 536-9.
- SUELVE, M., LOPEZ-ALEMANY, R., LLUIS, F., ANIORTE, G., SERRANO, E., PARRA, M., CARMELIET, P. et MUNOZ-CANOVES, P. (2002). "Plasmin activity is required for

- myogenesis in vitro and skeletal muscle regeneration in vivo." *Blood* 99(8): 2835-44.
- SUELVE, M., VIDAL, B., SERRANO, A. L., TJWA, M., ROMA, J., LOPEZ-ALEMANY, R., LUTTUN, A., DE LAGRAN, M. M., DIAZ-RAMOS, A., JARDI, M., ROIG, M., DIERSSEN, M., DEWERCHIN, M., CARMELIET, P. et MUNOZ-CANOVES, P. (2007). "uPA deficiency exacerbates muscular dystrophy in MDX mice." *J Cell Biol* 178(6): 1039-51.
- SUNG, J. H., YANG, H. M., PARK, J. B., CHOI, G. S., JOH, J. W., KWON, C. H., CHUN, J. M., LEE, S. K. et KIM, S. J. (2008). "Isolation and characterization of mouse mesenchymal stem cells." *Transplant Proc* 40(8): 2649-54.
- TAAFFE, D. R., HENWOOD, T. R., NALLS, M. A., WALKER, D. G., LANG, T. F. et HARRIS, T. B. (2009). "Alterations in muscle attenuation following detraining and retraining in resistance-trained older adults." *Gerontology* 55(2): 217-23.
- TAJBAKSH, S., BOBER, E., BABINET, C., POURNIN, S., ARNOLD, H. et BUCKINGHAM, M. (1996). "Gene targeting the myf-5 locus with nlacZ reveals expression of this myogenic factor in mature skeletal muscle fibres as well as early embryonic muscle." *Dev Dyn* 206(3): 291-300.
- TAJBAKSH, S., BORELLO, U., VIVARELLI, E., KELLY, R., PAPKOFF, J., DUPREZ, D., BUCKINGHAM, M. et COSSU, G. (1998). "Differential activation of Myf5 and MyoD by different Wnts in explants of mouse paraxial mesoderm and the later activation of myogenesis in the absence of Myf5." *Development* 125(21): 4155-62.
- TAKAHASHI, M., HOSHINO, H., KUSHIDA, K. et INOUE, T. (1995). "Direct measurement of crosslinks, pyridinoline, deoxypyridinoline, and pentosidine, in the hydrolysate of tissues using high-performance liquid chromatography." *Anal Biochem* 232(2): 158-62.
- TANABE, Y., ESAKI, K. et NOMURA, T. (1986). "Skeletal muscle pathology in X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) mouse." *Acta Neuropathol* 69(1-2): 91-5.
- TANAKA, K. K., HALL, J. K., TROY, A. A., CORNELISON, D. D., MAJKA, S. M. et OLWIN, B. B. (2009). "Syndecan-4-expressing muscle progenitor cells in the SP engraft as satellite cells during muscle regeneration." *Cell Stem Cell* 4(3): 217-25.
- TAO, Q., YOKOTA, C., PUCK, H., KOFRON, M., BIRSOY, B., YAN, D., ASASHIMA, M., WYLIE, C. C., LIN, X. et HEASMAN, J. (2005). "Maternal wnt11 activates the canonical wnt signaling pathway required for axis formation in *Xenopus* embryos." *Cell* 120(6): 857-71.
- TATSUMI, R., ANDERSON, J. E., NEVORET, C. J., HALEVY, O. et ALLEN, R. E. (1998). "HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells." *Dev Biol* 194(1): 114-28.
- TATSUMI, R., LIU, X., PULIDO, A., MORALES, M., SAKATA, T., DIAL, S., HATTORI, A., IKEUCHI, Y. et ALLEN, R. E. (2006). "Satellite cell activation in stretched skeletal muscle and the role of nitric oxide and hepatocyte growth factor." *Am J Physiol Cell Physiol* 290(6): C1487-94.

- TATSUMI, R., SHEEHAN, S. M., IWASAKI, H., HATTORI, A. et ALLEN, R. E. (2001). "Mechanical stretch induces activation of skeletal muscle satellite cells in vitro." *Exp Cell Res* 267(1): 107-14.
- TAVERNARAKIS, N. (2008). "Ageing and the regulation of protein synthesis: a balancing act?" *Trends Cell Biol* 18(5): 228-35.
- TEJPAR, S., NOLLET, F., LI, C., WUNDER, J. S., MICHILS, G., DAL CIN, P., VAN CUTSEM, E., BAPAT, B., VAN ROY, F., CASSIMAN, J. J. et ALMAN, B. A. (1999). "Predominance of beta-catenin mutations and beta-catenin dysregulation in sporadic aggressive fibromatosis (desmoid tumor)." *Oncogene* 18(47): 6615-20.
- TETSU, O. et MCCORMICK, F. (1999). "Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells." *Nature* 398(6726): 422-6.
- TIDBALL, J. G. (1995). "Inflammatory cell response to acute muscle injury." *Med Sci Sports Exerc* 27(7): 1022-32.
- TIDBALL, J. G. (2005). "Inflammatory processes in muscle injury and repair." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288(2): R345-53.
- TIDBALL, J. G. et VILLALTA, S. A. (2010). "Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298(5): R1173-87.
- TONLORENZI, R., DELLAVALLE, A., SCHNAPP, E., COSSU, G. et SAMPAOLESI, M. (2007). "Isolation and characterization of mesoangioblasts from mouse, dog, and human tissues." *Curr Protoc Stem Cell Biol* Chapter 2: Unit 2B 1.
- TORRENTE, Y., TREMBLAY, J. P., PISATI, F., BELICCHI, M., ROSSI, B., SIRONI, M., FORTUNATO, F., EL FAHIME, M., D'ANGELO, M. G., CARON, N. J., CONSTANTIN, G., PAULIN, D., SCARLATO, G. et BRESOLIN, N. (2001). "Intraarterial injection of muscle-derived CD34(+)Sca-1(+) stem cells restores dystrophin in mdx mice." *J Cell Biol* 152(2): 335-48.
- TRAPPE, T. (2009). "Influence of aging and long-term unloading on the structure and function of human skeletal muscle." *Appl Physiol Nutr Metab* 34(3): 459-64.
- TRENSZ, F., HAROUN, S., CLOUTIER, A., RICHTER, M. V. et GRENIER, G. (2010). "A muscle resident cell population promotes fibrosis in hindlimb skeletal muscles of mdx mice through the Wnt canonical pathway." *Am J Physiol Cell Physiol* 299(5): C939-47.
- TRENSZ, F., SCIME, A. et GRENIER, G. (2011). *Skeletal Muscle Engineering: The Need for of a Suitable Niche. Tissue Engineering in Regenerative Medicine.* H. S. Bernstein. New York, Springer.
- TROTTER, J. A. (2002). "Structure-function considerations of muscle-tendon junctions." *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 133(4): 1127-33.
- TSE, J. R. et ENGLER, A. J. (2010). "Preparation of hydrogel substrates with tunable mechanical properties." *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 10: Unit 10 16.
- TSIVITSE, S. (2010). "Notch and Wnt signaling, physiological stimuli and postnatal myogenesis." *Int J Biol Sci* 6(3): 268-81.
- UEZUMI, A., FUKADA, S., YAMAMOTO, N., TAKEDA, S. et TSUCHIDA, K. (2010). "Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle." *Nat Cell Biol* 12(2): 143-52.

- UEZUMI, A., OJIMA, K., FUKADA, S., IKEMOTO, M., MASUDA, S., MIYAGOE-SUZUKI, Y. et TAKEDA, S. (2006). "Functional heterogeneity of side population cells in skeletal muscle." *Biochem Biophys Res Commun* 341(3): 864-73.
- URCIUOLO, A., QUARTA, M., MORBIDONI, V., GATTAZZO, F., MOLON, S., GRUMATI, P., MONTEMURRO, F., TEDESCO, F. S., BLAAUW, B., COSSU, G., VOZZI, G., RANDO, T. A. et BONALDO, P. (2013). "Collagen VI regulates satellite cell self-renewal and muscle regeneration." *Nat Commun* 4: 1964.
- USTANINA, S., CARVAJAL, J., RIGBY, P. et BRAUN, T. (2007). "The myogenic factor Myf5 supports efficient skeletal muscle regeneration by enabling transient myoblast amplification." *Stem Cells* 25(8): 2006-16.
- VAINZOF, M., AYUB-GUERRIERI, D., ONOFRE, P. C., MARTINS, P. C., LOPES, V. F., ZILBERZTAJN, D., MAIA, L. S., SELL, K. et YAMAMOTO, L. U. (2008). "Animal models for genetic neuromuscular diseases." *J Mol Neurosci* 34(3): 241-8.
- VAN DER VELDEN, J. L., LANGEN, R. C., KELDERS, M. C., WOUTERS, E. F., JANSSEN-HEININGER, Y. M. et SCHOLS, A. M. (2006). "Inhibition of glycogen synthase kinase-3beta activity is sufficient to stimulate myogenic differentiation." *Am J Physiol Cell Physiol* 290(2): C453-62.
- VASYUTINA, E., LENHARD, D. C. et BIRCHMEIER, C. (2007). "Notch function in myogenesis." *Cell Cycle* 6(12): 1451-4.
- VASYUTINA, E., LENHARD, D. C., WENDE, H., ERDMANN, B., EPSTEIN, J. A. et BIRCHMEIER, C. (2007). "RBP-J (Rbpsi) is essential to maintain muscle progenitor cells and to generate satellite cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(11): 4443-8.
- VEEMAN, M. T., AXELROD, J. D. et MOON, R. T. (2003). "A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling." *Dev Cell* 5(3): 367-77.
- VERRECCHIA, F. et MAUVIEL, A. (2007). "Transforming growth factor-beta and fibrosis." *World J Gastroenterol* 13(22): 3056-62.
- VOERMANS, N. C., BONNEMANN, C. G., HUIJING, P. A., HAMEL, B. C., VAN KUPPEVELT, T. H., DE HAAN, A., SCHALKWIJK, J., VAN ENGELEN, B. G. et JENNISKENS, G. J. (2008). "Clinical and molecular overlap between myopathies and inherited connective tissue diseases." *Neuromuscul Disord* 18(11): 843-56.
- VON MALTZAHN, J., BENTZINGER, C. F. et RUDNICKI, M. A. (2012). "Wnt7a-Fzd7 signalling directly activates the Akt/mTOR anabolic growth pathway in skeletal muscle." *Nat Cell Biol* 14(2): 186-91.
- VON MALTZAHN, J., CHANG, N. C., BENTZINGER, C. F. et RUDNICKI, M. A. (2012). "Wnt signaling in myogenesis." *Trends Cell Biol* 22(11): 602-9.
- VON MALTZAHN, J., RENAUD, J. M., PARISE, G. et RUDNICKI, M. A. (2012). "Wnt7a treatment ameliorates muscular dystrophy." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(50): 20614-9.
- WAGNER, K. R., MCPHERRON, A. C., WINIK, N. et LEE, S. J. (2002). "Loss of myostatin attenuates severity of muscular dystrophy in mdx mice." *Ann Neurol* 52(6): 832-6.

- WANG, N., TYTELL, J. D. et INGBER, D. E. (2009). "Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus." *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(1): 75-82.
- WANG, Y. X. et RUDNICKI, M. A. (2012). "Satellite cells, the engines of muscle repair." *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(2): 127-33.
- WEHLING, M., SPENCER, M. J. et TIDBALL, J. G. (2001). "A nitric oxide synthase transgene ameliorates muscular dystrophy in mdx mice." *J Cell Biol* 155(1): 123-31.
- WEI, J., MELICHIAN, D., KOMURA, K., HINCHCLIFF, M., LAM, A. P., LAFYATIS, R., GOTTARDI, C. J., MACDOUGALD, O. A. et VARGA, J. (2011). "Canonical Wnt signaling induces skin fibrosis and subcutaneous lipoatrophy: a novel mouse model for scleroderma?" *Arthritis Rheum* 63(6): 1707-17.
- WELLE, S., BHATT, K., SHAH, B. et THORNTON, C. (2002). "Insulin-like growth factor-1 and myostatin mRNA expression in muscle: comparison between 62-77 and 21-31 yr old men." *Exp Gerontol* 37(6): 833-9.
- WEN, Y., BI, P., LIU, W., ASAKURA, A., KELLER, C. et KUANG, S. (2012). "Constitutive Notch activation upregulates Pax7 and promotes the self-renewal of skeletal muscle satellite cells." *Mol Cell Biol* 32(12): 2300-11.
- WHALEN, R. G., HARRIS, J. B., BUTLER-BROWNE, G. S. et SESODIA, S. (1990). "Expression of myosin isoforms during notexin-induced regeneration of rat soleus muscles." *Dev Biol* 141(1): 24-40.
- WHITE, J. D., SCAFFIDI, A., DAVIES, M., MCGEACHIE, J., RUDNICKI, M. A. et GROUNDS, M. D. (2000). "Myotube formation is delayed but not prevented in MyoD-deficient skeletal muscle: studies in regenerating whole muscle grafts of adult mice." *J Histochem Cytochem* 48(11): 1531-44.
- WILLIAMS, A. R. et HARE, J. M. (2011). "Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease." *Circ Res* 109(8): 923-40.
- WOZNIAK, A. C. et ANDERSON, J. E. (2007). "Nitric oxide-dependence of satellite stem cell activation and quiescence on normal skeletal muscle fibers." *Dev Dyn* 236(1): 240-50.
- WROBEL, E., BRZOSKA, E. et MORACZEWSKI, J. (2007). "M-cadherin and beta-catenin participate in differentiation of rat satellite cells." *Eur J Cell Biol* 86(2): 99-109.
- WYNN, T. A. (2008). "Cellular and molecular mechanisms of fibrosis." *J Pathol* 214(2): 199-210.
- YABLONKA-REUVENI, Z. et DAY, K. (2011). Skeletal muscle stem cells in the spotlight: the satellite cell. *Regenerating the Heart: Stem cells and the Cardiovascular system*. I. Cohen et Gaudette, G., Springer, Human Press: 173-200.
- YABLONKA-REUVENI, Z. et NAMEROFF, M. (1987). "Skeletal muscle cell populations. Separation and partial characterization of fibroblast-like cells from embryonic tissue using density centrifugation." *Histochemistry* 87(1): 27-38.
- YABLONKA-REUVENI, Z., RUDNICKI, M. A., RIVERA, A. J., PRIMIG, M., ANDERSON, J. E. et NATANSON, P. (1999). "The transition from proliferation to differentiation

- is delayed in satellite cells from mice lacking MyoD." *Dev Biol* 210(2): 440-55.
- YAMAMOTO, N., AKAMATSU, H., HASEGAWA, S., YAMADA, T., NAKATA, S., OHKUMA, M., MIYACHI, E., MARUNOUCHI, T. et MATSUNAGA, K. (2007). "Isolation of multipotent stem cells from mouse adipose tissue." *J Dermatol Sci* 48(1): 43-52.
- YI, L. et ROSSI, F. (2011). "Purification of progenitors from skeletal muscle." *J Vis Exp*(49).
- YIN, H., PRICE, F. et RUDNICKI, M. A. (2013). "Satellite cells and the muscle stem cell niche." *Physiol Rev* 93(1): 23-67.
- ZAMMIT, P. S. (2008). "All muscle satellite cells are equal, but are some more equal than others?" *J Cell Sci* 121(Pt 18): 2975-82.
- ZAMMIT, P. S., GOLDING, J. P., NAGATA, Y., HUDON, V., PARTRIDGE, T. A. et BEAUCHAMP, J. R. (2004). "Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal?" *J Cell Biol* 166(3): 347-57.
- ZHANG, J. S., KRAUS, W. E. et TRUSKEY, G. A. (2004). "Stretch-induced nitric oxide modulates mechanical properties of skeletal muscle cells." *Am J Physiol Cell Physiol* 287(2): C292-9.
- ZHOU, L., PORTER, J. D., CHENG, G., GONG, B., HATALA, D. A., MERRIAM, A. P., ZHOU, X., RAFAEL, J. A. et KAMINSKI, H. J. (2006). "Temporal and spatial mRNA expression patterns of TGF-beta1, 2, 3 and TbetaRI, II, III in skeletal muscles of mdx mice." *Neuromuscul Disord* 16(1): 32-8.
- ZHOU, Z. et BORNEMANN, A. (2001). "MRF4 protein expression in regenerating rat muscle." *J Muscle Res Cell Motil* 22(4): 311-6.
- ZHU, J., LI, Y., SHEN, W., QIAO, C., AMBROSIO, F., LAVASANI, M., NOZAKI, M., BRANCA, M. F. et HUARD, J. (2007). "Relationships between transforming growth factor-beta1, myostatin, and decorin: implications for skeletal muscle fibrosis." *J Biol Chem* 282(35): 25852-63.
- ZIMMERMAN, S. D., McCORMICK, R. J., VADLAMUDI, R. K. et THOMAS, D. P. (1993). "Age and training alter collagen characteristics in fast- and slow-twitch rat limb muscle." *J Appl Physiol* 75(4): 1670-4.
- ZUK, P. A., ZHU, M., MIZUNO, H., HUANG, J., FUTRELL, J. W., KATZ, A. J., BENHAIM, P., LORENZ, H. P. et HEDRICK, M. H. (2001). "Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies." *Tissue Eng* 7(2): 211-28.

Annexes

Annexe 1 Les dystrophies musculaires et protéines associées

Liste non exhaustive des dystrophies musculaires, leur mode de transmission mendélien, la localisation chromosomique de la mutation, la protéine mutée et les modèles murins disponibles. **DM**, dystrophie musculaire; **LGMD**, « Limb-girdle muscular dystrophie », dystrophie musculaire des ceintures; **DMC**, dystrophie musculaire congénitale; **RX**, récessive liée à l'X; **DA**, dominante autosomale; **RA**, récessive autosomale. Adapté de (DURBEEJ et CAMPBELL 2002)

DM de Duchenne et de Becker	RX	Xp21	Dystrophine	Mdx
DM d'Emery-Dreifuss	RX	Xp28	Emerine	-
LGMD 1A	DA	5q31	Myotiline	-
LGMD 1B	DA	1q11	Lamine A/C	Lmna ⁺
LGMD 1C	DA	3p25	Cavéoline-3	Cav3 ⁺
LGMD 1D	DA	6q23	?	-
LGMD 1 ^E	DA	7q32	?	-
LGMD 1F	DA	5q31	?	-
LGMD 2A	RA	15q15	Calpaïne-3	Capn3 ⁺
LGMD 2B	RA	2p13	Dysférine	SJL
LGMD 2C	RA	13q12	γ-sarcoglycane	Sgcg ⁺
LGMD 2D	RA	17q12	α-sarcoglycane	Sgca ⁺
LGMD 2 ^E	RA	4q12	β-sarcoglycane	Sgcb ⁺
LGMD 2F	RA	5q33	δ-sarcoglycane	Sgcd ⁺
LGMD 2G	RA	17q11	Telethonine	-
LGMD 2H	RA	9q31	TRIM31	-
LGMD 2I	RA	19q13	Protéine liée à la Fukutine	-
Myopathie de Miyoshi	RA	2p13	Dysférine	SJL
DM tibiale	DA	2q31	?	-
DMC classique	RA	6q22	Laminine α2	Dy
DMC de Fukuyama	RA	9q31	Fukutine	-
DMC1C	RA	19q13	Protéine liée à la Fukutine	-
DMC intégrine-α7	RA	12q13	intégrine-α7	Itga7 ⁺
DMC d'Ulrich	RA	?	Collagène VI α2	-
DMC de colonne raide	RA	1p35	Sélenoprotéine N	-
Syndrome muscle-œil-cerveau	RA	1p32	POMGnT1	-
DM d'Emery-Dreifuss	DA	1q11	Lamin A/C	Lmna ⁺
Myopathie de Bethlem	DA	21q22	Collagène VI α1	Col6a1 ⁺
Myopathie de Bethlem	DA	21q22	Collagène VI α2	-
Myopathie de Bethlem	DA	2q37	Collagène VI α3	-
DM Facio-scapulo-humérale	DA	4q35	?	-
DM Scapulo-péronéale	DA	12q21	?	-
DM Oculo-pharyngée	DA	14q11.2	Protéine de liaison PolyA -2	-
Dystrophie Myotonique	DA	19q13	Protéine kinase-myotonine/Six5	Six5 ⁺

Annexe 2 Modèles murins déficients pour une protéine du complexe DGC

De nombreux modèles murins déficients pour une protéine impliquée dans la jonction fibre/MEC ont été créés et présentent une longévité variable et un phénotype plus ou moins sévère. Adapté de (DURBEEJ et CAMPBELL 2002)

Sgca^{-/-} (α-sarcoglycane)	> 1 an	Modérée
Sgcb^{-/-} (β-sarcoglycane)	> 1 an	Sévère
Sgcg^{-/-} (γ-sarcoglycane)	20 sem.	Sévère
Sgcd^{-/-} (δ-sarcoglycane)	> 1 an	Sévère
Sspn^{-/-} (Sarcospane)	> 1 an	Aucune
DG^{-/-} (Dystroglycane)	Mort embryonnaire	Non applicable
DG chimérique (Dystroglycane)	> 1 an	Modérée
Mdx (dystrophine)	> 1 an	Modérée
Mdx^{2cv} (dystrophine, Dp260)	> 1 an	Modérée
Mdx^{3cv} (dystrophine, Dp260, Dp140, Dp116, Dp71)	> 1 an	Modérée
Mdx^{4cv} (dystrophine, Dp140, Dp260)	> 1 an	Modérée
Mdx^{5cv} (dystrophine)	> 1 an	Modérée
Mdx52 (dystrophine, Dp140, Dp260)	> 1 an	Modérée
Dp71^{-/-}	> 6 mois	Aucune
Mnf/mdx (myocyte nuclear factor, dystrophine)	3 sem.	Sévère
MyoD/mdx (MyoD, Dystrophine)	1 an	Sévère
nNOS^{-/-} (neuronal nitric oxyde synthase)	> 1 an	Aucune
nNOS/mdx	> 1 an	Modérée
Utrn^{-/-} (utrophine)	> 1 an	Aucune
Utrn^{-/-}/mdx (utrophine, dystrophine)	4-20 sem.	Sévère
Utrn^{-/-}/mdx^{3cv} (utrophine, dystrophine Dp260, Dp140, Dp116, Dp71)	4-20 sem.	Sévère
Adbn^{-/-} (α-dystrobrevine)	> 1 an	Modérée
Adbn^{-/-}/mdx (α-dystrobrevine, dystrophine)	8-10 mois	Modérée
Utrn^{-/-}/mdx/Adbn^{-/-} (utrophine, dystrophine, α-dystrobrevine)	3-11 sem.	Sévère
α1-dystrophine	> 1 an	Aucune
Cav3^{-/-} (Cavéoline-3)	>	Modérée

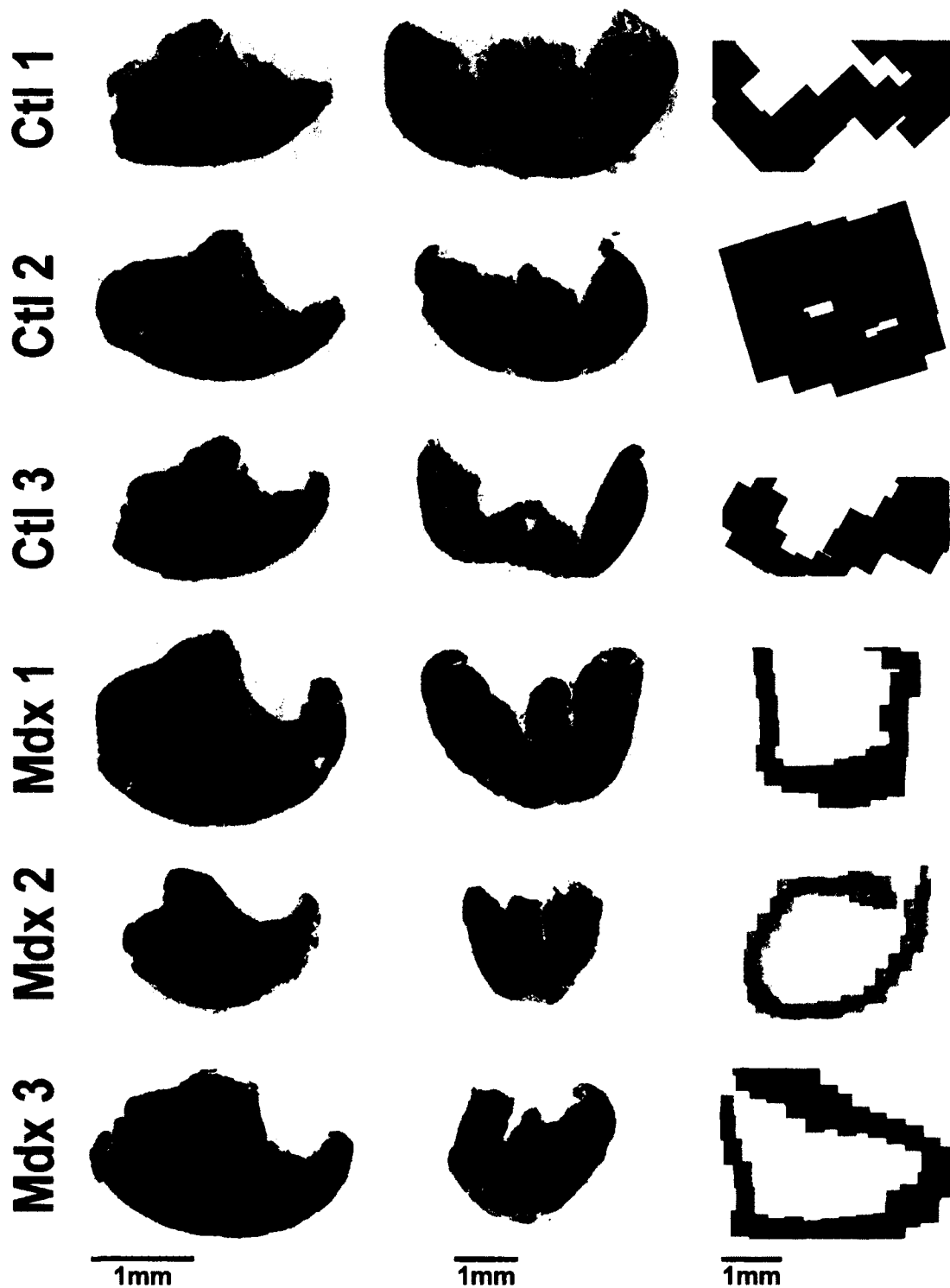


Figure S1 : Reconstitutions de coupes transversales (5 μm) de muscles Tibialis Antérieur (TA), Gastrocnemius, (Gas) et Diaphragme (Dia) provenant de 3 souris sauvages (CTL) et dystrophiques (mdx) colorées au trichrome de Masson. Cette coloration permet de localiser le collagène en bleu et les fibres musculaires en rouge.

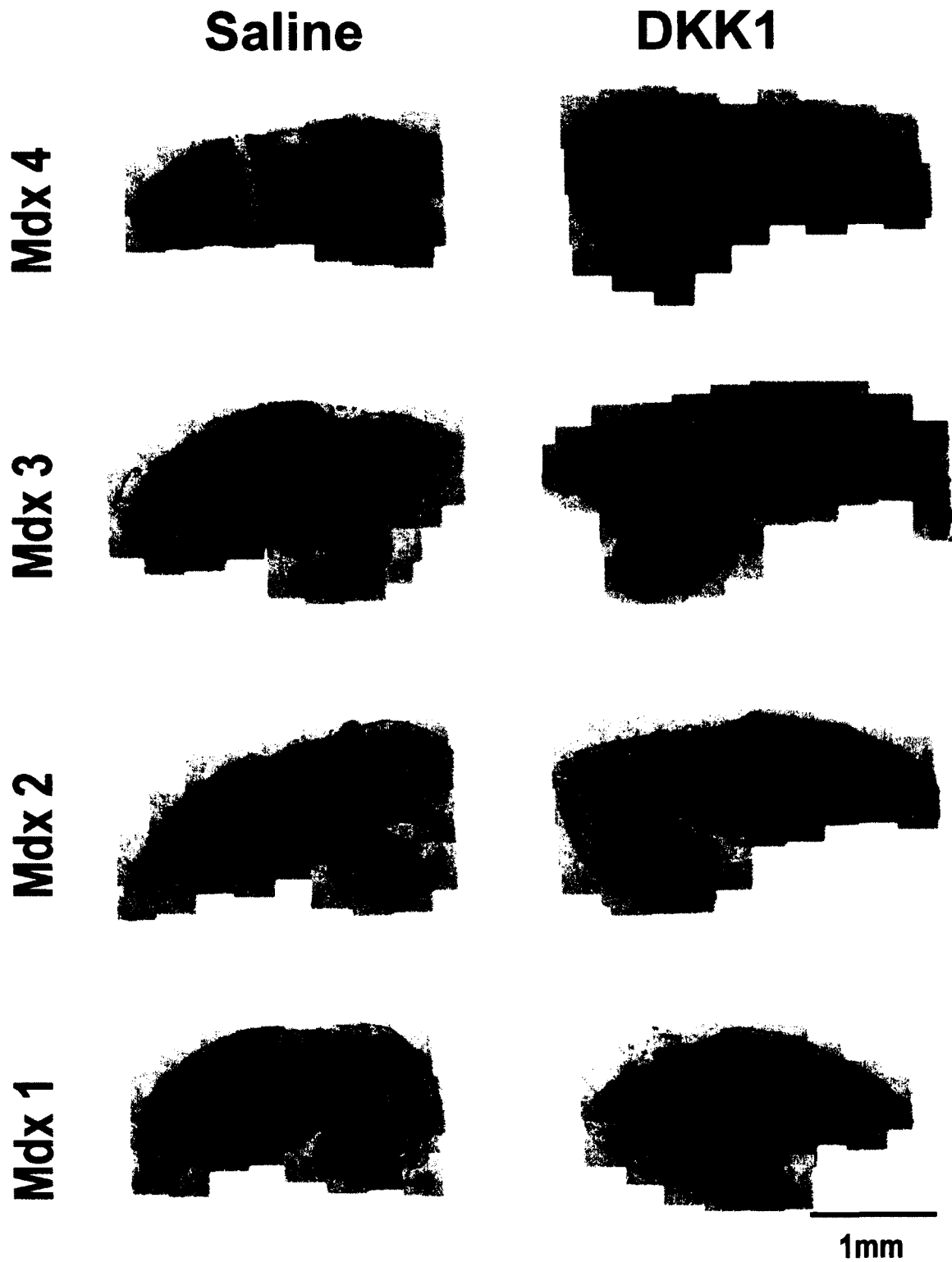


Figure S2 : Reconstitutions de coupes transversales (5 μ m) de Gastrocnemius (Gas) colorées au Sirius Red, provenant de 4 souris dystrophiques (mdx), taitées (DKK1) ou non (saline) avec l'antagoniste de la voie Wnt, DKK1.

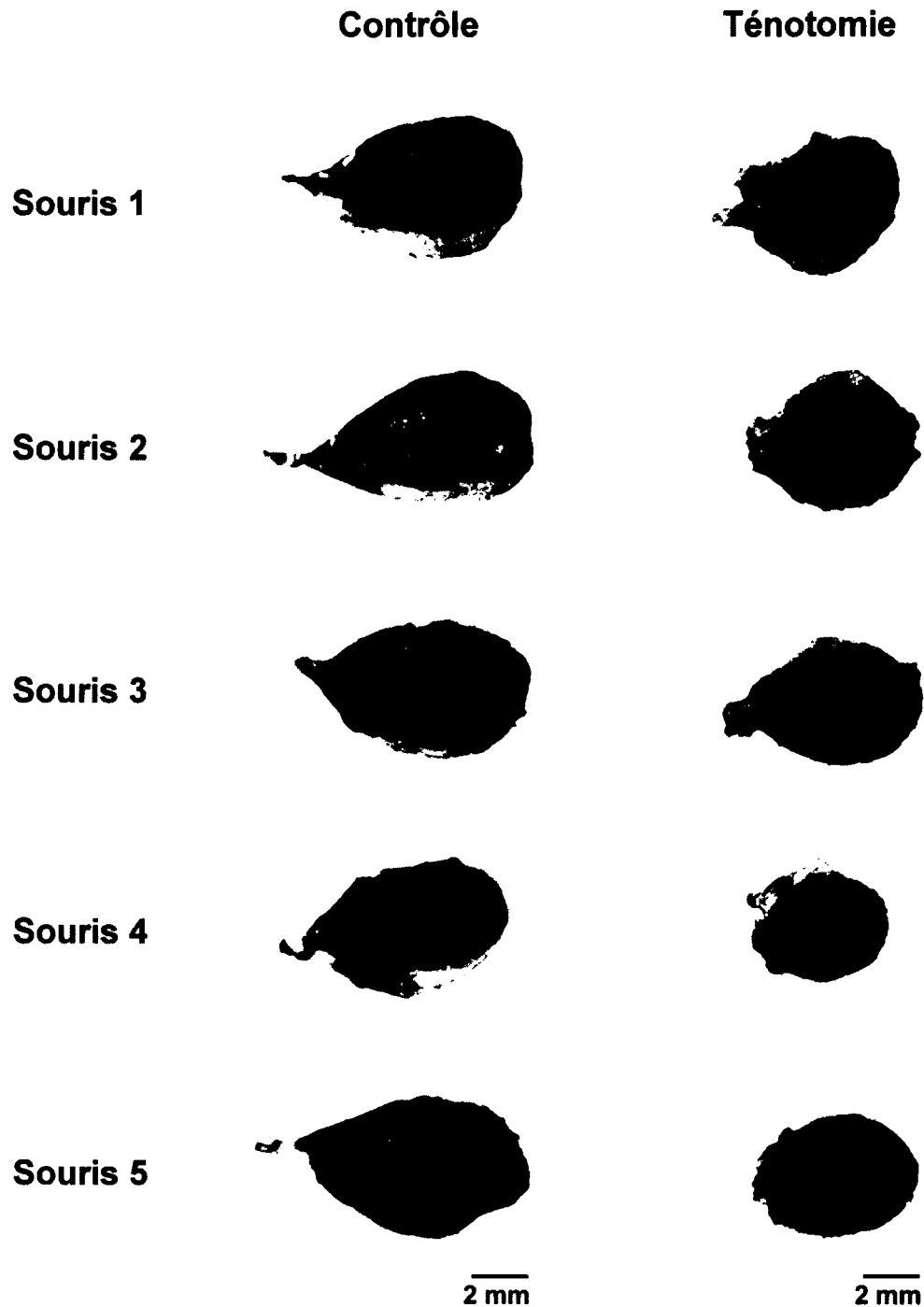


Figure S3 : Images en lumière visible de muscles Tibialis Anterior (TA) 10 jours suivant une ténotomie. Les TA controlatéraux ont été utilisés comme contrôle. Les ténotomies ont été effectuées chez des souris Myf5-nLacZ permettant, suite à un marquage au X-gal, de localiser les cellules satellites et les CPM en bleu. Notez l'important marquage bleu dans le muscle ayant subi la ténotomie attestant d'une forte présence des CPM prolifératives. Notez aussi la réduction de taille des muscles ténotomisés par rapport à leurs contrôles respectifs.