

Etat actuel des connaissances sur la régénération des muscles striés squelettiques et du sphincter strié urétral : les cellules satellites et les cellules précurseurs musculaires

Professeur René Yiou

Service d'Urologie
CHU Henri Mondor
51, av. du Mal de Lattre de Tassigny
94010 Créteil, France
Secrétariat: +33 (0)1.49.81.25.55
Email 1: rene.yiou@hmn.aphp.fr
Email 2: yiourene@gmail.com
<http://urologie-chu-mondor.aphp.fr>

Le terme générique de **cellules précurseurs musculaires** (CPM) est employé pour désigner l'ensemble des cellules ayant la capacité de former des fibres musculaires striées (figure 3, page 34). Il s'agit essentiellement des **cellules satellites** présentes à l'état quiescent dans les muscles striés squelettiques sous la lame basale des fibres. Lorsque ces cellules sont activées, elles prennent le nom de **myoblastes**.

3.1. Les cellules satellites et leur diversité

3.1.1. Anatomie des cellules satellites et de la fibre musculaire

Les muscles striés squelettiques sont composés de fibres multinuclées ayant chacune un récepteur cholinergique connecté à une terminaison nerveuse. Après avoir été lésées, les fibres musculaires peuvent régénérer à partir de cellules présentes entre leur membrane plasmique et la lame basale: les cellules satellites. Une fibre du muscle flexor brevis de rat possède environ 3 cellules satellites et sur une coupe transversale de muscle, 1 à 4 % des noyaux associés aux fibres musculaires observés correspondent en fait aux noyaux des cellules satellites (Morgan et Partridge, 2003 ; Bischoff, 1986, 1990). Il existe environ $2 \cdot 10^5$ à $3 \cdot 10^5$ cellules satellites par gramme de muscle strié soit approximativement 10^{10} à $2 \cdot 10^{10}$ cellules satellites dans le corps humain.

Dans un muscle normal, les cellules satellites sont présentes à l'état quiescent en phase G0 du cycle cellulaire. Leur cytoplasme est quasi virtuel, ne communique pas avec le cytoplasme de la fibre musculaire (Schmalbruch, 1978) et ne contient que très peu d'organites et pas de myofilaments (Campion, 1984). Le noyau, hétérochromatique, des cellules satellites est plus grand que celui, euchromatique, des fibres.

Lorsque la fibre musculaire est lésée, les cellules satellites sont activées et entrent dans une phase de prolifération. Elles sont alors nommées myoblastes. Ceux-ci fusionnent avec les fibres lésées ou bien forment de nouvelles fibres musculaires multinucléées (figure 3).

3.1.2. La diversité des cellules satellites

Il existe une grande hétérogénéité dans la population des cellules satellites musculaires. Celles-ci peuvent présenter des caractéristiques différentes en fonction de l'âge, du muscle et de l'espèce animale. Le vieillissement s'accompagne d'une perte de cellules satellites et de leur capacité proliférative (Cooper et coll., 2003 ; Renault et coll., 2002 ; Bonavaud et coll., 1997). Il existe trois fois plus de cellules satellites dans les muscles de type I (fonctionnant en mode aérobie et ayant la capacité de développer une activité tonique prolongée) que dans les muscles de type II (fibres anaérobiques rapidement fatigables). En culture, les cellules satellites humaines peuvent former des fibres de types I et II indifféremment du muscle dont elles proviennent (Bonavaud et coll., 2001). Cependant, in vivo, la différenciation terminale des myoblastes et le typage des fibres régénérées semblent influencés par des facteurs environnementaux tels que le mode d'innervation (Schmidt et Emser, 1985 ; Rafuse et coll., 1996 ; Wang et coll., 2002). Des expériences d'autotransplantation musculaire ont montré que la régénération des fibres de type I est plus lente que celle des fibres de type II (Schmidt et Emser, 1985). Ceci est à prendre en compte dans la physiopathologie de l'incontinence urinaire si l'on admet que les fibres musculaires sphinctériennes de l'homme sont de type I.

Il existe aussi une grande diversité parmi les cellules satellites d'une même fibre musculaire (Beauchamp et coll. 2000). En culture, certaines d'entre elles

fusionnent après une courte phase de prolifération alors que d'autres pourraient constituer une réserve de cellules souches restant à un stade indifférencié. Le rôle de ces cellules serait d'assurer le renouvellement de cellules satellites consommées à la suite d'un processus de dégénération-régénération.

3.2. La différenciation musculaire

A la sortie du cycle prolifératif, les myoblastes acquièrent des caractéristiques de différenciation myogénique et fusionnent pour former des myotubes. Cette phase est marquée par la synthèse de nombreuses protéines musculaires produites par les gènes de régulation musculaire (desmine, actine, myosine, tropomyosine, créatine phosphokinase). La différenciation myogénique est principalement régulée par des gènes codant pour un ensemble de protéines à structure *basic helix-loop-helix* (bHLH) appelé famille MRF (*Muscle Regulatory Factor*). Cette famille comprend quatre membres : MyoD, Myf-5, myogénine et MRF4 (Perry et Rudnicki, 2000). Les protéines de la famille MRF forment des homodimères ou plus généralement des hétérodimères grâce au couplage avec une protéine excitatrice. Cet hétérodimère peut alors se fixer sur une séquence consensus de l'ADN (CANNTG) appelée « E-box » et induire la transcription de protéines musculaires.

3.3. Les autres cellules précurseurs musculaires

D'autres types de cellules peuvent être recrutées et participer à la formation de nouvelles fibres musculaires lors d'un processus de régénération : les cellules souches médullaires (Ferrari et coll., 1998), les cellules thymiques (Grounds et coll., 1992) ou les fibroblastes (Pye et Watt, 2001).

D'après Labarge et Blau (2002), les cellules souches médullaires auraient, chez l'adulte, la faculté de coloniser des niches de cellules satellites préalablement vidées par une irradiation. Gussoni et coll. (2002) ont récemment rapporté le cas d'un homme ayant eu une greffe de moelle osseuse à la naissance en raison d'une aplasie médullaire et chez qui a été découvert, à l'adolescence et à l'occasion de chutes à répétition, une myopathie de Duchenne de Boulogne. Cette maladie musculaire étant habituellement létale (ou extrêmement invalidante) à l'âge à laquelle elle a été

découverte, il est probable que la greffe de moelle osseuse ait protégé les muscles du receveur, en plus de traiter l'aplasie. La contribution exacte du recrutement médullaire lors d'un processus de régénération musculaire n'est pas clairement définie, mais pourrait jouer un rôle crucial en cas de pathologie chronique.

3.4. Le cas du sphincter strié urétral

Le sphincter strié urétral est un muscle à part dont les capacités régénératives sont mal connues et doivent être analysées en tenant en compte de ses origines embryologiques.

Il est classiquement admis que les fibres musculaires squelettiques et les cellules satellites ont une origine somitique commune: chez la souris, les myoblastes embryonnaires issus de la partie dorsale des somites colonisent les membres avant le 18^{ème} jour post-coïtal (Perry et Rudnicki, 2000) puis fusionnent pour former les premières fibres ; certains d'entre eux restent dans un état quiescent pour former la population de cellules satellites responsables de la régénération musculaire à l'âge adulte. Selon Borirakchanyavat (1997b), les fibres musculaires du sphincter strié urétral ont une origine embryologique différente: elles résulteraient de la transdifférenciation des cellules musculaires lisses urétrales en fibres striées et par conséquent, proviendraient du mésoderme splanchnique et non des somites. Bien que peu documenté dans le sphincter, ce phénomène de transdifférenciation muscle lisse/strié a été décrit à plusieurs reprises dans l'œsophage (Kablar et coll., 2000, Patapoutian et coll., 1995) et dans le sphincter de l'iris (Volpe et coll., 1993) où un agencement similaire de fibres musculaires lisses et striées est observé. Cette originalité embryologique a plusieurs implications: elle pourrait expliquer l'innervation du sphincter strié de type végétatif - et donc tout à fait inhabituel pour un muscle strié - que certains auteurs ont observée ([Kakizaki](#) et coll., 1991 1994 ; Kumagai et coll., 1987), la trans-différenciation ayant entraîné un « glissement » de l'innervation initialement destinée aux fibres lisses vers des fibres striées.

Mais ces caractéristiques embryologiques posent avant tout la question des capacités régénératives du sphincter strié urétral. Selon la théorie classique, les cellules responsables de la régénération musculaire à l'âge adulte sont étroitement

liées aux cellules de la myogenèse embryonnaire, et les cellules musculaires lisses de l'appareil urinaire post natal n'ont aucune tendance spontanée à former des fibres striées in vitro ou in vivo.

L'autre caractéristique embryologique remettant en cause l'existence de cellules satellites dans le sphincter est son développement tardif en comparaison des muscles environnants, en particulier chez le rat (Borirakchanyavat et coll., 1997b). Chez cet animal, les premières fibres musculaires striées sphinctériennes apparaissent un peu avant la naissance, bien après la migration des myoblastes embryonnaires à l'origine des fibres musculaires et de leurs cellules satellites.

Les particularités embryologiques du sphincter strié urétral posent donc la question de sa capacité à régénérer après une lésion et de l'existence de cellules satellites sphinctériennes. Corvin et coll. (2001) ont isolé et cultivé des cellules provenant de sphincters striés humains et montré qu'elles formaient des fibres se contractant avec une stimulation chimique, mais cette étude n'a pas confirmé l'expression de marqueurs spécifiques des muscles striés ou des cellules satellites.

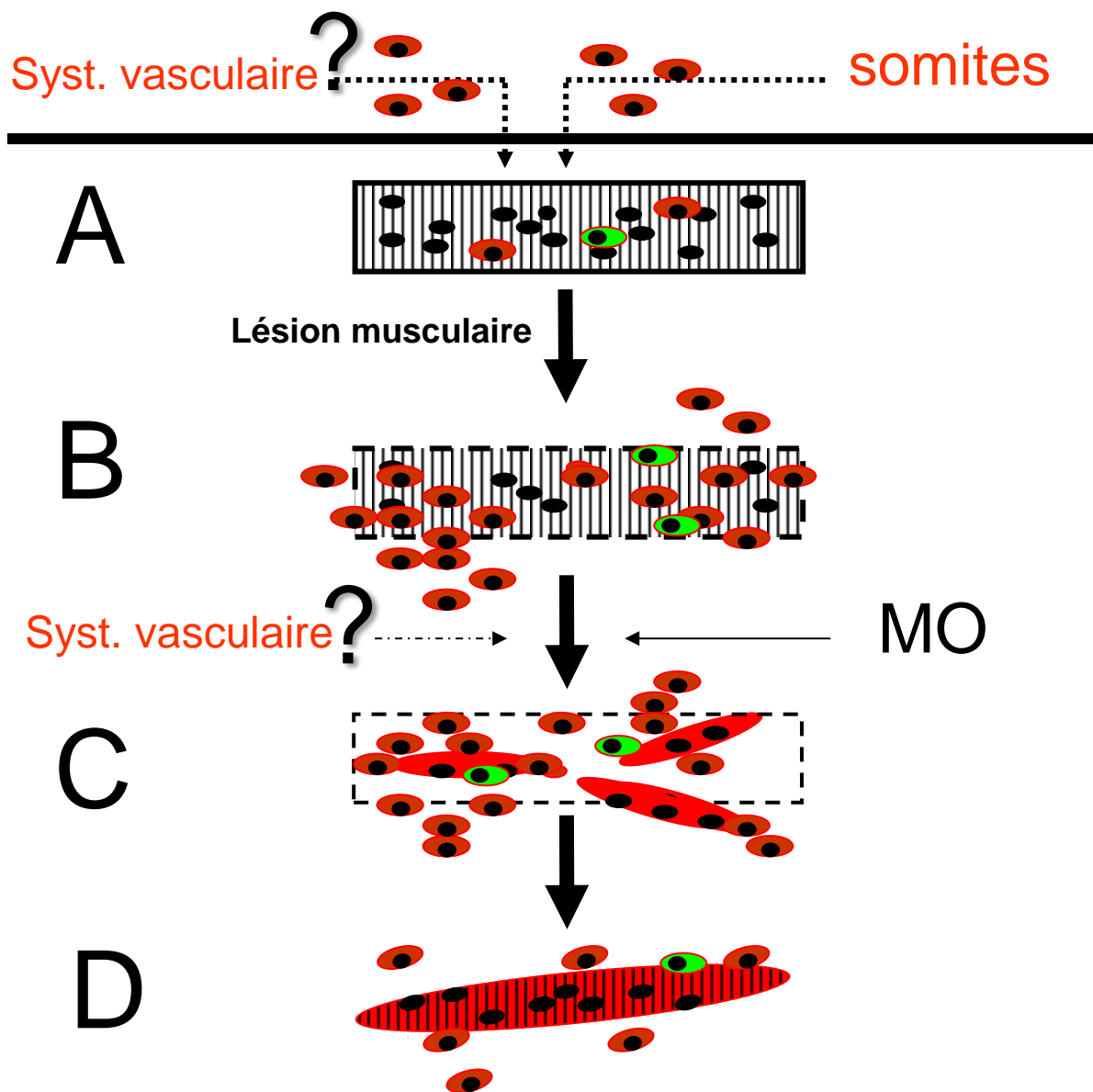


FIGURE 3. Origine embryologique et régénération des muscles striés squelettiques.

A : les muscles squelettiques sont composés de fibres striées multinuclées qui peuvent régénérer grâce aux cellules satellites présentes sous leur membrane basale. L'origine embryologique des muscles et de leurs cellules satellites est classiquement attribuée aux myoblastes primitifs issus de la partie dorsale des somites, mais des travaux récents ont aussi démontré l'existence de cellules précurseurs musculaires dans les vaisseaux sanguins. A l'âge adulte, toutes les cellules satellites ne sont pas au même stade de maturation, certaines d'entre elles étant déjà génétiquement engagées dans un processus myogéniques (rouge) alors que d'autres pourraient constituer une réserve de cellules souches multipotentes (vert).

B : après une lésion musculaire, les cellules satellites sont activées et prolifèrent puis fusionnent (**C**) pour former de nouvelles fibres musculaires multinuclées (**D**). D'autres cellules pourraient participer au processus de régénération musculaire à l'âge adulte, telles que les cellules souches médullaires (MO), des cellules du système vasculaire ou présentes

dans le tissu conjonctif. La contribution exacte de recrutement n'est pas encore clairement définie.

4. Etat actuel des connaissances sur les thérapies cellulaires des maladies musculaires: problématique de la greffe de cellules précurseurs musculaires dans les myopathies génétiques ou acquises

La grande majorité des connaissances acquises sur les thérapies cellulaires des maladies musculaires provient de travaux réalisés chez la souris mdx, qui représente le modèle murin de la myopathie de Duchenne de Boulogne. Cette pathologie est liée à une délétion du gène codant pour une protéine stabilisatrice de la membrane des fibres musculaires, la dystrophine. La fragilisation de la membrane qui en découle entraîne des cycles de dégénérescence-régénération avec destruction des fibres musculaires et activation des cellules satellites. Progressivement, les réserves en cellules satellites s'épuisent et les fibres musculaires sont remplacées par un tissu de fibrose qui se développe principalement dans les muscles posturaux et respiratoires. Des CPM saines (dystrophine+) injectées au cours d'un cycle de régénération musculaire peuvent s'incorporer aux fibres en cours de formation et apportent ainsi le gène défectueux (Partridge et coll., 1978, 1989).

Malgré les résultats encourageant obtenus chez la souris mdx, les essais de greffe de CPM dans la maladie de Duchenne chez l'homme n'ont pas apporté les résultats escomptés (tremblay et coll., 1993a, 1993b). Ces échecs ont été attribués à la faible capacité de migration des CPM et surtout à leur mort rapide après injection. Il a été montré que la majorité des CPM injectées dans un muscle disparaissent au cours de la première heure, probablement par ischémie, puis secondairement vers la dixième heure en raison de la réaction inflammatoire qu'elles engendrent (Beauchamp et coll., 1999 ; Qu et coll., 1998). Au total, moins de 3 % des CPM ont un réel potentiel myogénique in vivo, alors qu'in vitro, la grande majorité fusionne pour former de nouvelles fibres musculaires.

De nombreux moyens ont été proposés pour favoriser la prise de la greffe dans le cadre de la recherche sur les myopathies génétiques ou acquises. Kinoshita et coll. (1994) ont proposé l'utilisation d'immunosuppresseurs et le conditionnement du

muscle receveur par une lésion préalable pour favoriser la fusion rapide des CPM avec les fibres en cours de régénération. Pouzet et coll. (2000, 2001) ont montré que les résultats de la greffe de CPM dans le coeur étaient proportionnels au nombre de cellules injectées. Qu et coll. (1998) proposé d'enrichir la proportion de cellules myogéniques en éliminant les fibroblastes musculaires par une phase de preplating, et en transfectant les cellules afin qu'elles sécrètent une substance anti-inflammatoire.

Beauchamps et coll. (1999) ont développé une approche différente visant à définir les caractéristiques des CPM qui survivent à l'injection. Ils ont ainsi montré que ces cellules se comportent comme de cellules souches, se divisant lentement en culture mais proliférant rapidement après greffe. Comme les cellules souches hématopoïétiques et intestinales, les CPM survivant à l'injection seraient résistantes à l'irradiation. Dans une autre étude (Beauchamps et coll., 2000), ces auteurs ont montré qu'un faible pourcentage de cellules satellites n'exprime pas les marqueurs de différenciation myogénique et ont évoqué que cette sous-population puisse représenter les cellules souches musculaires. Jackson et coll. (1999) ont utilisé une méthode de sélection cellulaire par cytofluorimétrie (*Fluorescence Activated Cell Sorter*) et coloration nucléaire (Hoechst 33342) pour identifier, dans les muscles striés, une population de cellules ayant les mêmes caractéristiques physiques que les cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse (Googell et coll., 1996): les cellules SP (*Side Population*). Ces cellules disposent d'un transporteur membranaire ABC de type MDR (*Multidrug Resistance Protein*) qui leur confère la capacité de rejeter le colorant Hoechst 33342 (figure 4). Comme la plupart des transporteurs MDR, cette pompe peut être bloquée par le vérapamil. Les cellules SP musculaires et médullaires expriment des marqueurs communs tels que sca-1. Par contre, les marqueurs c-kit, CD-43 et CD-45 ne sont exprimés que par les cellules SP médullaires (Gussoni et coll., 1998). Les cellules SP musculaires et médullaires ont des propriétés de cellules souches multipotentes; en particulier, les cellules SP musculaires sont capables de repeupler le compartiment hématopoïétique d'une souris irradiée de manière létale (Gussoni et coll., 1998 ; Jackson et coll.,1999). Pour Gussoni et coll. (1998), les cellules SP musculaires et médullaires peuvent convertir un nombre significatif de fibres musculaires de la souris mdx lorsqu'elles sont injectées par voie intra-veineuse.

Jackson et coll. (2001) ont montré que les cellules SP médullaires peuvent se différencier en cardiomyocytes et en cellules endothéliales dans un modèle d'ischémie myocardique.

Il existe donc, dans les muscles squelettiques, une population de cellules myogéniques - les cellules souches musculaires ou cellules SP - résistantes à l'ischémie, proliférant lentement in vitro et rapidement in vivo, et capables de participer efficacement au processus de régénération d'un muscle lésé lorsqu'elles sont injectées localement ou par voie intraveineuse. La nature exacte de ces cellules n'est pas encore clairement établie. Il pourrait s'agir de : 1) la sous-population de cellules satellites n'exprimant pas les marqueurs de différenciation musculaire décrite par Beauchamps et coll. (2000) ; 2) de cellules associées aux capillaires (De Angelis et coll., 1999); 3) de cellules souches mésenchymateuses présentes dans le tissu conjonctif des muscles (Tamaki et coll., 2002 ; Bianco et Cossu, 1999). La mise au point d'une méthode d'extraction de CPM ayant des caractéristiques de cellules SP est, d'après les connaissances acquises en biologie musculaire fondamentale, un enjeu capital pour le développement de la thérapie cellulaire de l'insuffisance sphinctérienne.

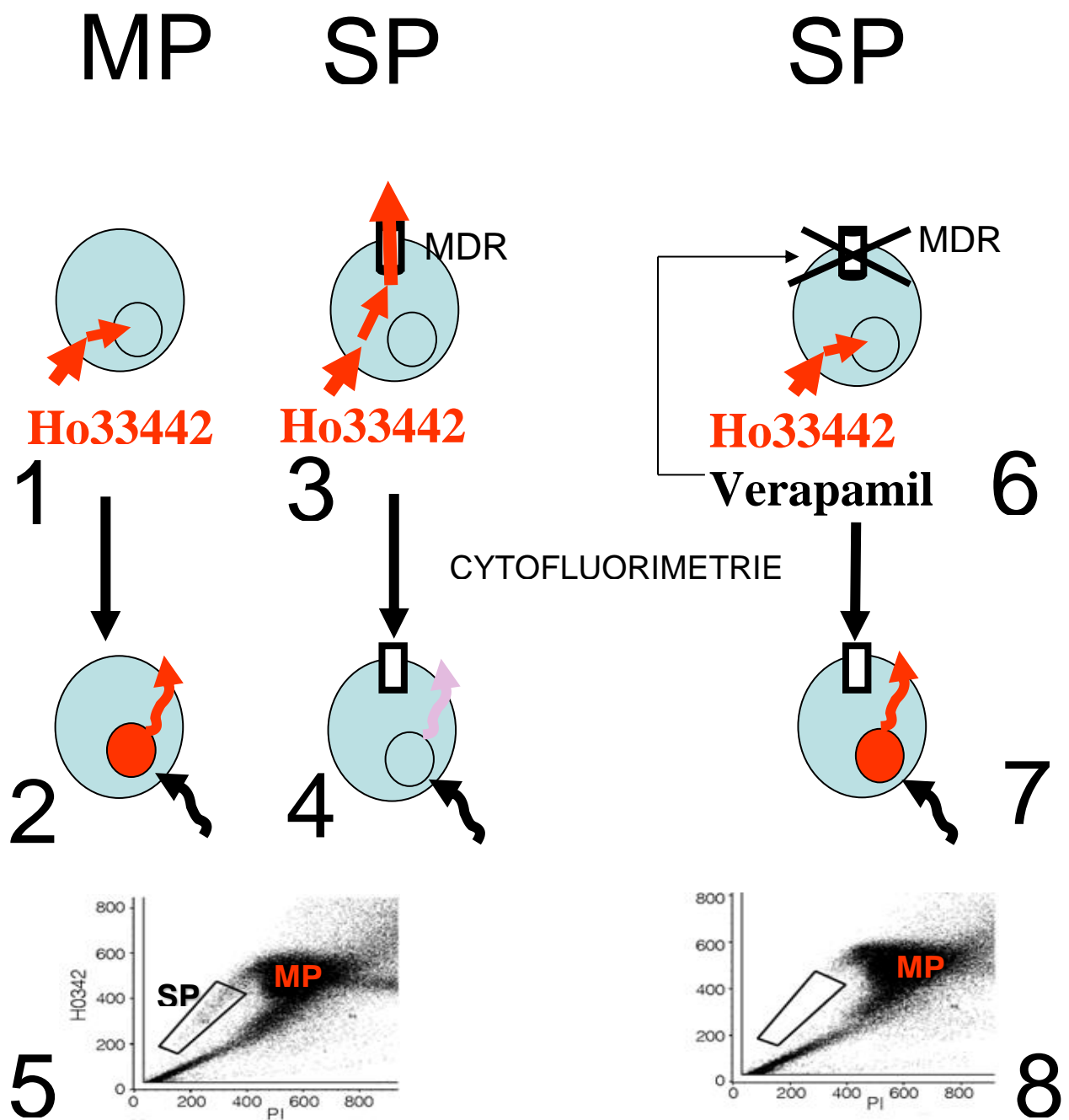


FIGURE 4. Séparation des cellules souches/cellules différenciées par cytofluorimétrie et triage cellulaire

Les cellules souches médullaires ou musculaires ont un transporteur membranaire de type MDR (*Multidrug Resistance Protein*) qui leur confère la capacité de rejeter le colorant nucléaire Hoechst 33342. La plupart des cellules différenciées (cellules MP, *Main Population*) captent le colorant qui se fixe dans le noyau (1) et émettent une fluorescence (2, *flèche rouge*) en cytofluorimétrie. La fluorescence émise par les cellules souches (cellules SP, *Side Population*) est plus faible en raison de la présence du transporteur membranaire MDR qui exclue le colorant (3, 4, *flèche rose*). L'analyse cytofluorimétrique de cellules incubées avec Hoechst 33342 permet d'établir la fenêtre des cellules SP (5, *cadre*). En cas d'incubation avec Hoechst

33342+vérapamil (6) sur un autre échantillon, il n'y a plus de cellules dans la fenêtre SP car le vérapamil bloque spécifiquement la pompe membranaire (7,8) et les cellules SP rejoignent la population principale de cellules.

