La signalisation TGF β contrôle la fusion cellulaire et la régénération musculaire

Francesco Girardi, Anissa Taleb, Lorenzo Giordani, Bruno Cadot, Fabien Le Grand

Introduction

La régénération musculaire repose sur une réserve de cellules souches musculaires appelées cellules satellites (MuSCs) [1]. Les MuSCs sont quiescentes et s'activent à la suite d'une blessure au muscle, donnant ainsi naissance à des progéniteurs s'amplifiant transitoirement (myoblastes), et fusionnant pour former de nouvelles fibres musculaires [2]. Ce processus est finement régulé par un réseau complexe de voies de signalisation, parmi lesquelles la cascade de signalisation « *Transforming Growth Factor β* » (TGF β) joue un rôle fondamental. Des rapports antérieurs ont proposé de nombreux rôles pour les membres de la superfamille TGF β , généralement considérés comme des régulateurs négatifs de la différenciation myogénique [3]. Toutefois, il a récemment été montré que l'activation de TGF β 2 est essentielle à la régénération musculaire [4]. En raison de ces différents résultats, nous avons décidé d'étudier le rôle de la cascade de signalisation TGF β durant la différenciation des myoblastes et la régénération musculaire.

Résultats

Avant d'évaluer les rôles respectifs des trois isoformes de TGF β , nous avons voulu estimer leur profil d'expression au cours de la différenciation *in vitro* des myoblastes et de la régénération musculaire *in vivo*. Les myoblastes primaires ont été différenciés durant trois jours, tandis que le muscle de souris était lésé par injection de cardiotoxine et analysées après différentes durées de régénération. Même s'ils se comportent différemment, les isoformes de TGF β sont tous les trois exprimés dans chacun de ces processus (*in vitro* et *in vivo*). De plus, nous avons vérifié les profils d'expression de TGF β R1 (Alk5) et TGF β R2 *in vitro*, confirmant que ces récepteurs ainsi que leurs ligands étaient bien exprimés dans les myoblastes primaires.

Ceci étant établi, nous avons commencé à étudier le rôle de ces isoformes de TGF β sur des myoblastes en prolifération et leur taux de mortalité. Nous avons sélectionné le dosage par incorporation de BrdU pour quantifier la vitesse de prolifération, et le dosage TUNEL (Kit de détection *in situ* de la

mortalité des cellules) pour identifier les cellules qui subissent une mort cellulaire programmée. Dans ces deux essais, les cellules ont été fixées et exploitées 24 heures après traitement avec les protéines recombinantes de TGF β (TGF β 1, 2 et 3). Mises ensemble, ces expériences suggèrent que l'action de la voie de signalisation TGF β n'altère ni la prolifération des myoblastes, ni leur taux de mortalité.

En conséquence, nous nous sommes concentrés sur la différenciation des myoblastes. Nous avons différencié des myoblastes primaires durant trois jours, en administrant régulièrement des protéines TGF β 1, 2 et 3 ou ITD-1, un inhibiteur spécifique de TGF β R2. Nous avons analysé les effets de ces traitements par immunofluorescence (IF), et découvert que l'activation de la cascade TGF β inhibe fortement la différenciation des myoblastes. En effet, l'administration de protéines TGF β réduit le pourcentage de cellules engagées (myoblastes Myogenin+) et l'index de fusion (paramètre indiquant la quantité de cellules ayant fusionné ensemble). D'autre part, l'administration d'inhibiteur entraîne la formation de grands myotubes (augmentation de l'index de fusion et de la taille des myotubes), présentant une forme ramifiée et aberrante, en comparaison aux formes linéaires caractérisant habituellement les myotubes.

L'effet sur la fusion étant très important, nous avons voulu comprendre si nos traitements avaient un effet direct sur la fusion des myoblastes, ou s'ils avaient un effet général sur la différenciation des myoblastes qui impacterait indirectement le processus de fusion. Pour répondre à cette question, nous avons mis en œuvre ce que nous avons appelé de la « Culture en forte densité » ; un protocole dans lequel nous prédifférencions des myoblastes en basse densité pendant deux jours, puis les remettons en forte densité, et répétons la même expérience que précédemment (traitement avec TGF β s ou ITD-1). Avec ce protocole, nous travaillons sur des myocytes préalablement différenciés (confirmés par IF pour Myogenin après l'étape de prédifférenciation), et par conséquent, nous nous concentrons exclusivement sur le processus de fusion. Nous avons ainsi confirmé que l'activation de la voie TGF β réduit la fusion des

Francesco Girardi
Anissa Taleb
Lorenzo Giordani
Bruno Cadot
Fabien Le Grand
Sorbonne Université,
Inserm UMRS974,
Centre for Research
in Myology,
75013 Paris, France

Contact
francesco.girardi1992
@gmail.com

INFOS

myoblastes, tandis que son inhibition entraîne la formation de très gros myotubes, présentant de nombreux noyaux et une forme aberrante.

Après avoir établi le rôle de la cascade de signalisation TGF β *in vitro*, nous avons voulu évaluer son rôle dans la fusion des cellules musculaires *in vivo*. Pour cette raison, nous avons blessé des muscles TA (Tibialis Antérieur) de souris adultes, et injecté soit la protéine TGF β 1, soit ITD-1, à trois jours après blessure (3dpi), au moment où la fusion commence à se produire. L'évaluation de la régénération des tissus à 7dpi a révélé que ces deux traitements entraînaient des changements frappants au niveau de la taille et de la morphologie des myofibres. L'addition de TGF β 1 a provoqué une diminution très importante du nombre de noyaux dans les fibres nouvellement formées, comparé aux contrôles, ce qui a également provoqué une diminution considérable de l'aire transversale des fibres (CSA). Au contraire, ITD-1 induit une large augmentation du nombre de noyaux de cellules musculaires, débouchant ainsi sur la formation de larges fibres, comparées aux contrôles. Pour déterminer si une modification de la signalisation TGF β *in vivo* affecte les structures et fonctions du muscle régénéré, nous avons réalisé une blessure du TA, suivie par trois injections successives de TGF β 1 ou d'ITD-1, et avons évalué la régénération du tissu, ainsi que sa force musculaire deux semaines après blessure. Tandis que TGF β 1 entraînait une forte réduction de la CSA ainsi qu'une diminution significative de la force musculaire, les muscles traités avec ITD-1 ne montraient aucune amélioration en termes de génération de force, bien que la taille des fibres ait largement augmenté. Ces observations indiquent que la signalisation TGF β détermine le nombre d'événements de fusion qui se produisent durant la régénération des tissus musculaires *in vivo*, et que l'augmentation de la taille des fibres résultant de l'excès de la fusion n'est pas bénéfique à la fonction musculaire.

Actuellement, notre but est de comprendre comment la cascade TGF β régule le processus de fusion. Pour identifier le réseau génétique régulé par

cette signalisation dans les cellules musculaires, nous avons réalisé une analyse du transcriptome des myocytes primaires différenciés, stimulés avec TGF β 1 ou ITD-1. Curieusement, nous avons trouvé que le cytosquelette d'actine faisait partie des signalisations les plus régulées. Nous avons alors décidé de visualiser le réseau filamentaire d'actine et de mesurer l'orientation de ces filaments dans les myoblastes traités avec TGF β 1 ou ITD-1. Nous avons observé que ces deux traitements entraînaient une dérégulation du cytosquelette d'actine, comparé aux formes linéaires standards des myoblastes en différenciation. Ces effets suggèrent que la cascade de signalisation TGF β pourrait réguler la fusion à travers le remodelage de F-Actine.

Conclusion

Nos expériences ont confirmé le rôle négatif de l'activation de la signalisation TGF β sur la différenciation myogénique, et montré un effet spécifique sur la fusion des myoblastes. Nous avons aussi testé les effets de l'inhibiteur de la cascade TGF β , et trouvé que la déficience/faiblesse de la voie de signalisation TGF β augmentait la fusion des myoblastes *in vitro* et *in vivo*. Nos études suggèrent donc que la cascade TGF β joue un rôle critique dans la différenciation myogénique, dans la fusion des myocytes, ainsi que dans la régénération du muscle.

TGF β signaling curbs cell fusion and muscle regeneration

LIENS D'INTÉRÊT

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

RÉFÉRENCES

1. Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* 1961 ; 9 : 493-495.
2. Yin H, Price F, Rudnicki MA. Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol Rev* 2013 ; 93 : 23-67.
3. Kollias HD, McDermott JC. Transforming growth factor- β and myostatin signaling in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2008 ; 104 : 579-87.
4. Rudolf A, Schirwis E, Giordani L, et al. β -catenin activation in muscle progenitor cells regulates tissue repair. *Cell Rep* 2016 ; 15 : 1277-90.

Retrouvez toutes les Actualités de la Myologie
sur les sites de :

la Société Française de Myologie

www.sfmyologie.org

la filière de santé neuromusculaire FILNEMUS

www.filnemus.fr

1. TGFβ Signaling in Myoblast Differentiation

Figure 2: A. Experimental scheme. B. Fusion Index and Myonuclei Distribution. C. Immunofluorescent staining of 3-days differentiated myotubes. Scale bar is 200μm.

2. TGFβ Signaling in Myoblast Fusion

Figure 3: A. Experimental scheme. Primary myoblasts were pre-differentiated and then re-plated at High Density. B. Myonuclei cells after 48h. C. Immunofluorescent staining for all myosin heavy-chain isoforms. D. Fusion Index, Fusion Index and Myonuclei Distribution. Scale bars are 200μm.

3. TGFβ Signaling Inhibition

Figure 4: A. Immunofluorescent staining for all myosin heavy-chain isoforms. B. Myonuclei Distribution. C. Fusion Index, Myotube Diameter and Branching. Scale bar is 200μm.

4. TGFβ Signaling regulates Actin Cytoskeleton

Figure 5: A. Volcano Plot showing the Ingenuity Pathway Analysis (IPA). B. Phalloidin staining of 1-day differentiated myocytes. Scale bar is 40μm.

5. Live Imaging of Myoblast Fusion

Figure 6: A. Experimental design. B. Live imaging frames on High-Density Co-Cultured Myotubes. Scale bar is 200μm.

6. Actin polymerization is essential for fusion

Figure 7: A. Experimental scheme. Primary myoblasts were pre-differentiated and then re-plated at High Density. B. Fusion Index and Myonuclei Distribution. Scale bar is 200μm.

7. TGFβ Signaling in Muscle Regeneration

Figure 8: A. Immunofluorescence on TA muscle cryosection. B. Mice were injected with TGFβ1 or ITD-1 three days post injury with Cardiotoxin. C. CSA, CSA Distribution and Myonuclei Distribution. Scale bar is 200μm.

8. TGFβ Signaling regulates Muscle Architecture

Figure 9: A. Immunofluorescence on TA muscle cryosection. B. Mice were injected three times after Cardiotoxin injury, and sacrificed after 14 days. C. CSA, CSA Distribution and Force Measurement. Scale bar is 200μm.

Conclusions

TGFβ Signaling Pathway acts on Myoblast Fusion and plays an essential role during Muscle Regeneration.