



Compte rendu de la réunion Club Muscle II

27 et 28 mai 2004, Marseille.

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

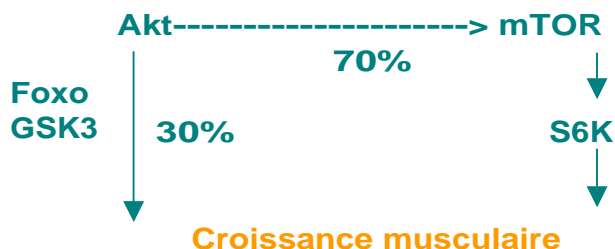
Le Club Muscle, organisé par C. Marcelle et P. Maire et subventionné par l'AFM, a de nouveau obtenu un grand succès lors de sa deuxième édition, grâce à la participation de nombreux intervenants.

L'ensemble des participants est favorable à la poursuite de ces rencontres bisannuelles, pour faire le point sur les avancées scientifiques des équipes françaises travaillant sur la biologie fondamentale du muscle squelettique et cardiaque. Les sujets de cette rencontre portaient sur les voies de signalisation, la myogenèse et la jonction neuromusculaire avec un total de 19 exposés.

Signalisation

Mise en évidence du rôle de la S6Kinase dans la croissance musculaire A. Sotiropoulos/M. Ohanna

La S6K activée par IGF1 est spécialisée dans le contrôle de la taille des cellules musculaires via la voie Akt/mTOR. La déficience en S6K induit un défaut de croissance et reproduit un état d'atrophie accompagné d'une perte en contenu protéique.



La voie Akt montre une alternance d'activation qui induit la croissance musculaire.

Rôle du facteur SRF dans le développement cardiaque et dans le développement postnatal des fibres musculaires squelettiques chez la souris

C. Charvet/D.Tuil ; (A.Parlakian/D.Paulin

SRF (Serum Response Factor) est un facteur transcriptionnel ubiquitaire qui permet la régulation de nombreux gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et dans la différenciation musculaire. L'inactivation complète du gène SRF entraîne une létalité des embryons de souris dès 6,5 jours de développement. L'inactivation ciblée et conditionnelle du gène SRF (utilisant le système Cre/loxP) permet d'inactiver de façon ciblée le gène SRF dans le temps et l'espace.

La délétion précoce de SRF dans le cœur, conduit à la mort embryonnaire entre 11,5 à 13,5 jours in utero. L'analyse histologique montre une diminution du nombre des trabécules et l'amincissement des parois cardiaques.

L'inactivation de SRF ciblée uniquement dans les muscles squelettiques donne des souris mutantes normales à la naissance, mais qui présentent dès 3 jours une hypotrophie harmonieuse qui s'accroît au cours du temps. Ces souris montrent également une forte mortalité post-natale, elles développent toutes une scoliose, signe de leur faiblesse musculaire. Chez l'adulte une altération importante de l'architecture musculaire est observée au niveau histologique : augmentation des espaces interstitiels, diminution de la taille des fibres associée à une hyperplasie du nombre de fibres et augmentation des fibres oxydatives au détriment des fibres glycolytiques. L'examen des fibres par microscopie électronique montre une désorganisation générale de l'ultrastructure des sarcomères, identique à celle observée dans une forme de myopathie némaline due à une mutation du gène de l'alpha-actine squelettique. De façon intéressante les transcrits de l'alpha-actine squelettique, dont le gène est une cible privilégiée de SRF, sont fortement diminués dans le muscle mutant adulte, ce qui pourrait rendre compte de la faiblesse musculaire et de l'hypotrophie de ces animaux comme le suggère le K.O. total de l'alpha-actine squelettique chez la souris. Des marqueurs clés de la myogenèse foetale : MyoD, Myogénine et MRF4 sont ré-exprimés chez les mutants SRF. L'ensemble de ces caractéristiques évoque un retard de maturation.

Ces résultats montrent que SRF est non seulement indispensable pour le développement normal du cœur, mais également pour le maintien du programme myogénique et la maturation des fibres musculaires squelettiques post-mitotiques.

Myogenèse

Différentes présentations avaient pour sujet les aspects précoces ou tardifs du développement du muscle squelettique et du complexe muscle/tendon.

Morphogenèse du myotome et croissance du poulet

J. Gros/C. Marcelle

Les mouvements cellulaires qui accompagnent la formation du myotome sont à l'origine de différents modèles controversés. L'électroporation dans les somites d'un gène GFP-reporter a permis de démontrer que la formation du myotome impliquait deux phases séquentielles : 1) croissance du myotome par la contribution des myocytes issus uniquement du bord médial du dermomyotome,

2) production de myocytes à partir de l'ensemble des 4 bords du dermomyotome (caudal, rostral, latéral et dorsal). La distribution des myocytes indique également que les bords latéral et médial du somite donnent naissance uniquement aux muscles epaxial (dos) et hypaxial (pattes).

Cellules endothéliales et régénération musculaire

F. Le Grand/J. Fontaine-Perus

Evaluation de la capacité de différenciation des cellules endothéliales du réseau vasculaire des muscles chez l'embryon de souris à 17 jours de développement. Les cellules triées et caractérisées par FACS sont CD34+/Flk1+ et n'expriment pas de facteurs de régulation myogéniques (Pax7, myogénine).

En culture in vitro, elles sont capables de s'engager dans la voie myogénique et de se différencier en myofibres squelettiques : l'expression des gènes endothéliaux diminue alors que l'expression des gènes myogéniques augmente.

Huit jours après transplantation de 700.000 cellules dans le TA de souris mdx irradiées et sous immunosuppresseur, les cellules CD34+/Flk1+ ont la capacité à se disperser au sein du muscle receveur (diffusion de 2-3.5 mm), à fusionner avec les fibres de l'hôte et à restaurer l'expression de la dystrophine (18% des fibres du TA). Le même protocole appliqué à l'EDL, muscle de plus faible volume, permet de restaurer l'expression de la dystrophine dans 70-80% des fibres. Par ailleurs, ces fibres expriment majoritairement les isoformes rapides de la MyHC, la forme embryonnaire n'est pas exprimée.

L'utilisation de cellules CD24+/Flk1+ de cerveau montrent, après transplantation dans l'EDL de souris mdx, des capacités myogéniques très limitées.

La fenêtre des 17 jours de développement fœtal est très important pour la capacité myogénique des cellules.

Ces expériences démontrent les potentialités myogéniques des cellules endothéliales CD34+/Flk1+ issues de la vasculature musculaire embryonnaire à 17 jours chez la souris.

Rôles de Pax3 et Pax7 dans la myogenèse post-natale

D. Montarras/M. Buckingham

Pax3 marque une population de cellules satellites qui est majoritaire dans certains muscles : Diaphragme >>> soleus, EDL, TA. l'expression du gène Pax3 marque les cellules musculaires adultes de l'état satellite à l'état de précurseur activé, l'arrêt de l'expression du gène Pax3 ne se produisant qu'au moment de l'activation du programme de différenciation terminale.

La greffe de 20.000 cellules Pax3(GFP+), isolées directement par FACS, dans le TA irradié de souris mdx-nude, contribuent massivement à la reconstitution des muscles détruits : environ 900 fibres du TA expriment la dystrophine. L'isolation par FACS de cellules Pax3(GFP+) à partir d'un TA greffé permet d'isoler une petite population homogène de cellule qui sont capables, en culture, de former des fibres musculaires. Ce dernier résultat permet de supposer que les cellules Pax3 ont reconstitué le pool des cellules réparatrices.

Par ailleurs, les facteurs Pax3 et Pax7 sont tous les deux capables d'activer l'expression de MyoD dans les cellules myosatellites activées et que Pax7 est aussi nécessaire à la survie de ces cellules. Il a aussi été observé que les cellules myosatellites ne sont pas absentes des muscles des souris déficientes en Pax7, mais de moins en moins abondantes, au cours de la croissance post-natale. Aussi, le déficit en cellules myosatellites, rencontré chez les animaux dépourvus

de Pax7 résulterait non pas d'un défaut de spécification de ces cellules mais d'une diminution de leur capacité de survie.

Déficiences myogéniques dans la dystrophie myotonique congénitale **D. Furling/V. Mouly**

La forme congénitale de la DM (CDM) qui est la plus sévère, est caractérisée par une forte répétition (>1500) de triplets CTG. L'analyse de l'expression des isoformes de MyHC dans des muscles normaux et des muscles CDM issus de fœtus âgés de 16-35 semaines, a montré la persistance de la MyHC embryonnaire chez les fœtus CDM et une forte diminution de la MyHC lente. Ces résultats indiquent un retard de maturation des fibres et une absence totale de la génération secondaire de fibres lentes chez les fœtus CDM.

In vitro, la capacité proliférative des myoblastes issus de muscles de fœtus CDM est réduite. Cependant, ce phénomène de sénescence précoce n'est pas lié à la taille des télomères et serait dû à un nouveau mécanisme indépendant. Les myoblastes issus de fœtus CDM montrent également une différenciation tardive qui s'accompagne par la formation de myotubes beaucoup plus fins que les contrôles. La mise en évidence d'un facteur soluble secrété dans le milieu de culture par les myoblastes CDM, pourrait expliquer la déficience de la différenciation myogénique observée chez ces cellules.

Jonction Neuromusculaire

Implication de la Fgf4 dans la régionalisation de la différenciation postsynaptique de la jonction neuromusculaire (JNM) **D. Duprez**

Les souris mutantes conditionnelles Fgf4^{-/-} montrent dans les muscles un clustering plus étendu des récepteurs ACh, alors que les muscles contrôles présentent un clustering des récepteurs ACh localisé à la JNM. De plus, Fgf4 est capable de réprimer la transcription des récepteurs ACh. Fgf4 dont l'expression est localisée à l'extrémité des fibres musculaires pourrait être impliquée dans la régionalisation centrale des transcrits des récepteurs ACh dans le muscle. Ces résultats sont d'autant plus importants que depuis 2001 le dogme de la formation de la JNM est tombé ; le nerf n'est plus responsable de la régionalisation centrale des récepteurs ACh au niveau des fibres musculaires. L'hypothèse actuelle est qu'il y a d'abord la régionalisation centrale des récepteurs ACh, puis l'arrivée du nerf qui induirait le maintien en position centrale des récepteurs ACh.

Implication des rafts lipidiques à la fois dans le transport et le recrutement des composants synaptiques **J. Cartaud**

Lors de la synaptogenèse de la jonction neuromusculaire, l'accumulation des composants de la membrane postsynaptique est réalisée par la coopération de plusieurs mécanismes qui incluent la compartimentation de l'expression des gènes codant les protéines synaptiques et le recrutement des récepteurs ACh par l'agrine secrétée par le nerf. Les composants majeurs de la membrane postsynaptique sont co-assemblés et transportés de l'appareil de Golgi vers les sites synaptiques via des transporteurs vésiculo-tubulaires le long du réseau

microtubulaire. Les rafts lipidiques semblent donc être impliqués à la fois dans le transport et le recrutement des composants synaptiques.

Mécanismes de l'accumulation de l'acétylcholinestérase et contrôle du niveau d'acétylcholine à la jonction neuromusculaire.

C. Legay ; E. Krejci

Au niveau de la jonction neuromusculaire (JNM), l'enzyme est ancrée et accumulée majoritairement dans la lame basale synaptique par l'intermédiaire d'un collagène spécifique, ColQ. ColQ est lié au perlecan par ses sites de liaison à l'héparine, lui-même associé au dystroglycan. Les mutations identifiées chez l'homme ou l'absence de ColQ chez les souris mutantes se caractérisent par une déficience en acétylcholinestérase accompagnée d'une myasthénie chez les patients. L'analyse des mutations de ColQ chez l'homme révèle que d'autres interactions moléculaires sont indispensables pour accumuler l'enzyme : en effet le domaine C-terminal de ColQ serait lié à MuSK, un récepteur tyrosine kinase spécifiquement exprimé dans le muscle qui joue un rôle clé dans la formation de la jonction neuromusculaire. La question se pose sur le rôle potentiel de l'interaction ColQ/MuSK comme voie de signalisation.

Chez les mammifères deux enzymes, l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE) hydrolysent efficacement l'ACh avec un rôle prépondérant de l'AChE dans le cerveau et dans les muscles. ColQ et PRiMA codent pour des molécules d'ancrages et contiennent une séquence riche en proline qui assure l'organisation en tétramères de l'extension C-terminale des enzymes. De très nombreuses analyses montrent des variations dans la quantité d'AChE, et dans la proportion des différents oligomères, en fonctions des muscles et de l'état physiologique. L'élimination, par recombinaison homologue, des séquences riches en proline dans les gènes ColQ et PRiMA permet d'éliminer chacun des hétéro-oligomères. Chaque mutant est viable, le mutant ColQ présentant une myasthénie marquée immédiatement visible dans une portée âgée de deux semaines alors que le mutant PRiMA n'est pas reconnaissable dans une portée. En première analyse dans la JNM, l'absence de ColQ entraîne une absence d'AChE et l'absence de PRiMA une absence de BChE.