



## Développement d'un microenvironnement artificiel pour maintenir la quiescence et le potentiel thérapeutique des cellules souches du muscle squelettique

Stéphane C. Boutet\*, Marco Quarta

Department of neurology and neurological sciences, Stanford University school of medicine, Stanford, California, États-Unis.

\*Adresse actuelle : 10x Genomics, Pleasanton, California, États-Unis.

[sboutet@gmail.com](mailto:sboutet@gmail.com)

[mquarta@stanford.edu](mailto:mquarta@stanford.edu)

► Les thérapies cellulaires représentent un énorme espoir pour guérir divers désordres génétiques. Elles impliquent la transplantation de cellules souches autologues<sup>1</sup> qui ont été corrigées génétiquement *ex vivo*. Un des problèmes majeurs de ces approches de thérapies cellulaires est la perte du potentiel régénératif des cellules souches pendant leur manipulation ou leur expansion en culture [1, 2] (Figure 1A). Définir de meilleures conditions de culture de ces cellules souches pourrait permettre leur persistance et leur expansion sans pour autant affecter leur efficacité thérapeutique.

Entre autres tissus, le muscle squelettique possède des cellules souches présentant un très grand pouvoir régénératif qui se traduit par un fort potentiel de transplantation et de repopulation du tissu d'origine [3] (→).

Ces cellules souches se maintiennent à l'état quiescent sur de très longues périodes : des mois pour la souris et des années pour l'homme [4, 5]. Au sein du tissu, elles résident dans un microenvironnement spécialisé (aussi appelé niche) défini par une combinaison unique de propriétés biophysiques, biochimiques et cellulaires. Ces propriétés sont impliquées dans la régulation de la quiescence dans de nombreux types de tissus [6-8]. Les cellules souches du muscle squelettique – ou cellules satellites – dans

un état de quiescence résident entre la lame basale<sup>2</sup> et la myofibre [9, 10].

Jusqu'à présent, les reconstitutions de niche de cellules souches *in vitro* se sont intéressées principalement, et presque exclusivement, à manipuler les caractéristiques autonomes cellulaires comme le processus de division cellulaire afin de modifier le renouvellement ou le destin cellulaire [8, 11]. Les caractéristiques autonomes non-cellulaires de la niche, comme les propriétés biomécaniques des myofibres ou la composition de la matrice extracellulaire, ont, elles, été très peu étudiées. Dans notre étude, publiée dans *Nature Biotechnology* [2], nous définissons les propriétés biochimiques et mécaniques de la niche des cellules satellites du muscle squelettique permettant la formation d'un milieu de culture de quiescence et d'une matrice extracellulaire en trois dimensions. Ce milieu de culture et cette matrice sont ainsi capables d'assurer la quiescence et le maintien du pouvoir régénératif de ces cellules satellites.

### Définir un milieu de culture de quiescence

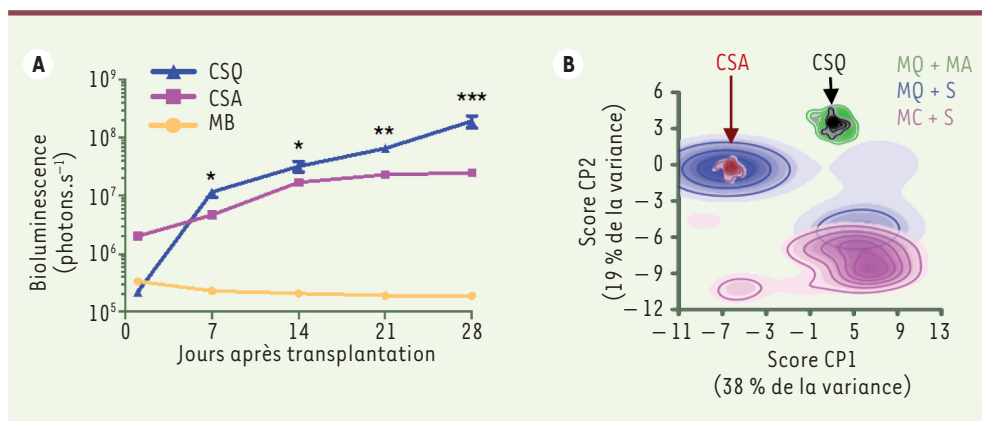
Nous avons utilisé une analyse monocellulaire pour comparer les cellules satellites quiescentes et celles activées à la suite d'une lésion induite par injection de

cardiotoxine<sup>3</sup> (analyse effectuée 1,5 et 3,5 jours après la lésion). Nous avons ainsi déterminé les signatures moléculaires caractéristiques des cellules quiescentes et des cellules activées. Les premières expriment Pax7 (*paired box 7*), Notch2 (*neurogenic locus notch homolog protein 2*), Notch3, Hes1 (*hairly and enhancer of split-1*), HeyL (*hairly/enhancer-of-split related with YRPW motif-like protein*), CD34 (*hematopoietic progenitor cell antigen CD34*) et Foxo3 (*forkhead box O3*). Les cellules actives, quant à elles, expriment Polg (*DNA polymerase subunit gamma*), Tp53 (*tumor protein 53*), Ezh2 (*enhancer of zeste homolog 2*) et MyoD1 (*myogenic differentiation 1*) [2]. Nous avons ensuite utilisé ces signatures moléculaires afin de tester l'effet de 50 molécules connues pour moduler divers aspects fonctionnels de la cellule souche du muscle comme leur homéostasie, leur prolifération, leur différenciation et leur quiescence. Une dizaine de ces molécules ont été sélectionnées en fonction de leur influence, seule puis en combinaison, sur le maintien de l'état de quiescence des cellules (Tableau 1). Nous avons pu ainsi définir la formulation d'un milieu de culture de quiescence (sans sérum) permettant d'assurer le maintien de l'état dormant des cellules satellites en culture pendant au moins 2 jours [2].

<sup>1</sup> Provenant du patient lui-même.

<sup>2</sup> Feuillet de glycoprotéines entourant, ici, les cellules musculaires.

<sup>3</sup> Toxine issue du venin de cobra provoquant des atteintes musculaires.



**Figure 1. Caractérisation fonctionnelle de la niche artificielle.** **A.** Résultats de l'imagerie non-invasive de la bioluminescence *in vivo* (1) de cellules satellites quiescentes (CSQ) fraîchement isolées, (2) activées *in vivo* par lésion induite par la cardiotoxine (CSA), ou (3) de myoblastes cultivés (MB). Ces cellules expriment le transgène de la luciférase et ont

été transplantées (10 000 cellules pour chaque condition) dans le muscle tibial antérieur de souris préalablement blessées à la cardiotoxine. Les myoblastes cultivés montrent une perte importante de leur potentiel régénératif ( $n = 6$  répliques biologiques ; comparaison de CSQ et CSA : \* $P < 0,05$  ; \*\* $P < 0,001$  ; \*\*\* $P < 0,0001$ ). **B.** Résultats de l'analyse en composantes principales (CP1, CP2) des profils d'expression monocellulaires des cellules satellites cultivées associées à des myofibres artificielles (MA) ou sur substrat plastique (S), et cultivées en présence de milieu de culture de quiescence (MQ) ou de croissance (MC) et comparés avec ceux des cellules satellites quiescentes et activées *in vivo*. Les nuages et les lignes de contours représentent la densité des distributions monocellulaires ; les couleurs indiquent les différentes populations de cellules satellites et leurs conditions de culture respectives. Seule la combinaison de MA et de MQ dans les conditions de culture permet de maintenir un état de quiescence des cellules similaire à celui des cellules quiescentes fraîchement isolées (adapté de [2]).

| Catégorie               | Rôle                                                                              | Composition/Paramètre                                                  |
|-------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| Facteurs physiques      | Élasticité du support                                                             | 1-2 kPa                                                                |
| Composants cellulaires  | Interaction myofibre/cellule satellite (VCAM)                                     | Intégrine $\alpha 4 \beta 1$                                           |
| Matrice extracellulaire | Support (lame basale)                                                             | Collagène I<br>Laminine                                                |
| Facteurs solubles       | Fonctions des cellules satellites (activation, renouvellement ou différenciation) | Inhibiteur de C-met<br>Inhibiteur de TGF- $\beta$<br>Inhibiteur de FGF |
|                         | Activateur de quiescence                                                          | Activateur du récepteur de la calcitonine                              |
|                         | Inhibition du cycle cellulaire                                                    | Absence de sérum<br>Inhibiteur de CDK/Aurora                           |
|                         | Régulation homéostatique des cellules satellites                                  | Activateur d'AMPc<br>Inhibiteur de p38-MAPK                            |

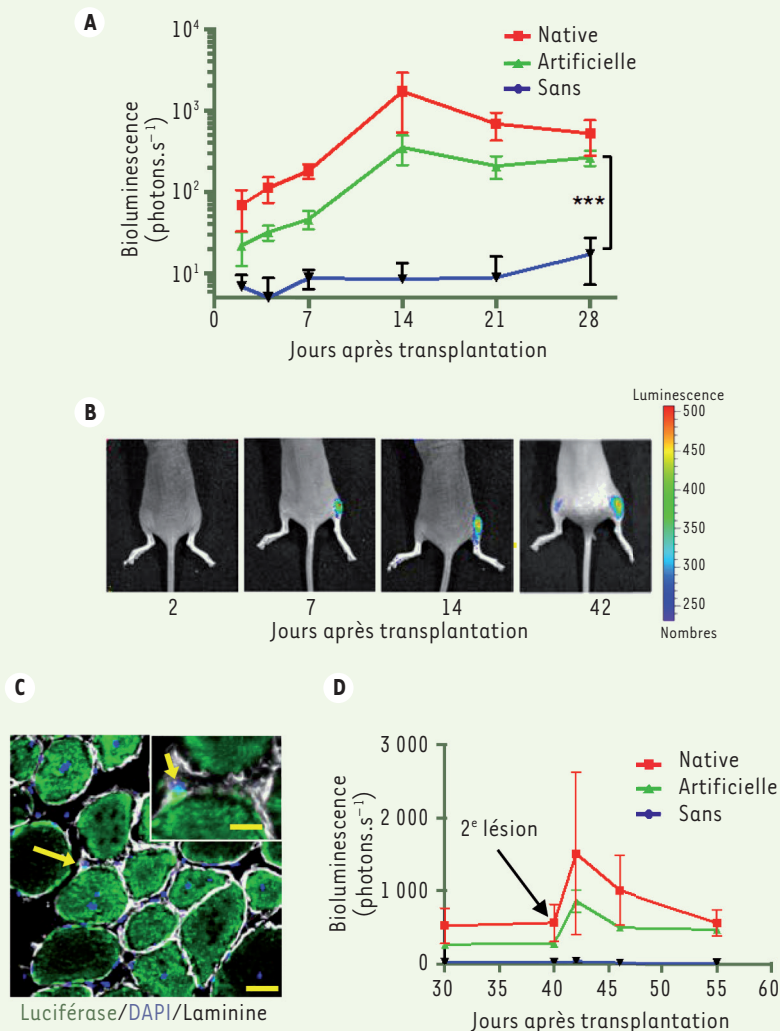
**Tableau 1. Récapitulatif des paramètres déterminés permettant de maintenir la quiescence des cellules satellites.** AMPc : adénosine monophosphate cyclique ; CDK : cyclin-dependent kinase ; FGF : fibroblast growth factor ; kPa : kilopascal ; p38-MAPK : p38 mitogen-activated protein kinase ; TGF- $\beta$  : transforming growth factor beta ; VCAM : vascular cell adhesion protein.

### Construire une myofibre artificielle pour maintenir la quiescence

Dans leur niche naturelle, les cellules satellites sont associées à leur myofibre. Cette association est fondamentale pour maintenir leur quiescence et leurs capacités prolifératives et régénératives. Nous avons donc entrepris

de créer une matrice extracellulaire, appelée myofibre artificielle, reprenant les caractéristiques clés des myofibres naturelles et de la lame basale. L'un des paramètres important à considérer est l'élasticité du substrat qui influence les capacités prolifératives et régénératives des cellules souches [11]. Ainsi, nous

avons déterminé que des substrats dont l'élasticité était comprise entre 1 et 2 kPa (kilopascal) assuraient le mieux le maintien de la dormance, sans induction de différenciation spontanée (environ 85 % des cellules en quiescence) [2]. Afin de déterminer la composition de la myofibre artificielle, nous nous sommes



**Figure 2. La niche artificielle améliore la transplantation des cellules souches du muscle.** **A.** Résultats de l'imagerie non-invasive de la bioluminescence *in vivo* de 50 cellules satellites, exprimant le transgène codant la luciférase, cultivées avant transplantation pendant 2,5 jours en milieu de culture de quiescence associées soit à une myofibre native, soit à une myofibre artificielle, soit en suspension (sans myofibre). Les animaux transplantés ont été évalués chaque semaine pendant un mois ( $n = 5$ , répétitions biologiques ;  $***P < 0,0001$  ; les barres d'erreurs indiquent la déviation standard). **B.** Imagerie au cours du temps représentative de la bioluminescence d'une des souris transplantées (décrites en **A**) dans chaque muscle tibial antérieur avec 50 cellules satellites associées avec une myofibre artificielle (patte de droite) et en suspension (sans myofibre) (patte de gauche). **C.** Immunofluorescence d'un muscle tibial antérieur transplanté avec 50 cellules satellites exprimant le gène rapporteur codant la luciférase. Après transplantation, les myofibres régénérées expriment la luciférase (marquage vert) indiquant la participation des cellules satellites transplantées. Les cellules satellites transplantées (flèches) se localisent dans leur niche naturelle entre la lame basale (en blanc, visualisée par marquage de la laminine) et la myofibre (barre = 10 µm). L'ADN nucléaire des cellules et des myofibres est marqué par le DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole, en bleu). **D.** Résultats de l'imagerie non-invasive de la bioluminescence *in vivo* de muscles préalablement transplantés (en **A**) et blessés par la cardiotoxine après 40 jours. Suite à cette lésion, l'intensité de la luciférase augmente suggérant que les cellules satellites transplantées (exprimant la luciférase) sont fonctionnelles et participent au processus de la régénération musculaire (adapté de [2]).

basés sur la composition de deux constituants présents dans la niche : la lame basale et les récepteurs VCAM (*vascular cell adhesion protein*) qui sont très fortement exprimés à la surface des cellules satellites [5]. Leurs composants (le collagène de type I et la laminine pour la lame basale, et l'intégrine  $\alpha 4 \beta 1$  pour les récepteurs VCAM) ont donc été associés dans un hydrogel (Tableau 1). Un des avantages des hydrogels qui ont pour base le collagène I est qu'ils répondent à l'exigence d'élasticité que nous avons prédéfinie : celle-ci est en effet de  $1,33 \pm 0,18$  kPa, avec un module mécanique de tension d'environ 27 kPa (similaire aux myofibres naturelles), ce qui les rend mécaniquement robustes et stables après manipulation et transplantation [2]. Nous avons montré que les cellules satellites cultivées sur cette myofibre artificielle en présence de milieu de culture de quiescence peuvent être maintenues en quiescence pendant 3,5 jours sans altération de leurs capacités d'activation et de prolifération. Après 7 jours dans ces conditions de culture, les cellules souches du muscle peuvent toujours être réactivées malgré une réduction graduelle de la viabilité cellulaire [2]. La culture des cellules satellites sur des myofibres artificielles permet donc d'améliorer significativement la durée pendant laquelle ces cellules conservent leurs propriétés de quiescence, en comparaison avec des cultures réalisées avec du milieu de culture quiescent seul. De plus, les profils d'expression monocellulaire des cellules satellites quiescentes *in vivo* sont remarquablement identiques et homogènes à ceux des cellules cultivées dans ces conditions artificielles de quiescence (Figure 1B) [2].

### La niche artificielle permet de maintenir le potentiel régénératif des cellules satellites murines et humaines

L'étape suivante a été de tester les propriétés des cellules souches ainsi cultivées après leur transplantation *in vivo*. Nous avons donc comparé les propriétés de cellules souches du muscle ayant

été cultivées dans le milieu de culture quiescent, soit avec des myofibres artificielles, soit avec des myofibres naturelles, soit en l'absence de matrice associée. Après leur transplantation dans la souris, le potentiel régénératif des cellules souches s'est avéré être similaire pour les cultures réalisées en présence de myofibres, qu'elles soient artificielles ou natives, et bien supérieur à celui observé pour la culture effectuée sans matrice (Figure 2A, 2B) [2]. Les cellules souches cultivées en présence de myofibres artificielles transplantées se sont montrées également capables d'assurer leur rôle fonctionnel de régénération à la suite d'une lésion musculaire. Les cellules satellites régénèrent en effet le muscle si une nouvelle lésion à la cardiotoxine est induite, et reprennent leur place dans les niches nouvellement recrées (Figure 2C, 2D) [2]. Des résultats identiques ont été obtenus avec des cellules satellites humaines, suggérant que la combinaison du milieu de culture quiescent et des myofibres artificielles mime également le microenvironnement de ces cellules chez l'homme [2].

## Conclusion

La perte du potentiel régénératif des cellules souches est un problème majeur pour le développement de thérapies

cellulaires efficaces. Le développement de nouveaux systèmes de culture cellulaire, comme celui que nous présentons, est indispensable afin de permettre le maintien des cellules dans leur état de quiescence ou de les cultiver pendant de longues périodes sans perdre leur potentiel régénératif, le but étant de pouvoir corriger les mutations associées à un désordre génétique (comme c'est le cas pour les dystrophies musculaires) [12] (→). (→) Voir la Nouvelle de C.E. Brun et N.A. Dumont, m/s n° 10, octobre 2016, page 800

Ces nouveaux systèmes de culture ouvrent ainsi la voie à de futures applications cliniques. Les microenvironnements biomimétiques peuvent également être utiles dans le cas de transplantation de cellules souches effectuées dans le cadre de thérapies cellulaires nécessitant la reconstruction de tissu comme pour la perte volumétrique de muscle après accident ou chirurgie. ♦

**Development of an artificial microenvironment to maintain the quiescence and the therapeutic potential of skeletal muscle stem cells**

## LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

## RÉFÉRENCES

1. Montarras D, Morgan J, Collins C, et al. Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration. *Science* 2005 ; 309 : 2064-7.
2. Quarta M, Brett JO, DiMarco R, et al. An artificial niche preserves the quiescence of muscle stem cells and enhances their therapeutic efficacy. *Nat Biotechnol* 2016 ; 34 : 752-9.
3. Abou-Khalil R, Partridge T, Chazaud B. Les cellules du muscle chantent en chœur une berceuse pour cellules souches. *Med Sci (Paris)* 2010 ; 26 : 589-91.
4. Li L, Clevers H. Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *Science* 2010 ; 327 : 542-5.
5. Cheung TH, Rando TA. Molecular regulation of stem cell quiescence. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013 ; 14 : 329-40.
6. Nishikawa SI, Osawa M, Yonetani S, et al. Niche required for inducing quiescent stem cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2008 ; 73 : 67-71.
7. Fu J, Wang YK, Yang MT, et al. Mechanical regulation of cell function with geometrically modulated elastomeric substrates. *Nat Methods* 2010 ; 7 : 733-6.
8. Chakkalakal JV, Jones KM, Basson MA, et al. The aged niche disrupts muscle stem cell quiescence. *Nature* 2012 ; 490 : 355-60.
9. Schultz E, Gibson MC, Champion T. Satellite cells are mitotically quiescent in mature mouse muscle: an EM and radioautographic study. *J Exp Zool* 1978 ; 206 : 451-6.
10. Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* 1961 ; 9 : 493-5.
11. Gilbert PM, Havenstrite KL, Magnusson KE, et al. Substrate elasticity regulates skeletal muscle stem cell self-renewal in culture. *Science* 2010 ; 329 : 1078-81.
12. Brun CE, Dumont NA. Déficits intrinsèques des cellules satellites dans la dystrophie musculaire de Duchenne. *Med Sci (Paris)* 2016 ; 32 : 800-2.

## Bon de commande

À retourner à EDP Sciences, 109, avenue Aristide Briand, 92541 Montrouge Cedex  
Tél. : 01 41 17 74 05 - Fax : 01 49 85 03 45 - E-mail : francois.flori@edpsciences.org

NOM : ..... Prénom : .....

Adresse : .....

Code postal : ..... Ville : .....

Pays : .....

Fonction : .....

Je souhaite recevoir l'ouvrage **Hépatite B** : 54 € + 3 € de port = **57 € TTC** offre exceptionnelle réservée aux abonnés à m/s jusqu'au 31 décembre 2010

en ..... exemplaire, soit un total de ..... €

☐ Par chèque, à l'ordre de EDP Sciences

☐ Par carte bancaire : ☐ Visa ☐ Eurocard/Mastercard

Carte n° | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Signature :

Date d'expiration : | | | | | |

N° de contrôle au dos de la carte : | | | | |

## Hépatite B

Jean-Michel Pawlowsky  
Daniel Dhumeaux



ISBN : 978-2-8425-4131-6 576 pages