



Compte rendu de la réunion Club Muscle Développement III

16-17 décembre 2004, Paris.

**Compte Rendu rédigé par Thierry Toursel, PhD
AFM, Direction du développement des Thérapeutiques**

La troisième réunion du club muscle s'est tenue les 16 et 17 décembre 2004 à l'Institut de Myologie, Paris.

Cette rencontre a été divisée en trois parties : Signalisation, Développement et Cellules satellites qui ont fait l'objet de 21 présentations.

Voici un résumé des exposés les plus marquants.

Signalisation

Les cadhérines sont des molécules d'adhésion impliquées dans la reconnaissance cellulaire et la morphogénèse tissulaire. Les muscles squelettiques expriment les N-, M- et R-cadhérines. La transduction du signal par les cadhérines se fait via des Rho GTPases (RhoA, Rac1 et Cdc42), molécules impliquées dans le remodelage du cytosquelette et la transcription des gènes.

R.M.Medge/J.Gavard, Inserm U440, Institut du Fer à Moulin, Paris

La N-cadhérine est exprimée durant la myogenèse et serait impliquée dans le programme de différenciation des précurseurs myogéniques. Dans ce travail l'implication de la N-cadhérine et ses mécanismes d'action au début de la différenciation ont été étudiés. L'activation de la N-cadhérine pourrait promouvoir l'activation de la myogénine et la troponine T. Par ailleurs l'adhésion cellulaire via la N-cadhérine serait associée à l'arrêt du cycle cellulaire par l'accumulation nucléaire de p21 et p27, des inhibiteurs de kinases intervenant avec les cyclines. La signalisation via la N-cadhérine ferait intervenir les protéines p120 et les bêta-caténines.

C.Gautier-Rouvière, CRBM-CNRS UPR1086, Montpellier

Dans les myoblastes, l'adhésion cellulaire via les N-cadhérines induit l'engagement dans la voie de la myogenèse via la régulation positive de RhoA et la régulation négative de Rac1 et Cdc42. La signalisation se fait également dans le sens RhoA vers la N-cadhérine. Ainsi, dans les myoblastes l'activation de RhoA

est nécessaire pour la formation de contacts cellulaires 'N-cadhérine dépendants'. De plus, RhoA inhibe l'activité de la M-cadhérine et la fusion des myoblastes.

S.Leibovitch, INRA-UMR866, Montpellier

Au cours du cycle cellulaire, MyoD présente un profil d'expression bi-modale avec un pic majeur au milieu de la phase G1 et un autre pic en fin de G2. L'arrêt de la prolifération et le déclenchement de la différenciation myogénique dépendent du taux d'expression de la protéine MyoD à la transition G1/S du cycle cellulaire.

MyoD exerce un contrôle sur le déclenchement de la mitose en régulant l'accumulation de la protéine p21 en fin de G2. L'entrée en mitose des myoblastes est accompagnée de la phosphorylation de MyoD sur ses résidus Ser5 et Ser200 et par une chute brutale de l'expression des protéines MyoD et p21. La mutation des Sérines 5 et 200 en Alanine stimule l'activité transcriptionnelle de MyoD sur le promoteur du gène p21, provoque l'accumulation de cellules en G2 et retarde leur entrée en mitose. En fin de G2, MyoD est dégradé par le système ubiquitine-protéasome indépendamment de l'APC/cyclosome, malgré la présence d'une boîte de destruction très conservée dans le domaine b-HLH. Seule la phosphorylation de la sérine 200 par la cycline B-Cdc2 apparaît être impliquée dans la dégradation de MyoD à la transition G2/M. Au cours de la mitose, on observe une stabilisation de MyoD accompagnée d'une répression de sa fixation sur l'ADN et de son activité transcriptionnelle sur le promoteur du gène p21. MyoD est exclu des chromosomes condensés et redistribué dans le cytoplasme mitotique. Enfin, MyoD redevient instable au début de la phase G1 par le jeu de nouvelles déphosphorylation/phosphorylation. L'ensemble de ces données plaide en faveur d'un rôle majeur de MyoD aux points critiques G1/S et G2/M du cycle cellulaire.

D.Hantai, Institut de Myologie, Paris

Description d'un premier cas d'une atteinte de la transmission neuromusculaire chez l'homme due à des mutations dans le gène codant le récepteur tyrosine kinase musculaire, MuSK. L'analyse génétique a permis d'identifier deux mutations hétéroalléliques, une mutation décalant le cadre de lecture (c.220insC) et une mutation faux sens (V790M). Sur la biopsie musculaire du patient ont été observées d'importantes anomalies structurales pré- et post-synaptiques de la jonction neuromusculaire et une diminution majeure de l'expression de la sous-unité ϵ du récepteur de l'acétylcholine (RACH) et de MuSK. Des expériences d'expression des mutants de MuSK, soit dans les cellules COS soit chez la souris, reproduisent le phénotype des remaniements synaptiques observés chez le patient.

I.Marty, CEA-Inserm U607, Grenoble

Fonction duale de la triadine Trisk 95 dans le muscle squelettique : le couplage excitation contraction et la différenciation. La triadine est une protéine spécifique des muscles striés, et qui était imaginée localisée uniquement au niveau de la triade du muscle squelettique et associée au complexe de mobilisation calcique. Plusieurs isoformes de la triadine sont exprimées dans le muscle squelettique de rat, le laboratoire en a cloné 4, appelées Trisk 95, Trisk 51, Trisk 49 et Trisk 32,

en fonction de leur poids moléculaire. Alors que Trisk 95 et Trisk 51 sont spécifiquement localisées au niveau de la triade, Trisk 49 et Trisk 32 sont dans d'autres parties très spécifiques du reticulum sarcoplasmique, mais pas dans la triade. Elles pourraient avoir un rôle dans l'ancrage du reticulum sarcoplasmique. Afin de comprendre le rôle de Trisk 95 dans la différenciation et dans le couplage excitation contraction, son expression dans des cellules satellites en culture a été modifiée à l'aide d'adénovirus permettant soit la surexpression de Trisk 95, soit son blocage. La surexpression de Trisk 95 aboutit au blocage du couplage excitation-contraction, alors que le blocage de Trisk 95 par un virus antisens aboutit au blocage de la différenciation. L'ensemble de ces observations tend à mieux comprendre l'intervention spécifique de chacune de ces isoformes de triadine partenaires du complexe de mobilisation calcique, dans les pathologies qui lui sont associées (HM, CCD, MmCD).

S.Konig/L.Bernheim, Genève

Les myoblastes humains doivent subir une hyperpolarisation (-70 mV) avant d'entrer dans le processus de différenciation. Cette hyperpolarisation met en jeu des courants potassiques via le canal Kir2.1 et génère une entrée de calcium nécessaire pour la différenciation et la fusion des myoblastes.

Ce travail indique que les canaux Kir2.1 fonctionnels peuvent être détectés plusieurs heures avant l'expression des facteurs de transcription myogénine et MEF2. Par ailleurs, l'utilisation de drogues ou d'antisens pour réduire les courants issus des canaux Kir2.1, inhibent l'expression/activité de myogénine et MEF ainsi que le taux de fusion des myoblastes en myotubes. Ces résultats indiquent que l'activation des canaux Kir2.1 est un événement clé précoce responsable de l'initiation de la myogenèse, en activant les facteurs de transcription myogénine et MEF2 via une voie dépendante du calcium et activée par l'hyperpolarisation. L'hyperpolarisation induite par les canaux Kir2.1 pourrait contrôler les voies de régulation (p38 MAPK, CaMK et calcineurine) impliquées dans le contrôle des facteurs de transcription myogéniques.

Développement

G.Junior/K.Jagla, Inserm U384, Clermont Ferrand

Une nouvelle stratégie de recherche de gènes cibles de facteurs de transcription myogéniques chez la Drosophile. En s'appuyant sur les données disponibles chez la Drosophile nous avons développé une approche permettant d'identifier chez la Drosophile les gènes cibles d'un facteur de transcription de manière tissu spécifique. Cette approche s'appuie sur l'utilisation de 2 techniques complémentaires, un outil bioinformatique (Flyenhancer) permettant la recherche ciblée de modules de régulation et la construction d'un microarray génomique et une technique de recherche in vivo par cross-link et immunoprécipitation de chromatine (X-ChIP). La combinaison de ces deux techniques permet d'identifier de manière tissu-spécifique les gènes cibles d'un facteur de transcription donné mais également les séquences régulatrices adjacentes sur lesquelles il se fixe. Pour tester cette approche nous avons utilisé deux types de facteurs de transcription mésodermiques. D'une part un facteur exprimé ubiquitairement dans ce tissu : Mef2 dont certaines cibles ont été décrites in vivo, d'autre part, le facteur Ladybird dont l'expression est restreinte à quelques types cellulaires et

dont les cibles in vivo ne sont pas identifiées. Les résultats préliminaires ont montré que dans le cas du facteur ubiquitaire Mef2, plus de 70% des régions sélectionnées par bioinformatique sont enrichies dans le matériel immunoprécipité avec anticorps anti-Mef2. Nous avons également pu montrer que la sensibilité de cette technique est suffisante pour identifier des gènes cibles de facteurs exprimés de manière restreinte, comme Ladybird. Les analyses fonctionnelles et des expériences de transgénèse sont en cours pour valider les cibles identifiées.

J.J.Brustis/P.Cottin, USC-INRA 2009, Bordeaux

Interactions m-calpaïne/cavéoles dans des myoblastes issus de cellules C2C12 : approche protéomique pour l'étude de la fonction et de la régulation de cette protéase au niveau membranaire. Les cavéoles sont des vésicules membranaires impliquées dans différentes voies de signalisation et, par conséquent sont impliquées dans différentes maladies comme la dystrophie des ceintures LGMD1C. Ces vésicules sont enrichies en sphingolipides et en cholestérol, la présence de la protéine cavéoline caractérise ces structures. La cavéoline a un rôle central dans l'organisation des protéines et des lipides présents dans les cavéoles. La purification de cavéoles couplée à des techniques de protéomique a permis de localiser la m-calpaïne et ses 2 substrats (protéine kinase C et MARCKS) dans des cavéoles de cellules musculaires. Des études complémentaires sont en cours pour étudier les mécanismes impliqués dans la protéolyse calcium-dépendante dans les cavéoles des cellules musculaires.

C.Genet/X.Cousin, INRA-UMR866, Montpellier

Rôle de l'acide rétinoïque (AR) au cours du développement du muscle squelettique. Pour étudier le rôle joué par l'AR au cours du développement musculaire, les concentrations endogènes d'AR ont été modifiées par incubation avec de l'AR exogène ou avec un inhibiteur de sa synthèse : le DEAB. Par la suite, a été réalisée l'analyse microarray avec des ARN extraits des somites et du mésoderme présomitique d'embryons traités par l'AR (versus contrôle) ou par le DEAB (versus contrôle). Une puce à oligonucléotides comportant ~ 17 000 gènes a été utilisée. Suite à l'exploitation statistique des résultats, ont été identifiés 467 gènes différentiellement exprimés par l'AR et 1873 gènes pour le DEAB. Après sélection des gènes potentiellement intéressants (facteurs de transcription, partenaires des voies de signalisation etc..), la validation expérimentale des changements d'expression de ces gènes par RT-PCR quantitative reste à faire. En parallèle, le projet s'attachera à déterminer le profil d'expression spatiale des gènes sélectionnés par hybridation in situ. L'identification de ces gènes ouvrira de nouvelles pistes d'exploration pour comprendre les mécanismes impliqués dans la régulation du développement musculaire chez les vertébrés.

Cellules souches

M.Kitzmann/G.Carnac, CRBM FRE2593, Montpellier

Rôle de Notch 1 dans l'hypertrophie musculaire.

Les cellules satellites sont capables de générer des cellules qui vont entrer en différenciation et des cellules qui vont adopter un phénotype immature, proche de celui de la cellule satellite originelle, que l'on a appelé cellules "apparentées-

satellite". Néanmoins, les mécanismes moléculaires responsables de cette ségrégation cellulaire restent à déterminer. Notch est un récepteur membranaire dont l'activation induit l'expression de gènes impliqués dans la détermination tissulaire et cellulaire ainsi que dans le maintien de l'état immature des cellules souches au cours du développement dans de nombreux tissus.

Afin de mieux caractériser le rôle du récepteur Notch1 dans la détermination et l'entrée en prolifération des cellules satellites, ont été caractérisées l'expression et l'activité de Notch 1 dans des cellules satellites prolifératives, différenciées et immatures ou "apparentées satellites". Il a pu être montré que Notch 1 était responsable du maintien d'une sous-population de cellules satellites dans un état immature et que l'inhibition de son activité (par inhibiteurs de g-sécrétases) dans cette sous-population entraînait une fusion de ces cellules avec les myotubes pré-existants, conduisant ainsi à un mécanisme d'hypertrophie musculaire.

F. Relaix/M. Buckingham, Inst Pasteur, Paris

L'origine somitique et la régulation moléculaire des cellules musculaires embryonnaires précoces sont bien documentées, cependant les étapes plus tardives de la myogenèse sont peu connues. Une nouvelle population de cellules présentes dans les somites et exprimant les marqueurs Pax3 et Pax7, mais pas les marqueurs spécifiques des cellules musculaires, a été identifiée. Ces cellules sont maintenues en une population cellulaire en "auto-renouvellement" dans tous les muscles aux stades embryonnaires et fœtaux. Elles constituent un pool de cellules progénitrices de cellules musculaires. Plus tard dans le développement fœtal ces cellules adoptent une position de cellules satellites caractéristiques des cellules progénitrices dans le muscle post-natal. Cette population résidente de cellules progénitrices Pax3/Pax7 constitue une source de cellules myogéniques d'une grande importance pour la formation des muscles squelettiques, mais également dans le contexte de la thérapie cellulaire pour les myopathies. Cette identification de l'origine embryonnaire de cellules satellites est de première importance.

S. Tajbakhsh, Inst Pasteur, Paris

Gènes de détermination de l'identité musculaire et hétérogénéité des cellules souches. Au cours du développement, plusieurs vagues de précurseurs musculaires viennent de cellules progénitrices localisées précisément dans l'embryon. Le muscle squelettique se différencie et se diversifie, non seulement par l'acquisition de l'identité musculaire, mais curieusement y compris par l'hétérogénéité dans la population de cellules souches. Des travaux réalisés grâce à l'obtention de souris double-mutantes (Myf5-Myod), ont permis de montrer qu'en l'absence de ces facteurs les cellules progénitrices restent multipotentes et ne peuvent pas réaliser la transition vers leur destin myogénique. Mais l'utilisation d'autres mutants de facteurs régulant la myogenèse a permis de révéler la hiérarchie entre ces facteurs Myf5 et Myod et un autre gène de régulation myogénique, Myf4. En fait contrairement à ce qui était admis, à savoir que Myf5 et Myod suffisaient seuls à conférer l'identité myogénique, les travaux présentés montrent Myf4 comme un gène de détermination myogénique en amont de Myod.

A.Fernandez, CNRS UPR 1142, Montpellier

Rôle et régulations de MyoD dans la Myogenèse Post-natale : implications pour la régénération du muscle squelettique. Deux phases essentielles contrôlent la régénération du muscle squelettique: 1) La phase d'activation puis multiplication des myoblastes 2) la phase post-mitotique de différenciation/fusion des myoblastes en myotubes, ou le retour à l'état quiescent indifférencié. Parmi les différents facteurs de régulation musculaire, le facteur myogénique MyoD a été montré comme essentiel pour induire la différenciation myogénique dans le muscle en régénération.

Le facteur myogénique MyoD, absent dans les cellules quiescentes est induit très rapidement lors de leur activation. Le facteur transcriptionnel SRF est directement impliqué dans l'activation du gène MyoD. Cette activation utilise une séquence CA₂G de fixation de SRF présente dans une région régulatrice du gène MyoD, qui lorsqu'elle est mutée ne permet plus l'expression de MyoD ex vivo dans les myoblastes, ni son induction normalement observée in vivo lors de la régénération musculaire chez la souris. L'étude de ce motif ADN CA₂G est poursuivie, ce motif s'avère posséder une double spécificité de liaison, capable de fixer SRF en prolifération et MEF2 en différenciation. Est également étudié le rôle de la voie insuline/PI3K/PKB pour laquelle ont été caractérisés les rôles respectifs des kinases AKT/PKB a et b. Cette voie coopère avec la voie Wnt/ β -caténine pour induire une fusion des cellules de réserve avec les myotubes en différenciation, permettant leur hypertrophie.

V.Mouly/A.Bigot/V.Jacquemin, UMR7000, bd de l'Hôpital, Paris

Facteurs impliqués dans les sorties de cycle cellulaire des cellules satellites. Dans le muscle squelettique, les cellules satellites sont les seules cellules myogéniques responsables de la croissance des fibres et de leur régénération. Ces cellules présentent deux sorties de cycle irréversibles, l'une au cours de la sénescence répllicative et l'autre au cours de la différenciation.

Dans un premier temps, le but de cette étude est de déterminer les facteurs impliqués dans ces deux types de sorties de cycle. Le cycle cellulaire étant finement régulé par les protéines Rb, p53 et par les inhibiteurs des CdK (CKI), l'analyse de l'expression de ces facteurs a été réalisée. La famille Cip-Kip des CKI joue un rôle essentiel en différenciation : p57, absent dans les myoblastes en prolifération est induit et se maintient à un niveau élevé dans les stades tardifs de différenciation. En revanche cette famille ne semble pas jouer de rôle prépondérant dans le mécanisme de sénescence. Au cours de la vie proliférative des myoblastes humains, une accumulation de la protéine p16 (famille des Ink-4) a lieu de façon concomitante à une augmentation d'expression de la Cycline D1. On peut également noter une disparition totale des deux formes de la protéine du rétinoblastome Rb (phosphorylée et non phosphorylée) en sénescence tardive.

D'autre part, le projet consistait à déterminer l'impact d'un facteur de croissance, l'IGF1 sur ces deux sorties de cycle. Nous montrons que l'IGF1 n'augmente pas de façon significative la capacité proliférative des myoblastes humains mais induit un délai dans l'entrée en sénescence. L'IGF1 induit également une hypertrophie des myotubes humains in vitro. Cette hypertrophie est caractérisée par une augmentation du nombre de noyaux par myotubes, une augmentation

de l'index de fusion et une augmentation de l'expression des chaînes lourdes de myosines. De plus l'IGF1 induit une hypertrophie indépendamment du processus de prolifération, par recrutement des cellules réserves. En perspective, l'objectif est de déterminer l'impact de l'IGF1 sur les facteurs du cycle cellulaire qui ont montré être impliqués dans ces deux sorties de cycle irréversibles des myoblastes humains.

I. Guillet-Deniau, Inst Cochin, Paris

La synthèse de lipides intramyocellulaires est corrélée à une diminution d'activité de la voie Wnt-b-caténine dans les cellules satellites. Wnt-10b, un membre de la famille des protéines secrétées qui régulent le développement embryonnaire, stimule l'expression de facteurs myogéniques (MyoD, Myf5) et réprime l'adipogenèse. L'inhibition de la voie canonique Wnt-b-caténine pouvant induire la « transdifférenciation » des myoblastes en adipocytes, l'hypothèse a été émise qu'une altération du potentiel myogénique puisse activer par défaut un programme adipogénique dans les cellules satellites. Il a été montré que le facteur adipogénique Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c (SREBP-1c) induisait une lipogenèse de novo conduisant à l'accumulation de lipides dans des cellules satellites de rat en culture primaire. Les protéines Wnt-10b et SREBP-1c montrent un profil d'expression inverse au cours de la différenciation des cellules satellites, SREBP-1c n'étant exprimé que dans les myotubes, alors que Wnt-10b n'y est plus détectable. De plus, l'invalidation par ARN interférence de la protéine SREBP-1c dans les myotubes re-induit l'expression de Wnt-10b, ainsi que l'activation de la b-caténine et sa translocation dans le noyau. Ces résultats suggèrent que l'inhibition des gènes adipogéniques pourrait conduire à la réactivation de la voie Wnt-b-caténine dans les cellules satellites musculaires totalement différenciées en culture. L'activation de la voie de signalisation Wnt pourrait maintenir les cellules satellites dans la lignée myoblastique, empêchant ainsi la « dérive » adipocytaire qui se produit dans le muscle squelettique dans de nombreuses pathologies, ainsi qu'au cours du vieillissement.

B. Chazaud/R.K. Gherardi, Inserm EM I0011, Créteil

La niche vasculaire des cellules satellites: aspects microanatomiques et fonctionnels. Les cellules souches résident dans des niches anatomiques discrètes qui contrôlent leur devenir. Ces cellules, les cellules satellites, sont localisées à proximité des microvaisseaux. Une association non aléatoire entre les cellules satellites et les capillaires a été établie, par une analyse spatiale de muscles squelettiques de différentes espèces (fonction de Ripley's K et quadrat test) et par des études de microscopie confocale et électronique. Des expériences de transplantation de moelle osseuse marquée à la GFP montrent que les cellules GFP+ trouvées dans les niches sub-laminales des muscles squelettiques, sont localisées à la même distance des vaisseaux que les cellules satellites contrôles. La niche vasculaire des cellules souches est certainement un élément important à prendre en compte dans les essais de thérapie cellulaire. Des études moléculaires plus approfondies de cette intimité cellulaire seront certainement des pistes à explorer.