



HAL
open science

Les progéniteurs fibro-adipogéniques des muscles squelettiques humains sains et dystrophiques : caractérisation et interactions avec les progéniteurs myogéniques et les macrophages

Claudine Moratal

► **To cite this version:**

Claudine Moratal. Les progéniteurs fibro-adipogéniques des muscles squelettiques humains sains et dystrophiques : caractérisation et interactions avec les progéniteurs myogéniques et les macrophages. Sciences agricoles. COMUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019), 2016. Français. NNT : 2016AZUR4128 . tel-01490562

HAL Id: tel-01490562

<https://theses.hal.science/tel-01490562v1>

Submitted on 15 Mar 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Ecole Doctorale 85 : Sciences de la Vie et de la Santé (SVS)

Spécialité : interactions cellulaires et moléculaires

Unité de recherche : Institut de Biologie Valrose

Thèse de doctorat

Présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en sciences de la vie et de la santé de

L'UNIVERSITE COTE D'AZUR

par

Claudine MORATAL

**Les progéniteurs fibro-adipogéniques des muscles squelettiques
humains sains et dystrophiques : caractérisation et interactions
avec les progéniteurs myogéniques et les macrophages**

Dirigée par Claude Dechesne

Soutenue le 13 décembre 2016

Devant le jury composé de :

Mme Anne Bonnieu, DR, Université de Montpellier	Rapporteur
Mme Anne Bouloumié, DR, Université Toulouse III – Paul Sabatier	Examineur
Mr Claude Dechesne, CR, Université Côte d'Azur	Directeur de thèse
Mr Claude Desnuelle, PU-PH, Université Côte d'Azur	Président
Mr Jean-Thomas Vilquin, DR, Université Pierre et Marie Curie	Rapporteur

Remerciements

Mes premiers remerciements s'adressent au Dr. Christian Dani pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et pour m'avoir donné les moyens de réaliser cette thèse dans de bonnes conditions. Je remercie sincèrement le Dr. Claude Dechesne pour la confiance qu'il m'a accordée durant ces quatre années, pour son soutien dans mes moments de doute, et surtout pour les discussions scientifiques qui sont les fondements de cette thèse.

Pour le temps qu'ils ont consacré à cette thèse, je remercie également chaque membre du jury : le Pr. Claude Desnuelle pour avoir accepté de présider le jury, le Dr. Anne Bonnieu et le Dr. Jean-Thomas Vilquin pour avoir accepté d'être mes rapporteurs, et le Dr. Anne Bouloumié pour avoir accepté d'examiner mes travaux.

Je tiens à remercier particulièrement l'AFM-Téléthon pour avoir intégralement financé ma thèse et pour m'avoir permis de présenter mes recherches aux « Colloques jeunes chercheurs AFM-Téléthon ». Les rencontres et les discussions avec les autres jeunes chercheurs de l'association ont été très enrichissantes.

Aux collaborateurs...

Je remercie le Dr. Jean-Yves Kurzenne pour nous avoir fourni la plupart des biopsies musculaires humaines ainsi que la MYOBANK-AFM de l'Institut de Myologie qui nous a procuré les biopsies musculaires de patients DMD et sains.

Je remercie le Pr. Giulia Chinetti qui nous a fourni les milieux conditionnés de macrophages et qui a permis d'aborder un projet qui me tenait à cœur.

Je remercie aussi le Dr. Bernard Mari et Grégoire Savary pour leurs collaborations sur le projet micro-RNA et pour leurs précieux conseils.

Aux membres actuels de toute l'équipe « Cellules souches et différenciation cellulaire »...

Merci à Nicole pour sa participation à mes travaux de thèse pendant les moments où j'étais débordée ainsi que pour les discussions scientifiques et non scientifiques de voisines de bureaux.

Merci à Annie et Pascal pour leur soutien tout au long de ma thèse et aux discussions pendant les labmeetings qui ont permis de faire avancer mes recherches.

Merci à Phi de l'aide qu'il m'a apportée d'un point de vue technique. Je suis très contente que tu aies pu reprendre le travail avant que je parte. Je te souhaite un bon retour au sein de l'équipe et surtout une bonne fin de rétablissement.

Merci aux étudiants actuellement en thèse dans l'équipe. Christophe, ce fut un réel plaisir de te rencontrer, j'ai notamment beaucoup apprécié ton dynamisme et ta bonne humeur quotidienne. Je te remercie aussi de m'avoir véhiculée quand j'en avais besoin et te souhaite sincèrement de réussir ta carrière et beaucoup de bonheur avec Eléna. Martin, merci pour ton humour communicatif et ton « délicieux » accent québécois. Xi, I am very impressed by your courage to leave China to do your PhD in France and thank you for your good mood every day.

Aux membres passés de l'équipe...

Un grand merci aux anciens thésards avec qui j'ai débuté ma thèse : Anne-Laure, Pauline et Nicolas. Nos repas du midi au laboratoire font partie des plus beaux souvenirs que j'ai eus au cours de ma thèse. Anne-Laure, merci pour ta bienveillance, ta gentillesse et nos discussions. Pauline, merci pour ton humour et pour la bonne ambiance que tu as instaurée entre les étudiants. Nicolas, merci pour ton humour que j'ai eu du mal à cerner au début et bonne continuation pour la suite.

Merci à Noémie pour m'avoir formée sur les cultures primaires humaines de cellules musculaires. J'ai beaucoup apprécié ta bonne humeur et te souhaite plein de bonheur avec Samy et votre fille.

Merci à Brigitte pour son accueil lors de mon arrivée dans l'équipe. Nous avons passé de bons moments au laboratoire mais qui furent trop courts.

Merci à Martina pour son soutien et sa joie de vivre. Dommage que ton séjour au sein de l'équipe ait été court... On a presque réussi à teindre les cheveux blancs de Monsieur Claude !

Merci à Julian pour ton soutien, ta bonne humeur, pour nos bavardages entre voisins de bureaux et aux parties de tennis avec Christophe.

Aux autres membres de l'Institut de Biologie Valrose...

Merci à Agnès de la plate-forme cytométrie de l'iBV pour les tris cellulaires, pour ses conseils et surtout pour nos discussions auprès des cytomètres.

Merci à toute l'équipe du Dr. Zoubir Amri pour la bonne entente entre nos deux équipes au 11^{ème} étage, Rayane, Jean-Claude, Zoubir, Cécilia, Guillaume, Nathalie, Amanda, Clémence, Julia, Charlotte. Des mercis particuliers à Maude qui nous a bien fait rire pendant trois ans et

pour sa joie de vivre communicative. Un grand merci à Didier pour ses conseils et pour les discussions que l'on a pu avoir tous les deux.

Merci à Ivana et Georges avec qui j'ai pu échanger de bons moments au cours de ma thèse.

Aux autres personnes avec qui j'ai travaillé tout au long de mon cursus universitaire...

Je voudrais remercier le Dr. Jean-Luc Villeval pour m'avoir acceptée dans son équipe et pour m'avoir donnée la chance de travailler à ses côtés. Ce fut une expérience très enrichissante. Merci à toutes les personnes avec qui j'ai travaillé à l'IGR et particulièrement Salma, Catherine, Marc, Laure, Franck, Caroline et Sarah.

Un immense merci au Dr. François Morlé pour m'avoir accueillie dans son équipe durant une année entière. Ce fut une très belle rencontre et c'est toujours un plaisir de travailler avec des gens passionnés. Merci aux autres membres de l'équipe de l'époque : Stéphanie, Guy, Marie-France pour ses conseils de culture cellulaire, Boris, Michèle, Joëlle, Azza, Samer, et Guillaume.

A mes amis...

Merci à ma meilleure amie Jennifer avec qui j'ai partagé quelques années de galère mais remplies de bons souvenirs. Nous serons toujours là l'une pour l'autre.

Merci à mon meilleur ami Matthieu pour son soutien et sa présence quand j'en avais besoin ainsi qu'à sa famille que j'adore : Pascal, Carmela et Anthony.

Merci à mes amis lyonnais Vincent à qui je dois beaucoup, et Virginie pour son soutien moral, pour sa créativité qui m'a permis de m'évader et pour nos journées shopping passées sur Lyon.

Merci à mes amis niçois avec qui j'ai passé d'excellents moments hors labo pendant ces quatre années : Laurie, Marilyne, Marco, Moussa, Christopher, Christophe, Cindy, Jules, Julien, Emy, Robin, Réal, Jo, Tof, Guillaume. Bien-sûr, je n'oublie pas ma Jen qui restera niçoise quoi qu'il en soit.

Merci à mes amis de toujours : Marine, Elodie, Flore et Julia.

A Salomon...

Merci à toi pour m'avoir soutenue et pour m'avoir épaulée quand j'en avais besoin. L'aventure de la thèse a été mille fois plus intéressante à tes côtés. Tous les deux, nous allons vivre de nouvelles expériences aussi palpitantes que celle que l'on a vécue à Nice.

A ma famille...

Je garde les meilleurs remerciements pour la fin. Merci à ma proche famille (maman, papa, Colette, Claire et Vincent) pour m'avoir épaulée pendant mes longues études, pour m'avoir soutenue financièrement et moralement, pour m'avoir guidée dans mes choix et pour avoir cru en moi. Je remercie bien-sûr tout le reste de ma famille, oncles, tantes, cousins, cousines et mémé Marie. Une petite pensée à mémé Germaine et pépé Georges.

A toutes les personnes qui auront fait le déplacement pour ma soutenance de thèse.

*« Je sers la science et c'est ma joie »
Basile Landouye, Disciple de Léonard*

Résumé

La régénération musculaire implique des interactions fonctionnelles entre différents types de cellules mononucléées. Parmi elles, citons les progéniteurs myogéniques (MPs), qui fusionnent pour générer de nouvelles myofibres en réponse à un dommage, et les macrophages qui envahissent les muscles endommagés. La régénération musculaire est altérée dans certaines myopathies telles que la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) et au cours du vieillissement. Les muscles sont alors infiltrés par des dépôts fibrotiques et d'adipocytes qui limitent l'efficacité des thérapies cellulaires.

Les cellules musculaires à l'origine de la formation de ces dépôts non-myogéniques sont en cours d'investigations. Nous avons démontré que les MPs participent à la formation des dépôts fibro-adipogéniques dans les muscles de patients DMD. Chez la souris, il est admis que des cellules souches mésenchymateuses musculaires, les progéniteurs fibro-adipogéniques (FAPs), contribueraient au développement de ces dépôts non myogéniques. Chez l'homme, la caractérisation de tels progéniteurs fibro-adipogéniques est peu documentée. Mes recherches ont montré que des FAPs peuvent être extraits à partir de muscles squelettiques humains grâce à leur expression membranaire du PDGFR α . Ces progéniteurs se différencient en adipocytes blancs fonctionnels, bien qu'étant insensibles à l'insuline, et sont également capables de générer des myofibroblastes *in vitro* et *in vivo*.

Les interactions cellulaires FAPs/MPs/macrophages sont encore inexplorées chez l'homme. Nos résultats indiquent que les FAPs stimulent la myogenèse des MPs et inhibent leur prolifération. Les MPs stimulent la prolifération des FAPs *via* la sur-activation de la signalisation PI3Kinase/Akt dans les FAPs. Les myotubes inhibent l'adipogenèse et augmentent la fibrogenèse des FAPs en stimulant l'activation des voies TGF β et Hedgehog. Nous avons également identifié une régulation des FAPs par les macrophages. Contrairement aux macrophages anti-inflammatoires, les macrophages pro-inflammatoires inhibent l'adipogenèse des FAPs. Les deux types de macrophages peuvent stimuler la fibrogenèse des FAPs. Pour les progéniteurs âgés ou dystrophiques, les interactions entre les FAPs et les MPs sont perturbées. De manière intéressante, la régulation des FAPs DMD ou âgés peut être restaurée en remplaçant les MPs DMD ou âgés par des MPs jeunes et sains.

Nos résultats montrent que les muscles humains contiennent des progéniteurs fibro-adipogéniques qui jouent un rôle central dans la régulation de l'homéostasie musculaire en interagissant avec les progéniteurs myogéniques et les macrophages.

Abstract

Muscle regeneration involves functional interactions between different types of mononuclear cells including myogenic progenitors (MPs) and macrophages. Following injury, damaged muscles are invaded by macrophages and MPs fuse to generate new myofibres. Muscle regeneration is disrupted in various myopathies, such as Duchenne muscular dystrophy (DMD), and in aging. In these cases, intramuscular fibrotic and adipocyte deposits develop and impair the success of cell therapies.

Muscle cells responsible for the formation of these non-myogenic deposits are being investigated. We demonstrated that MPs contribute to the formation of non-myogenic deposits in DMD muscles. In mice, it is accepted that muscle mesenchymal stem cells, named fibro-adipogenic progenitors (FAPs), are the cause of these non-myogenic deposits. The characterization of FAPs is poorly documented in humans. We showed that FAPs can be purified from human skeletal muscles by their expression of the cell-surface marker PDGFR α . These progenitors differentiate into functional white adipocytes that have the feature to be insulino-resistant, and give rise to myofibroblasts *in vitro* and *in vivo*.

FAPs/MPs/macrophages interactions are still unexplored in humans. Our results indicate that FAPs stimulate MPs myogenesis and inhibit their proliferation. MPs stimulate FAPs proliferation *via* the over-activation of the PI3K/Akt signaling in FAPs. Myotubes inhibit adipogenesis and increase fibrogenesis of FAPs by stimulating the activation of TGF β and Hedgehog pathways. We have also identified a FAPs regulation by macrophages. Unlike anti-inflammatory macrophages, pro-inflammatory macrophages inhibit adipogenesis of FAPs. The two types of macrophages can stimulate FAPs fibrogenesis. For aged or dystrophic progenitors, the interactions between FAPs and MPs are disturbed. Interestingly, they are restored if aged or DMD FAPs are replaced by healthy and young MPs.

Our results show that the human muscles contain fibro-adipogenic progenitors that play a crucial role in the control of muscle homeostasis by interacting with myogenic progenitors and macrophages.

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS	5
-------------------------------	----------

LISTE DES FIGURES	9
--------------------------	----------

LISTE DES TABLEAUX	11
---------------------------	-----------

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	12
-------------------------------------	-----------

CHAPITRE 1. LES CELLULES SOUCHES MYOGENIQUES DU MUSCLE SQUELETTIQUE 13

1. GENERALITES SUR LE MUSCLE SQUELETTIQUE 13

1. 1 . Structure et fonctions du muscle squelettique 13

1. 2 . Développement embryonnaire et régénération musculaire 15

1. 2. 1. Développement embryonnaire du muscle squelettique 15

1. 2. 2. Introduction à la régénération musculaire 18

2. LES CELLULES SOUCHES A POTENTIEL MYOGENIQUE RESIDENT DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE 21

2. 1 . Les cellules satellites et progéniteurs myogéniques 21

2. 1. 1. Identification et isolement des cellules satellites 22

2. 1. 2. Hétérogénéité des cellules satellites 22

2. 1. 3. Auto-renouvellement des cellules satellites 25

2. 1. 4. Activation des cellules satellites 26

2. 1. 5. Engagement des cellules satellites dans la myogenèse 26

2. 1. 6. Différenciation des cellules satellites 27

2. 1. 7. Retour à l'état de quiescence des cellules satellites activées 29

2. 2 . Les cellules musculaires « side population » (SP) 30

2. 3 . Les MDSCs (muscle-derived stem cells) 31

2. 4 . Les cellules interstitielles PW1⁺ ou PICs (PW1⁺ interstitial cells) 32

2. 5 . Les progéniteurs associés aux vaisseaux 34

2. 5. 1. Les mésoangioblastes 34

2. 5. 2. Les péricytes 35

2. 5. 3. Les cellules endothéliales myogéniques ou MECs (myogenic endothelial cells) 37

2. 6 . Les cellules CD133⁺ 37

CHAPITRE 2. DEGENERESCENCE MUSCULAIRE ET THERAPIES CELLULAIRES 39

1. LES CELLULES SATELLITES DANS LE MUSCLE SARCOPENIQUE 39

1. 1 . Caractéristiques cliniques et causes de la sarcopénie 39

1. 2 . Perte numérique des cellules satellites avec l'âge 40

1. 2. 1. Modifications extrinsèques et déclin numérique des cellules satellites âgées	41
1. 2. 2. Changements intrinsèques et déclin numérique des cellules satellites âgées	41
1. 3 . Perte des fonctions des cellules satellites avec l'âge	43
1. 3. 1. Facteurs extrinsèques et déclin fonctionnel des cellules satellites âgées	43
1. 3. 2. Modifications intrinsèques et déclin fonctionnel des cellules satellites âgées	45
2. LES CELLULES SATELLITES DANS LE MUSCLE DYSTROPHIQUE DMD	47
2. 1 . Caractéristiques cliniques et causes de la DMD	47
2. 2 . Défaut de l'auto-renouvellement des cellules satellites dystrophiques	48
2. 3 . Le devenir des cellules satellites dystrophiques	49
3. LES THERAPIES CELLULAIRES POUR TRAITER LES PATIENTS DMD	51
3. 1 . Principes des thérapies basées sur la transplantation de cellules souches	52
3. 2 . Les cellules souches idéales pour traiter la DMD	53
3. 2. 1. Les cellules satellites et les myoblastes comme traitement de la DMD	54
3. 2. 2. Autres cellules souches musculaires myogéniques comme traitement de la DMD	55
3. 2. 3. Les cellules souches à potentiel myogénique ne résidant pas dans le muscle squelettique comme traitement de la DMD	56
3. 3 . Les essais cliniques pour traiter la DMD	58
3. 3. 1. Transplantation de myoblastes	58
3. 3. 2. Transplantation de cellules CD133 ⁺	59
3. 3. 3. Transplantation des mésoangioblastes	60
CHAPITRE 3. LES PROGENITEURS FIBRO-ADIPOGENIQUES : SOURCE DES DEPOTS GRAISSEUX ET FIBROTIQUES INTRAMUSCULAIRES	61
1. DEPOTS GRAISSEUX ET FIBROTIQUES DANS LES MUSCLES SQUELETTIQUES	61
1. 1 . Adipocytes et gouttelettes lipidiques intramusculaires	61
1. 2 . La matrice extracellulaire et les myofibroblastes	63
2. LES MACROPHAGES : REGULATEURS DE L'ADIPOGENESE ET DE LA FIBROSE MUSCULAIRE	65
2. 1 . Les macrophages au cours de la régénération musculaire	65
2. 1. 1. Cinétique des macrophages au cours de la régénération musculaire	66
2. 1. 2. Phénotypes des macrophages au cours de la régénération musculaire	66
2. 1. 3. Effets des macrophages polarisés sur les progéniteurs myogéniques	68
2. 1. 4. Transition du phénotype des macrophages au cours de la régénération musculaire	70
2. 2 . Régulation de l'adipogenèse musculaire par les macrophages	71
2. 3 . Régulation de la fibrose musculaire par les macrophages	72
3. LES PROGENITEURS FIBRO-ADIPOGENIQUES, FAPs	73
3. 1 . Identification des FAPs	73
3. 2 . Purification des FAPs	75
3. 3 . Localisation des FAPs	77
3. 4 . Rôles des FAPs dans la régénération et la dégénérescence musculaire	77
3. 5 . Mécanisme moléculaire de la régulation des FAPs au cours de la régénération	79

3. 5. 1. Régulation des FAPs par les molécules systémiques et locales	79
3. 5. 2. Régulation des FAPs par les cellules immunitaires	79
3. 5. 3. Régulation épigénétique des FAPs	81

OBJECTIFS DE LA THESE **83**

RESULTATS **87**

CHAPITRE 1. CHARACTERIZATION OF ADIPOCYTES DERIVED FROM FIBRO/ADIPOGENIC PROGENITORS RESIDENT IN HUMAN SKELETAL MUSCLE	88
1. OBJECTIFS DE L'ETUDE	88
2. ARTICLE	90
3. CONCLUSION	91
CHAPITRE 2. FIBROGENIC POTENTIAL OF PROGENITORS RESIDENT IN HUMAN HEALTHY AND DMD MUSCLES	92
1. OBJECTIFS DE L'ETUDE	92
2. ARTICLE	94
3. CONCLUSION	95
CHAPITRE 3. CROSSTALKS BETWEEN MYOGENIC AND FIBRO-ADIPOGENIC PROGENITORS FROM HEALTHY AND DYSTROPHIC SKELETAL MUSCLES IN HUMANS	96
1. OBJECTIFS DE L'ETUDE	96
2. ARTICLE	98
3. CONCLUSION	99
4. A LA RECHERCHE DES FACTEURS REGULANT LES INTERACTIONS CELLULAIRES ENTRE LES LIGNAGES FIBRO-ADIPOGENIQUE ET MYOGENIQUE	100
CHAPITRE 4. ETUDE <i>IN VITRO</i> DE LA REGULATION DES FAPs SAINS PAR LES MACROPHAGES SANGUINS CHEZ L'HOMME	103
1. OBJECTIFS DE L'ETUDE	103
2. MATERIELS ET METHODES	104
3. RESULTATS	106
4. CONCLUSION	107

DISCUSSION **108**

1. LES FAPs DES MUSCLES SQUELETTIQUES HUMAINS	109
1. 1 . Expression du marqueur de surface PDGFR α par les FAPs	109
1. 2 . Les adipocytes formés à partir des FAPs	110
1. 3 . Le potentiel fibrogénique des FAPs et des MPs	112
2. PARTICIPATION DU LIGNAGE FIBRO-ADIPOGENIQUE HUMAIN DANS LA REGENERATION MUSCULAIRE	114

2. 1 . Importance du « ménage à trois » FAPs/MPs/macrophages : particularités de l'espèce humaine115

2. 2 . Les facteurs impliqués dans ce « ménage à trois » : cibles thérapeutiques potentielles 117

REFERENCES

122

LISTE DES ABREVIATIONS

ABCG2: ATP binding cassette subfamily G member 2

ADAM12: metallopeptidase domain 12

ADN: acide désoxyribonucléique

ADSCs: adipose-derived stem cells

ALDH: aldéhyde déshydrogénase

ALK5: activin linked kinase 5

ALP: alkaline phosphatase

ARN: acide ribonucléique

ASCs: adipose stroma cells

BAF60: BRG1/BRM-associated factor 60

BHLHE41: basic helix-loop-helix family member e41

BMPR1A: bone morphogenic protéin receptor type 1A

BMPs: bone morphogenetic proteins

CCL: C-C motif chemokine ligand

CD: cluster of differentiation

CDK: cyclin-dependent kinase

COL1A1: collagen type I alpha 1

CTGF: connective tissue growth factor

CXCL: C-X-C motif chemokine ligand

CXCR4: C-X-C motif chemokine receptor 4

DLK1: delta like non-canonical Notch ligand 1

DMD: Duchenne muscular dystrophy

ECM: extracellular matrix

EDL: *extensor digitorum longus*

ESCs: embryonic stem cells

FABP4: fatty acid-binding protein 4

FACS: fluorescence activated cell sorting

FAPs: fibro-adipogenic progenitors

FGF: fibroblast growth factor

Flk-1: fetal liver kinase-1

FN1: fibronectin 1
Fzd7: frizzled receptor 7
G-CSF: granulocyte-colony stimulating factor
GDF11: growth and differentiation factor 11
GFP: green fluorescent protein
HDACi: HDAC inhibitor
HDACs: histone deacetylases
HGF: hepatocyte growth factor
HMGB1: high mobility group box 1
IFN γ : interferon gamma
IGF: insulin-like growth factor
IL: interleukin
IMAT: intermuscular adipose tissue
iPS: induced pluripotent stem
IRM: imagerie par résonance magnétique
Itga7: α 7-integrin
Itgb1: β 1-integrin
JAK: Janus kinase
Lin $^{-}$: lineage negative
LPS: lipopolysaccharide
Ly6C: lymphocyte antigen 6 complex
MAPK: mitogen-activated protein kinase
Mcad: M-cadherin
MCK: muscle creatine kinase
MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1
M-CSF: macrophage colony-stimulating factor
MDSCs: muscle-derived stem cells
MECs: myogenic endothelial cells
MEF2: myocyte enhancer factor 2
miR: micro-RNA
MPs: myogenic progenitors
MRF: myogenic regulatory factor
MSCs: mesenchymal stem cells
Myf5: myogenic factor 5

MyHC: myosin heavy chain
MyoD: myogenic differentiation 1
NCAM1: neuronal cell adhesion molecule 1
NF- κ B: nuclear factor-kappa B
NG2: neural/glial antigen 2
NKX2.5: NK2 homeobox 5
Oct4: octamer-binding transcription factor 4
Pax3 ou 7: paired box 3 ou 7
PCR: polymerase chain reaction
PDGF: platelet-derived growth factor
PDGFR α : platelet-derived growth factor receptor alpha
PDGFR β 1: platelet-derived growth factor receptor beta 1
PI3K: phosphatidylinositol-3 kinase
PICs: PW1⁺ interstitial cells
PLIN1: perilipin 1
PPAR γ : peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PW1/Peg3: paternally-expressed gene 3
Rb: retinoblastoma protein
ROS: reactive oxygen species
Sca-1: stem cell antigen 1
SDF-1: stromal cell-derived factor 1
SEM: standard error of the mean
SHH: sonic hedgehog
siARN: small interfering ARN
SP: side population
STAT: signal transducer and activator of transcription
SWI/SNF: switch/sucrose non fermentable
Synd3/4: syndecan-3 et syndecan-4
TA: *tibialis anterior*
TBP: TATA box-binding protein
TCF4: transcription factor 4
TGF β : transforming growth factor beta
TNF α : tumor necrosis factor alpha

Treg: cellule T régulatrice

UCP1: uncoupling protein 1

VCAM: vascular cell adhesion molecule

VE-cadherin: vascular-endothelial cadherin

VEGF: vascular endothelial growth factor

VLA-4: very late antigen 4

Wnt: Wingless-type mouse mammary tumor virus integration site family

α SMA: alpha smooth muscle actin

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure d'un muscle squelettique.....	p13
Figure 2. Les différentes couches de tissus conjonctifs constituant le muscle squelettique...	p14
Figure 3. Plaque motrice, zone d'une jonction neuromusculaire.....	p14
Figure 4. Embryogenèse des muscles squelettiques des membres.....	p15
Figure 5. Origines et morphologies des précurseurs du lignage myogénique.....	p16
Figure 6. Expressions séquentielles des facteurs Pax3, Pax7, MRFs et de la myosine au cours de la myogenèse embryonnaire chez la souris.....	p17
Figure 7. Morphologie des fibres musculaires en réponse à une blessure induite par la cardiotoxine.....	p20
Figure 8. Activation, prolifération, différenciation et maturation des cellules satellites au cours de la régénération musculaire.....	p21
Figure 9. Phénotype des cellules satellites murines.....	p22
Figure 10. Division symétrique et asymétrique des différentes populations des cellules satellites.....	p25
Figure 11. Régulation réciproque de l'expression de Pax7 et des MRFs au cours de l'engagement et du devenir des cellules myogéniques.....	p27
Figure 12. Déclin fonctionnel et numérique des cellules satellites avec l'âge.....	p40
Figure 13. Facteurs extrinsèques et intrinsèques qui perturbent les fonctions des cellules satellites au cours du vieillissement.....	p46
Figure 14. Les efficacités de la régénération musculaire et de l'homéostasie tissulaire dépendent d'une balance entre divisions symétriques et asymétriques des cellules satellites.....	p49
Figure 15. Adipocytes et gouttelettes intramusculaires.....	p61
Figure 16. Dépôts de collagène intramusculaires.....	p63
Figure 17. Dépôts d'ECM après un dommage aigu ou chronique.....	p63
Figure 18. Induction de la différenciation des fibroblastes tissulaire en myofibroblastes.....	p64
Figure 19. Apparition séquentielle des deux sous-populations de macrophages au cours de la régénération des muscles de souris.....	p67
Figure 20. Cinétiques des cellules myéloïdes et de l'expression des principaux gènes myogéniques au cours de la régénération musculaire de la souris.....	p68
Figure 21. Polarisation des macrophages au cours de la réparation du muscle squelettique...	p71
Figure 22. Potentiels de différenciation <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> des FAPs.....	p74

Figure 23. Localisation des FAPs PDGFR α ⁺ dans les muscles normaux au repos.....	p77
Figure 24. Rôle de la sécrétion de l'IL-33 par les FAPs au cours de la régénération musculaire.....	p78
Figure 25. Rôles multiples des FAPs au cours de la régénération musculaire.....	p79
Figure 26. Régulation des FAPs murins par les cellules immunitaires.....	p80
Figure 27. Mécanisme épigénétique de la plasticité myogénique des FAPs des muscles de souris <i>mdx</i> jeunes.....	p81
Figure 28. Effets de la cyclopamine et du SB431542 sur la myogenèse des MPs.....	p99
Figure 29. Effets du SB203580 et du U0126 sur la fibro-adipogenèse et la myogenèse des FAPs et des MPs respectivement.....	p100
Figure 30. Expressions de <i>TGFβ1</i> , <i>TGFβ3</i> , <i>IL-8</i> , <i>TNFα</i> , <i>IGF-2</i> et <i>MCP-1</i> dans les co-cultures et les mono-cultures.....	p101
Figure 31. Effets de la neutralisation du TNF α sur l'adipogenèse et la fibrogenèse des FAPs dans les co-cultures.....	p101
Figure 32. Effets de la neutralisation du TNF α sur l'adipogenèse et la fibrogenèse des FAPs cultivés en présence du milieu conditionné de myotubes.....	p102
Figure 33. Régulation du potentiel fibro-adipogénique des FAPs par les macrophages.....	p107

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Caractéristiques des différentes populations de cellules souches musculaires à potentiel myogénique.....	p29
Tableau 2. Avantages et inconvénients des cellules souches musculaires capables de contribuer <i>in vivo</i> à la régénération musculaire comme traitement pour la DMD.....	p54
Tableau 3. Avantages et inconvénients des cellules souches non musculaires capables de contribuer <i>in vivo</i> à la régénération musculaire comme traitement pour la DMD.....	p56
Tableau 4. Résultats des essais cliniques de transplantations de cellules souches musculaires dans des patients atteints de la DMD.....	p58
Tableau 5. Phénotypes immunologiques des FAPs de souris et humains.....	p75
Tableau 6. Interactions cellulaires entre FAPs, MPs et macrophages humains chez les donneurs jeunes et sains.....	p115

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

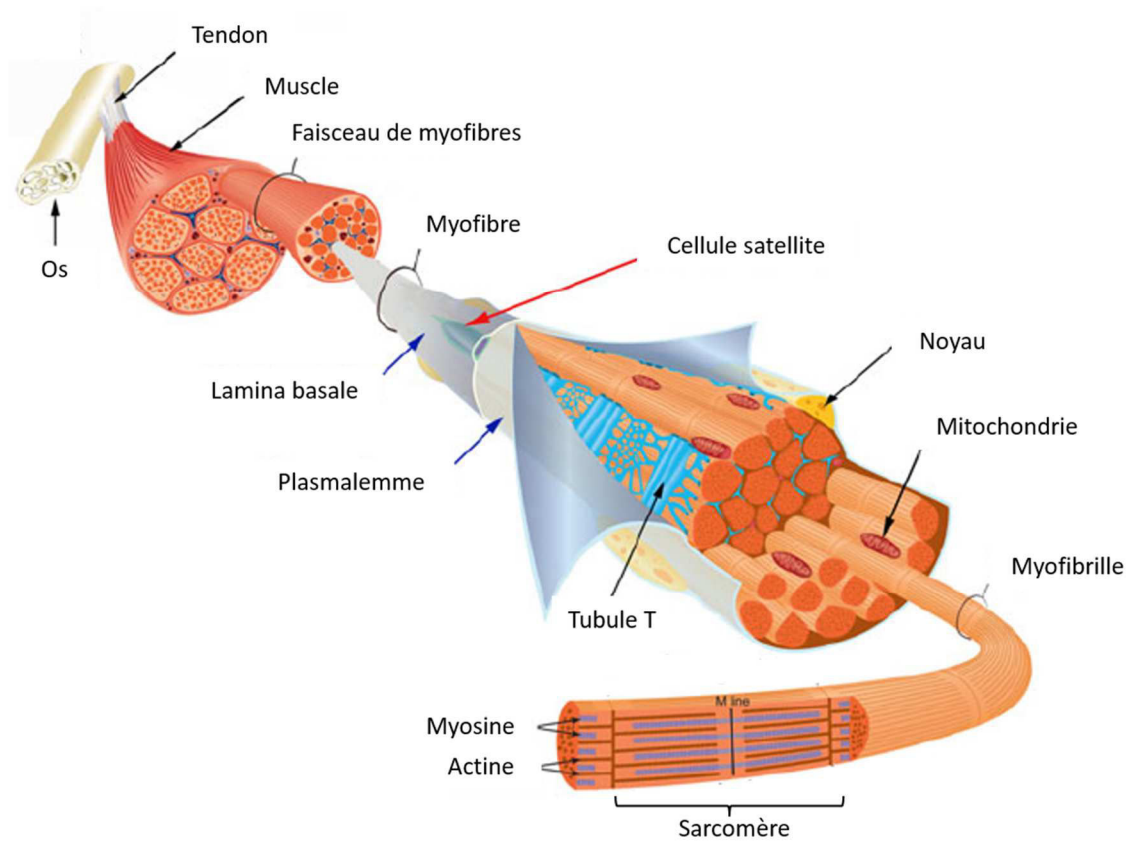


Figure 1. Structure d'un muscle squelettique. Le plasmalemme, entouré par la lamina basale, est la membrane plasmique qui délimite chaque fibre musculaire. Une myofibre contient une multitude de noyaux localisés à la périphérie des myofibres. Le tubule T ou tubule transversal est une invagination de la membrane plasmique permettant de conduire le potentiel d'action musculaire jusqu'au cœur de la myofibre. Les filaments des sarcomères sont composés de protéines : myosine, actine, troponine et tropomyosine. (Relaix and Zammit 2012)

Chapitre 1. Les cellules souches myogéniques du muscle squelettique

1. Généralités sur le muscle squelettique

Le tissu musculaire représente environ 40% à 45% du poids corporel pour l'homme et 35% pour la femme. Les muscles sont classés en trois catégories : lisses, cardiaques et squelettiques. Les muscles lisses et cardiaques sont dits « involontaires » car leur contraction est indépendante de la volonté. Ils sont localisés dans les organes internes tels que le cœur ou encore l'estomac et, de par leurs localisations, assurent des fonctions vitales pour l'organisme comme la respiration, la circulation sanguine et la digestion. Les muscles cardiaques et squelettiques ont une structure striée sous observation histologique reflétant le cytosquelette de l'appareil contractile. Contrairement aux deux autres types de muscle, la plupart des muscles squelettiques sont reliés aux os par les tendons pour transmettre au squelette les forces et les mouvements produits suite à la contraction volontaire du muscle. C'est également un tissu très hétérogène, car en tant que tissu il rassemble des dizaines de muscles différents, au niveau de leur structure, taille, métabolisme et donc de leur fonction. Ainsi, environ 640 muscles striés squelettiques sont répertoriés pour le corps humain avec 200 muscles pour les membres, 170 pour la tête et le cou, 200 pour le tronc et 50 pour les appareils et les organes (Huard, Li, and Fu 2002, Brooks 2003, Exeter and Connell 2010).

1. 1. Structure et fonctions du muscle squelettique

Le muscle squelettique est composé de vaisseaux sanguins, de cellules musculaires, de tissus conjonctifs et de nerfs. L'irrigation sanguine d'un muscle comprend des artères pour un approvisionnement plus ou moins continu en oxygène nécessaire pour la contraction des cellules musculaires, des veines pour évacuer les déchets métaboliques après une contraction, et des capillaires dont la taille peut être modulée au cours d'un étirement ou d'une contraction.

L'élément structural de base du muscle squelettique est la fibre musculaire ou myofibre (**Fig. 1**). Leur diamètre se situe entre 10 et 100 μm et leur longueur peut atteindre de 30 à 35

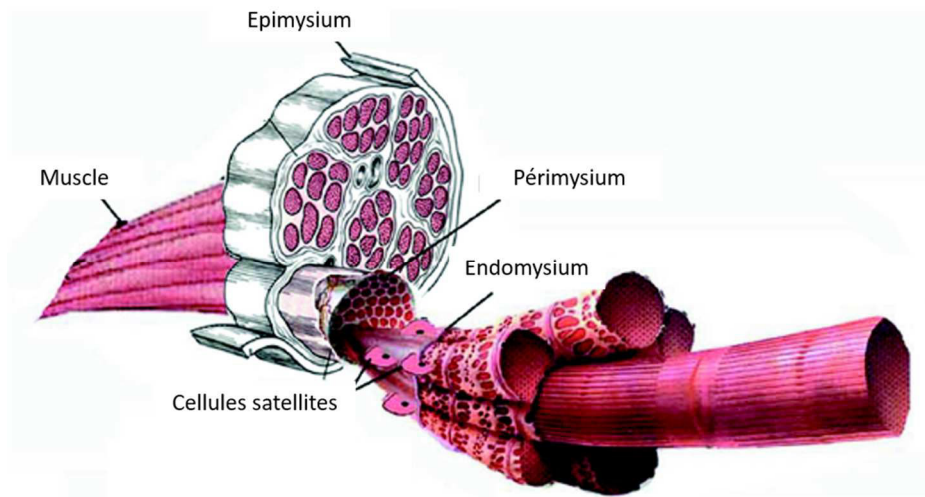


Figure 2. Les différentes couches de tissu conjonctifs constituant le muscle squelettique. Chaque fibre musculaire est revêtue d'une fine gaine de tissu conjonctif, l'endomysium. Les faisceaux de fibres musculaires sont délimités par une gaine plus épaisse de tissu conjonctif, le périmysium. L'ensemble du muscle est renforcé et recouvert par une gaine grossière de tissu conjonctif, l'épimysium. (Huard, Li, and Fu 2002)

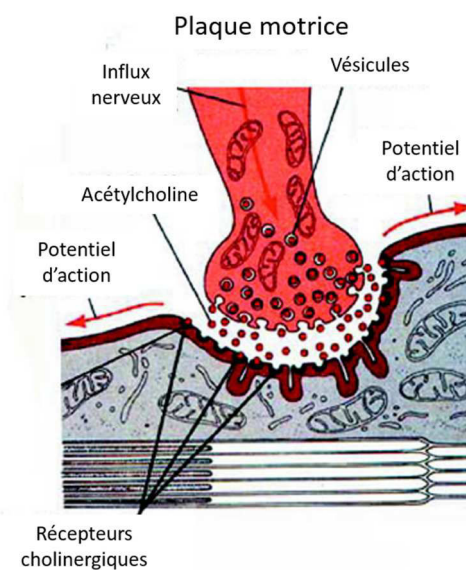


Figure 3. Plaque motrice, zone d'une jonction neuromusculaire. L'influx nerveux est illustré par le cheminement de molécules d'acétylcholine libérées dans la fente synaptique à partir du nerf moteur pour se fixer sur leurs récepteurs présents à la surface des fibres musculaires, générant ainsi un potentiel d'action migrant le long de la myofibre. (Huard, Li, and Fu 2002)

cm. Elles sont formées suite à la fusion de multiples myoblastes et sont par conséquent multinucléées. Les myoblastes dérivent des cellules satellites localisées sous la lamina basale qui, une fois activées, génèrent des progéniteurs engagés dans le processus de différenciation myogénique. Le cytoplasme des myofibres, sarcoplasme, contient une matrice cellulaire et des organelles dont l'appareil de Golgi, des mitochondries, du réticulum sarcoplasmique, des gouttelettes lipidiques, du glycogène et de la myoglobine. Chaque fibre musculaire comprend des milliers de myofibrilles, et chaque myofibrille est composée d'une série de sous-unités appelées sarcomères joints bout à bout qui sont à la base des propriétés contractiles du muscle. L'aspect strié de l'ensemble de la cellule est induit par les indexes de réfraction qui varient selon les différents filaments composant les sarcomères qui sont presque parfaitement alignés.

Les myofibres individuelles sont entourées par une couche de tissu conjonctif nommé endomysium, tandis que le pérимysium délimite chaque faisceau de fibres musculaires (**Fig. 2**). L'épimysium est la couche de tissu conjonctif la plus externe encerclant le muscle squelettique. Toutes ces gaines de tissu conjonctif constituent un ensemble continu incluant aussi les tendons qui relient les muscles aux os. Lorsque les fibres musculaires se contractent, elles tirent sur leurs différentes gaines, lesquelles, à leur tour, transmettent la force à l'os. Elles contribuent également à l'élasticité naturelle du tissu musculaire.

La contraction du muscle squelettique est sous le contrôle de motoneurones qui sont en contact direct avec les myofibres. Le point de contact entre la myofibre et le nerf est appelé jonction neuro-musculaire et est composé de l'axone pré-synaptique, de la fente synaptique et de l'aire post-synaptique de la myofibre (**Fig. 3**). La première étape de la contraction musculaire implique la libération de molécules d'acétylcholines au niveau de la fente synaptique par les axones pré-synaptiques. Par la suite, les neurotransmetteurs libérés se lient aux récepteurs cholinergiques présents sur la lamina basale des myofibres dépolarisant ainsi la cellule. Cette dépolarisation déclenche un potentiel d'action qui traverse la membrane musculaire et entre dans le sarcoplasme par les tubules transversaux causant la libération de calcium à partir du réticulum sarcoplasmique. Le calcium libéré se lie à la protéine troponine permettant ainsi son interaction avec les protéines contractiles telles que la myosine et l'actine. Ce sont ces interactions protéiques qui sont à l'origine de la contraction du muscle squelettique. A la fin de la contraction musculaire, les molécules d'acétylcholines sont désactivées par les enzymes cholinestérases et le muscle se relâche.

Il existe trois types de contraction musculaire : isométrique, concentrique et excentrique. Lors d'une contraction isométrique, la force générée par le muscle est égale à la charge de résistance entraînant une absence du changement de taille du muscle et donc de mouvement

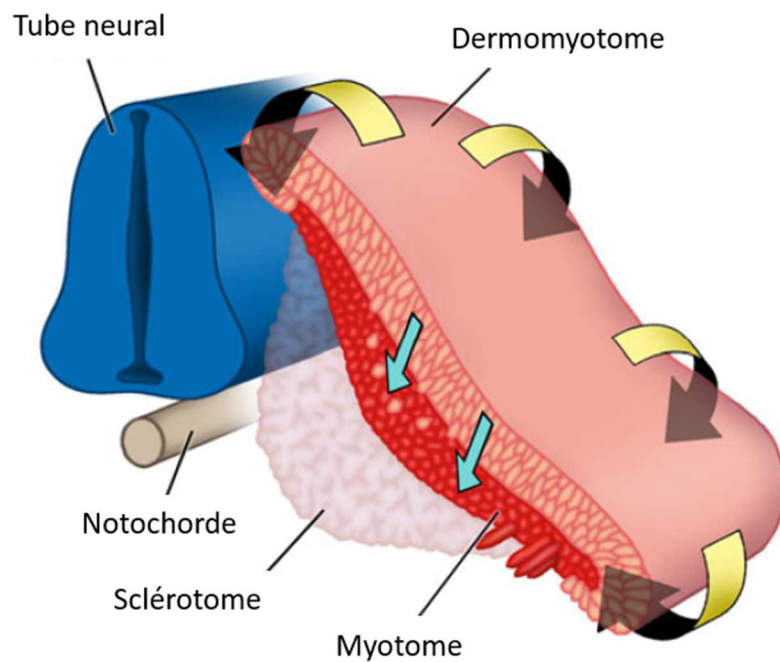


Figure 4. Embryogenèse des muscles squelettiques des membres. Tous les rebords du dermomyotome participent à la formation du myotome (flèches jaunes). Les progéniteurs musculaires proviennent du dermomyotome central (flèches bleues). Ces cellules se déplacent directement dans le myotome où elles deviennent des myoblastes prolifératifs responsables de la croissance du myotome. (Yusuf and Brand-Saberi 2012)

articulaire. La contraction concentrique implique la génération d'une force musculaire plus forte que la charge de résistance causant le raccourcissement du muscle, alors que la contraction excentrique entraîne l'allongement du muscle car la force de résistance est plus grande que la force produite par le muscle.

L'intensité et le temps de contraction d'un muscle squelettique varient selon le type de fibres musculaires qui le composent. Il existe deux types de fibres : à contraction lente (type I) ou rapide (type II). Les fibres de type I sont riches en mitochondries et en myoglobines donnant au tissu musculaire sa couleur rouge. Ces fibres sont fortement oxydantes leur conférant une capacité de contraction longue mais ne développent pas une force importante. Les fibres de type II peuvent se contracter plus rapidement et possèdent une force de contraction plus importante mais de courte durée en raison d'un contenu mitochondrial inférieur.

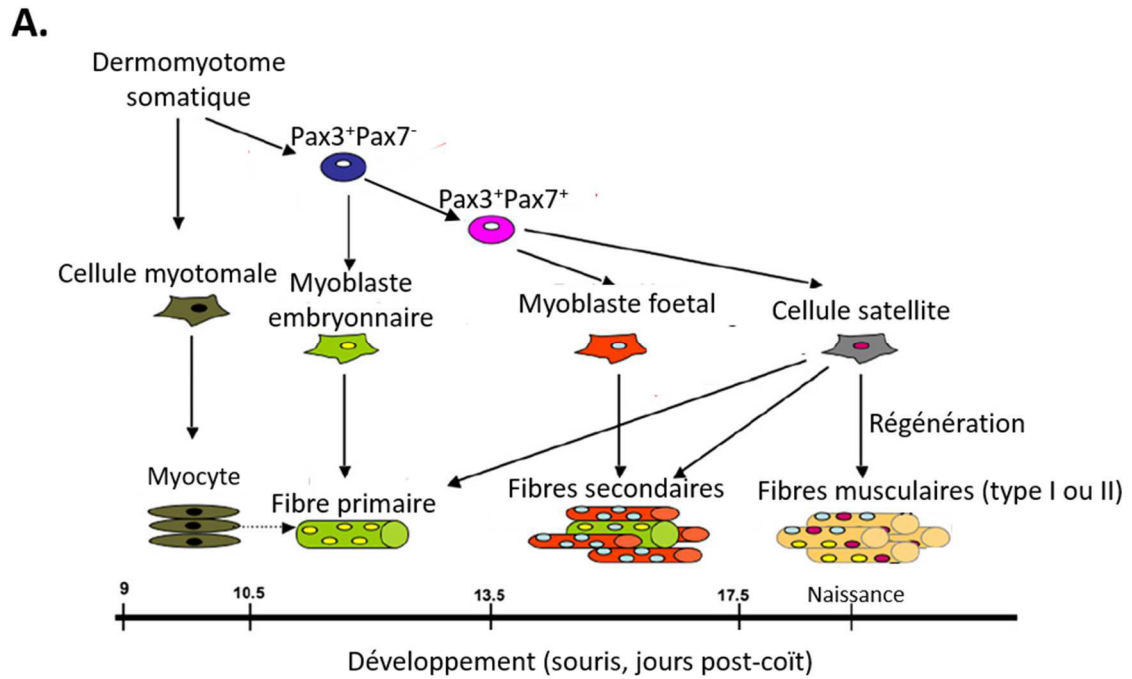
Tout au long de notre vie, l'intégrité du muscle squelettique peut être perturbée par de nombreuses causes diverses incluant les traumatismes directs comme les lacérations ou les claquages, ou indirectes incluant les maladies et le vieillissement.

1. 2. Développement embryonnaire et régénération musculaire

De nombreux facteurs peuvent influencer la structure du muscle squelettique et par conséquent leurs fonctions : des pathologies telles que la dystrophie musculaire ; une exposition à des agents myotoxiques comme l'hypivacaine ou la lidocaine ; un trauma tranchant ou contondant, une ponction ou contusion ; l'ischémie ; une exposition à des températures froides ou chaudes, et la propre contraction du muscle (Karalaki et al. 2009). La dégradation du muscle squelettique induite par ces facteurs déclenche l'activation du puissant processus de régénération musculaire orchestré par des événements cellulaires et moléculaires. La régénération musculaire chez les mammifères possède de fortes similarités au développement musculaire au cours de l'embryogenèse et semble suivre la même procédure. Un aperçu du développement du muscle squelettique paraît donc être nécessaire à la compréhension des différentes étapes de la réparation musculaire post-natale chez les mammifères.

1. 2. 1. Développement embryonnaire du muscle squelettique

A l'exception des muscles de la tête, les muscles squelettiques du tronc et des membres sont formés à partir du mésoderme paraxial segmenté en somites de part et d'autre du tube



B.

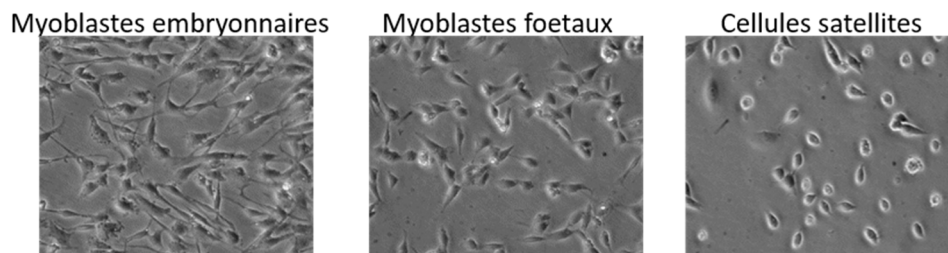


Figure 5. Origines et morphologies des précurseurs du lignage myogénique. (A). Schéma du lignage myogénique embryonnaire et post-natal. Les cellules myotomales, originaires du dermomyotome somatique, se différencient en myocytes dans le myotome. Au cours du développement embryonnaire, les cellules somatiques $Pax3^+/Pax7^-$ présentes dans le dermomyotome génèrent des myoblastes embryonnaires et d'autres cellules somatiques $Pax3^+/Pax7^+$ qui, à leur tour, donnent naissance aux myoblastes foetaux et aux cellules satellites. Les myoblastes embryonnaires et foetaux se différencient en fibres primaires et secondaires respectivement. Les cellules satellites apparaissent à la fin de la gestation et sont responsables de la croissance post-natale et de la régénération musculaire. (Biressi, Molinaro, and Cossu 2007). (B). Images de microscopie en contraste de phase des différentes morphologies des myoblastes embryonnaires, foetaux et des cellules satellites en culture. (Cossu and Biressi 2005)

neural et de la notochorde (Buckingham et al. 2003, Christ and Ordahl 1995) (**Fig. 4**). Des signaux moléculaires produits par le tube neural et la notochorde induisent les somites à se subdiviser en domaines distincts. Sonic hedgehog (SHH) sécrété par la notochorde entraîne la formation du sclérotome ventral qui contribue au développement du cartilage et des os de la colonne vertébrale et des côtes (Johnson et al. 1994). Les molécules de la voie Wnt (Wingless-type mouse mammary tumor virus integration site family) et les BMPs (bone morphogenetic proteins) produites par le tube neural induisent la formation du dermomyotome dorsal à l'origine du derme recouvrant le dos et les muscles squelettiques du tronc et des membres (Fan, Lee, and Tessier-Lavigne 1997, Marcelle, Stark, and Bronner-Fraser 1997). Le développement des muscles squelettiques chez la souris débute dès le stade E8.75 de l'embryogénèse où apparaissent les premières cellules musculaires différenciées mononucléées appelées myocytes (Biressi, Molinaro, and Cossu 2007).

Chez la souris, le muscle squelettique poursuit son développement aux stades tardifs de l'embryogénèse (E10-12.5), puis durant la vie fœtale (E14.5-17.5) et post-natale. Au cours de ces étapes successives, différents types de myoblastes sont générés : les myoblastes embryonnaires, les myoblastes fœtaux et les cellules satellites (**Fig. 5A**). Ces 3 types de progéniteurs musculaires présentent des caractéristiques et des comportements différents une fois mis en culture (Biressi, Molinaro, and Cossu 2007, Biressi et al. 2007, Cossu and Biressi 2005) (**Fig. 5B**). Les myoblastes embryonnaires sont des cellules allongées, et sont plus enclins à se différencier, ce qui leur confère une faible capacité clonale. Les myoblastes fœtaux ont une forme triangulaire et leur expansion est limitée en réponse aux facteurs de croissance. Les cellules satellites possèdent une forte capacité clonale mais deviennent sénescents au bout d'un nombre limité de passages *in vitro*.

La formation du muscle squelettique se réalise en deux phases distinctes : la myogénèse primaire et secondaire (**Fig. 5A**). Dès le stade E10.5 de l'embryogénèse, les myoblastes embryonnaires fusionnent en fibres primaires multinucléées, en incorporant probablement les myocytes mononucléés initialement formés, à travers le processus de myogénèse primaire (Messina and Cossu 2009, Sambasivan and Tajbakhsh 2007). Puis au cours de la phase de la myogénèse secondaire qui a lieu aux stades E13.5-17.5, les myoblastes fœtaux fusionnent entre eux ou avec les fibres primaires pour former les fibres secondaires multinucléées. A la fin de cette phase, les cellules satellites mononucléées émergent entre la lamina basale et la membrane plasmique des fibres musculaires. Au cours du développement péri- et post-natal, les cellules satellites se divisent lentement et une majorité fusionne avec les fibres adjacentes pour continuer la croissance des fibres musculaires. Au terme de la phase de croissance post-natale,

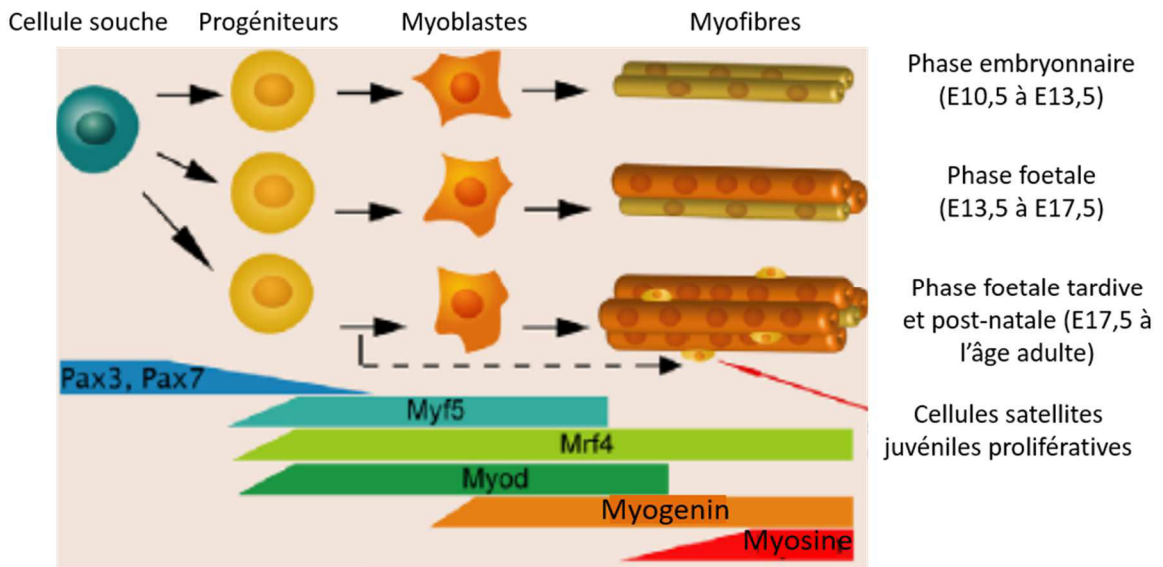


Figure 6. Expressions séquentielles des facteurs Pax3, Pax7, MRFs et de la myosine au cours de la myogenèse embryonnaire chez la souris. Contrairement à Pax7, l'expression de Pax3 décline dans le fœtus et est absente dans les cellules satellites. MRF4 n'est pas exprimé dans les myoblastes fœtaux. Au stade embryonnaire E16.5, les cellules satellites Pax7⁺ sont localisées sous la lamina basale des myofibres. Une sous-unité de ces cellules deviendra les cellules satellites quiescentes des muscles squelettiques adultes indispensables à la régénération musculaire. (Sambasivan and Tajbakhsh 2007)

les cellules satellites deviennent quiescentes mais peuvent être activées si le tissu musculaire subit un dommage.

Tous les myoblastes dérivent d'un précurseur myogénique commun originaire du dermomyotome qui co-exprime les facteurs de transcription Pax3 (paired box 3) et Pax7 (paired box 7) (Relaix et al. 2005, Sambasivan and Tajbakhsh 2007, Biressi et al. 2007). Ces précurseurs myogéniques migrent le long de l'embryon afin de recouvrir la totalité du somite dans le but de se différencier en myocytes et former ainsi le myotome primaire (**Fig. 5A**). La migration des progéniteurs musculaires est régulée par le facteur FGF8 (fibroblast growth factor 8) sécrété par le myotome primaire qui augmente l'expression du facteur de transcription Snail1 dans les progéniteurs, déclenchant leur transition épithélio-mésenchymateuse à partir du dermomyotome (Delfini et al. 2009). L'expression de Pax3 est essentielle pour cette migration puisqu'il induit l'expression du gène *c-met* permettant ainsi aux progéniteurs de répondre au ligand HGF (hepatocyte growth factor) produit par le myotome primaire (Bladt et al. 1995, Epstein et al. 1996). Depuis peu, il a été démontré que Pax3 et Pax7 s'expriment différemment dans le temps au cours de l'embryogenèse, leur conférant alors des rôles distincts dans le lignage myogénique (Gros et al. 2005, Schienda et al. 2006, Messina and Cossu 2009, Lepper and Fan 2010, Hutcheson et al. 2009) (**Fig. 5A**). Les cellules somatiques Pax3⁺/Pax7⁻ sont requises pour la myogenèse embryonnaire tandis que les cellules Pax3⁺/Pax7⁺ ont un rôle essentiel dans la myogenèse fœtale et adulte.

La spécification des myoblastes est contrôlée par l'activation de l'expression des MRFs (myogenic regulatory factors) dans les cellules Pax3⁺/Pax7⁺ sous l'influence des voies de signalisation SHH (Borycki et al. 1999, Gustafsson et al. 2002), Wnt (Tajbakhsh et al. 1998) et BMP (Reshef, Maroto, and Lassar 1998), ainsi que du facteur de transcription Pax3 (Maroto et al. 1997, Bajard et al. 2006). Chez les vertébrés, il existe 4 MFRs : Myf5, myogenic factor 5 (Braun et al. 1989), MyoD, myogenic differentiation 1 (Tapscott et al. 1988), MRF4, myogenic regulatory factor 4 (Rhodes and Konieczny 1989) et la myogénine (Wright, Sassoon, and Lin 1989). Ils sont exprimés séquentiellement au cours de l'embryogenèse et dans les muscles post-nataux et adultes (**Fig. 6**). Myf5 est le premier MRF à être exprimé au cours du développement, suivi de l'expression de MyoD (Delfini et al. 2000). A la fois Myf5 et MyoD sont nécessaires pour induire les expressions de MRF4 puis de la myogénine (Rudnicki et al. 1993). La croissance du muscle au cours du développement embryonnaire dépend d'une balance entre prolifération et différenciation des myoblastes, elle-même régulée par de nombreux facteurs de croissance. Par exemple, la prolifération des myoblastes est activée par les facteurs FGFs,

(Marcelle, Wolf, and Bronner-Fraser 1995, Edom-Vovard, Bonnin, and Duprez 2001), IGFs, insulin-like growth factors (Mitchell, Johnson, and Hannon 2002) et la follistatine (Amthor et al. 2002), alors que les facteurs HGFs maintiennent l'état indifférencié des cellules (Scaal et al. 1999). A l'inverse, Notch, Twist, Noggin et la myostatine sont des régulateurs négatifs à la fois de la prolifération et de la différenciation des myoblastes (Kopan, Nye, and Weintraub 1994, Spicer et al. 1996, McPherron, Lawler, and Lee 1997, Amthor, Christ, and Patel 1999). La diminution de la concentration de ces facteurs de croissance déclenche l'arrêt de la prolifération des myoblastes, et par conséquent le déclenchement de leur différenciation. La sortie du cycle cellulaire est accomplie par l'induction de l'expression des inhibiteurs CDKs (cyclin-dependent kinases) comme p21 et la protéine retinoblastoma (Rb protein), qui sont aussi nécessaires pour l'activation de l'expression des gènes MRFs (Gu et al. 1993, Halevy et al. 1995, Novitch et al. 1996, Andrés and Walsh 1996). Par la suite, les myoblastes engagés s'alignent, fusionnent en myotubes multinucléés et commencent à exprimer des protéines contractiles spécifiques du muscle telles que l'actine et la myosine (STOCKDALE and HOLTZER 1961, Ontell et al. 1993).

Pour résumer, chez les Vertébrés, les cellules satellites adultes impliquées dans la réparation musculaire proviennent de précurseurs myogéniques Pax3⁺/Pax7⁺ originaires du dermomyotome et sont capables de se différencier en myotubes multinucléés contractiles grâce à l'induction des expressions successives des gènes MRFs. Cependant, des études ont révélé l'émergence occasionnelle de cellules myogéniques à partir de tissus non originaires des somites. Notamment, des précurseurs myogéniques provenant de l'aorte dorsale embryonnaire et isolés à partir d'embryons de souris c-Met-null dans lesquels la migration des myoblastes à partir du dermomyotome est impossible, présentent toutes les caractéristiques des cellules satellites adultes (De Angelis et al. 1999). Ces résultats suggèrent que d'autres progéniteurs myogéniques, ayant des origines embryonnaires différentes des cellules satellites, résident dans le muscle squelettique adulte et participeraient au processus de régénération musculaire.

1. 2. 2. Introduction à la régénération musculaire

Quotidiennement, les muscles squelettiques subissent des lésions mineures qui entraînent l'activation d'un processus de réparation n'engendrant aucune mort cellulaire, réponse inflammatoire ou changement structural. Par exemple, une lésion locale de la membrane plasmique causée par des contractions musculaires excentriques spontanées peut être

efficacement réparée grâce au recrutement de vésicules intracellulaires au niveau de la partie de la membrane endommagée (Bansal et al. 2003). Ce processus de réparation dépend de l'expression des gènes *Dysferlin* (Bansal et al. 2003) et *Caveolin-3* (Galbiati, Volonte, Minetti, et al. 1999), puisque leurs mutations causent le développement de la myopathie des ceintures 2B (Liu et al. 1998) et 1C (Minetti et al. 1998) respectivement. A l'inverse, des dommages musculaires sévères dus à des traumatismes ou à des défauts génétiques induisent un processus de régénération complexe qui implique une nécrose des myofibres endommagées, une réponse inflammatoire, l'activation des cellules satellites, la prolifération et la différenciation des myoblastes. La régénération du muscle squelettique a été décrite pour la première fois dans les années 1860 et le mécanisme de ce processus a été résolu un siècle plus tard (Scharner and Zammit 2011). Elle se réalise en 3 étapes interdépendantes : la dégénérescence et la réponse inflammatoire, la phase de réparation impliquant l'activation et la différenciation des cellules satellites, puis la maturation et le remodelage des myofibres nouvellement formées (Karalaki et al. 2009, Yin, Price, and Rudnicki 2013, Ceafalan, Popescu, and Hinescu 2014).

La dégénérescence musculaire débute dès les premières minutes qui suivent la blessure par la nécrose des fibres musculaires lésées. Cet événement est initié par la dissolution du sarcolemme des myofibres engendrant la perméabilisation de ces dernières. La conséquence de la destruction de l'intégrité des myofibres est une augmentation du taux plasmatique de la protéine musculaire créatine kinase et du micro-ARN-133a (micro-acide ribonucléique-133a) qui sont présents dans le cytosol des myofibres non endommagées (Angelini, Di Mauro, and Margreth 1968, Laterza et al. 2009). La nécrose des myofibres est accompagnée par une augmentation de l'influx calcique ou de calcium libéré à partir du réticulum sarcoplasmique qui, à son tour, active la protéolyse dépendante du calcium entraînant la dégénérescence tissulaire (Alderton and Steinhardt 2000). Cette phase nécrotique active la cascade du complément et induit les réponses inflammatoires (Orimo et al. 1991). Les neutrophiles sont les premières cellules inflammatoires à infiltrer le muscle lésé et leur nombre ne cesse d'augmenter jusqu'à 6 heures post-lésion (Fielding et al. 1993). L'infiltration musculaire des neutrophiles est suivie par l'invasion séquentielle de deux sous-populations distinctes de macrophages qui deviennent à leur tour les cellules prédominantes du muscle endommagé (Chazaud et al. 2009). Les premiers macrophages qui infiltrent le muscle expriment à leur surface le marqueur CD68 (cluster of differentiation 68) mais pas la protéine CD163. Leur concentration atteint un pic 24 heures suivant la blessure puis décline très rapidement. Les macrophages CD68⁺/CD163⁻ sécrètent des cytokines pro-inflammatoires comme TNF α (tumor necrosis factor α) et l'IL-1 (interleukin 1), et nettoient la zone nécrotique en phagocytant les

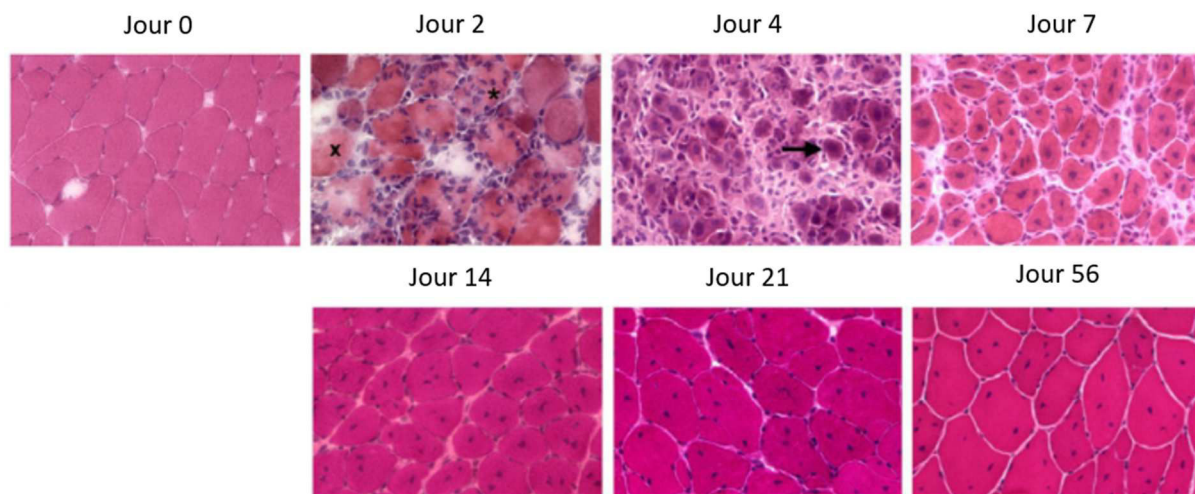


Figure 7. Morphologie des fibres musculaires en réponse à une blessure induite par la cardiotoxine. Coupes transversales de muscles TA blessés de souris colorées à l'hématoxyline et éosine. Avant la blessure (jour 0), les myofibres ont une taille régulière et leurs noyaux sont localisés à la périphérie. Deux jours après la blessure, des fibres nécrotiques (croix) et des myofibres phagocytés (astérisque) sont observés. Au jour 4 post-dommage, les premières fibres en régénération sont observées (flèche). Au jour 7, les myofibres en régénération sont caractérisés par des noyaux centraux puis leur taille augmente jusqu'au jour 56. (Mounier et al. 2013)

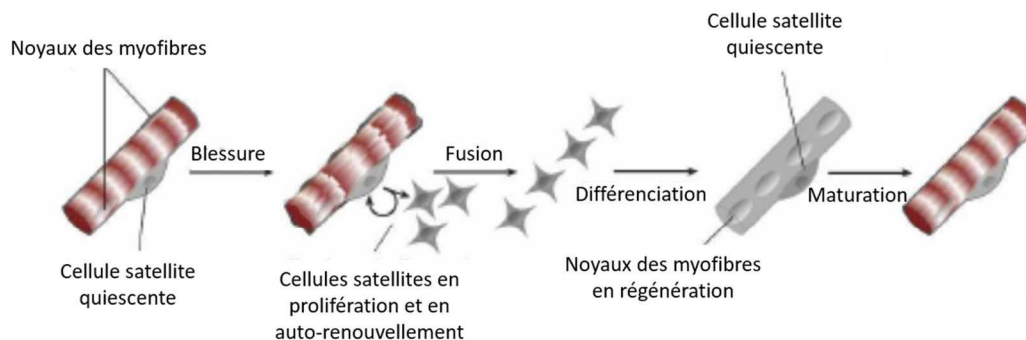
débris cellulaires. La seconde population de macrophages qui expriment CD163 mais pas CD68 envahissent le muscle avec un pic de concentration à 2 et 4 jours post-blessure. Ces macrophages CD68⁻/CD163⁺ sécrètent des facteurs anti-inflammatoires tels que l'IL-10 (interleukin 10), et persistent dans le muscle endommagé jusqu'à la fin de l'inflammation. Leur rôle est de faciliter la prolifération et la différenciation des cellules satellites (Cantini et al. 1995, Cantini et al. 2002, Lescaudron et al. 1999, Merly et al. 1999, Sonnet et al. 2006).

Suite à la dégénérescence musculaire, le processus de régénération prend place dès la première semaine après la lésion avec un pic d'activité au bout de la deuxième semaine. Une caractéristique de cette phase est la prolifération cellulaire. Elle est importante puisque le blocage de la prolifération cellulaire induit par la colchicine (Pietsch and McCollister 1965) réduit drastiquement la capacité régénérative du muscle. La prolifération des cellules satellites et de leur descendance fournit une source suffisante de nouveaux noyaux qui se localiseront dans les myofibres une fois la réparation réalisée (Snow 1978, 1977). Après une phase d'expansion, les progéniteurs myogéniques fusionnent entre eux ou avec des fibres endommagées pour former de nouvelles myofibres. Dans la plupart des cas, ce processus récapitule les étapes de la myogenèse embryonnaire décrites dans le chapitre 1 partie 1. 2. 1. La régénération musculaire est caractérisée par une série de changements morphologiques qui peuvent être visualisés sur des coupes histologiques et par immunofluorescence (**Fig. 7**). Notamment, les myofibres nouvellement formées sont distinguées par leur petit calibre et leurs noyaux localisés au centre de la fibre. Au début de la régénération, ces fibres musculaires sont en général basophiles à cause d'une importante synthèse de protéines et de l'expression de la forme embryonnaire de la myosine (Hall-Craggs and Seyan 1975, Whalen et al. 1990).

La phase de remodelage des fibres musculaires commence pendant la deuxième semaine qui suit la blessure. Une fois la fusion des cellules myogéniques complète, la taille des myofibres nouvellement formées augmente et les noyaux centraux migrent à la périphérie des fibres. Au final, le tissu musculaire régénéré est identique à celui du muscle non blessé d'un point de vue morphologique mais aussi fonctionnel.

Le temps de régénération musculaire peut varier considérablement selon les espèces ainsi qu'au sein d'une même espèce selon le type et la sévérité de la blessure ou l'état métabolique de l'individu.

A.



B.

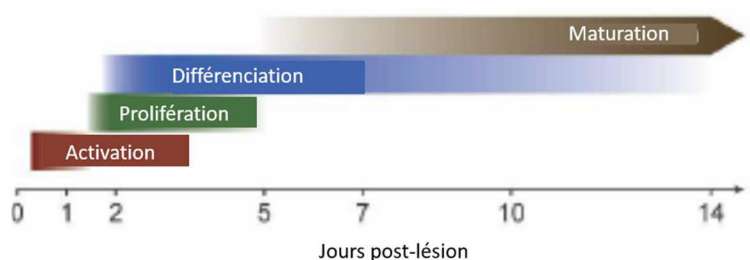


Figure 8. Activation, prolifération, différenciation et maturation des cellules satellites au cours de la régénération musculaire. (A). En réponse à une blessure, les cellules satellites quiescentes sont activées par de nombreux facteurs tels que HGFs, FGFs ou Notch. Elles s'auto-renouvellent pour reconstituer le pool de cellules satellites et prolifèrent afin de produire des myoblastes qui fusionnent pour former de nouvelles myofibres (caractérisées par la localisation centrale des noyaux). **(B).** Les différents rôles des cellules satellites au cours de la régénération sont séquentiels. L'activation des cellules satellites débute très tôt après la blessure (2 heures après la lésion), suivie par la prolifération des cellules satellites (1 à 5 jours post-lésion), la différenciation des cellules satellites (dès le jour 2 post-lésion jusqu'à la fin du processus de régénération), puis de la maturation des myofibres nouvellement formées (à partir du jour 5 post-lésion jusqu'à 2 semaines après la blessure). (Shi and Garry 2006)

2. Les cellules souches à potentiel myogénique résident dans le muscle squelettique

En plus des cellules satellites, dans le muscle squelettique adulte résident de nombreuses populations cellulaires jouant un rôle dans le processus de régénération. Notamment, des cellules interstitielles associées ou non aux vaisseaux présentent peu ou pas d'activité mitotique au repos, mais sont capables de proliférer et de se disperser dans le tissu musculaire en réponse à une blessure (Pannérec, Marazzi, and Sassoon 2012, Bentzinger et al. 2013, Ceafalan, Popescu, and Hinescu 2014, Judson, Zhang, and Rossi 2013, Mounier, Chrétien, and Chazaud 2011).

Il est communément admis que la cellule satellite est la première source de progéniteurs à l'origine des fibres musculaires nouvellement formées après régénération du muscle. Cependant, d'autres progéniteurs musculaires peuvent également posséder un potentiel myogénique et ainsi contribuer à la formation endogène du tissu musculaire qui se définit par la création de nouvelles myofibres par prolifération, recrutement, migration et fusion des cellules mononuclées (Yin, Price, and Rudnicki 2013). Les rôles de ces cellules souches myogéniques adultes dans la régénération musculaire font l'objet de cette partie.

2. 1. Les cellules satellites et progéniteurs myogéniques

Il y a plus de 50 ans, les cellules satellites du muscle squelettique ont été identifiées par Mauro par microscopie électronique grâce à leur localisation particulière entre le plasmalemme et la lamina basale (MAURO 1961). Les cellules satellites sont impliquées dans la croissance des myofibres au stade post-natal du développement musculaire puis deviennent quiescentes (Schultz 1978). Comme évoqué précédemment, elles sont fréquemment recrutées tout au long de la vie chez l'adulte pour maintenir l'homéostasie des fibres musculaires ou réparer les myofibres endommagées (Zammit 2008). Suite à une blessure musculaire, elles sont activées, prolifèrent et se différencient en progéniteurs myogéniques qui à leur tour se divisent plusieurs fois avant de fusionner en myotubes multinucléés (**Fig. 8**).

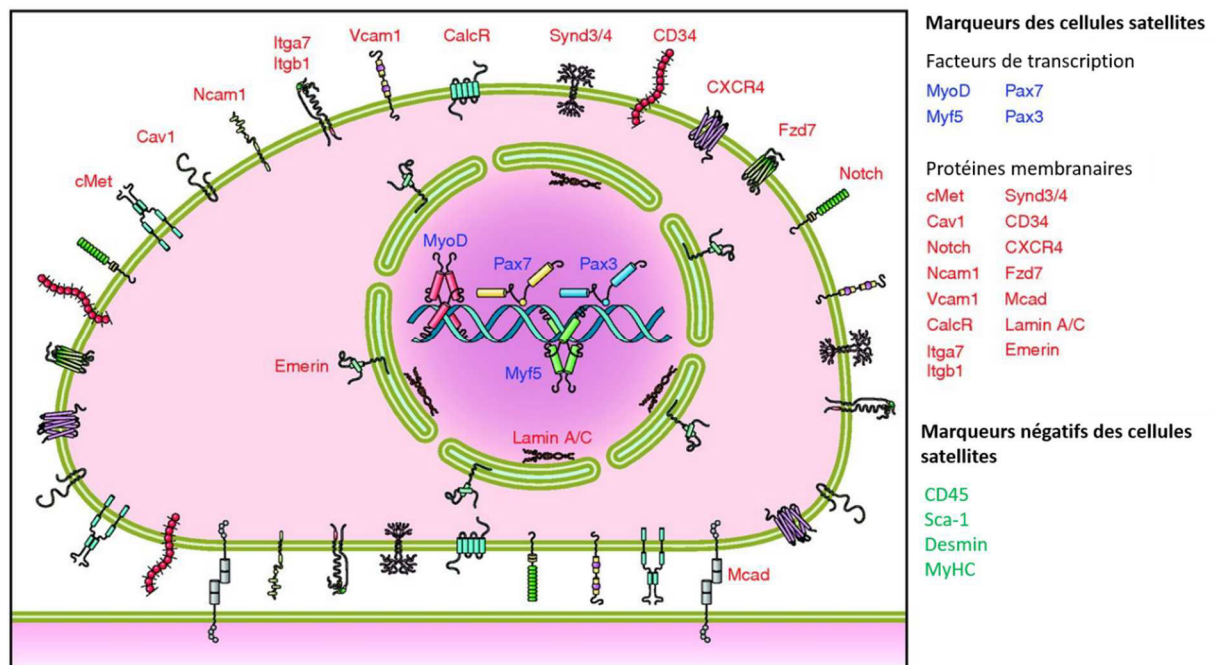


Figure 9. Phénotype des cellules satellites murines. De nombreuses protéines sont exprimées par les cellules satellites et sont utilisées en tant que marqueurs pour distinguer les cellules satellites des autres types cellulaires présents dans le muscle squelettique. A cause de l'hétérogénéité des cellules satellites, il est très probable que tous ces marqueurs ne soient pas exprimés dans une cellule satellite donnée à un moment précis de l'état du muscle. Néanmoins, ce panel résume la localisation cellulaire des marqueurs utilisés pour identifier les cellules satellites. Une sélection négative des cellules satellites peut aussi être utilisée grâce aux marqueurs CD45, Sca-1 (stem cells antigen 1), desmin et MyHC (myosin heavy chain). Cav-1 : caveolin-1 ; NCAM1 (neuronal cell adhesion molecule 1) ; VCAM1 : vascular cell adhesion molecule ; CalcR : calcitonin receptor ; Itga7 : α 7-integrin ; Itgb1 : β 1-integrin ; Synd3/4 : syndecan-3 et syndecan-4 ; CXCR4 : C-X-C motif chemokine receptor 4 ; Fzd7 : frizzled receptor 7 ; Mcad : M-cadherin. (Yin, Price, and Rudnicki 2013, Ceafalan, Popescu, and Hinescu 2014)

2. 1. 1. Identification et isolement des cellules satellites

Les caractéristiques morphologiques des cellules satellites, révélées par la microscopie électronique, sont : un ratio noyau sur cytoplasme élevé, peu d'organelles, un petit noyau et une chromatine condensée (MAURO 1961). Cette morphologie est en adéquation avec le fait que la plupart des cellules satellites, dans les muscles sains non stressés, sont quiescentes et ont une machinerie de transcription inactive (Schultz 1978). L'identification des cellules satellites par microscopie à fluorescence repose sur des biomarqueurs spécifiques énumérés dans la **figure 9**. De tous ces marqueurs, Pax7 est le biomarqueur canonique des cellules satellites puisqu'il est spécifiquement exprimé dans toutes les cellules quiescentes et en prolifération (Seale et al. 2000), et que son expression est conservée dans de multiples espèces incluant l'homme (McLoon and Wirtschafter 2003), le singe (McLoon and Wirtschafter 2003), la souris (Seale et al. 2000), le porc (Patrino et al. 2008), le poulet (Halevy et al. 2004), la salamandre (Morrison et al. 2006), la grenouille (Chen, Lin, and Slack 2006) et le poisson zèbre (Hammond et al. 2007). Certains marqueurs des cellules satellites de souris tels que $\alpha 7$ -intégrin et CD34 sont également exprimés dans d'autres types de cellules présentes dans le muscle et ne sont donc pas utilisés seuls pour isoler les cellules satellites. Chez l'homme, CD56, aussi appelé NCAM1 (neuronal cell adhesion molecule 1), est exprimé à la surface des cellules satellites mais pas le marqueur CD34. La stratégie d'isolement des cellules satellites à partir du muscle squelettique la plus couramment utilisée est le FACS (fluorescence activated cell sorting). Les cellules sont libérées à partir d'un morceau de muscle par digestion enzymatique, puis marquées par immunofluorescence pour des marqueurs spécifiquement exprimés à la surface des cellules satellites (sélection positive) et pour des marqueurs absents de la surface des cellules satellites (sélection négative).

2. 1. 2. Hétérogénéité des cellules satellites

Les cellules satellites ont longtemps été considérées comme étant une population homogène de progéniteurs musculaires engagées dans le lignage myogénique. Cependant des études récentes ont démontré que la population de cellules satellites est hétérogène et que les cellules satellites diffèrent selon leur expression génique, leur capacité myogénique, leur caractère souche et leurs potentiels non myogéniques (Yin, Price, and Rudnicki 2013).

En ce qui concerne l'expression génique, il a été observé que seulement une sous-unité de cellules satellites exprime Pax3 (Montarras et al. 2005, Relaix et al. 2006). De même, une

autre sous-population de cellules satellites n'exprime pas les marqueurs CD34, M-cadherin et Myf5 (Beauchamp et al. 2000). Similairement, des cellules satellites humaines manifestent une hétérogénéité dans leur expression des gènes *PAX7*, *NCAMI*, *C-MET* et *DLK1* (delta like non-canonical Notch ligand 1) (Lindström, Pedrosa-Domellöf, and Thornell 2010). Deux études récentes ont montré que les cellules satellites des muscles de la tête ou de ceux du reste du corps ont des signatures moléculaires distinctes (Harel et al. 2009, Sambasivan et al. 2009). Enfin, une équipe a analysé l'expression des gènes *Pax7*, *Pax3*, *Myf5* et *MyoD* dans 40 cellules souches musculaires individuellement isolées par FACS (Sacco et al. 2008). Les 40 cellules souches expriment le marqueur *Pax7*. En plus de l'expression variable de *Pax3*, ils ont trouvé que 25% des cellules satellites expriment *MyoD*, facteur de transcription impliqué dans l'engagement des cellules vers le lignage myogénique ainsi que dans la myogenèse.

Les cellules satellites sont aussi hétérogènes de par leurs multiples potentiels de différenciation. En effet, les cellules satellites ressemblent fonctionnellement à des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse puisqu'elles peuvent spontanément se différencier en myocytes, adipocytes et ostéocytes (Asakura, Komaki, and Rudnicki 2001, Csete et al. 2001). Grâce à des analyses clonales, il a été montré que les cellules satellites myogéniques et adipogéniques sont deux populations distinctes bien qu'elles soient toutes deux présentes dans le compartiment de cellules satellites Pax7⁺ (Shefer, Wleklinski-Lee, and Yablonka-Reuveni 2004). Cependant, deux autres études indiquent que la plupart des cellules satellites sont incapables de se différencier spontanément en adipocytes en culture (Sherwood *et al.*, 2004; (Starkey et al. 2011). Ces deux dernières études étant réalisées sur des sous-populations de cellules satellites CD45⁻ (Sherwood et al. 2004) ou MyoD⁺ (Starkey et al. 2011), des investigations supplémentaires sur la population totale de cellules satellites Pax7⁺ sont nécessaires pour clarifier la contribution exacte des cellules satellites dans la formation de cellules non myogéniques dans les muscles.

L'hétérogénéité des cellules satellites concerne également leur capacité myogénique. Des cellules satellites isolées à partir de myofibres provenant de différentes sources de muscles squelettiques ont été transplantées dans des muscles irradiés de souris dystrophiques dans lesquels les cellules satellites endogènes ont été préalablement supprimés (Collins et al. 2005). La transplantation de myofibres provenant du *tibialis anterior* (TA) a généré moins de fibres musculaires que la greffe de myofibres issues du muscle *extensor digitorum longus* (EDL), suggérant des différences inhérentes dans le potentiel de différenciation/prolifération et/ou dans la composition de sous-populations des cellules satellites selon l'origine anatomique des muscles. Les cellules satellites peuvent être séparées en deux groupes en fonction de leur

capacité mitotique : une population qui se divise rapidement (80 % des cellules satellites) et une population qui se divise lentement (20 % des cellules satellites) (Schultz 1996). Il a été proposé que la population de cellules satellites proliférant le moins rapidement reste à l'état de quiescence au cours de la croissance des fibres musculaires à l'étape post-natale du développement embryonnaire et prolifère seulement en réponse à une régénération extensive (Schultz 1996). De plus, une étude récente a comparé les profils d'expression génique et le potentiel de prolifération/différenciation des cellules satellites isolées à partir des muscles des membres ou de la tête (Ono et al. 2010). En plus de leurs expressions géniques hétérogènes, les cellules satellites du muscle *masseter* (tête) prolifèrent plus longtemps et se différencient plus tardivement que les cellules satellites du muscle EDL (membre). Par contre une fois transplantées, les cellules satellites des muscles de la tête régénèrent le muscle TA aussi efficacement que celles du muscle EDL (Ono et al. 2010). Bien que les cellules satellites provenant de muscles distincts aient une expression génique et un comportement différents *in vitro*, leur capacité régénérative *in vivo* serait largement déterminée par le microenvironnement et la niche cellulaire du muscle dans lequel elles se trouvent.

Des études récentes ont révélé une hétérogénéité des cellules satellites concernant leur caractère souche et indiquent que seulement un petit pourcentage de la population totale des cellules satellites correspondrait à de véritables cellules souches (Kuang et al. 2007, Conboy, Karasov, and Rando 2007, Shinin et al. 2006). Notamment, il a été observé *in vivo* que seulement 10% des cellules satellites Pax7⁺ isolées à partir des muscles EDL n'avaient jamais exprimé le facteur de régulation de la myogenèse Myf5 indiquant que 90% des cellules satellites sont déjà engagées dans le processus de la myogenèse (Kuang et al. 2007). Ces deux sous-populations de cellules satellites diffèrent aussi dans leur potentiel régénératif : les cellules satellites Pax7⁺/Myf5⁻ sont capables de reconstituer le pool de cellules souches et de réparer le muscle de façon durable, alors que les cellules satellites Pax7⁺/Myf5⁺ entrent directement dans le processus de myogenèse une fois transplantées dans les muscles en régénération (Kuang et al. 2007). De plus, seulement une sous-population de cellules satellites peut se diviser de manière asymétrique *in vivo* et *in vitro* (Kuang et al. 2007, Conboy, Karasov, and Rando 2007, Shinin et al. 2006). Ensemble, ces études montrent l'existence d'une hiérarchisation de la population totale des cellules satellites qui débiterait à partir d'une population Pax7⁺/Myf5⁻ (cellules souches satellites) pour donner naissance à une population Pax7⁺/Myf5⁺ (cellules satellites myogéniques). A travers la division asymétrique, les cellules souches satellites s'auto-renouvellent pour restituer le pool de cellules souches musculaires et produire des progéniteurs engagés dans la myogenèse qui participent à la croissance et à la régénération du muscle.

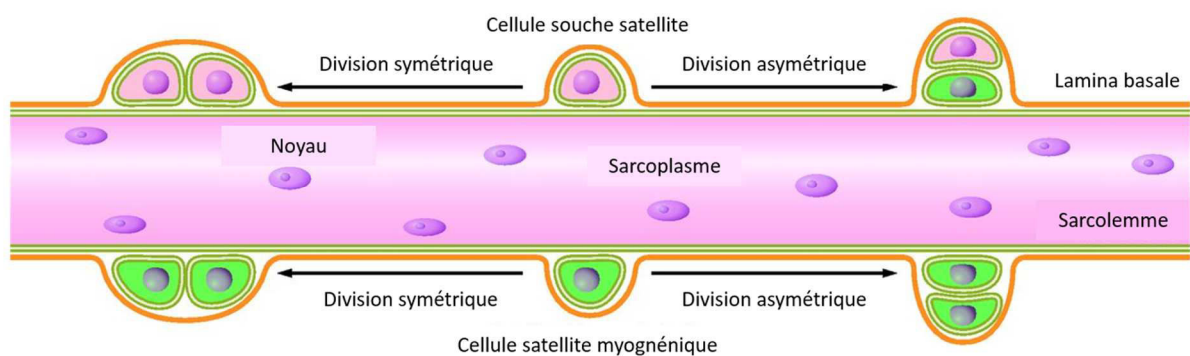


Figure 10. Division symétrique et asymétrique des différentes populations des cellules satellites. La population des cellules satellites est hétérogène et peut être classée hiérarchiquement selon leurs fonctions et leur expression génique. Dans la hiérarchie, une sous-population de cellules satellites n'exprimant pas le facteur de transcription Myf5 (cellules souches satellites en rose) est située en amont de la sous-population des cellules satellites exprimant Myf5 (cellules souches myogéniques en vert). Par division asymétrique, les cellules souches satellites (en rose) donnent naissance à deux cellules filles dont une seule exprime Myf5 (cellule verte). Des différences fonctionnelles dans le potentiel régénératif existent entre les deux sous-populations des cellules satellites. Après transplantation, les cellules souches satellites repeuplent préférentiellement la niche des cellules satellites et contribuent sur le long terme à la régénération musculaire. A l'inverse, les cellules satellites myogéniques se différencient préférentiellement après leur transplantation. (Yin, Price, and Rudnicki 2013)

2. 1. 3. Auto-renouvellement des cellules satellites

La quantité de cellules satellites dans le muscle adulte est constante, même après des cycles récurrents de nécrose-régénération, suggérant que le pool de cellules satellites est maintenu par auto-renouvellement. La capacité d'auto-renouvellement des cellules satellites a été clairement démontrée par deux études dans lesquelles des myofibres intacts (Collins et al. 2005) ou des cellules satellites fraîchement isolées par FACS (Sacco et al. 2008) ont été transplantées dans des muscles de souris irradiées. Dans la première étude, les auteurs ont montré que sept cellules satellites d'une seule myofibre transplantée pouvaient générer plus de cent nouvelles myofibres contenant des milliers de noyaux (Collins et al. 2005). De plus, ces cellules satellites sont fonctionnelles puisqu'elles peuvent être activées et supporter plusieurs cycles de régénération musculaire. De même, les auteurs de la seconde étude ont prouvé que les cellules de souris Lin^- (lineage negative)/ $\alpha 7$ -integrin $^+$ /CD34 $^+$ transplantées sont capables de générer de nouvelles myofibres ainsi que de migrer, de se loger dans la niche des cellules satellites et d'y perdurer (Sacco et al. 2008).

Comme mentionné dans le paragraphe « hétérogénéité des cellules satellites », l'équipe de Rudnický a montré pour la première fois que les cellules satellites pouvaient subir des divisions symétriques ou asymétriques (**Fig. 10**). Le choix du type de division par la cellule satellite est corrélé à l'orientation de l'axe mitotique par rapport à l'axe longitudinal de la myofibre (Kuang et al. 2007). La division asymétrique est seulement observée pour la population de cellules satellites Pax7 $^+$ /Myf5 $^-$, qui donne naissance à une cellule souche satellite Pax7 $^+$ /Myf5 $^-$ et à une cellule satellite plus engagée dans la myogenèse Pax7 $^+$ /Myf5 $^+$. La division asymétrique se produit la plupart du temps quand l'axe mitotique est perpendiculaire à la myofibre : la cellule Pax7 $^+$ /Myf5 $^-$ se retrouve alors en contact direct avec la lamina basale tandis que la cellule Pax7 $^+$ /Myf5 $^+$ est adjacente à la membrane plasmique de la myofibre. La division symétrique est présente dans les deux sous-populations de cellules satellites. Dans ce cas, l'axe mitotique est parallèle à l'axe de la myofibre : les deux cellules filles sont alors en contact à la fois avec la lamina basale et avec la membrane plasmique de la fibre musculaire.

Bien que l'auto-renouvellement par division asymétrique puisse être suffisant dans des conditions physiologiques, les cellules souches satellites favoriseraient la division symétrique pour maintenir et étendre leur population en réponse à une blessure ou dans des conditions pathologiques (Morrison et al. 2006). En effet, les cellules souches satellites représentent 10% de la population totale de cellules satellites dans le muscle intact alors que ce pourcentage augmente jusqu'à 30% 3 jours suivant la blessure (Kuang et al. 2007). L'auto-renouvellement

par division asymétrique des cellules souches satellites est soutenu par le facteur Wnt7a sécrété par la niche au cours de la régénération musculaire (Kuang et al. 2007, Le Grand et al. 2009), démontrant que le microenvironnement de la niche des cellules satellites gouverne le mode d'auto-renouvellement.

2. 1. 4. Activation des cellules satellites

Dans le muscle non lésé, les cellules satellites quiescentes sont caractérisées par leur expression de Pax7 mais pas de Myod ou de la myogénine (Cornelison and Wold 1997). Le locus Myf5 est exprimé dans 90% des cellules satellites quiescentes renforçant l'idée que la plupart des cellules satellites est engagée dans le lignage myogénique (Beauchamp et al. 2000).

En réponse à des stimuli induits par un dommage, les cellules satellites sortent de leur état de quiescence et commencent à proliférer (activation des cellules satellites). Les cellules satellites en prolifération ainsi que les progéniteurs qui naissent de leur division sont le plus souvent désignés comme des progéniteurs myogéniques ou des myoblastes adultes. L'activation des cellules satellites est contrôlée par de multiples facteurs et de voies de signalisation telles que Wnt, Notch et des sphingolipides (Yin, Price, and Rudnicki 2013) et n'est pas seulement restreinte au niveau du site de la lésion musculaire. En effet, un dommage situé à une extrémité d'une myofibre mène à l'activation de toutes les cellules satellites localisées le long de la même myofibre et entraîne la migration de celles-ci jusqu'au site de régénération (Schultz, Jaryszak, and Valliere 1985). Les cellules peuvent migrer entre les myofibres et même entre les muscles en traversant la lamina basale et les tissus conjonctifs au cours du développement, de la croissance et de la régénération musculaire (Watt et al. 1987, Jockusch and Voigt 2003, Hughes and Blau 1990). CD34, dont l'expression est forte dans les cellules satellites quiescentes de souris mais diminue au cours de leur activation, agit comme une molécule antiadhésive pour faciliter la migration et la prolifération des cellules satellites dans les étapes précoces de la régénération musculaire (Alfaro et al. 2011).

2. 1. 5. Engagement des cellules satellites dans la myogenèse

Comme lors du développement embryonnaire, la différenciation des myoblastes adultes est dirigée par l'expression séquentielle dans le temps des gènes MRFs. Rapidement après la blessure, les précurseurs myogéniques expriment les facteurs de transcription MyoD (Cooper et al. 1999, Cornelison et al. 2000, Cornelison and Wold 1997, Füchtbauer and Westphal 1992,

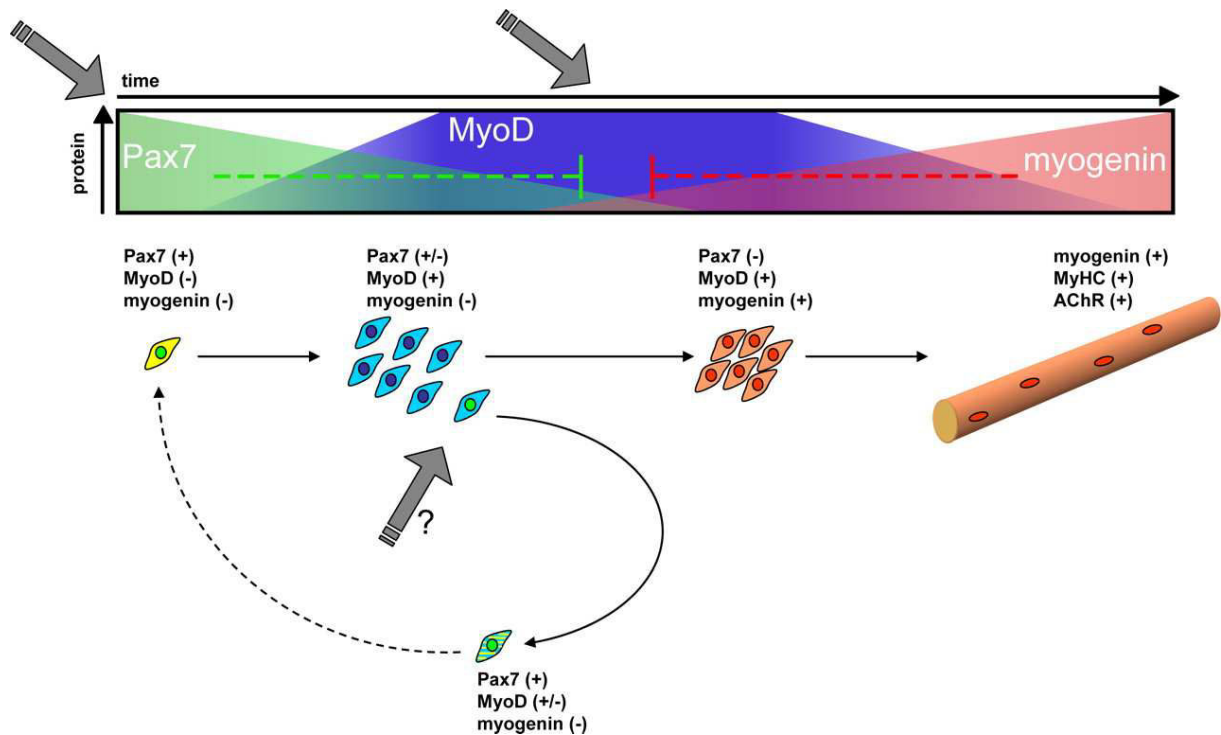


Figure 11. Régulation réciproque de l'expression de Pax7 et des MRFs au cours de l'engagement et du devenir des cellules myogéniques. Les cellules satellites Pax7⁺/MyoD⁻/myogenin⁻ doivent proliférer, se différencier ou auto-renouveler la population de progéniteurs myogéniques pour maintenir la fonction des muscles squelettiques. L'induction de la prolifération des cellules satellites requiert des signaux environnementaux (flèches grises) qui activent les cellules et stimulent l'expression de MyoD (en bleu) en concomitance avec une réduction de l'expression de Pax7 (en vert). Lors de l'induction de la différenciation terminale, l'augmentation de l'expression de la myogénine (en rose) entraîne la chute de celle de Pax7. La stimulation de l'expression de la myogenin est empêchée dans une petite population de cellules satellites augmentant alors l'expression de Pax7 par des mécanismes encore inconnus (flèche grise et point d'interrogation). L'expression de MyoD est diminuée (cellules avec le noyau vert) entraînant la cellule à retourner vers un état quiescent et vers un phénotype indifférencié. Dans ce modèle, le ratio d'expression Pax7/MRFs est critique et fait intervenir des signaux environnementaux (flèches grises) pour réguler l'engagement et le devenir des cellules satellites. (Olguin et al. 2007)

Grounds et al. 1992, Smith, Janney, and Allen 1994, Yablonka-Reuveni and Rivera 1994, Zammit et al. 2002) et Myf5 (Cooper et al. 1999, Cornelison and Wold 1997). La majorité des cellules satellites exprime Myod ou Myf5 24 heures suivant la blessure (Cooper et al. 1999, Cornelison and Wold 1997, Zammit et al. 2002), puis co-expriment ces deux facteurs 48 heures post-dommage (Cooper et al. 1999, Cornelison and Wold 1997). A noter que les présences de MyoD, de la desmine et de la myogénine dans les cellules satellites sont observées 12 heures post-lésion avant que la prolifération cellulaire n'ait lieu (Smith, Janney, and Allen 1994, (Rantanen et al. 1995). L'expression précoce de Myod serait associée à une sous-population de cellules satellites déjà engagées dans le lignage myogénique et qui sont capables de se différencier sans passer par l'étape de prolifération (Rantanen et al. 1995).

L'expression des facteurs MyoD et Myf5 est requise pour engager les progéniteurs myogéniques dans le processus de différenciation (Rudnicki et al. 2008). Les souris mutantes *MyoD*^{-/-} ont une réduction de leur masse musculaire qui est accompagnée d'une différenciation myogénique retardée et d'une augmentation du nombre de myoblastes dans les zones musculaires endommagées (Megoney et al. 1996, White et al. 2000, Yablonka-Reuveni et al. 1999). A l'inverse, les souris mutantes *Myf5*^{-/-} présentent une hypertrophie des myofibres associée à une prolifération compromise des myoblastes (Ustanina et al. 2007, Gayraud-Morel et al. 2007). Ces résultats démontrent des rôles distincts pour Myod et Myf5 : Myf5 est impliqué dans la prolifération des myoblastes, tandis que MyoD est essentiel à leur différenciation. L'expression de Pax7 est aussi importante pour déterminer le devenir des cellules satellites (Olguin et al. 2007). Une expression très forte de Pax7 par rapport à MyoD garde les cellules satellites dans un état de quiescence. Un ratio Pax7/MyoD intermédiaire permet aux cellules de proliférer mais pas de se différencier. Les cellules satellites qui ont un ratio d'expression Pax7/MyoD faible commencent à se différencier, puis le niveau d'expression de Pax7 réduit au cours de la myogenèse où est observée l'activation de l'expression de la myogénine (**Fig 11**).

2. 1. 6. Différenciation des cellules satellites

Après un nombre limité de division cellulaire, la plupart des cellules satellites entre dans le programme de différenciation myogénique et commence à fusionner avec des myofibres endommagées ou nouvellement formées. L'initiation de la différenciation terminale commence avec l'expression de la myogénine et de MRF4 (Cornelison et al. 2000, Cornelison and Wold 1997, Grounds et al. 1992, Smith, Janney, and Allen 1994, Yablonka-Reuveni and Rivera 1994). La myogénine, dont l'expression est induite par MyoD, augmente les expressions des

gènes préalablement initiées par MyoD (Cao et al. 2006). Une grande partie des gènes cibles de MyoD et de la myogénine sont des gènes impliqués dans la contraction et la structure du muscle comme ceux codant pour les protéines actine, myosine et troponine (Cao et al. 2006, Bergstrom et al. 2002, Blais et al. 2005). Les expressions des facteurs MyoD et de la myogénine sont régulées par des modifications post-transcriptionnelles telles que des interactions protéine/protéine, la phosphorylation, l'acétylation et l'ubiquitination (Puri and Sartorelli 2000).

En plus des facteurs MRFs, des micro-ARNs sont impliqués dans la différenciation myogénique (Nguyen and Frasch 2006, Williams et al. 2009). Les micro-ARNs sont des petits ARNs non codants de 20 à 22 nucléotides dont la fonction est de réprimer la traduction et de réduire la stabilité des ARNs messagers cibles. De récentes études ont montré que les facteurs MRFs activent l'expression de micro-ARNs myogéniques tels que les micro-ARNs-1, -133 et -206. En collaboration avec d'autres micro-ARNs, les micro-ARNs myogéniques modulent les niveaux d'expression de régulateurs et de facteurs de transcription myogéniques comme Pax3 (Crist et al. 2009, Goljanek-Whysall et al. 2011, Hirai et al. 2010) et Pax7 (Dey, Gagan, and Dutta 2011, Chen et al. 2010) au cours de l'activation et de la différenciation des cellules satellites.

La fusion des cellules satellites est un processus complexe largement étudié depuis des décennies (Knudsen and Horwitz 1977, Lipton and Konigsberg 1972, Rash and Fambrough 1973, Wakelam 1985, Abmayr and Pavlath 2012, Hindi, Tajrishi, and Kumar 2013). Semblable à la myogenèse embryonnaire, la formation *de novo* des myofibres pendant la régénération musculaire se déroule en deux phases. Dans la première phase, les myoblastes différenciés fusionnent entre eux et génèrent des myotubes avec peu de noyaux. Au cours de la seconde phase, des myoblastes additionnels s'incorporent dans ces myotubes formant alors des myofibres matures qui augmentent de taille et expriment des protéines contractiles. Depuis quelques années, des études *in vitro* ont identifié des molécules intracellulaires, extracellulaires et de surface cellulaire comme étant importantes pour ces deux phases de fusion des myoblastes (Horsley and Pavlath 2004). Par exemple, on peut citer les protéines β 1-integrin (Schwander et al. 2003), VLA-4 integrin (very late antigen 4) (Rosen et al. 1992), V-CAM (vascular cell adhesion molecule) (Rosen et al. 1992) et caveolin-3 (Galbiati, Volonte, Engelman, et al. 1999).

Pour résumer, en réponse à une lésion musculaire, l'activation des cellules satellites chez l'adulte mène à l'expansion d'un pool de cellules myogéniques et à l'initiation de la myogenèse. Le programme myogénique, orchestré par des facteurs de transcription clés, dicte la balance

Types cellulaires	Localisations musculaires	Potentiels de différenciation	Marqueurs positifs	Marqueurs négatifs
Cellules SP (Side population)	Espace interstitiel et autour des vaisseaux sanguins	Myogénique Hématopoïétique	ABCG2, Sca-1, cd45 ^{-/+}	CD45, c-kit, Myf5, desmin, Pax7
MDSCs (Muscle-derived stem cells)	Espace interstitiel	Myogénique Ostéogénique Adipogénique Chondrogénique Hématopoïétique Endothélial Neuronal Cardiaque Hépatocytaire	Flk-1, Sca-1, desmin, CD34	CD45, M-Cadherin, Pax7
PICs (PW1 interstitial cells)	Espace interstitiel	Myogénique (cellules lisses et squelettiques) Adipogénique	Sca-1, CD34, PW1, PDGFR α	Pax7, CD45
Mésoangioblastes	Autour des vaisseaux	Myogénique (cellules lisses et squelettiques) Adipogénique Chondrogénique Ostéogénique	CD34, c-Kit, Flk-1	NKX2.5, Myf5, Oct4
Péricytes	A proximité des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins	Myogénique Chondrogénique Ostéogénique Adipogénique Fibrogénique	Nestin ^{+/+} , NG2, CD146, PDGFR β 1, CD10, CD13, CD44, CD73, CD90	CD34, CD56, CD45, CD144
MECs (myogenic endothelial cells)	Dans les vaisseaux sanguins	Adipogénique Myogénique Chondrogénique Ostéogénique	CD56, CD34, Pax7, von Willebrand factor, VE-cadherin/CD144	CD45
Cellules CD133 ⁺	Espace interstitiel	Myogénique	CD133, CD34, M-Cadherin, CD56, Pax7, Myf5, MyoD, desmin, ALP, PDGFR β , NG2, α SMA, CD49b, CD44	

Tableau 1. Caractéristiques des différentes populations de cellules souches musculaires à potentiel myogénique. Les marqueurs des SPs, des MDSCs, des PICs et des mésoangioblastes proviennent d'études faites chez la souris. Ceux des MECs et des cellules CD133⁺ proviennent d'études faites chez l'homme. Les marqueurs des péricytes proviennent d'études faites chez l'homme et/ou chez la souris.

entre prolifération et différenciation et conduit à la transformation fonctionnelle de cellules myogéniques prolifératives en une myofibre contractile.

2. 1. 7. Retour à l'état de quiescence des cellules satellites activées

Des études *ex vivo*, reposant sur la dynamique d'expression de Pax7, MyoD et Myogénin, ont montré qu'un retour à l'état de quiescence des cellules satellites activées est possible (Zammit et al. 2004, Halevy et al. 2004). Des cellules satellites isolées à partir de myofibres sont activées dès leur mise en culture et commencent rapidement à exprimer le facteur MyoD. Presque la totalité des myoblastes exprime MyoD après 24 heures de culture *in vitro*. Bien que la plupart des myoblastes en prolifération Pax7⁺/MyoD⁺ se différencient en cellules Pax7⁻/MyoD⁻/Myogénin⁺ après 72 heures de culture, des myoblastes Pax7⁺/MyoD⁺ répriment l'expression de MyoD et maintiennent celle de Pax7 pour sortir du cycle cellulaire (Zammit et al. 2004). Ces observations suggèrent que les cellules satellites quiescentes se renouvellent à partir de cellules myogéniques engagées dans la myogenèse au moins *in vitro*, et que ce renouvellement dépendrait de l'expression de Pax7.

Une telle régression dans le lignage myogénique des cellules satellites a aussi été observée *in vivo* (Shea et al. 2010). Une équipe a démontré que Sprouty-1, un inhibiteur de la signalisation récepteur tyrosine kinase, est exprimé dans les cellules satellites quiescentes Pax7⁺ dans les muscles endommagés. Son expression est réduite dans les progéniteurs myogéniques en prolifération puis est induite à nouveau dans certains progéniteurs sortis du cycle cellulaire et relocalisés dans le compartiment des cellules satellites. En l'absence de Sprouty-1, les progéniteurs myogéniques prolifèrent et se différencient normalement mais un nombre réduit de cellules satellites subsiste après la régénération musculaire. Ces données indiquent que l'expression de Sprouty-1 est requise pour le retour à l'état de quiescence et à l'homéostasie du pool des cellules satellites au cours de la réparation du muscle.

*En plus des cellules satellites, les muscles squelettiques contiennent d'autres types de cellules souches possédant un potentiel myogénique et capables de participer au processus de régénération musculaire. Leur localisation intramusculaire, leur potentiel de différenciation et leur immunophénotype sont listés dans le **tableau 1**.*

2. 2. Les cellules musculaires « side population » (SP)

Le muscle squelettique de la souris contient une population cellulaire appelée SP dont l'isolement est basé sur sa capacité à exclure le colorant Hoechst 33342 (Gussoni et al. 1999, Jackson, Mi, and Goodell 1999). Ces cellules résident dans le muscle squelettique et sont juxtaposées aux vaisseaux sanguins. La majorité de ces cellules expriment les marqueurs de surface Sca-1 (stem cell antigen 1) et ABCG2 (ATP binding cassette subfamily G member 2) mais n'expriment pas c-Kit, le marqueur hématopoïétique CD45 et les marqueurs myogéniques Pax7, Myf5 et desmine, les distinguant alors des cellules satellites et de la moelle osseuse (Asakura et al. 2002, Doyle et al. 2011, Meeson et al. 2004, Zhou et al. 2001, Rivier et al. 2004, Schienda et al. 2006). Après injection directe dans les muscles en régénération, les cellules SP greffées sont retrouvées dans les myofibres et dans la niche des cellules satellites, suggérant que ces cellules SP satellites peuvent contribuer à la régénération musculaire sur le long terme (Asakura et al. 2002). Lorsqu'elles sont injectées par voie intraveineuse, les cellules SP s'incorporent également dans les myofibres indiquant que ces cellules sont capables de migrer jusque dans les muscles en régénération par le système sanguin (Bachrach et al. 2004, Gussoni et al. 1999).

Comme pour les cellules satellites, plusieurs observations indiquent que la population de cellules SP est hétérogène. Initialement, une population minoritaire de cellules SP exprimant le marqueur CD45 avait été identifiée (Asakura et al. 2002, Schienda et al. 2006, Seale et al. 2000). Les cellules SP CD45⁺ persistent dans les souris mutantes *Pax7*^{-/-} et peuvent générer des cellules hématopoïétiques en culture (Asakura et al. 2002, Seale et al. 2000). De plus, les cellules SP CD45⁺ isolées à partir des souris *Pax7*^{-/-} et sauvages ont un potentiel myogénique. Elles peuvent être induites à se différencier en cellules myogéniques en les co-cultivant avec des myoblastes primaires ou en forçant l'expression de Pax7 ou de MyoD (Asakura et al. 2002, Seale et al. 2004). Des études de suivi de lignage cellulaire ont révélé que seulement la population majoritaire de cellules SP CD45⁻ proviendrait des cellules somatiques embryonnaires Pax3⁺, suggérant que la population minoritaire de cellule SP CD45⁺ aurait des origines différentes telles que endothéliales ou hématopoïétiques (Schienda et al. 2006). Ces résultats sont consistants avec ceux d'un transcriptome réalisé sur des cellules SP isolées à partir de muscles en repos ou en régénération, qui indiquent que les expressions de c-Kit et CD45 augmentent dans les cellules SP cinq jours après l'induction de la blessure (Meeson et al. 2004). De plus, il a été démontré que les cellules SP CD45⁻ sont plus myogéniques que les cellules SP CD45⁺ une fois cultivées *in vitro*, indiquant que l'origine développementale des cellules SP affecte leur

capacité myogénique intrinsèque (Schienda et al. 2006). Enfin, une récente étude a montré qu'une sous-population de cellules satellites possède aussi un phénotype SP (Tanaka et al. 2009). Ces cellules SP résident dans le compartiment des cellules satellites, n'expriment pas le marqueur hématopoïétique CD45 mais expriment Sca-1, ABCG2 et les marqueurs myogéniques Pax7 et Syndecan-4, ce qui les distingue de la population majoritaire des cellules SP CD45⁻.

2. 3. Les MDSCs (*muscle-derived stem cells*)

Les MDSCs ont été découvertes il y a une dizaine d'années chez la souris après les avoir isolées *in vitro* selon différentes méthodes. Pour la plupart de ces cellules, des études *in situ* ont montré leur localisation dans l'espace interstitiel du muscle squelettique. Elles sont caractérisées par leur faible capacité d'adhésion et leur prolifération sur le long terme une fois mises en culture (Qu-Petersen et al. 2002, Lee et al. 2000, Deasy, Jankowski, and Huard 2001). De par l'expression spécifique de marqueurs de surface, ces cellules musculaires CD45⁻/M-Cadherin⁻/CD34⁺/Flk-1⁺ (fetal liver kinase-1)/Sca-1⁺/Desmin⁺ se distinguent des cellules satellites et hématopoïétiques (Qu-Petersen et al. 2002, Lee et al. 2000, Usas et al. 2011). Par contre, des observations indiquent qu'elles sont proches des cellules SP. Premièrement, tout comme les cellules SP, la différenciation myogénique des MDSCs dépend de l'expression du facteur Pax7 (Lu et al. 2008). Deuxièmement, des MDSCs peuvent être isolées à partir de muscles de souris transgéniques Pax7^{-/-} (Lu et al. 2008). Troisièmement, des MDSCs peuvent aussi repeupler le lignage hématopoïétique dans des souris irradiées et, en retour, la moelle osseuse reconstituée contribue à la régénération musculaire (Cao et al. 2003).

Les MDSCs sont multipotentes puisqu'elles peuvent se différencier en cellules des lignages myogénique, adipogénique, ostéogénique, chondrogénique, hématopoïétique, endothélial, neuronal, cardiaque et hépatocyte (Usas et al. 2011). Après leur transplantation intra-artérielle, les MDSCs contribuent à régénérer des myofibres, s'incorporent dans la niche des cellules satellites, et donnent aussi naissance à des cellules neurales et endothéliales (Qu-Petersen et al. 2002). Ces cellules possèdent une capacité régénérative supérieure à celle des cellules satellites une fois transplantées dans des muscles dystrophiques d'un modèle murin de dystrophie musculaire (Ikezawa et al. 2003). Bien que les MDSCs puissent se différencier en multiples lignages et participer à la régénération musculaire, il a été proposé que leur différenciation terminale ne soit pas déterminante pour le succès de la réparation tissulaire (Usas et al. 2011). En fait, la vaste majorité des cellules régénérées proviennent des cellules de

l'hôte et très peu sont originaires des cellules MDSCs transplantées. L'hypothèse la plus probable quant au rôle des MDSCs dans la réparation musculaire est que ces cellules agiraient comme des médiateurs paracrines en libérant des facteurs de croissance qui augmenteraient les mécanismes endogènes de la régénération.

2. 4. Les cellules interstitielles PW1⁺ ou PICs (PW1⁺ interstitial cells)

Il a été décrit que des cellules interstitielles, caractérisées par l'expression de la protéine PW1 (aussi appelée *peg3*, paternally-expressed gene 3), pourraient être impliquées dans la croissance périnatale du muscle squelettique (Mitchell et al. 2010). Une étude récente du même groupe reporte que des cellules souches adultes peuvent directement être identifiées et isolées à partir de souris possédant le gène rapporteur PW1 (Besson et al. 2011). PW1 est un facteur de transcription à doigts de zinc qui est fortement transcrit dans le muscle squelettique aux stades post-nataux et embryonnaires (Relaix et al. 1996). Dans le muscle squelettique de souris, l'expression de PW1 est détectée dans les cellules satellites et dans un groupe de cellules interstitielles Sca-1⁺/CD34⁺/Pax7⁻ (Moresi et al. 2008, Nicolas et al. 2005, Seale, Ishibashi, Holterman, et al. 2004, Pannérec et al. 2013). Ces mêmes cellules ont aussi été récemment identifiées dans le muscle squelettique du porc, et tout comme celles présentes dans les muscles de souris, elles expriment les marqueurs PW1, CD34 mais pas le marqueur myogénique Pax7 et ni le marqueur hématopoïétique CD45 (Lewis et al. 2014).

Les PICs ont un potentiel myogénique *in vitro* et *in vivo* (Mitchell et al. 2010, Pannérec and Sassoon 2010). Chez les souris invalidées pour le gène *Pax7*, on dénombre deux fois plus de PICs que chez des souris non modifiées génétiquement (Pannérec and Sassoon 2010). Alors que les cellules satellites issues d'animaux *Pax7*^{-/-} sont parfaitement myogéniques, les PICs sont incapables de se différencier en myotubes, suggérant que Pax7 est nécessaire à la spécification des PICs dans la voie myogénique lors de la croissance post-natale (Pannérec and Sassoon 2010). Bien qu'il ait été démontré que les PICs et les cellules satellites ne sont pas originaires du même progéniteur myogénique embryonnaire Pax7⁺/Pax3⁺, les PICs expriment les gènes du lignage myogénique *Pax7* et *MyoD* dans des conditions de culture favorables à leur différenciation en myotubes (Mitchell et al. 2010). De plus, une fois transplantées dans des muscles blessés de souris, les PICs Sca-1⁺/CD34⁺/CD45⁻ génèrent à la fois des cellules interstitielles et des cellules satellites Pax7⁺, alors que la population cellulaire enrichie en cellules satellites Sca-1⁻/CD34⁺/CD45⁻ donne naissance uniquement à des cellules satellites Pax7⁺ (Pannérec and Sassoon 2010). Cette observation supporte l'hypothèse que les PICs

pourraient contribuer à la génération de la population de cellules satellites au cours de la croissance musculaire post-natale et durant la régénération du muscle adulte (Mitchell et al. 2010). De ce fait, les PICs constituent une population de cellules moins déterminées et plus « souches » que les cellules satellites dans la hiérarchie du lignage myogénique (Pannérec and Sassoon 2010).

En plus de leur potentiel de différenciation en cellules musculaires squelettiques, une étude récente a montré que les PICs pouvaient spontanément former *in vitro* des cellules musculaires lisses ainsi que des adipocytes suggérant que ces progéniteurs musculaires ont une grande plasticité (Pannérec et al. 2013). Ceci est confirmé par l'expression d'un large panel de gènes communs aux cellules souches mésenchymateuses dans ces cellules (Pannérec et al. 2013). Le potentiel adipogénique des PICs correspond à une sous-population cellulaire exprimant le marqueur PDGFR α (platelet-derived growth factor receptor α). A l'inverse, les PICs avec un potentiel myogénique n'expriment pas ce marqueur (Pannérec et al. 2013). En cohérence avec ces résultats, les PICs isolées à partir de muscles de porc sont multipotentes puisqu'elles possèdent un potentiel myogénique bipotent (muscle lisse et squelettique), un potentiel endothélial et peuvent générer des cardiomyocytes (Lewis et al. 2014).

Avant de découvrir l'expression du marqueur PW1 dans des cellules du muscle squelettique, d'autres études avaient démontré le potentiel myogénique des cellules interstitielles musculaires de souris Sca-1⁺/CD34⁺. Une des populations Sca-1⁺/CD34⁺, appelée SK-34, avait été isolée par FACS et localisée dans l'espace interstitiel du muscle squelettique. Ces cellules n'expriment pas les marqueurs myogéniques (MyoD, Myf-5, MRF4, myogenin, M-cadherin, Pax3 et Pax7), le marqueur hématopoïétique CD45, ainsi que les marqueurs endothéliaux (CD14, CD31, CD49, CD144 et Flk1) (Tamaki et al. 2002). Par contre, elles possèdent un potentiel myogénique, endothélial et adipogénique (Tamaki et al. 2002). D'une manière intéressante, l'expansion clonale de ces cellules a fait émerger par division asymétrique des cellules exprimant le marqueur des cellules satellites Pax7 (Tamaki et al. 2008). Ces cellules satellites peuvent former des fibres musculaires lorsqu'elles sont transplantées dans des muscles de souris endommagés. Ces données ont permis de mettre en évidence une nouvelle source potentielle de cellules satellites dans le muscle squelettique adulte (Tamaki et al. 2008).

La seconde population de cellules musculaires de souris Sca-1⁺/CD34⁺ à potentiel myogénique a été isolée selon sa propriété à adhérer lentement au support (Mu et al. 2011). De part cette caractéristique, ces cellules musculaires ont été nommées « slow-adhering stem cells » (Mu et al. 2011). Elles peuvent se différencier *in vitro* en myotubes, en ostéoblastes et

en adipocytes. *In vivo*, elles contribuent activement à la régénération musculaire en formant de nouvelles myofibres et en stimulant l'angiogenèse dans le muscle transplanté (Mu et al. 2011).

Ces populations de cellules interstitielles Sca-1⁺/CD34⁺ multipotentes pourraient exprimer le facteur de transcription PW1 et, par conséquent, appartenir à la population cellulaire PW1⁺ récemment découverte.

2. 5. Les progéniteurs associés aux vaisseaux

2. 5. 1. Les mésoangioblastes

Les mésoangioblastes proviennent de l'aorte dorsale embryonnaire et sont localisés autour des petits vaisseaux dans le muscle squelettique adulte (Tonlorenzi et al. 2007). Chez la souris, ils sont caractérisés par l'expression de marqueurs de surface : CD34⁺/c-Kit⁺/Flk-1⁺/NKX2.5⁻(NK2 homeobox 5)/Myf5⁻/Oct4⁻ (octamer-binding transcription factor 4) (Minasi et al. 2002). Les mésoangioblastes prolifèrent rapidement *in vitro* et sont multipotents puisqu'une fois transplantés, ils sont capables de s'intégrer dans divers tissus du mésoderme tels que l'os, le cartilage et les muscles lisses, cardiaques et squelettiques (Minasi et al. 2002).

Plusieurs études ont démontré que les mésoangioblastes faciliteraient la régénération musculaire, en particulier dans les muscles dystrophiques. Les mésoangioblastes isolés à partir de souris transgéniques *α-sarcoglycan*^{-/-} (un modèle murin de dystrophie musculaire) peuvent être transfectés *in vitro* par un vecteur lentiviral contenant le gène *α-sarcoglycan* (Sampaolesi et al. 2003). Leur transplantation par voie intra-artérielle dans des souris *α-sarcoglycan*^{-/-} entraîne leur différenciation en myofibres *α-sarcoglycan*⁺ suggérant que les propriétés intrinsèques des mésoangioblastes leur permettent de migrer par voie sanguine jusqu'aux muscles en régénération (Sampaolesi et al. 2003). Dans le modèle canin de golden retriever qui mime la perte d'expression de la dystrophine observée chez les patients humains atteints de la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD, Duchenne muscular dystrophy), l'injection intra-artérielle de mésoangioblastes sains exprimant la dystrophine a permis de restaurer remarquablement une morphologie et une fonction normale du muscle des chiens dystrophiques transplantés (Sampaolesi et al. 2006).

Les potentiels myogéniques des mésoangioblastes issus de biopsies musculaires humaines ont été comparés chez des patients souffrant de myopathies inflammatoires différentes (Morosetti 2006). Les mésoangioblastes de patients atteints de la myopathie à inclusion ne se différencient pas en myofibres *in vitro* et une fois xénotransplantés dans les

muscles de souris préalablement blessés (Morosetti 2006). Par contre, ce défaut de myogenèse peut être contrecarré soit en surexprimant de manière transitoire *MyoD*, soit en diminuant l'expression d'une protéine inhibitrice de MyoD, BHLHE41 (basic helix-loop-helix family member e41), ce qui suggère que la myogenèse des mésoangioblastes dépend de l'expression de MyoD (Morosetti 2006). Une étude récente rapporte que la compétence myogénique des mésoangioblastes issus des muscles adultes humains, canins et murins dépend de la forte expression du facteur PW1 mais pas de celle de Pax3 (Bonfanti et al. 2015). En plus du potentiel myogénique, l'expression forte de PW1 est requise pour permettre aux mésoangioblastes de traverser la paroi des vaisseaux sanguins et de se greffer dans les muscles endommagés (Bonfanti et al. 2015).

Des études ont montré que des facteurs impliqués dans la régénération musculaire facilitent aussi l'activité pro-régénérative des mésoangioblastes. Par exemple, HMGB1 (high mobility group box 1), SDF-1 (stromal cell-derived factor 1) et $\alpha 4$ -intégrin améliorent la migration des mésoangioblastes à partir des vaisseaux sanguins vers les muscles lésés (Galvez et al. 2006, Palumbo et al. 2004). De même, le prétraitement des mésoangioblastes avec de l'oxyde nitrique avant la transplantation stimule l'expression de l' α -sarcoglycan dans des myofibres dérivées de la différenciation des mésoangioblastes (Sciorati et al. 2006). Récemment, il a été observé que l'engagement myogénique des mésoangioblastes *in vitro* et *in vivo* dépend de l'activation de la voie Notch par DLK1 (Quattrocchi 2014), et de l'inhibition de la voie des BMPs (Costamagna et al. 2016).

2. 5. 2. Les péricytes

Les péricytes sont des cellules contractiles qui entourent la membrane basale de l'endothélium des capillaires. Ils sont originaires du sclérotome embryonnaire et sont impliqués dans la régulation du flux sanguin dans les capillaires (Kutcher and Herman 2009, Pouget, Pottin, and Jaffredo 2008). Les péricytes isolés à partir de muscles squelettiques humains présentent à leur surface la combinaison de marqueurs suivante : CD45⁻/CD34⁻/CD56⁻/CD144⁻/CD146⁺/PDGFR β 1⁺ (platelet-derived growth factor receptor β 1)/NG2⁺ (neural/glial antigen 2) (Dellavalle et al. 2007). Des cellules exprimant les mêmes marqueurs de surface sont retrouvées dans d'autres tissus incluant le pancréas, le tissu adipeux et le placenta, et possèdent aussi un potentiel myogénique une fois mises en culture quel que soit leur origine (Crisan et al. 2008). Les péricytes expriment également plusieurs marqueurs de surface spécifiques des cellules souches mésenchymateuses (CD10⁺/CD13⁺/CD44⁺/CD73⁺/CD90⁺), ce qui permet d'émettre

l'hypothèse que ces cellules représenteraient une portion significative des cellules souches mésenchymateuses de l'adulte (Crisan et al. 2008, Caplan 2008, Feng et al. 2011).

Comme les cellules souches mésenchymateuses, les péricytes peuvent se différencier en adipocytes (Farrington-Rock et al. 2004), en chondrocytes (Farrington-Rock et al. 2004) et en ostéoblastes (Doherty et al. 1998). Il a été démontré que les péricytes, qui n'expriment pas Pax7, Myf5 ou MyoD, peuvent générer des cellules musculaires *in vitro* et *in vivo*, suggérant que la myogenèse des péricytes suit un programme de différenciation myogénique différent de celui des cellules satellites (Dellavalle et al. 2007, Dellavalle et al. 2011). La transplantation par voie fémorale de péricytes humains dans des souris immuno-déficientes souffrant d'une dystrophie musculaire donne naissance à de nombreuses myofibres exprimant la dystrophine humaine (Dellavalle et al. 2007). Il est important de noter qu'une faible proportion de péricytes (3 à 5%) s'est incorporée sous la lamina basale des myofibres, indiquant que les péricytes sont capables d'occuper la niche des cellules satellites dans les muscles dystrophiques (Dellavalle et al. 2007). De plus, la transplantation de péricytes humains a significativement augmenté la performance des muscles dystrophiques montrant que les myofibres dérivées de la différenciation des péricytes sont fonctionnelles (Dellavalle et al. 2007).

De récents travaux réalisés chez la souris ont reporté la présence de deux sous-populations de péricytes dans le muscle squelettique (Birbrair et al. 2014). Les péricytes de type-1 (Nestin⁻/NG2⁺) et de type-2 (Nestin⁺/NG2⁺) sont localisés à proximité des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins (Birbrair et al. 2013b). Par contre, seulement les péricytes de type-2 sont myogéniques et participent à la régénération musculaire, suggérant que les péricytes de type-1 n'exprimeraient pas les récepteurs spécifiques nécessaires à activer les voies de signalisation requises pour la différenciation myogénique (Birbrair et al. 2013a). De plus, les péricytes de type-2 sont les seuls à entrer dans le compartiment des cellules satellites et à exprimer le facteur Pax7 (Birbrair, Zhang, Wang, Messi, Mintz, et al. 2013). Contrairement aux péricytes de type-2, les péricytes de type-1 représentent une source de cellules produisant du collagène dans les dépôts fibrotiques observés dans les muscles de souris âgées (Birbrair, Zhang, Wang, Messi, Mintz, et al. 2013). Enfin, ce sont également les péricytes de type-1 qui contribuent à l'accumulation intramusculaire d'adipocytes blancs (Birbrair et al. 2013a). Ces résultats suggèrent que les deux sous-populations de péricytes participent au succès de la régénération musculaire qui résulterait d'une balance d'activations cellulaires entre différenciation myogénique et non-myogénique.

2. 5. 3. Les cellules endothéliales myogéniques ou MECs (myogenic endothelial cells)

Les MECs ont été identifiées *in situ* par microscopie confocale dans les vaisseaux sanguins de muscles squelettiques humains (Zheng et al. 2007). Ces cellules co-expriment des marqueurs myogéniques (Pax7 et CD56) et des marqueurs endothéliaux (CD144, CD34, von Willebrand factor, VE-cadherin pour vascular-endothelial cadherin) (Zheng et al. 2007, Zheng et al. 2013). Les MECs CD56⁺/CD34⁺/CD144⁺/CD45⁻ isolées par FACS sont multipotentes puisque ces cellules peuvent se différencier *in vitro* en myotubes, ostéoblastes, chondroblastes et adipocytes (Zheng et al. 2007, Zheng et al. 2013). A noter que leur capacité à générer des fibres musculaires dans des muscles de souris endommagés est plus efficace que celle des myoblastes (Zheng et al. 2007).

2. 6. Les cellules CD133⁺

Depuis une décennie, une fraction de cellules mononucléées CD133⁺ (aussi appelées AC133) possédant un potentiel myogénique a été identifiée dans le sang humain dans un premier temps (Torrente et al. 2004). Les cellules humaines CD133⁺ fraîchement isolées peuvent se différencier *in vitro* en myotubes lorsqu'elles sont co-cultivées avec des cellules myogéniques ou exposées à des cellules produisant des facteurs de la famille Wnt (Torrente et al. 2004). Une fois injectées par voie intra-artérielle ou par injection intramusculaire, les cellules CD133⁺ peuvent fusionner avec des myofibres en régénération et améliorer la force des muscles transplantés (Torrente et al. 2004). De plus, ces cellules humaines CD133⁺, exprimant les marqueurs des cellules satellites M-Cadherin et Myf5, ont été détectées dans le compartiment des cellules satellites après transplantation (Torrente et al. 2004).

Dans un second temps, une petite sous-population de cellules doubles positives CD133⁺/CD34⁺ a été localisée dans l'espace interstitiel du muscle squelettique des souris (Holleman et al. 2008). Récemment, des cellules CD133⁺ ont aussi été détectées dans des muscles squelettiques humains dystrophiques et sont localisées sous la lamina basale des myofibres ou dans l'espace interstitiel (Meng et al. 2014). Une fois mises en culture, ces cellules peuvent exprimer des marqueurs myogéniques (CD56⁺/Pax7⁺/M-Cadherin⁺/Myf5⁺/MyoD⁺/desmin⁺), des péricytes (ALP⁺(alkaline phosphatase)/PDGFRβ⁺/NG2⁺/αSMA⁺(α smooth muscle actin) et des cellules souches mésenchymateuses (CD49b⁺/CD44⁺) (Meng et al. 2014). Ces cellules humaines musculaires sont capables de se différencier en myotubes *in vitro* et de former de nouvelles myofibres dans des muscles de

souris immunodéficientes en condition de régénération (Meng et al. 2014, Negroni et al. 2009). A noter que les cellules humaines CD133⁺ manifestent une plus grande capacité myogénique dans les muscles en régénération que les myoblastes humains (Negroni et al. 2009).

Malgré la présence d'autres cellules souches adultes myogéniques dans le muscle squelettique, les cellules satellites sont indispensables au bon déroulement de la régénération musculaire en réponse à un traumatisme. En effet, l'altération de la régénération musculaire induite par l'ablation des cellules satellites n'est pas compensée par les autres types de cellules myogéniques endogènes (Sambasivan et al. 2011). De plus, des mutations génétiques touchant uniquement la population des cellules satellites dans les muscles génèrent des myopathies invalidantes et mortelles telles que la DMD.

Chapitre 2. Dégénérescence musculaire et thérapies cellulaires

Suite à une blessure, la capacité du muscle squelettique à se régénérer est remarquablement efficace chez l'adulte mais son efficacité peut décliner au cours du vieillissement ou dans des conditions pathologiques telles que la DMD. Dans la plupart des cas, la perte d'efficacité de la régénération est liée à une réduction de la masse musculaire, à un déclin de l'activité des cellules satellites, et à une infiltration intramusculaire de tissus non myogéniques. Pour traiter les dystrophies musculaires, les thérapies cellulaires basées sur l'isolement et la transplantation de cellules souches musculaires à potentiel myogénique sont employées et étudiées dans le but de stimuler la régénération musculaire.

1. Les cellules satellites dans le muscle sarcopénique

1. 1. *Caractéristiques cliniques et causes de la sarcopénie*

Le terme « sarcopénie » a été proposé pour la première fois en 1988 pour décrire le déclin de la masse musculaire au cours du vieillissement (Rosenberg 1997). La sarcopénie est considérée comme un syndrome gériatrique caractérisé par une perte progressive et généralisée de la masse et de la force musculaire dont les conséquences peuvent être une invalidité physique, une qualité de vie réduite et le décès (Delmonico et al. 2007). Parce que la force musculaire ne dépend pas exclusivement de la masse musculaire et que la relation entre la force et la masse n'est pas linéaire, la dynapénie ou perte de la force et de la fonction du muscle est aussi une des caractéristiques de la sarcopénie (Cruz-Jentoft et al. 2010).

Les facteurs contribuant à la sarcopénie sont ceux liés aux changements hormonaux, nutritionnels, métaboliques et immunologiques qui affectent le système neuromusculaire menant à la perte des neurones moteurs et à l'atrophie des myofibres (Doherty 2003). Au niveau cellulaire, les muscles sarcopéniques présentent une grande hétérogénéité dans la taille des fibres, une prédominance de fibres atrophiées de type 2, une capacité oxydative diminuée, et une présence importante de tissus conjonctifs et graisseux intramusculaires. Des études transcriptomiques et protéomiques ont permis d'identifier une signature moléculaire spécifique des muscles sarcopéniques (Ibebunjo et al. 2013, Barns et al. 2014). Ces derniers ont des

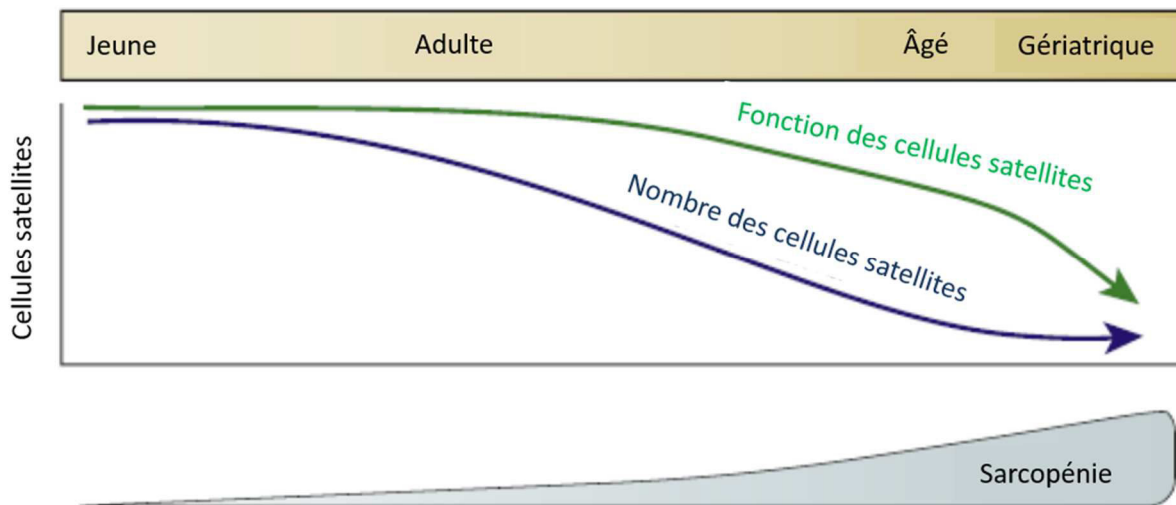


Figure 12. Déclin fonctionnel et numérique des cellules satellites avec l'âge. Le nombre et les fonctions des cellules satellites chutent au cours du vieillissement. A un âge gériatrique avancé, les cellules satellites éprouvent un fort déclin dans leurs fonctions comparées aux cellules satellites âgées (ligne verte). Cependant, la diminution de la population totale de cellules satellites observée chez les personnes âgées n'est pas accentuée chez les personnes ayant atteint un âge gériatrique (ligne bleue). (Sousa-Victor et al. 2015)

perturbations multiples comme un fort déficit du métabolisme énergétique mitochondrial, des processus de remodelage neuromusculaire liés à la dénervation, une augmentation de l'inflammation et de la dégradation des protéines (Ibebunjo et al. 2013).

Comme les motoneurones et les fibres matures sont les cibles principales de la sarcopénie (Grounds 2014) et en absence de stress imposé au muscle, la perte expérimentale des cellules satellites n'altère pas directement la sarcopénie, mais augmente la fibrose musculaire liée à l'âge (Fry et al. 2015). Cependant, les muscles âgés présentent un déclin dans le nombre et la fonction des cellules satellites (Sousa-Victor et al. 2014) (**Fig. 12**). Par conséquent, dans des situations de stress ou de blessure, la capacité des muscles sarcopéniques à régénérer est compromise par le pouvoir régénératif limité des cellules satellites.

1. 2. Perte numérique des cellules satellites avec l'âge

La question de savoir si le nombre de cellules satellites décline avec l'âge a longtemps été débattue. Des études rapportent que le nombre de cellules satellites est similaire dans les muscles de souris jeunes et âgées (Conboy et al. 2003, Roth et al. 2000, Wagers and Conboy 2005), alors que d'autres articles indiquent que le pool de cellules satellites est réduit dans les muscles âgés (Hawke and Garry 2001, Shefer et al. 2006, Shefer et al. 2010, Zammit et al. 2002). La disponibilité croissante de marqueurs des cellules satellites, qui a mené à l'amélioration des techniques d'analyses d'immunohistochimie et de cytométrie en flux, a permis de montrer qu'indéniablement le nombre de cellules satellites décline avec l'âge avec une réduction de 50% dans les muscles âgés en comparaison avec les muscles jeunes et adultes (Brack, Bildsoe, and Hughes 2005, Cerletti et al. 2012, Chakkalakal et al. 2012). De plus, toutes ces études indiquent que la diminution numérique des cellules satellites dans les muscles âgés affecte leur capacité régénérative. Néanmoins, le mécanisme qui provoque cette perte de cellules satellites est encore largement méconnu et les causes sous-jacentes commencent tout juste à être révélées. Des changements dans la composition de la niche des cellules satellites et du microenvironnement systémique ainsi que des modifications intrinsèques des cellules satellites ont été proposés comme déclencheurs de la perte du pool de cellules satellites au cours du vieillissement (García-Prat, Sousa-Victor, and Muñoz-Cánoves 2013, Rezza, Sennett, and Rendl 2014, Chang and Rudnicki 2014, Jung and Brack 2014). Tous ces changements provoqueraient la dérégulation de la balance entre prolifération et quiescence des cellules satellites ainsi que la perturbation de leur survie.

1. 2. 1. Modifications extrinsèques et déclin numérique des cellules satellites âgées

Les myofibres des muscles âgés expriment en grande quantité le facteur FGF2 sous des conditions homéostatiques, ce qui conduit les cellules satellites à sortir de leur état de quiescence et à perdre leur capacité d'auto-renouvellement (Chakkalakal et al. 2012). Cette expression forte de FGF2 est contrôlée par le facteur Sprouty-1 qui est un inhibiteur de la voie de signalisation FGF (Chakkalakal et al. 2005) et dont l'expression est requise pour maintenir le pool des cellules satellites dans les muscles en régénération (Shea et al. 2010). Ainsi, l'inhibition de l'expression de Sprouty-1 entraîne une augmentation de celle de FGF2, la baisse du nombre de cellules quiescentes et la diminution de la capacité régénérative des cellules satellites âgées (Chakkalakal et al. 2012). A l'inverse, la réduction de l'activation de la voie FGF induite par la surexpression de Sprouty-1 dans les cellules satellites prévient la déplétion de ces progéniteurs myogéniques dans les muscles de souris âgées (Chakkalakal et al. 2012). Ces résultats indiquent que la production de FGF2 dans les muscles âgés conduit au déséquilibre de la balance entre quiescence et activation/prolifération des cellules satellites qui, en retour, cause la perte numérique des progéniteurs myogéniques dans les muscles âgés (Chakkalakal et al. 2012).

Il est bien connu que les cellules souches provenant de divers tissus perdent leur capacité d'auto-renouvellement avec l'âge, ce qui contribue à leur déclin progressif dans le temps. Bien que les cellules satellites quiescentes ne soient activées qu'uniquement en réponse à une blessure ou à un stress, les changements liés à l'âge dans la composition de la micro-niche provoqueraient un arrêt de la quiescence et une activation spontanée des cellules satellites au repos qui contribueraient à leur épuisement (Sousa-Victor et al. 2015). A noter que les voies de signalisation p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase) et JAK/STAT3 (Janus kinase-Signal transducer and activator of transcription 3) contribuent à la perte numérique des cellules satellites dans les muscles âgés blessés en affectant leurs fonctions de prolifération et d'auto-renouvellement (Cosgrove et al. 2014, Bernet et al. 2014, Tierney et al. 2014, Price et al. 2014).

1. 2. 2. Changements intrinsèques et déclin numérique des cellules satellites âgées

La perte du nombre de cellules satellites avec l'âge pourrait aussi être causée par l'altération des processus de la survie cellulaire tels que l'apoptose et la sénescence. Il a été montré que la délétion de Sprouty-1 dans les cellules satellites en prolifération affecte l'auto-renouvellement de ces dernières sans toucher à leurs capacités prolifératives ou de

différenciation (Shea et al. 2010). En revanche, le retour à l'état de quiescence de ces cellules satellites est empêché entraînant leur mort par apoptose (Shea et al. 2010).

Bien que l'apoptose mène à l'élimination rapide des cellules non fonctionnelles, la réponse alternative des cellules stressées et défectueuses est l'induction du programme de sénescence (Sousa-Victor and Muñoz-Cánoves 2016). L'état de sénescence d'une cellule est défini par un arrêt irréversible du cycle cellulaire et est caractérisé par la présence de marqueurs tels que l'inhibiteur CDK p16^{INK4a}. Dans les muscles de souris âgées, les cellules satellites sont dans un état de présénescence et expriment fortement p16^{INK4a} (Sousa-Victor, Perdiguero, and Muñoz-Cánoves 2014). Sous des conditions prolifératives, ces cellules quiescentes entrent dans un état de sénescence avancée causant l'altération irréversible de leur capacité d'activation/prolifération indispensable pour l'auto-renouvellement et l'expansion des progéniteurs myogéniques impliqués dans le processus régénératif (Sousa-Victor, Perdiguero, and Muñoz-Cánoves 2014). L'entrée des cellules satellites âgées quiescentes dans un état de sénescence avancée peut être empêchée par l'inhibition de l'expression du gène p16^{INK4a}, ce qui restaure l'auto-renouvellement des cellules satellites et améliore le potentiel régénératif musculaire (Sousa-Victor, Perdiguero, and Muñoz-Cánoves 2014). D'une manière intéressante, la clairance des cellules exprimant p16^{INK4a} est suffisante pour atténuer la progression de la sarcopénie : le diamètre des fibres musculaires des animaux traités en fin de vie est augmenté et leur performance au test d'effort du tapis roulant est améliorée (Baker et al. 2011).

Une étude récente montre que la voie de l'autophagie, qui est nécessaire pour empêcher l'entrée des cellules satellites dans un état sénescence, est inactivée dans les cellules satellites de muscles de souris âgées (García-Prat et al. 2016). L'autophagie est un processus ubiquitaire par lequel les cellules éliminent les composants intracellulaire endommagés tels que les organelles et les protéines mal conformées. Ces débris cellulaires sont ensuite délivrés aux lysosomes pour être dégradés et recyclés. Une défaillance de ce processus est observée dans les cellules satellites âgées et provoque l'accumulation de protéines et d'organelles subcellulaires non fonctionnelles causant l'entrée des cellules dans un état quiescent (García-Prat et al. 2016). De plus, l'incapacité à éliminer les mitochondries endommagées mène à l'augmentation de la concentration des dérivés oxydatifs de l'oxygène (ROS, reactive oxygen species) ce qui affecte l'homéostasie et le caractère souche des cellules satellites (García-Prat et al. 2016). De ce fait, la régénération des myofibres endommagées et le maintien du pool des cellules satellites sont sévèrement altérés dans les muscles de souris âgées.

1. 3. Perte des fonctions des cellules satellites avec l'âge

1. 3. 1. Facteurs extrinsèques et déclin fonctionnel des cellules satellites âgées

De nombreuses études supportent l'idée que l'environnement, c'est-à-dire les signaux provenant du milieu systémique et de la niche, contribue de manière importante au processus du vieillissement des cellules satellites. La première preuve du rôle de l'environnement systémique dans la fonction des cellules satellites est une expérience de transplantation sur des rats jeunes ou âgés de muscles totaux isolés à partir de sujets jeunes ou âgés (Carlson and Faulkner 1989). Cette étude montre que les facteurs présents dans le tissu hôte sont plus importants que la source des cellules transplantées pour déterminer l'efficacité de la réponse régénérative. Récemment, il a été prouvé que la réussite de la greffe de fibres musculaires âgées dans des souris jeunes irradiées est identique à celle de la transplantation de myofibres jeunes (Collins et al. 2007). L'environnement de l'hôte joue donc un rôle crucial dans les fonctions des cellules satellites et la régénération musculaire. Des expériences récentes d'appariements de souris jeunes avec des souris âgées ont confirmé que les fonctions des cellules satellites sont influencées positivement par l'environnement systémique d'animaux jeunes et négativement par celui d'animaux âgés (Brack and Rando 2007, Conboy et al. 2005).

Il est maintenant admis que la plupart des voies de signalisation connues pour réguler les cellules satellites sont dérégulées au cours du vieillissement et agissent en synergie pour compromettre les fonctions des cellules satellites (Sousa-Victor et al. 2015, Sousa-Victor and Muñoz-Cánoves 2016). Les principaux changements liés à l'âge de l'environnement systémique et de la niche des cellules satellites sont : une augmentation de la présence des ligands Wnt dans le sérum d'individus âgés, une augmentation de l'expression des facteurs FGF2 et TGF β (transforming growth factor beta 1) et un manque d'expression de DLK1 à partir des myofibres et/ou des progéniteurs myogéniques des muscles âgés.

L'expression insuffisante de DLK1 par les myofibres et les progéniteurs myogéniques dans les muscles squelettiques de souris âgées au cours de la myogenèse affaiblit les capacités de prolifération et de différenciation des cellules satellites âgées (Conboy et al. 2003). En effet, l'inhibition de l'activation de la signalisation Notch altère la régénération des muscles de souris jeunes, tandis que l'activation de cette voie restaure le potentiel régénératif des muscles de souris âgées. La signalisation Notch est donc un déterminant clé du potentiel régénératif musculaire qui décline avec l'âge.

En plus de la diminution de l'activation de la voie Notch, les muscles de souris âgées présentent un niveau d'expression élevé de facteurs TGF β qui est habituellement associé à une baisse de la capacité régénérative des muscles (Carlson, Hsu, and Conboy 2008). Les voies de signalisation Notch et TGF β ont des effets antagonistes dans le contrôle de la prolifération des cellules satellites. L'activation de la voie Notch bloque la surexpression des inhibiteurs CDKs p15, p16, p21 et p27 dépendante de la voie TGF β , alors que l'inhibition de la voie Notch induit l'expression de ces CDKs. De plus, l'inhibition de l'activation de la voie TGF β dans les muscles de souris âgées restaure la capacité régénérative des cellules satellites *in vivo*. Ces résultats suggèrent qu'une balance endogène entre l'activation des voies Notch et TGF β contrôle la capacité régénérative des cellules satellites, et qu'une dérégulation de cette balance dans la micro-niche des muscles de souris âgées interfère avec la régénération musculaire.

Une dérégulation de la signalisation Wnt au cours du vieillissement a aussi été proposée pour expliquer la perte de fonction des cellules satellites dans les muscles squelettiques sarcopéniques. L'augmentation de la signalisation Wnt contribue à stimuler la fibrose intramusculaire au dépend de la myogenèse diminuant ainsi la capacité régénérative des muscles squelettiques (Brack et al. 2007). Une des protéines du complément C1q a été identifiée comme un activateur de la voie Wnt et serait impliquée dans la réduction de la capacité régénérative des muscles squelettiques en ciblant à la fois les fibroblastes et les cellules satellites (Naito et al. 2012). En effet, C1q inhibe la prolifération des cellules satellites et favorise la fibrose musculaire en stimulant l'expression des protéines de la matrice extracellulaire par les fibroblastes musculaires (Naito et al. 2012). Les effets synergiques de la perte d'activation de la voie Notch et de la forte activation de la voie Wnt contribueraient à favoriser une mauvaise différenciation plutôt que l'auto-renouvellement des progéniteurs myogéniques causant alors l'épuisement du pool de cellules satellites au cours du vieillissement (Brack et al. 2008). Une étude récente reporte que l'activation de la voie Wnt n'est pas indispensable pour la myogenèse au cours de la régénération musculaire mais que l'inhibition de cette voie est une étape cruciale pour empêcher les effets délétères d'une réponse régénérative prolongée (Murphy et al. 2014).

Comme évoqué précédemment dans le paragraphe « perte numérique des cellules satellites avec l'âge », l'augmentation de l'expression de FGF2 par les myofibres au cours du vieillissement compromet le maintien de l'état de quiescence des cellules satellites (Chakkalakal et al. 2012). Cet effet est induit par la diminution de l'expression de Sprouty-1 qui est un inhibiteur de la signalisation de FGF2 (Chakkalakal et al. 2012). Récemment, il a été montré que les précurseurs musculaires humains adultes et âgés présentent une augmentation

de la méthylation d'ADN (acide désoxyribonucléique) au niveau du gène Sprouty-1 qui est corrélée à une incapacité des cellules à retourner à l'état quiescent (Bigot et al. 2015).

L'ocytocine, GDF11 (growth and differentiation factor 11) et la myostatine sont aussi impliqués dans la perte de fonctions des cellules satellites au cours du vieillissement. En effet, le niveau d'ocytocine est réduit dans le plasma des souris âgées et l'administration de ce composé dans les animaux âgés restaure la capacité régénérative musculaire (Elabd et al. 2014). De même, le taux plasmatique de GDF11 diminue avec l'âge alors que celui de la myostatine augmente (Egerman et al. 2015, Poggioli et al. 2016, Bergen et al. 2015, Sinha et al. 2014).

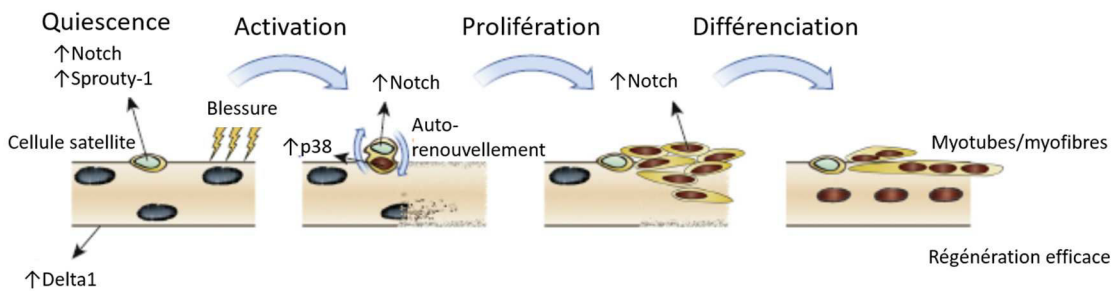
1. 3. 2. Modifications intrinsèques et déclin fonctionnel des cellules satellites âgées

En plus des facteurs extrinsèques présents dans le microenvironnement, des changements intrinsèques liés à l'âge impactent le comportement des cellules satellites. Parmi ces modifications intrinsèques, on retrouve : l'instabilité génomique, les dommages à l'ADN, les stress oxydatifs et les altérations de la fonction mitochondriale.

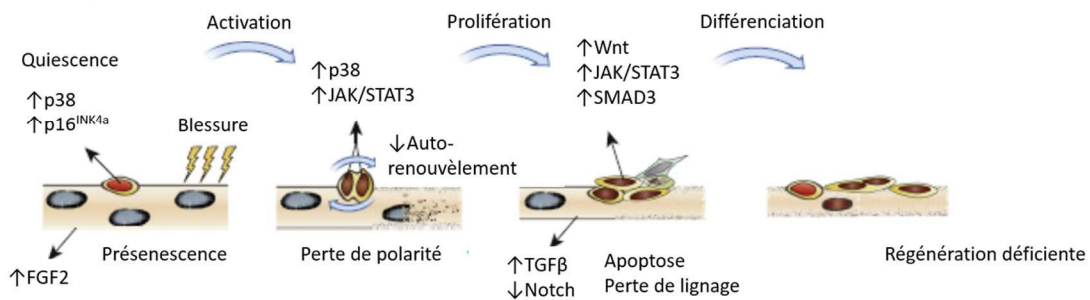
Les cellules souches satellites seraient plus résistantes aux dommages que subit l'ADN et seraient capables de les réparer plus efficacement que les progéniteurs myogéniques plus engagés dans le processus de la myogenèse (Vahidi Ferdousi et al. 2014). Néanmoins, l'effet combiné d'une exposition à des stress génotoxiques tout au long de la vie et un déclin de la capacité antioxydante des cellules satellites semblent avoir un impact néfaste sur l'intégrité du génome des cellules satellites (Fulle et al. 2005).

Le vieillissement induit des changements dans le programme transcriptionnel des cellules satellites conduisant à des défauts dans la fonction de ces cellules tels qu'une activité antioxydante diminuée, une capacité limitée à compléter le programme de différenciation due à une expression altérée des gènes spécifiques de la myogenèse, une expression augmentée des gènes liée à l'atrophie musculaire, et une dérégulation de l'expression des gènes impliqués dans la conformation des protéines (Bortoli et al. 2003, Pietrangelo et al. 2009). Ces modifications transcriptionnelles pourraient clarifier le mécanisme moléculaire de la baisse du potentiel myogénique, de la formation limitée de colonies myogéniques *in vitro* des cellules satellites âgées (Conboy et al. 2003, Shefer et al. 2006, Collins et al. 2007, Chargé, Brack, and Hughes 2002, Shadrach and Wagers 2011, Day et al. 2010, Baj et al. 2005) et de leur tendance à adopter des devenir fibroblastiques et adipogéniques (Brack et al. 2007). Les changements de l'expression génique des cellules satellites liés à l'âge pourraient provenir d'altérations

Muscle jeune



Muscle âgé



Facteurs qui **augmentent** et **diminuent** avec l'âge:
TGFβ, **Wnt**, **FGF2**, **GDF11**, **Ocytocine**, **Notch**

Figure 13. Facteurs extrinsèques et intrinsèques qui perturbent les fonctions des cellules satellites au cours du vieillissement. Dans les muscles au repos, les cellules satellites sont à l'état de quiescence et expriment le récepteur Notch3 et le facteur de transcription Sprouty-1. Les myofibres libèrent le ligand Notch Delta 1 dans le microenvironnement des cellules satellites pour préserver l'état quiescent des cellules satellites. Avec l'âge, la composition de la niche est altérée avec une réduction de l'expression de Delta1 et une augmentation de celle de FGF2 et du TGFβ par les myofibres. Une augmentation de l'expression de Wnt ainsi qu'une diminution des taux plasmatiques d'ocytocine et de GDF11 sont aussi observées chez les sujets âgés, ce qui affecte les fonctions des cellules satellites et altère la quiescence des cellules souches ou les étapes de la régénération musculaire. Les cellules satellites quiescentes des muscles âgés présentent une activité élevée de la MAPK p38 et de la voie de signalisation JAK/STAT3 entraînant une perte de l'auto-renouvellement des cellules souches. La perturbation de la signalisation FGF2-Sprouty-1 entraîne la sortie de l'état quiescent des cellules satellites âgées alors que l'induction de p16^{INK4} provoque la présénescence de ces cellules. La prolifération, la différenciation et l'auto-renouvellement des cellules satellites âgées sont aussi affectés par un déséquilibre de la balance Notch/Smad3 dans le microenvironnement menant à une augmentation de la voie Wnt impliquée dans la conversion des cellules satellites vers un devenir fibrotique. (Sousa-Victor et al. 2015)

épigénétiques qui ont été découvertes en comparant les profils épigénétiques de cellules satellites quiescentes isolées à partir des muscles de souris jeunes et âgées (Liu et al. 2013).

Des études récentes se sont focalisées sur l'identification de stratégies de rajeunissement des cellules satellites en agissant sur les voies de signalisation intracellulaires spécifiquement dérégulées dans les cellules satellites âgées (Cosgrove et al. 2014, Bernet et al. 2014, Tierney et al. 2014, Price et al. 2014). En accord avec l'augmentation du niveau d'expression de FGF2 dans les muscles âgés (Chakkalakal et al. 2012), une dérégulation de la voie FGF-p38 MAPK est observée dans les cellules satellites ayant un déficit de potentiel régénératif lié à l'âge (Bernet et al. 2014). L'augmentation de la signalisation p38 MAPK dépendante de l'âge limiterait l'expansion des cellules satellites au cours de la phase de prolifération tout en favorisant leur sortie du cycle cellulaire (Cosgrove et al. 2014). De même, le faible potentiel de régénération des cellules satellites âgées est corrélé avec une augmentation de l'activité de la voie JAK/STAT, ce qui affecte la fonction des cellules satellites en stimulant leur division asymétrique (Price et al. 2014). De plus, la stimulation de l'expression de MyoD par la cascade de signalisation IL-6/STAT3 favorise la différenciation des cellules satellites âgées au dépend de leur expansion (Tierney et al. 2014). Enfin, l'inhibition de l'activité des voies de signalisation JAK/STAT3 ou p38 MAPK améliore la capacité régénérative des cellules satellites âgées dans des expériences de transplantation musculaire (Cosgrove et al. 2014, Bernet et al. 2014, Tierney et al. 2014, Price et al. 2014).

Au cours du vieillissement, les muscles squelettiques subissent une grosse perte de leur masse et de leur fonction. La sarcopénie réduit fortement les fonctions volontaires des muscles comme le maintien de la posture et de la mobilité, ce qui affecte la qualité de vie des personnes âgées. En réponse à une blessure, les cellules satellites musculaires supportent des changements extrinsèques, provenant de leur environnement, ainsi que des modifications intrinsèques qui altèrent leur capacité régénérative et leur rôle dans le maintien de l'homéostasie musculaire (Fig. 13).

Le vieillissement est un des facteurs de risque majeur pour le développement de maladies chroniques chez l'homme (Kennedy et al. 2014). Il n'est donc pas surprenant de trouver des dysfonctionnements cellulaires du muscle communs à des patients atteints de dystrophies musculaires et à des individus d'âge avancé.

2. Les cellules satellites dans le muscle dystrophique DMD

2. 1. Caractéristiques cliniques et causes de la DMD

La forme la plus courante de dystrophie musculaire est la DMD qui est une maladie génétique rare touchant presque exclusivement les garçons, et dont l'incidence est de 1 sur 3500 naissances (Emery 2002). Les premiers signes de déficience motrice se manifestent entre 2 et 5 ans, puis la maladie progresse rapidement avec l'apparition d'une faiblesse musculaire extrême vers l'âge de 12 ans obligeant les enfants à se déplacer en fauteuil roulant. Les insuffisances cardiaques et respiratoires causent le décès de ces malades avant l'âge de 30 ans.

Le gène *DMD* responsable du développement de cette maladie est localisé sur le chromosome X et code pour la protéine dystrophine (Koenig, Monaco, and Kunkel 1988). Il est le plus long des gènes connus chez l'homme puisqu'il mesure 2.5 méga bases et comprend 79 exons et, par conséquent, peut être sujet à de nombreuses mutations (Koenig et al. 1987). La DMD est causée par un changement du cadre de lecture du gène *DMD* dû à des délétions, à la duplication ou à des mutations non-sens entraînant la perte de l'expression de la dystrophine ou la production d'une protéine non fonctionnelle (Rahimov and Kunkel 2013). La dystrophine est principalement exprimée dans les muscles squelettiques et cardiaques et plus faiblement dans le muscle lisse et le cerveau (Campbell and Kahl 1989, Ervasti et al. 1990). Cette protéine est un composant majeur du complexe dystrophine-glycoprotéines, acteur essentiel du maintien de l'intégrité cellulaire et de la fonction des cellules musculaires (Matsumura et al. 1993).

D'un point de vue histologique, les muscles DMD sont caractérisés par la présence de fibres musculaires de taille variable, de tissus fibrotiques localisés entre les myofibrilles et de fibres en régénération et en nécrose (Wang et al. 2010). A cause du manque de dystrophine, le muscle DMD présente une fragilité mécanique et subit des dommages à chaque contraction musculaire (McArdle, Edwards, and Jackson 1995) provoquant une infiltration de cellules inflammatoires et une activation permanente des cellules satellites prenant part au processus de régénération (Watkins and Cullen 1988). La DMD est définie par des cycles continus de dégénération/régénération jusqu'aux stades tardifs de la maladie où les fibres musculaires sont remplacées par des tissus fibrotiques et adipogéniques compromettant la fonction normale du muscle (Matsumura et al. 1993).

Bien qu'il ait été récemment publié que les cellules satellites expriment fortement la dystrophine, la contribution précise de ces cellules dans la progression de la DMD demeure une question en suspens dans le domaine musculaire (Dumont et al. 2015). Pour définir

l'importance du rôle des cellules satellites dans le développement de la DMD, plusieurs modèles de souris transgéniques ont été générés, notamment le modèle murin *mdx* (Bulfield et al. 1984). Bien qu'elles soient aussi déficientes pour la dystrophine, ces souris mutantes présentent un phénotype dystrophique modéré et ne possède pas exactement les mêmes caractéristiques cliniques que celles de la DMD (Bulfield et al. 1984). Les souris *mdx* avec invalidation du gène *MyoD* présentent une myopathie sévère démontrant que la perte d'expression de *MyoD* exacerbe le phénotype dégénératif des souris *mdx* (Megency et al. 1996). Récemment, l'introduction d'une mutation nulle de la télomérase dans les souris *mdx* a induit le développement d'une myopathie sévère qui ressemble étroitement à celle de la DMD (Sacco et al. 2010). Les modèles dystrophiques qui miment le plus les caractéristiques cliniques de la DMD sont les modèles canins dont le golden retriever chez lequel la mutation sur le gène *DMD* est naturelle et non induite (Kornegay et al. 2012).

2. 2. Défaut de l'auto-renouvellement des cellules satellites dystrophiques

Il était admis depuis longtemps que le muscle dystrophique subissait un épuisement des cellules satellites induit par les cycles répétitifs de dégénération et régénération musculaires (Blau, Webster, and Pavlath 1983, Sacco et al. 2010). Ce modèle suggérait que les cellules satellites étaient incapables de maintenir leur nombre face au processus de régénération constamment activé entraînant alors une éventuelle perte de leur capacité régénérative. Depuis quelques années, plusieurs études contredisent cette hypothèse puisqu'une augmentation du nombre de cellules satellites dans les muscles dystrophiques est observée. En effet, l'analyse de biopsies musculaires provenant de patients DMD âgés de 2 à 7 ans a révélé que la quantité de cellules satellites est élevée dans les muscles dystrophiques comparés aux muscles isolés à partir d'individus sains du même âge (Kottlors and Kirschner 2010). Une autre étude démontre que le contenu en cellules satellites des fibres musculaires de type I augmente avec la progression de la maladie (Bankolé et al. 2013). De même, des études récentes ont prouvé la présence d'un plus grand nombre de cellules satellites dans les fibres musculaires provenant de souris *mdx* de tout âge comparé à des souris non malades du même âge, ainsi qu'une augmentation de leur nombre avec la progression de la dystrophie (Dumont et al. 2015, Jiang et al. 2014, Boldrin, Zammit, and Morgan 2015). Collectivement, ces résultats suggèrent que la capacité régénérative diminuée des muscles dystrophiques ne peut pas être causée uniquement par un épuisement des cellules satellites.

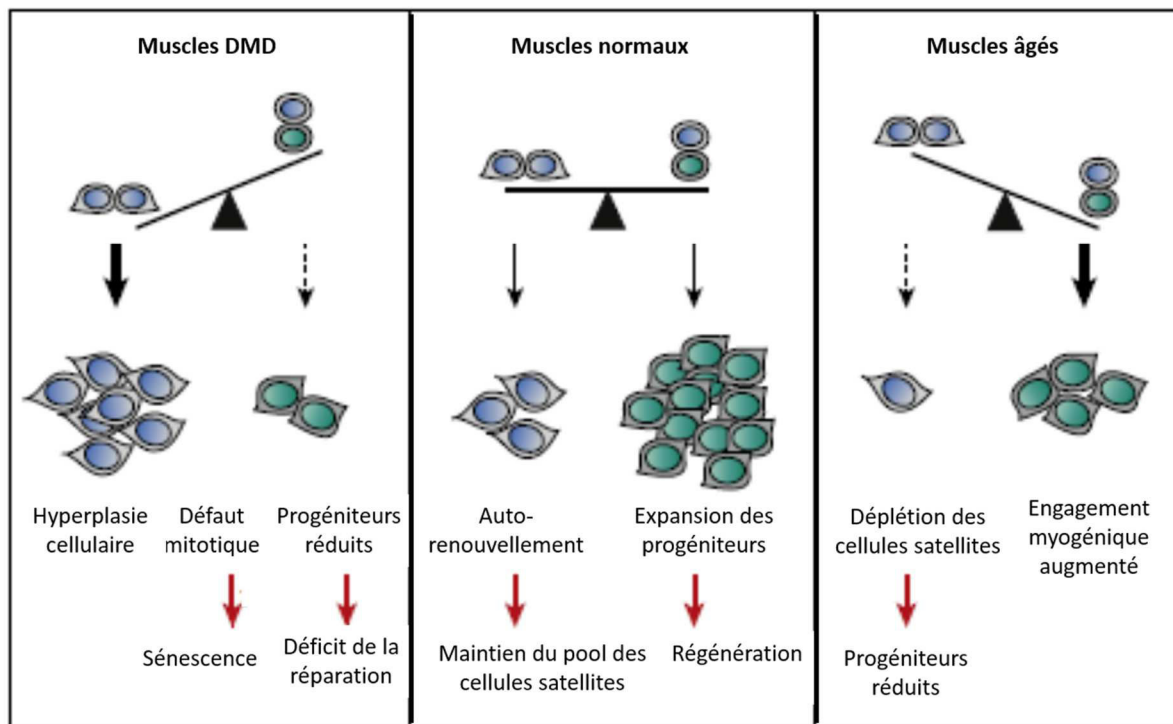


Figure 14. Les efficacités de la régénération musculaire et de l'homéostasie tissulaire dépendent d'une balance entre divisions symétriques et asymétriques des cellules satellites. Après la blessure d'un muscle normal, l'expansion des cellules satellites par divisions symétriques maintient le pool de cellules souches (cellules bleues), alors que les divisions asymétriques génèrent des progéniteurs myogéniques (cellules vertes) qui prolifèrent pour régénérer le muscle endommagé. Dans le muscle âgé, les cellules satellites favorisent leur engagement vers la myogenèse au détriment de leur auto-renouvellement (augmentation des divisions asymétriques et diminution des divisions symétriques) entraînant une perte graduelle des cellules satellites. Progressivement, le déclin des cellules satellites et la réduction du nombre de cellules à entrer dans le cycle cellulaire mènent à la diminution du nombre des cellules souches et des progéniteurs myogéniques et à une incapacité à régénérer efficacement les muscles âgés. Dans le muscle DMD, la perte de polarité cellulaire causée par l'absence de la dystrophine empêche les cellules satellites de se diviser de manière asymétrique et provoque une diminution du nombre de cellules souches. L'incapacité des cellules satellites à réaliser des divisions asymétriques et les défauts mitotiques forceraient les cellules souches à devenir sénescents. La déplétion progressive des progéniteurs myogéniques suite aux cycles répétitifs de dégénérescence/régénération mène à l'affaiblissement musculaire. (Chang, Chevalier, and Rudnicki 2016)

Le choix des cellules satellites à s'auto-renouveler par division symétrique ou asymétrique est une étape clé pour déterminer le devenir des cellules satellites puisqu'une dérégulation de ce processus a des conséquences néfastes sur le processus de régénération musculaire (chapitre 1, partie 2. 1. 3) (Chang, Chevalier, and Rudnicki 2016) (**Fig. 14**). La baisse de la capacité des cellules satellites à s'auto-renouveler par division symétrique est une cause sous-jacente du déclin lié à l'âge de la capacité régénérative des cellules satellites murines (Price et al. 2014). A l'inverse, l'auto-renouvellement incontrôlé mène à la surproduction des cellules satellites et peut être impliqué dans la tumorigenèse (Chang, Chevalier, and Rudnicki 2016). Une étude récente a révélé un des mécanismes impliqués dans la dérégulation de l'homéostasie des cellules souches et des progéniteurs plus engagés dans la myogenèse, ainsi que les modifications intrinsèques des cellules satellites, qui contribuent à la pathologie de la DMD (Dumont et al. 2015). En accord avec un défaut d'expression de protéines impliquées dans la polarité cellulaire, une réduction significative du nombre de divisions asymétriques est observée pour les cellules satellites dystrophiques provenant de souris *mdx* (Dumont et al. 2015). Dans les cellules satellites *mdx*, la perte de la polarité cellulaire provoque un défaut de l'orientation de l'axe mitotique, des divisions cellulaires anormales et prolongées (Dumont et al. 2015). Ces résultats montrent que l'expression de la dystrophine est essentielle pour établir la polarité et l'alignement apico-basal de l'axe mitotique requis pour la division asymétrique des cellules satellites. Pour la première fois, un rôle direct de la dystrophine dans la régulation des cellules satellites a pu être ainsi décrit permettant d'établir un lien entre les cellules satellites dystrophiques et la perte de la capacité régénérative des muscles des patients atteints de la DMD. De plus, le gène *Dmd* est quatre fois plus exprimé dans les cellules satellites que dans les myotubes en différenciation (Dumont et al. 2015). Cette observation supporte l'hypothèse, qu'en plus des dommages subis aux myofibres, le manque de dystrophine dans les cellules satellites contribue de manière importante au phénotype DMD.

2. 3. Le devenir des cellules satellites dystrophiques

Comme les cellules satellites sont incapables de se diviser normalement, nous pouvons alors nous demander quel est le destin de ces cellules dans le muscle malade. En accord avec l'observation que les cellules satellites des souris *mdx* présentent une capacité réduite à s'engager dans le programme myogénique (Dumont et al. 2015), deux autres études récentes prouvent que les cellules satellites de souris *mdx* possèdent un potentiel myogénique diminué et peuvent s'engager dans un programme fibrogénique (Biressi et al. 2014, Pessina et al. 2015).

Ces observations sont aussi valables pour les cellules satellites de patients DMD et cette plasticité fibrogénique dépendrait de l'augmentation de la signalisation TGF β observée dans les muscles dystrophiques (Pessina et al. 2015). Il est alors concevable que le dysfonctionnement des cellules satellites dans les muscles DMD pourrait contribuer à l'apparition de certains aspects pathologiques de la maladie tels que la réduction de la capacité régénérative musculaire et l'augmentation de la fibrose intramusculaire.

Cependant, le nombre élevé de cellules satellites trouvées dans les muscles DMD suggérerait que ces cellules satellites non fonctionnelles persistent mais ne peuvent pas participer au processus de réparation musculaire. Au vue de l'amplification des centrosomes dans les cellules satellites *mdx* (Dumont et al. 2015), il est possible d'émettre l'hypothèse que ces cellules subissent une déficience mitotique les conduisant à leur sénescence, état irréversible de la cellule où le cycle cellulaire est arrêté (Chang, Chevalier, and Rudnicki 2016). Notamment, une étude récente montre que les cellules satellites, pour lesquelles l'assemblage du fuseau mitotique est impossible, sont arrêtées en phase G1 du cycle cellulaire ce qui empêche leur différenciation (Kollu et al. 2015).

Il est admis que les cellules sénescents qui s'accumulent au cours du vieillissement sécrètent des protéases, des facteurs de croissance et des cytokines pro-inflammatoires compromettant la fonction des cellules voisines (Jenkins 2002). Plusieurs études montrent que les ROS contribuent à la progression physiopathologique des dystrophies musculaires. Effectivement, une oxydation des protéines musculaires par les ROS (Haycock et al. 1996) ainsi qu'une peroxydation des lipides (Grosso et al. 2008) sont observées dans les biopsies musculaires de patients DMD. Les ROS induisent l'activation de la voie NF- κ B (nuclear factor-kappa B) entraînant une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires, telles que TNF α et IL-1 β qui sont fortement exprimées dans les muscles de souris *mdx* avant le développement de la maladie (Kumar and Boriek 2003). Les myotubes de souris *mdx* cultivés *in vitro* sont plus sensibles à la mort cellulaire induite par les ROS que les myotubes de souris saines (Rando et al. 1998). Néanmoins, les myoblastes indifférenciés provenant de muscles de souris *mdx* et saines ont une sensibilité équivalente au stress oxydatif induit par les ROS (Rando et al. 1998). Comme la dystrophine est fortement exprimée dans les cellules satellites, nous pouvons supposer que l'absence de la dystrophine dans les cellules satellites des patients DMD pourrait entraîner une accumulation du stress oxydatif dans le muscle dystrophique et, par conséquent, contribuer à la mort par apoptose des myofibres hypersensibles aux ROS (Chang, Chevalier, and Rudnicki 2016).

Il a été démontré que la voie de l'autophagie est compromise dans certaines pathologies neurodégénératives (Menzies, Fleming, and Rubinsztein 2015) dont la DMD (De Palma et al. 2012), ainsi que dans les muscles TA des souris *mdx* (Spitali et al. 2013). Ces résultats suggèrent que le dysfonctionnement précoce de la voie de l'autophagie dans les cellules satellites déficientes pour la dystrophine favoriserait leur entrée dans un état quiescent et fournirait une explication supplémentaire au nombre élevé de cellules satellites ne participant pas à la régénération musculaire bien que contribuant à la progression de la maladie.

La dystrophie musculaire et la sarcopénie présentent des caractéristiques physiopathologiques communes telles qu'une atrophie du muscle, une faiblesse musculaire, des infiltrations intramusculaires de tissus non myogéniques et une dénervation (Rudolf et al. 2014). Dans ces deux types de pathologie, le lignage myogénique est touché puisque l'auto-renouvellement et le potentiel de différenciation des cellules satellites sont compromis ce qui a pour conséquence d'altérer la régénération du tissu musculaire. Bien que la balance entre les divisions symétriques et asymétriques des cellules satellites soit dérégulée de manière différente dans la sarcopénie et la DMD, les cellules satellites subissent des modifications intrinsèques communes aux deux pathologies telles qu'une inhibition de la voie de l'autophagie qui aboutit à la sénescence cellulaire. Les modifications du microenvironnement sont aussi des facteurs qui affectent la fonction des cellules satellites âgées et dystrophiques. Par exemple, une production persistante de facteurs pro-fibrotiques dans les muscles pathologiques est observée, ce qui favorise la formation de tissus fibrotiques intramusculaires (Shin et al. 2013).

Malgré les recherches cliniques qui se multiplient, aucun traitement n'existe pour soigner les patients atteints de la DMD. Une des stratégies thérapeutiques prometteuse est la thérapie cellulaire qui vise à corriger le dysfonctionnement des cellules satellites malades en les remplaçant par des cellules saines à potentiel myogénique capables de régénérer le muscle dystrophique.

3. Les thérapies cellulaires pour traiter les patients DMD

Les thérapies cellulaires pourraient être un traitement idéal pour soigner les patients atteints de dystrophie musculaire. D'un point de vue clinique, les cellules satellites transplantées survivraient, proliféreraient et migreraient dans les muscles du patient malade où elles se

différencieraient en fibres musculaires pour réparer les myofibres endommagés ou remplacer celles qui ont disparu ; et enfin elles pourraient reconstituer le pool de cellules satellites avec des cellules souches fonctionnelles non mutées (Meng, Muntoni, and Morgan 2011).

Dans cette partie, nous examinerons comment certaines populations de cellules souches à potentiel myogénique pourraient améliorer les phénotypes pathologiques de la DMD, ainsi que les études précliniques et cliniques en cours ou terminées.

3. 1. Principes des thérapies basées sur la transplantation de cellules souches

Pour empêcher ou casser les cycles de dégénération/régénération dans les muscles DMD, l'expression de la dystrophine doit être restaurée à la membrane des fibres musculaires. Cette restauration peut être réalisée en traitant les patients DMD avec des cellules souches exprimant la dystrophine fonctionnelle selon deux stratégies possibles. Dans la première stratégie, autogreffe, les cellules isolées à partir du patient malade sont génétiquement modifiées *in vitro* pour restaurer l'expression de la dystrophine puis réimplantées chez le malade (Mendell and Clark 2006, Chakkalakal et al. 2005). Dans la seconde stratégie, allogreffe, les cellules souches provenant d'un individu sain et exprimant la dystrophine fonctionnelle sont greffées chez un patient dystrophique (Partridge 2004). Ces deux stratégies de thérapie cellulaire ont des avantages et des inconvénients. L'avantage de l'autogreffe est que les cellules transplantées proviennent du patient malade donc une induction d'une réponse immunitaire par le patient est très peu probable. Par contre, la modification génétique des cellules a, par le passé, entraîné des effets indésirables tels que la transformation des cellules transplantées et parfois même le décès du patient (Marshall 1999, Hacein-Bey-Abina, von Kalle, et al. 2003, Hacein-Bey-Abina, Von Kalle, et al. 2003). A l'inverse, l'allogreffe n'impliquant aucune modification génétique des cellules transplantées est une stratégie idéale pour induire une régénération musculaire fonctionnelle. Néanmoins, le risque de rejet de la greffe est important soulevant le problème d'incompatibilité des donneurs et du traitement immunosuppresseur donné au patient receveur.

Dans le cas de l'autogreffe, plusieurs méthodes sont employées pour exprimer une dystrophine fonctionnelle dans les cellules dystrophiques. Les cellules autologues sont génétiquement modifiées en introduisant un gène permettant l'expression d'une mini-dystrophine (Li et al. 2005), ou en utilisant la technique du saut d'exon qui empêche l'expression des exons mutés de la dystrophine endogène (Goyenvallé et al. 2009, Benchaouir et al. 2007). Pour introduire des gènes dans les cellules souches, les lentivirus sont parfaits car ils peuvent infecter des cellules quiescentes ou post-mitotiques et s'intégrer au génome de la

cellule hôte permettant une expression du gène sur le long terme à la fois *in vitro* et *in vivo* (Escors and Breckpot 2010, Kimura et al. 2010, Pauwels et al. 2009). Cependant, ils ont l'inconvénient d'insérer uniquement des gènes de petite taille (Dissen et al. 2009, Thomas, Ehrhardt, and Kay 2003) et, potentiellement, des mutations dans le génome (Hacein-Bey-Abina, Von Kalle, et al. 2003, Bokhoven et al. 2009). Le choix d'un promoteur approprié pour que l'expression du gène d'intérêt soit seulement présente dans les fibres musculaires (Blain et al. 2010, Larochelle et al. 2002) et maintenue dans le temps *in vivo* est aussi fondamental (Dunant et al. 2003, Talbot et al. 2010). En plus des vecteurs viraux, des vecteurs non viraux tels que les transposons (Ivics and Izsvák 2006, Claeys Bouuaert and Chalmers 2010, Loperfido et al. 2016) et les chromosomes artificiels humains (Hoshiya et al. 2009, Tedesco et al. 2011) sont des outils alternatifs à l'intégration de gènes dans les cellules souches. Un vecteur transposon a la capacité d'intégrer de manière stable le gène cible dans le génome de la cellule hôte avec un niveau élevé de l'expression du gène intégré durant une longue période (Izsvák et al. 2009). Les chromosomes artificiels humains permettent l'expression stable du gène d'intérêt et d'éviter d'insérer des mutations dans le génome de la cellule hôte, et ont la possibilité d'inclure des inserts de grande taille tels que le gène entier de la dystrophine (Hoshiya et al. 2009, Tedesco et al. 2011).

3. 2. Les cellules souches idéales pour traiter la DMD

Théoriquement, pour traiter la DMD, les cellules souches transplantées doivent remplir les critères suivants (Meng, Muntoni, and Morgan 2011) :

- Etre expansibles *in vitro* sans perdre leurs propriétés de cellules souches.
- Etre injectées de manière systémique car la majorité des muscles squelettiques du corps est affectée par la maladie.
- Survivre, proliférer et migrer dès l'entrée dans le muscle de l'hôte pour parvenir à intégrer la totalité de la surface de tous les muscles.
- Se différencier en fibres musculaires pour réparer les fibres endommagées ou remplacer les fibres disparues.
- Reconstituer le pool de cellules satellites avec des cellules souches fonctionnelles
- Etre capables d'exprimer la dystrophine sur le long terme.
- Leur transplantation doit induire une amélioration de la qualité de vie des patients traités comme par exemple, une force musculaire augmentée.

Types cellulaires	Avantages	Désavantages
Cellules satellites	Reconstituent un pool de cellules satellites fonctionnelles Faciles à purifier	Faible quantité de cellules purifiées Non amplifiables avant la transplantation Non injectables de manière systémique
Myoblastes	Faciles à isoler et à amplifier <i>in vitro</i> Reconstituent un pool de cellules satellites fonctionnelles	Faible efficacité à participer à la régénération Non injectables de manière systémique
Mésoangioblastes	Faciles à amplifier <i>in vitro</i>	Difficulté à purifier
Péricytes	Reconstituent un pool de cellules satellites Testés dans des modèles de souris et de chiens	Capacité régénérative différente selon les préparations cellulaires
Cellules CD133 ⁺	Reconstituent un pool de cellules satellites	Difficulté à purifier et à amplifier <i>in vitro</i>
PICs	Reconstituent un pool de cellules satellites et de PICs	Difficulté à purifier Injection systémique non testée

Tableau 2. Avantages et inconvénients des cellules souches musculaires capables de contribuer *in vivo* à la régénération musculaire comme traitement pour la DMD. A noter que les cellules CD133⁺ musculaires contribuent moins efficacement à la régénération musculaire que celles provenant du sang. (Meng *et al.*, 2011)

Les précurseurs et les cellules souches musculaires à potentiel myogénique ont longtemps été considérés comme des outils prometteurs pour traiter les dystrophies musculaires. L'utilisation des modèles DMD de souris et de chiens, et en particulier les modèles de souris immunodéficientes, a permis de tester la capacité des cellules souches exogènes à contribuer à la régénération musculaire une fois transplantées. Les avantages et les inconvénients de l'utilisation potentielle de ces différentes cellules souches comme traitement de la DMD sont résumés dans les **tableaux 2 et 3** et discutés ci-dessous (Meng, Muntoni, and Morgan 2011).

3. 2. 1. Les cellules satellites et les myoblastes comme traitement de la DMD

Les cellules satellites quiescentes peuvent régénérer efficacement le muscle squelettique (Silva-Barbosa et al. 2008) ainsi que reconstituer fonctionnellement le compartiment des cellules satellites (Collins et al. 2005). Malheureusement, la croissance *in vitro* des cellules satellites fraîchement isolées réduit leur potentiel myogénique *in vivo* (Montarras et al. 2005). Il est donc impossible d'obtenir une quantité suffisante de cellules satellites fraîchement isolées pour envisager des études cliniques avec ces cellules. Le premier type cellulaire à avoir été considéré comme un traitement prometteur pour la DMD est le myoblaste, descendant de la cellule satellite. Les myoblastes prolifèrent efficacement en culture et (Allen et al. 1985, Bischoff 1986), une fois injectés dans les muscles de souris *mdx*, participent à la réparation musculaire (Huard et al. 1994, Partridge et al. 1989) qui est cependant moins efficace qu'avec des cellules satellites fraîchement isolées (Montarras et al. 2005). De plus, les myoblastes ne peuvent pas être transplantés de manière systémique (Dellavalle et al. 2007, Sampaolesi et al. 2003) et ont une capacité de migration limitée après injection intramusculaire (Moens, Van-Schoor, and Maréchal 1996). Malgré les multiples tentatives pour améliorer la migration des myoblastes dans le muscle entier, aucune n'a particulièrement été un succès (Benabdallah et al. 2009, Bouchentouf, Benabdallah, and Tremblay 2004, Lafreniere et al. 2009, Silva-Barbosa et al. 2008, Yang, Laumonier, and Menetrey 2007). En dépit de récentes données prometteuses (Skuk et al. 2007, Skuk et al. 2006, Huard, Cao, and Qu-Petersen 2003), les déceptions des essais cliniques ont diminué l'intérêt de la transplantation des myoblastes (Gussoni, Blau, and Kunkel 1997, Mendell et al. 1995, Miller et al. 1997, Tremblay et al. 1993).

3. 2. 2. Autres cellules souches musculaires myogéniques comme traitement de la DMD

Comme indiqué précédemment (chapitre 1, partie 2), d'autres cellules souches musculaires myogéniques que les cellules satellites participent à la régénération musculaire et pourraient être utilisées pour traiter les patients dystrophiques (**Tab. 2**).

Les cellules les plus prometteuses qui peuvent être transplantées de manière systémique dans les muscles squelettiques sont les progéniteurs musculaires associés aux vaisseaux (Dellavalle et al. 2007, Sampaolesi et al. 2003, Sampaolesi et al. 2006, Guttinger et al. 2006) et les cellules souches CD133⁺ (Benchaouir et al. 2007, Negroni et al. 2009). La capacité des mésoangioblastes et des péricytes à contribuer à la régénération musculaire a été testée en transplantant des cellules isolées à partir de souris (Sampaolesi et al. 2003, Guttinger et al. 2006), de chien (Sampaolesi et al. 2006) et d'humain (Dellavalle et al. 2007) dans des souris dystrophiques et dans un modèle canin déficient pour l'expression de l'alpha-sarcoglycan. De manière intéressante, les péricytes d'un donneur humain peuvent reconstituer le pool de cellules satellites une fois transplantés de manière systémique (Dellavalle et al. 2007).

Les cellules CD133⁺ résidant dans le muscle squelettique sont aussi très prometteuses pour traiter les patients atteints de dystrophie musculaire (Benchaouir et al. 2007). Cependant, 02c/5es cellules souches ne représentent qu'une petite fraction de cellules mononucléées dans le muscle. Leurs applications sont donc limitées à cause des difficultés techniques liées à l'isolement des cellules CD133⁺, puis à leur amplification en culture dans le but d'obtenir une quantité suffisante pour la transplantation.

Les PICs peuvent aussi participer à la régénération musculaire en générant à la fois des cellules satellites et des PICs après leur transplantation intramusculaire (Mitchell et al. 2010). Néanmoins, l'injection systémique de ces cellules n'a encore jamais été testée.

Le muscle squelettique contient plusieurs types de cellules souches possédant les propriétés des cellules souches musculaires. Comme il est difficile de préparer une population pure de ces cellules, il est cependant possible qu'une population cellulaire isolée contienne une fraction d'un autre type cellulaire ce qui pourrait altérer leur capacité régénérative et le succès de la transplantation (Meng, Muntoni, and Morgan 2011).

Types cellulaires	Avantages	Désavantages
MSCs, moelle osseuse et sang	Faciles à isoler Bien caractérisées Injection systémique possible	Contribution limitée à la régénération Les cellules générées après transplantation ne sont pas forcément fonctionnelles
MSCs, tissu adipeux	Reconstituent un pool de cellules satellites Multipotentes Faciles à isoler Injection de cellules humaines possible	
ESCs	Pluripotentes	Problèmes éthiques Engagement des cellules vers le lignage myogénique avant transplantation
Cellules iPS	Faciles à amplifier <i>in vitro</i> Fort potentiel myogénique <i>in vivo</i>	Injection systémique non testée Possible effet cancérigène

Tableau 3. Avantages et inconvénients des cellules souches non musculaires capables de contribuer *in vivo* à la régénération musculaire comme traitement pour la DMD. (Meng *et al.*, 2011)

3. 2. 3. Les cellules souches à potentiel myogénique ne résidant pas dans le muscle squelettique comme traitement de la DMD

Comme les cellules souches musculaires sont pour la plupart difficiles à purifier, il est important d'obtenir des cellules plus facilement isolables et pour lesquelles l'environnement du muscle dystrophique n'altère pas leurs fonctions, et pour lesquelles les cycles continus de régénération ne contribuent pas à leur déplétion (Meng, Muntoni, and Morgan 2011) (**Tab. 3**).

- Les cellules souches mésenchymateuses, MSCs (mesenchymal stem cells), isolées à partir de la moelle osseuse et du sang :

Comme elles peuvent se différencier en plusieurs tissus différents, les MSCs ont souvent été utilisées pour des objectifs thérapeutiques. Les MSCs de la moelle osseuse (Ferrari et al. 1998, Chan et al. 2007, Dezawa et al. 2005, Shi et al. 2004, Xaymardan et al. 2009) et du sang (Gang et al. 2004, Shi et al. 2009, Torrente et al. 2004) sont faciles à isoler et ont très bien été caractérisées. Bien que des études ont démontré qu'elles pouvaient générer des fibres musculaires une fois transplantées dans des souris, la quantité de tissu musculaire produite est faible (Ferrari et al. 1998, Chan et al. 2007, Camargo et al. 2003, Corbel et al. 2003, Cossu and Mavilio 2000, LaBarge and Blau 2002) et les myofibres contenant les noyaux des MSCs du donneur n'expriment que certaines protéines musculaires (Cossu and Sampaolesi 2007) telles que la dystrophine (Dell'Agnola et al. 2004) ou l'alpha-sarcoglycan (Lapidos et al. 2004). De plus, même si les cellules de la moelle osseuse donnent naissance à des cellules en position satellite (LaBarge and Blau 2002), elles ne seraient pas toutes fonctionnelles (Sherwood et al. 2004). Récemment, une étude montre que la progression de la maladie des souris *mdx* est associée à une déplétion d'une population de MSCs de la moelle osseuse (Fujita et al. 2015). Une fois cette population cellulaire injectée dans les muscles de souris *mdx*, l'inflammation musculaire est diminuée et la régénération musculaire est améliorée grâce à l'expression d'une protéine anti-inflammatoire qui stimule la prolifération des myoblastes de la souris hôte. Cet article suggère qu'une certaine population endogène de MSCs de la moelle osseuse est requise pour préserver la fonction des muscles des souris dystrophiques non pas en participant à la myogenèse mais en interagissant avec les myoblastes.

- Les MSCs isolées à partir du tissu adipeux :

Les MSCs isolées à partir du tissu adipeux sont appelées adipose-derived stem cells, ADSCs. Après la transplantation des ADSCs dans les souris *mdx*, l'expression de la dystrophine

est restaurée (Rodriguez et al. 2005). L'injection systémique de progéniteurs myogéniques qui dérivent d'ADSCs dans des muscles de souris *mdx* a permis de générer de nouvelles fibres musculaires, de restaurer l'expression de la dystrophine et de contribuer au maintien du pool des cellules satellites (Zhang, Zhu, et al. 2015). Il a été démontré qu'une quantité énorme d'ADSCs humaines délivrée de manière systémique dans un modèle canin dystrophique a permis l'expression stable de la dystrophine humaine dans les muscles des chiens jusqu'à 27 mois après la dernière transplantation (Vieira et al. 2008). Ces résultats démontrent que cette technique pourrait être utilisée sur des patients souffrant de formes différentes de dystrophies musculaires progressives. De plus, les ADSCs humaines sont faciles à obtenir à partir de gras de liposuccions et pourraient être greffées sans avoir besoin de traiter le patient avec des drogues immunosuppressives (Vieira et al. 2012).

- Les cellules souches pluripotentes :

Des études récentes se sont intéressées à la participation des cellules souches pluripotentes, les cellules souches embryonnaires ESCs (embryonic stem cells), sur la régénération musculaire. Le principal problème de l'utilisation des ESCs pour étudier leurs rôles dans la régénération du muscle est de sélectionner des cellules non tumorigéniques (Hess 2009) possédant un fort potentiel myogénique. De manière intéressante, des ESCs sont capables de se différencier *in vitro* en cellules du lignage musculaire (Barberi et al. 2005), et peuvent survivre après leur transplantation dans les muscles de la souris hôte sans former de tumeurs (Barberi et al. 2007, Bhagavati and Xu 2005). Il a été reporté qu'en induisant l'expression de Pax3 dans une population cellulaire PDGFR α ⁺/Flk⁻, les ESCs murines contribuaient au développement musculaire sans provoquer la formation de tumeurs dans des modèles de souris (Darabi et al. 2008, Darabi et al. 2009).

Les problèmes éthiques induits par l'utilisation des ESCs humaines ont été contournés en établissant des cellules souches pluripotentes induites, iPS (induced pluripotent stem) (Kastenbergh and Odorico 2008). Les cellules iPS sont des cellules souches pluripotentes artificielles générées à partir de cellules somatiques (Takahashi and Yamanaka 2006, Takahashi, Tanabe, et al. 2007, Takahashi, Okita, et al. 2007) et ont des comportements très similaires aux ESCs (Takahashi et al. 2009, Unger et al. 2009). La contribution d'une sous-population des cellules iPS à la régénération musculaire a été reportée (Mizuno et al. 2010) mais ces expériences sont difficiles à reproduire. En effet, l'anticorps SM/C-2.6 utilisé pour sélectionner ces cellules iPS myogéniques et qui reconnaît un antigène inconnu présent sur la surface des cellules satellites (Fukada et al. 2004), n'est pas disponible dans le commerce.

Types de cellules transplantées	Méthodes de transplantation	Résultats	Notes	Références
Myoblastes	Allogreffe intramusculaire	Expression sur le long terme de la dystrophine du donneur Pas d'effets secondaires	Applicable seulement aux muscles squelettiques Besoin d'un traitement immunosuppressif	(Law <i>et al.</i> , 1991; Law <i>et al.</i> , 1992; Law <i>et al.</i> , 1993; Skuk <i>et al.</i> , 2007; Tremblay <i>et al.</i> , 1993)
Cellules CD133 ⁺	Autogreffe intramusculaire	Survie des cellules transplantées Pas d'effets secondaires	Pas besoin d'un traitement immunosuppressif	(Torrente <i>et al.</i> , 2007)
Mésoangioblastes	Allogreffe intra-artérielle	Pas d'effets secondaires Survie des cellules transplantées Progression de la maladie Aucune amélioration fonctionnelle des muscles Faible expression de la dystrophine du donneur	Besoin d'un traitement immunosuppressif	(Cossu <i>et al.</i> , 2015)

Tableau 4. Résultats des essais cliniques de transplantations de cellules souches musculaires dans des patients atteints de la DMD.

Enfin, il a été récemment démontré que des myoblastes dérivés d'ESCs humaines et de cellules iPS dystrophiques, dans lesquels l'expression du gène *MYOD* a été forcée, participent à la régénération musculaire (Goudenege et al. 2012). En effet, une fois transplantés dans des souris immunodéficientes *mdx*, ces cellules peuvent fusionner avec des fibres musculaires déjà existantes dans le muscle de l'hôte et peuvent se localiser dans le compartiment des cellules satellites. De plus, le nombre de myofibres humaines formées dans les muscles de souris transplantés est plus important après la greffe des myoblastes dérivés des cellules iPS qu'après injection des myoblastes isolés à partir de muscles squelettiques humains (Goudenege et al. 2012).

3. 3. Les essais cliniques pour traiter la DMD

3. 3. 1. Transplantation de myoblastes

Les essais cliniques pour traiter les patients atteints de DMD par thérapie cellulaire ont débuté dans les années 90 (**Tab. 4**). Une des premières études a été menée sur 3 garçons atteints de la DMD âgés de 9 à 10 ans dans lesquels 8 millions de myoblastes d'un donneur sain ont été injectés dans un des deux muscles courts extenseurs des orteils (Law et al. 1991). L'injection n'a entraîné aucune séquelle permanente. En revanche, les analyses ont montré que les muscles injectés par les myoblastes exprimaient la dystrophine du donneur. De plus, des caractéristiques cliniques de la DMD telles que, la scission des myofibres, les noyaux centraux dans les fibres, la nécrose induite par la phagocytose, les variations dans la taille et la forme des fibres, les infiltrations d'adipocytes et de tissus conjonctifs, étaient beaucoup moins présentes dans les muscles traités que dans les muscles contrôles n'ayant pas reçu l'injection de myoblastes. La même équipe a réalisé deux autres études cliniques de transferts de myoblastes par injections intramusculaires sur un nombre plus important de patients DMD âgés de 6 à 14 ans (Law et al. 1992, Law et al. 1993). Les résultats de ces études ont montré que le transfert de myoblastes était réalisable, n'était pas rejeté par les patients immunodéprimés et augmentait la force des muscles traités. L'année suivante, il a été démontré que l'efficacité du transfert de myoblastes de donneurs sains requiert un traitement immunosuppresseur des patients DMD traités (Tremblay et al. 1993).

Plus récemment, une étude clinique menée par l'équipe de Tremblay a montré que l'injection d'une grande quantité de cellules était possible et permettait d'induire l'expression sur le long terme de la dystrophine dans les muscles de patients traités (Skuk et al. 2006, Skuk

et al. 2007) (**Tab. 4**). Des progéniteurs musculaires provenant de patients sains ont été préalablement amplifiés puis transplantés dans les biceps bronchiaux et dans une partie du muscle gastrocnémien de patients DMD âgés de 26 ans. La transplantation cellulaire a bien été tolérée par les patients et n'a causé aucune séquelle permanente. 27.5% et 34.5% des myofibres du muscle gastrocnémien greffé ont exprimé la dystrophine du donneur à 1 et 18 mois post-transplantation respectivement. Bien que prometteuse, cette méthode de transplantation intramusculaire est cependant restreinte aux muscles squelettiques de la surface du corps.

3. 3. 2. Transplantation de cellules CD133⁺

Comme évoqué dans le chapitre 1 partie 2. 6, les cellules CD133⁺ ont un potentiel myogénique plus important que les myoblastes ce qui les rend très intéressantes pour les thérapies cellulaires. Deux études précliniques basées sur l'injection intramusculaire des cellules CD133⁺ humaines, génétiquement modifiées pour exprimer la dystrophine fonctionnelle, ont été réalisées sur des modèles de souris dystrophiques (Benchaouir et al. 2007, Meregalli et al. 2015). L'expression de la dystrophine a été restaurée dans les deux études. De manière intéressante, l'injection intra-artérielle de ces mêmes cellules a aussi permis de restaurer l'expression de la dystrophine, la morphologie et les fonctions des muscles des souris dystrophiques (Benchaouir et al. 2007).

Une étude clinique impliquant les cellules CD133⁺ a été récemment menée (**Tab. 4**). En effet, des cellules autologues CD133⁺, extraites à partir de biopsies musculaires de 1 gramme, ont été injectées par voie intramusculaire à 8 garçons atteints de la DMD (Torrente et al. 2007). Ces cellules n'ont pas été génétiquement modifiées et les enfants n'ont pas reçu de traitement immunosuppresseur. La transplantation cellulaire n'a causé aucun effet indésirable. Les cellules injectées ont survécu dans les muscles des patients et le nombre de capillaires par fibre musculaire a augmenté. Pour la première fois, ces résultats montrent que les cellules CD133⁺ provenant du patient à traiter peuvent être réimplantées et restent fonctionnelles 7 mois après la transplantation. L'étape suivante est d'introduire le gène de la dystrophine dans des cellules CD133⁺ isolées à partir d'un patient malade et de les injecter de manière systémique dans le même patient afin de restaurer l'expression de la dystrophine et de reconstruire des muscles squelettiques fonctionnels.

3. 3. 3. Transplantation des mésoangioblastes

Plusieurs études précliniques ont prouvé la faisabilité de la greffe de mésoangioblastes dans des muscles de souris (Sampaolesi et al. 2003, Tedesco et al. 2011) ou de chiens dystrophiques (Sampaolesi et al. 2006). Pour la première fois, des mésoangioblastes humains, provenant de donneurs sains compatibles, ont été injectés de manière intra-artérielle dans 5 patients DMD sous traitement immunosuppresseur (Cossu et al. 2015) (**Tab. 4**). Premièrement, tous les patients ont survécu aux injections de mésoangioblastes. Deuxièmement, aucun effet secondaire grave n'a été induit par la transplantation cellulaire. Troisièmement, la maladie a progressé dans 4 des 5 patients traités et aucune amélioration fonctionnelle des muscles squelettiques n'a été notée. De plus, seulement de faibles quantités d'ADN et d'expression de la dystrophine du donneur ont été détectées dans les biopsies musculaires de 4 patients. Malgré tout, cette étude montre que la transplantation de mésoangioblastes est possible chez l'humain et est bien supportée par les patients DMD.

La thérapie cellulaire par autogreffe est privilégiée pour traiter les patients atteints de la DMD car elle ne nécessite pas l'utilisation d'un traitement immunosuppresseur. Dans ce cas, elle doit être combinée avec une approche génétique dont le but est de corriger la mutation du gène de la dystrophine dans les cellules à transplanter.

Cependant, les thérapies cellulaires et génétiques ne sont pas suffisantes pour guérir les enfants dystrophiques puisque aucun traitement curatif n'existe à ce jour. Une des causes envisageables de l'inefficacité des traitements est l'accumulation intramusculaire de cellules non myogéniques, tels que des adipocytes et des cellules exprimant les protéines de la matrice extracellulaire, qui préviennent la formation de fibres musculaires fonctionnelles.

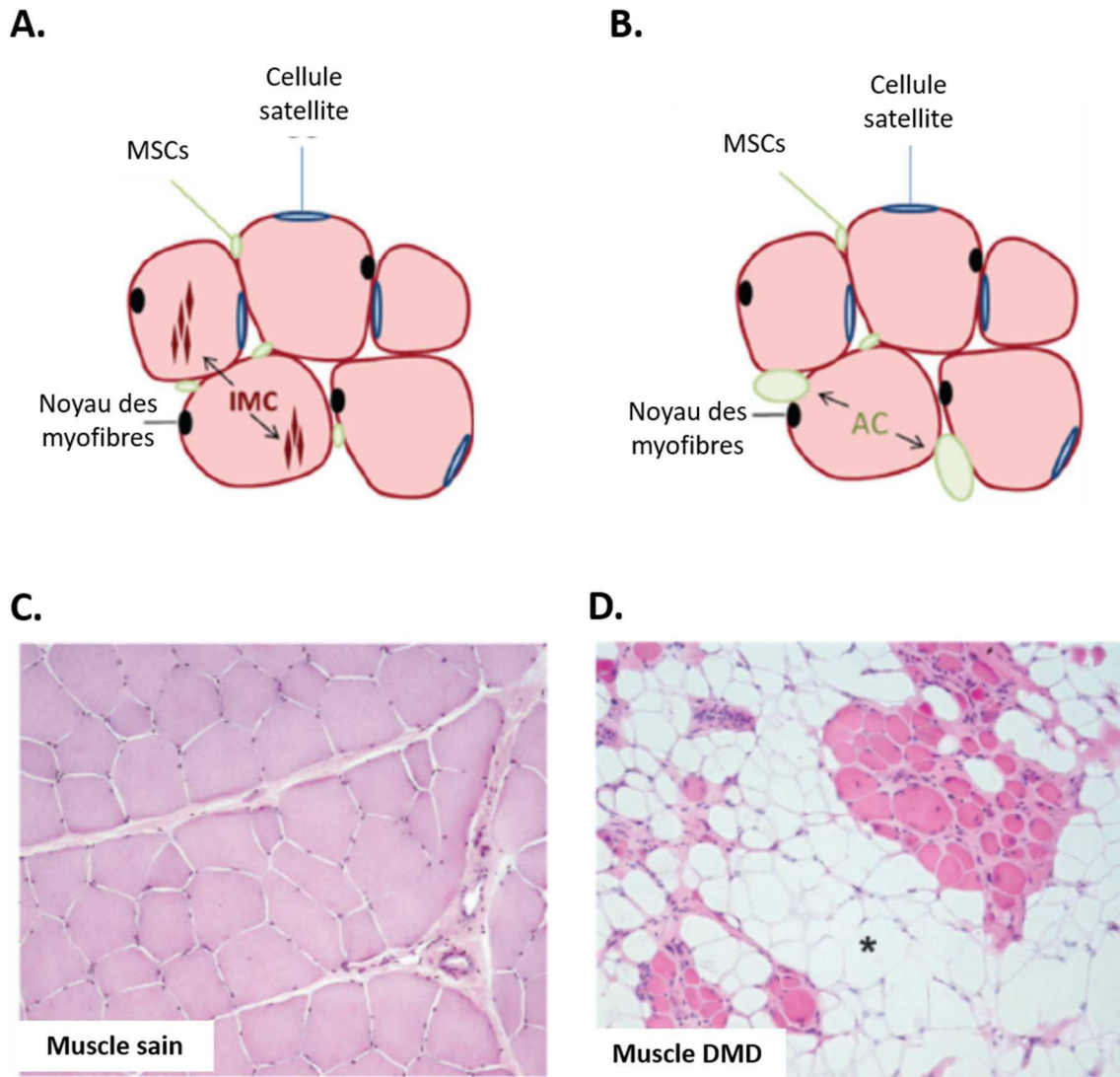


Figure 15. Adipocytes et gouttelettes intramusculaires. (A) et (B). Les myofibres (en rose) sont multinucléées (noyaux noirs), possèdent des cellules satellites (en bleu) localisées sous la lamina basale, et sont entourées par des cellules interstitielles mésenchymateuses (MSCs en blanc). **(A).** Des gouttelettes lipidiques acellulaires (IMC, intramyocellular lipid) peuvent s'accumuler dans les myofibres. **(B).** En réponse à un traumatisme, des MSCs interstitielles peuvent se différencier en adipocytes (AC) contribuant à l'accumulation de gras intramusculaire. **(C) et (D).** Coupes histologiques transversales de muscles squelettiques humains. **(C).** Muscle squelettique d'un sujet sain présentant des myofibres de taille normale et proches les unes des autres. Les fibres musculaires sont séparées par une fine couche de tissu conjonctif (endomysium) et sont groupées en faisceaux séparés par le périmysium. **(D).** Muscle squelettique d'un patient DMD présentant une perte sévère et une réduction de la taille des myofibres. Une forte infiltration d'adipocytes (astérisque) est observée entre les myofibres. (Skuk 2004, Hamrick, McGee-Lawrence, and Frechette 2016)

Chapitre 3. Les progéniteurs fibro-adipogéniques : source des dépôts graisseux et fibrotiques intramusculaires

1. Dépôts graisseux et fibrotiques dans les muscles squelettiques

Les blessures chroniques que subissent les muscles dystrophiques compromettent la capacité du tissu à cicatriser entraînant la formation de dépôts ectopiques osseux, fibrotiques et graisseux qui remplacent les fibres défectueuses et nécrosées (Sciorati et al. 2015).

1. 1. Adipocytes et gouttelettes lipidiques intramusculaires

Le gras musculaire inclue les gouttelettes lipidiques acellulaires présentes dans les myofibres (**Fig. 15A**) ainsi que les adipocytes interstitiels (**Fig. 15B**) caractérisés par des gouttes de triglycérides et d'ester de cholestérol et par l'expression des facteurs de transcription PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) et FABP4 (fatty acid-binding protein 4), des hormones leptine et adiponectine, et de la protéine structurale périlipine (Vettor et al. 2009, Schulz et al. 2011). Le gras intra- et inter- fibrillaire est le plus souvent blanc mais des adipocytes bruns ont également été identifiés chez la souris (Schulz et al. 2011). Les adipocytes bruns expriment la protéine UCP1 (uncoupling protein 1) et sont caractérisés par une respiration découplée utile lorsque les muscles squelettiques ne peuvent pas produire de chaleur pendant un exercice physique (Enerbäck 2010a).

L'infiltration intramusculaire d'adipocytes est une caractéristique des muscles de souris mutantes dans lesquelles les cellules satellites ont perdu leur fonction suite à la déplétion des gènes *Pax7* (Kuang et al. 2006), de la myogénine (Hasty et al. 1993) ou *MyoD* (Rudnicki et al. 1992). C'est aussi une caractéristique histopathologique des dystrophies musculaires (chapitre 2, partie 2. 1), des myopathies inflammatoires (Reimers and Finkenstaedt 1997), de la sarcopénie (chapitre 2, partie 1. 1), de l'obésité, des diabètes et d'autres maladies métaboliques (Greco et al. 2002, Hilton et al. 2008).

Chez les patients DMD, le gras intramusculaire peut représenter jusqu'à la moitié de la masse musculaire des jeunes garçons (Gaeta et al. 2012) (**Fig. 15C et 15D**). Grâce à l'imagerie

par résonance magnétique (IRM), l'évaluation du contenu en gras musculaire est un biomarqueur de la progression de la DMD et permet de mesurer l'efficacité d'un traitement lors d'essais cliniques (Gaeta et al. 2012, Kim et al. 2013, Wren et al. 2008).

Pour étudier la formation des dépôts graisseux dans les muscles de souris, l'injection de glycérol est la méthode la plus couramment utilisée (Pisani, Bottema, et al. 2010). L'adipogenèse peut aussi être détectée après injection d'une myotoxine, la cardiotoxine, ou après blessure induite au froid et dépend du fond génétique de la souche de souris (Lukjanenko et al. 2013, Wagatsuma 2007). Ces résultats indiquent que l'activation des cellules responsables des dépôts graisseux dans les muscles pourrait être une caractéristique du processus de régénération et qu'il y aurait des interactions entre les précurseurs des adipocytes et les cellules du lignage myogénique. De plus, l'ablation des cellules adipogéniques du muscle altère la régénération suggérant que les pré-adipocytes intramusculaires sont importants pour l'homéostasie du muscle squelettique (Liu et al. 2012, Uezumi, Ikemoto-Uezumi, and Tsuchida 2014). Il est donc important d'examiner les facteurs qui influencent le choix entre régénération et dépôts adipogéniques dans le tissu musculaire.

Parmi les facteurs, molécules et signalisation influençant l'adipogenèse intramusculaire, nous pouvons citer la voie Wnt puisque l'inhibition ou la déficience de l'activité de cette voie sont impliquées dans la formation d'adipocytes dans les muscles en réponse à divers types de dommages (Vertino et al. 2005, Itoigawa et al. 2011). De plus, l'activation de la signalisation Wnt est inhibée dans les muscles âgés (Vertino et al. 2005). Ces résultats suggèrent que la voie Wnt a un rôle protecteur contre l'adipogenèse intramusculaire. La myostatine est un facteur membre de la famille TGF β et régule négativement la croissance musculaire (Carnac, Vernus, and Bonniou 2007). En plus d'avoir une hypertrophie et une hyperplasie des fibres musculaires, les souris déficientes pour la myostatine présentent une réduction de l'accumulation de graisse intramusculaire liée à l'âge (McPherron and Lee 2002). L'adipogenèse intramusculaire est inhibée par la signalisation impliquant le récepteur BMPRI1A (bone morphogenic protéin receptor type 1A) indiquant que les BMPs, autres facteurs de la famille TGF β , peuvent aussi réguler la formation d'adipocytes dans le muscle (Huang et al. 2014). L'oxyde nitrique est une molécule importante pour la structure du muscle et contrôle de nombreuses fonctions musculaires (Filippin et al. 2009). Entre autres, l'adipogenèse intramusculaire de souris dystrophiques est inhibée par l'action de l'oxyde nitrique (Cordani et al. 2014). Les histones déacétylases (HDACs, histone deacetylases) sont des enzymes régulant l'expression de nombreux gènes dont celle de gènes spécifiquement exprimés dans le muscle comme la follistatine (Iezzi et al. 2004). Le traitement de souris *mdx* avec un inhibiteur HDAC améliore

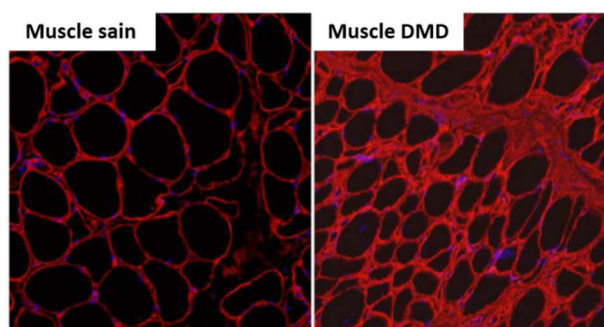


Figure 16. Dépôts de collagène intramusculaires. Immunohistochimie du collagène IV (en rouge) d'une coupe transversale d'un muscle squelettique provenant d'un sujet sain (à gauche) ou d'un patient DMD (à droite). Le muscle DMD présente une augmentation de dépôts de collagène de l'endomysium comparé au muscle sain. (Zhou and Lu 2010)

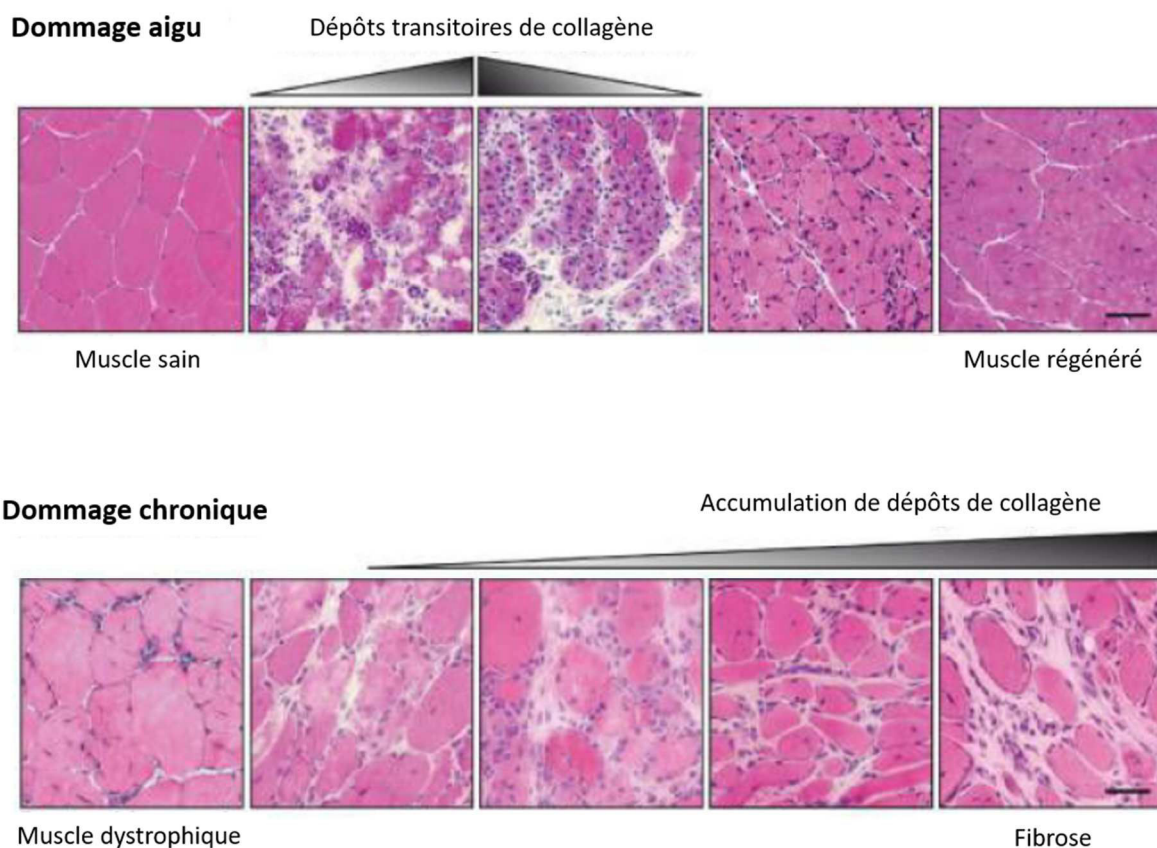


Figure 17. Dépôts d'ECM après un dommage aigu ou chronique. Suite à une blessure aiguë, des dépôts transitoires de collagène sont observés dans le muscle squelettique. En réponse à un dommage chronique, une accumulation intramusculaire de dépôts de collagène est visible entraînant la formation de tissus fibrotiques dans les muscles dystrophiques. (Mann et al. 2011)

la physiopathologie de la dystrophie en stimulant la régénération et en empêchant la fibrose et la graisse de s'installer dans les muscles (Colussi et al. 2008, Minetti et al. 2006).

1. 2. La matrice extracellulaire et les myofibroblastes

La fibrose est définie comme un dépôt excessif et incontrôlé des composants de la matrice extracellulaire (ECM, extracellular matrix) et est une des conséquences de la déficience des processus de réparation induite par une blessure dans plusieurs types de tissus tels que le muscle squelettique, le foie, les poumons, les reins et le pancréas (Kharraz et al. 2014). Dans le muscle squelettique, la fibrose est souvent associée aux dystrophies musculaires telles que la DMD (Zhou and Lu 2010) (**Fig. 16**). Une étude réalisée sur 25 patients DMD suivis pendant 10 ans a montré que la fibrose endomysiale est le seul paramètre myopathologique significativement corrélé à un mauvais pronostic moteur du malade mesuré selon la force musculaire et l'âge auquel le patient a perdu la capacité de marcher (Desguerre et al. 2009). Ce résultat pourrait supporter la notion que la fibrose endomysiale contribue directement au dysfonctionnement progressif des muscles et au phénotype létal de la DMD.

La régénération musculaire requiert la migration et la prolifération de fibroblastes pour produire de manière temporaire de nouvelles protéines de l'ECM comme les collagènes de type I et de type III, la fibronectine, l'élastine, les protéoglycans et la laminine (Serrano et al. 2011) (**Fig. 17**). Ces protéines ont pour but de stabiliser le tissu en régénération, elles servent d'échafaud pour la formation de nouvelles fibres musculaires et participent à la génération des jonctions neuromusculaires. La formation et la dégradation de l'ECM sont réalisées par diverses protéases et leurs inhibiteurs spécifiques exprimés au cours de la régénération musculaire. La dégradation de l'ECM mène également à la formation de fragments protéiques nécessaires pour faciliter la réparation normale du tissu au niveau du site endommagé (Chen and Li 2009).

Lorsque le tissu conjonctif est endommagé, les fibroblastes activés produisent des composants de l'ECM en réponse à des cytokines pro-fibrotiques telles que TGF β (Serrano et al. 2011) (**Fig. 18**). Un aspect important de la biologie des fibroblastes est, qu'une fois activés, ils sont identifiés par l'augmentation de l'expression d' α SMA. α SMA est une protéine contractile organisée en fibres de stress qui se connectent à l'ECM par des adhésions focales en plus des jonctions adhérentes. Ainsi, ces fibres de stress α SMA exercent une tension mécanique sur l'ECM qui, à son tour, fournit un support résistant mécanique. Ce phénotype contractile confère aux fibroblastes activés le nom de myofibroblastes.

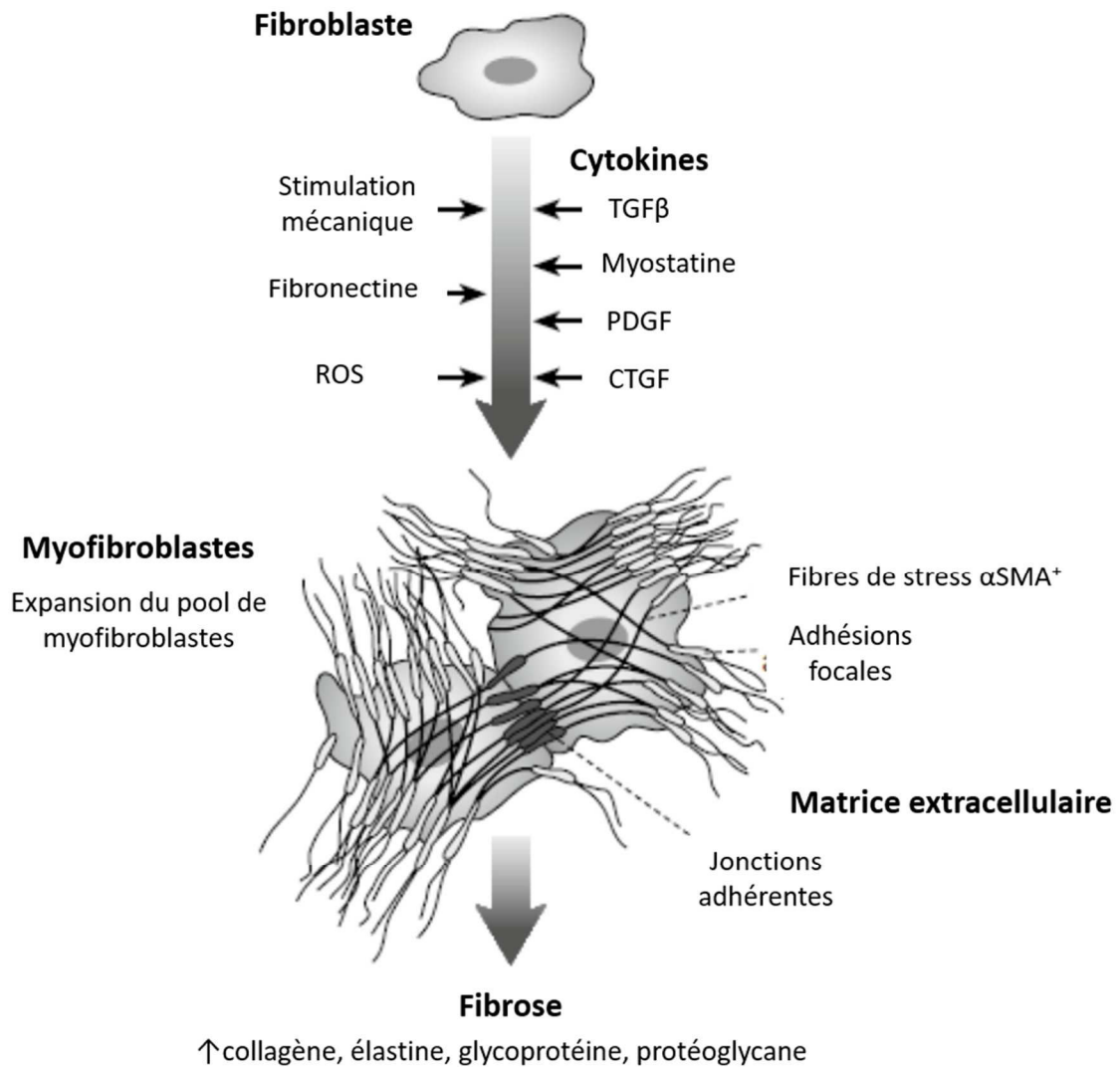


Figure 18. Induction de la différenciation des fibroblastes tissulaire en myofibroblastes.

La stimulation mécanique, la fibronectine et/ou les ROS (reactive oxygen species) activent la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes qui sont caractérisés par la présence de filaments contractiles exprimant α SMA. La stabilité mécanique est générée par les adhésions focales permettant l’ancrage des fibres dans la membrane cellulaire. De nombreux facteurs de croissances et autres molécules stimulent la synthèse de collagène. Parmi eux, les plus importants sont le TGF β , la myostatine, PDGF et CTGF (connective tissue growth factor). Ces facteurs induisent aussi la prolifération des fibroblastes et des myofibroblastes qui se connectent *via* les jonctions adhérentes. Les propriétés contractiles des myofibroblastes sont importantes pour la contraction du tissu fibrotique. Ces mécanismes entraînent une stimulation de la production de collagène, d’élastine, de glycoprotéine et de protéoglycane. Le remodelage de la matrice extracellulaire mène à la conversion fibrotique du tissu conjonctif. (Klingler et al. 2012)

La persistance des myofibroblastes serait responsable d'un large éventail de maladies fibrotiques comme la fibrose pulmonaire (Glasser et al. 2016) et la sclérodermie (Pattanaik et al. 2015). Cependant, l'existence de ces myofibroblastes dans les muscles squelettiques est encore controversée, et on parle plutôt de fibroblastes matures produisant activement des composants de l'ECM. Néanmoins, pour être en accord avec la littérature, j'utiliserai le terme myofibroblastes musculaires dans la suite de ce manuscrit.

TGF β est le facteur pro-fibrotique le plus puissant et le régulateur majeur de la cicatrisation et du développement de la fibrose tissulaire (**Fig. 18**). Trois isoformes de TGF β existent : TGF β 1, TGF β 2 et TGF β 3, toutes générées initialement comme des précurseurs latents (Zhou et al. 2006). Les molécules de TGF β actives, produites à partir de précurseurs par protéolyse, se fixent à un complexe hétérodimérique composé d'un récepteur TGF β de type I (ALK5, activin linked kinase 5) et d'un récepteur TGF β de type II. Dans la voie TGF β canonique, la fixation du ligand sur le récepteur hétérodimérique induit ALK5 à phosphoryler Smad2 et Smad3, qui en retour, se lient à Smad4. Enfin, le complexe Smad2/3/4 migre dans le noyau pour activer la transcription (Bonniaud et al. 2005). La signalisation ALK5/Smad est considérée comme la voie principalement activée en réponse aux facteurs TGF β dans les fibroblastes. TGF β est exprimé dans les muscles sains mais plus faiblement que dans les muscles dystrophiques de patients DMD où une fibrose musculaire s'installe autour des myofibres probablement *via* la stimulation des fibroblastes pour produire des protéines de l'ECM (Pessina et al. 2015). L'antagonisme de la signalisation TGF β par divers agents thérapeutiques permet d'inhiber la fibrose et d'améliorer la régénération musculaire dans différents modèles animaux et expérimentaux. Par exemple, l'injection d'un inhibiteur spécifique d'ALK5, LY2157299, dans des muscles de souris *mdx* a permis de réduire la fibrose musculaire et de stimuler la taille des myofibres et la vascularisation des muscles traités (Pessina et al. 2015). D'autres facteurs de croissance sont capables d'induire des changements fibrotiques dans les muscles tels que ceux appartenant à la famille PDGF (platelet-derived growth factor) qui inclue PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC et PDGF-DD (Bonner 2004). Ces ligands se fixent sur les deux récepteurs à tyrosine kinase, PDGFR α et β . Comme pour TGF β , les PDGFs et leurs récepteurs sont plus fortement exprimés dans les fibres en régénération des muscles de patients DMD et dans ceux des souris *mdx*. L'utilisation de l'imatinib, inhibiteur chimique des récepteurs à tyrosine kinase, entraîne la réduction de la fibrose dans le diaphragme des souris *mdx* (Huang et al. 2009). La myostatine peut également directement réguler l'activation des fibroblastes musculaires et favoriser la progression de la fibrose (Li, Kollias, and Wagner 2008). Il a été démontré que les souris déficientes pour la

myostatine développent moins de fibrose et présentent une meilleure régénération musculaire après le dommage que les souris témoins (Zhu et al. 2007). En accord avec ce résultat, la fibrose est réduite dans le diaphragme des souris *mdx* invalidée pour l'expression de la myostatine comparée aux muscles de souris *mdx* exprimant normalement la myostatine (Wagner et al. 2002). De même, la neutralisation immunologique de la myostatine dans les souris *mdx* atténue la dystrophie en améliorant la régénération musculaire et en réduisant l'accumulation des protéines de l'ECM (McCroskery et al. 2005).

La formation des dépôts adipogéniques et fibrotiques intramusculaires est contrôlée par divers facteurs de croissance ou autres molécules solubles présents dans le microenvironnement. Ces molécules sécrétées peuvent provenir des cellules musculaires (cellules souches myogéniques, MSCs interstitielles, fibroblastes, fibres musculaires en nécrose ou en régénération), de l'ECM, et/ou des cellules infiltrant le muscle squelettique en provenance du système sanguin telles que les cellules immunitaires incluant les macrophages.

2. Les macrophages : régulateurs de l'adipogenèse et de la fibrose musculaire

Avant de définir les rôles des macrophages dans l'adipogenèse et la fibrose musculaire, il semble important de définir exactement l'implication de ces cellules immunitaires dans la régénération musculaire et dans la physiopathologie de la DMD.

2. 1. Les macrophages au cours de la régénération musculaire

L'inflammation a toujours été associée au processus de régénération musculaire et son action est plus ou moins prononcée dans les muscles squelettiques selon l'étendue et le type du dommage. La présence des cellules inflammatoires, en particulier les macrophages, a été décrite dans de nombreux modèles expérimentaux depuis plus de 35 ans. A partir des années 2000, les nouvelles technologies, incluant la transgénèse des souris et l'isolement des populations cellulaires à partir des muscles squelettiques, ont permis l'analyse poussée des phénotypes et des fonctions des cellules immunitaires au cours de la réparation musculaire et de démontrer l'importance des macrophages dans ce processus (Saclier, Cuvellier, et al. 2013).

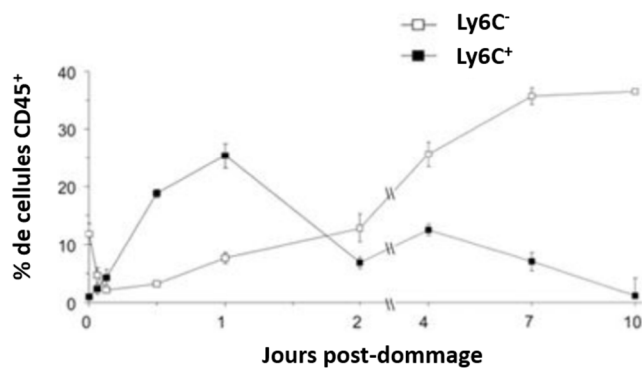
2. 1. 1. Cinétique des macrophages au cours de la régénération musculaire

Les macrophages sont à peine détectables dans le muscle squelettique adulte normal. Ils sont localisés dans l'espace interstitiel mais sont plus présents dans le pérymysium et l'épimysium où ils résident à proximité des vaisseaux et des capillaires (McLennan 1993, Honda, Kimura, and Rostami 1990, Pimorady-Esfahani, Grounds, and McMenamin 1997). Les macrophages dérivent principalement des monocytes sanguins qui traversent la barrière endothéliale des vaisseaux pour envahir les tissus. Ils apparaissent dans les zones endommagées des muscles quelques heures après la blessure induite par des toxines (Seibel et al. 1978, Yarom et al. 1976, McLennan 1996), par une excision partielle du muscle (Roth and Oron 1985) ou par un exercice excentrique (Armstrong, Ogilvie, and Schwane 1983, Armstrong 1986). Comme indiqué dans le chapitre 1 partie 1. 2. 2, les neutrophiles sont les premiers leucocytes à apparaître dans les zones endommagées et disparaissent après 36-24 heures. A l'inverse, le nombre de macrophages augmente en continu au cours de cette période (Smith et al. 2008). En effet, le nombre de macrophages augmente 30 à 50 fois et 150 à 200 fois au jour 1 et aux jours 3 et 4 respectivement après blessure par la cardiotoxine, qui est le modèle le plus inflammatoire (Arnold et al. 2007, Martinez et al. 2010). Les macrophages persistent dans les muscles squelettiques tout au long du processus de régénération. Peu de temps après la blessure, les macrophages sont les premiers à être associés aux myofibres nécrotiques pour phagocyter les fibres endommagées et les débris musculaires. Une fois la phagocytose terminée, les macrophages sont encore en plus grand nombre dans les zones en régénération et sont fortement associés aux progéniteurs myogéniques et aux myofibres nouvellement formées. Lorsque la différenciation et la fusion des myoblastes sont terminées, le nombre de macrophages chute (McLennan 1996, Arnold et al. 2007).

2. 1. 2. Phénotypes des macrophages au cours de la régénération musculaire

Les premières analyses des cellules inflammatoires au cours de la régénération musculaire ont révélé que plusieurs types de macrophages étaient présents dans les muscles squelettiques. Des études effectuées sur les rats ont montré que les macrophages exprimant ED2 (aussi nommé CD163) sont des macrophages résidents et ne sont pas impliqués dans la phagocytose des myofibres nécrotiques (McLennan 1993). Peu de temps après la blessure, les macrophages exprimant ED1 (aussi appelé CD68), absents des muscles normaux, infiltrent les zones endommagées et phagocytent les débris musculaires. En revanche, les macrophages ED2⁺

A.



B.

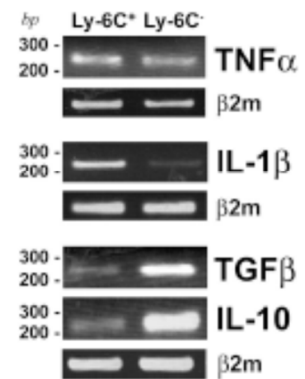
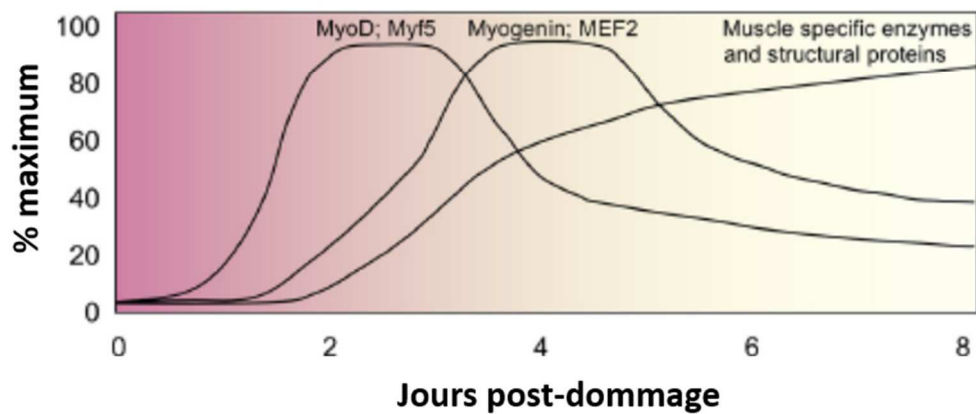
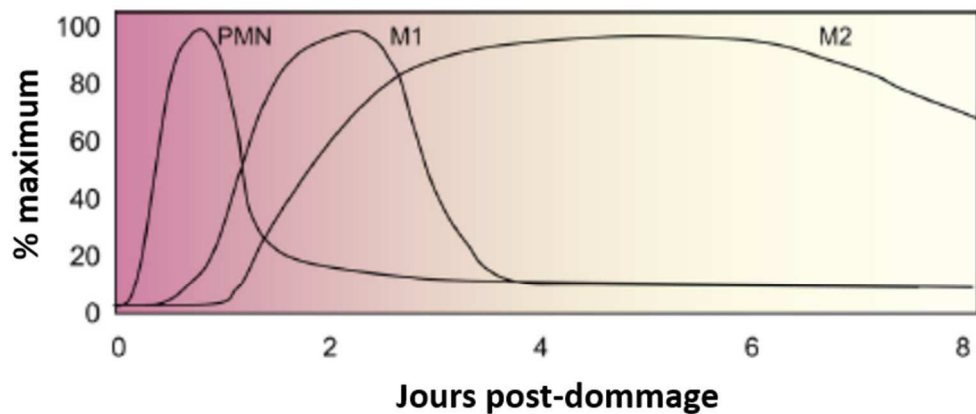


Figure 19. Apparition séquentielle des deux sous-populations de macrophages au cours de la régénération des muscles de souris. (A). Les cellules CD45⁺ présentes dans le muscle blessé ont été analysées par cytométrie en flux pour leur expression de Ly6C. Les résultats sont présentés comme le pourcentage de cellules CD45⁺. **(B).** Les expressions de TNF α , IL-1 β , TGF β et IL-10 ont été analysées par RT-PCR (reverse transcription -polymerase chain reaction) dans les populations cellulaires Ly6C⁺ et Ly6C⁻ 4 jours après la blessure. Le gène β 2-microglobulin (β 2m) a été utilisé comme gène de référence. (Arnold et al. 2007)

envahissent uniquement les zones en régénération non nécrotiques une fois que la phagocytose est terminée (McLennan 1996).

L'hétérogénéité des populations de macrophages et de monocytes a été plus largement étudiée par la suite chez la souris. Les monocytes de souris sont composés au moins de deux sous-populations phénotypiquement distinctes (Geissmann, Jung, and Littman 2003). La première sous-population exprime fortement la protéine de surface Ly6C (lymphocyte antigen 6 complex) et produit à des niveaux élevés les facteurs TNF α , IL-1 et l'oxyde nitrique. Ces cellules ont une durée de demi-vie courte au cours de la régénération tissulaire. La seconde sous-population de monocytes n'exprimant pas Ly6C est retrouvée dans les tissus enflammés et en repos et a un rôle pro-angiogénique (Yona and Jung 2010). Ces deux populations de monocytes peuvent infiltrer les tissus endommagés où ils se différencient en macrophages ou en cellules dendritiques qui auront des fonctions différentes (Auffray et al. 2007, Tacke et al. 2007, Nahrendorf et al. 2007). Peu de temps après la blessure, la population de monocytes Ly6C⁺ infiltre le muscle endommagé (Arnold et al. 2007, Perdiguero et al. 2011). Un jour après la lésion, cette population décline alors que le nombre de monocytes Ly6C⁻ augmente grâce à leur capacité de prolifération (**Fig. 19A**). Des analyses d'expression génique ont montré que les monocytes Ly6C⁺ expriment des niveaux élevés de TNF α et d'IL-1 β , tandis que les monocytes Ly6C⁻ expriment fortement l'IL-10 et TGF β (**Fig. 19B**). La présence séquentielle d'une population de macrophages pro-inflammatoires Ly6C⁺ puis de macrophages anti-inflammatoires Ly6C⁻ est suivie par l'apparition d'une autre population de macrophages dans laquelle l'expression à la fois des marqueurs pro- et anti-inflammatoires est atténuée (Perdiguero et al. 2011).

Dans les tissus humains, les macrophages adoptent aussi différents phénotypes en réponse aux stimuli présents dans l'environnement (Martinez et al. 2008, Mosser and Edwards 2008). Plusieurs états de polarisation des macrophages ont été décrits principalement grâce à des études *in vitro*. Chaque profil d'activation est défini par l'expression d'un panel de marqueurs incluant des cytokines, des facteurs de croissance et des antigènes de surface (Biswas and Mantovani 2010). L'existence de ces phénotypes *in vivo* a été peu testée mais il est très probable que les macrophages présentent de nombreux phénotypes qui varient selon les 4 principaux états d'activation décrits *in vitro* (Mosser and Edwards 2008, Biswas and Mantovani 2010). Dans un premier temps, deux types de polarisation ont été identifiés. L'activation classique des macrophages pro-inflammatoires (M1) est induite par des fractions de bactéries telles que le lipopolysaccharide ou l'IFN γ (interferon gamma), les chémokines CXCL9 et CXCL10 (C-X-C motif chemokine ligand 9 ou 10), et les cytokines pro-inflammatoires (IL-1, TNF α , IL-6...).



- Période de l'invasion des muscles blessés par les cellules myéloïdes
- Phase proliférative de la régénération
- Phase précoce de la différenciation régénérative
- Phase terminale de la différenciation régénérative

Figure 20. Cinétiques des cellules myéloïdes et de l'expression des principaux gènes myogéniques au cours de la régénération musculaire de la souris. Les premières cellules à envahir le muscle blessé sont les neutrophiles (PMN). Un pic du nombre de macrophages M1 (M1) se produit deux jours après la lésion et est corrélé avec l'expression des gènes impliqués dans la prolifération des progéniteurs myogéniques (MyoD et Myf5). Puis, le nombre de macrophages M1 diminue et les macrophages M2 (M2) commencent à infiltrer le muscle à 2 jours post-dommage et restent à un niveau élevé jusqu'au jour 6. Pendant cette période, les gènes de la myogenèse (myogénine et MEF2) et ceux associés à la différenciation terminale des progéniteurs myogéniques sont exprimés. MEF2, myocyte enhancer factor 2 (autre nom de MRF4). (Tidball and Villalta 2010)

L'activation alternative des macrophages anti-inflammatoires (M2) est induite en réponse à l'IL-4. Les macrophages M2 expriment fortement les récepteurs au galactose et au mannose, l'IL-10, l'IL-12 et les chémokines CCL17, CCL22 et CCL24 (C-C motif chemokine ligand 17, 22 et 24). Dans un second temps, les macrophages M2 ont été subdivisés en macrophages M2a (activés en réponse à l'IL-4 ou l'IL-13) associés à la fibrogenèse et l'angiogenèse, M2b (activés en réponse aux complexes immuns en combinaison avec l'IL-1 β ou le lipopolysaccharide) et M2c (activés en réponse à l'IL-10 ou aux glucocorticoïdes) associés à la résolution de l'inflammation et de la réparation tissulaire (Martinez et al. 2008). La présence séquentielle des macrophages pro- et anti-inflammatoires a été récemment confirmée au cours de la régénération musculaire chez l'homme (Saclier, Yacoub-Youssef, et al. 2013). Le type de blessure utilisé dans cette étude consiste en une série de contractions excentriques volontaires associée à une électrostimulation. Sept jours après la blessure, les macrophages exprimant les marqueurs M1 (oxyde nitrique synthase et cyclooxygénase 2) et M2 (arginase 1, CD206 et CD163) sont observés dans 80% des zones en régénération, indiquant que les différentes sous-unités de macrophages sont présentes en même temps et aux mêmes endroits dans les muscles endommagés. Néanmoins, les macrophages M1 et M2 sont différentiellement associés aux zones en régénération contenant ou pas des cellules myogéniques exprimant la myogénine, facteur de transcription de la myogenèse terminale. Ainsi, les macrophages M1 sont retrouvés dans les zones en régénération contenant seulement des progéniteurs myogéniques en prolifération, et les macrophages M2 sont localisés dans les zones en régénération contenant des progéniteurs myogéniques exprimant la myogénine.

Pour résumer, la première étape de la régénération musculaire, caractérisée par la phagocytose des débris nécrotiques et l'expansion des cellules myogéniques, est associée à la présence de macrophages pro-inflammatoires M1 (Fig. 20). Puis, les étapes tardives de la régénération, où les cellules myogéniques se différencient en myofibres, sont caractérisées par la présence de macrophages anti-inflammatoires M2. La présence successive des sous-populations de macrophages suggère des rôles différents et séquentiels des macrophages M1 et M2 dans le processus myogénique au cours de la régénération musculaire.

2. 1. 3. Effets des macrophages polarisés sur les progéniteurs myogéniques

Comme les macrophages sont présents tout au long du processus de réparation, plusieurs études ont exploré leurs effets sur le lignage myogénique. Les premières études *in vitro* ont

montré que les macrophages et le milieu conditionné de macrophages stimulent la croissance des progéniteurs myogéniques (Chazaud et al. 2003, Cantini et al. 1994). A noter que les effets des macrophages sont plus importants lorsqu'ils sont en contact avec les progéniteurs myogéniques (Chazaud et al. 2003). Des signaux anti-apoptotiques en provenance des macrophages sont à l'origine de ces effets et sont plus efficaces sur les myotubes que sur les précurseurs (Sonnet et al. 2006). Leurs effets sur la fusion cellulaire ont aussi été débattus puisqu'il a été reporté que les macrophages pouvaient stimuler (Cantini et al. 1994, Cantini et al. 2002) ou inhiber/retarder la myogenèse (Merly et al. 1999). Des études récentes ont établi que les macrophages exercent des activités différentes sur les progéniteurs myogéniques en fonction de leur état inflammatoire. Les macrophages M1 stimulent la prolifération des progéniteurs myogéniques et inhibent leur fusion (Arnold et al. 2007, Saclier, Yacoub-Youssef, et al. 2013). A l'inverse, les macrophages M2a et M2b stimulent la myogenèse en favorisant l'engagement des progéniteurs myogéniques vers la différenciation terminale et la formation de gros myotubes (Saclier, Yacoub-Youssef, et al. 2013). En accord avec ce résultat, la déplétion *in vivo* des macrophages intramusculaires 5-6 jours après la blessure entraîne une diminution de la taille des myofibres nouvellement formées, confirmant le rôle des macrophages M2 dans la myogenèse et la régénération musculaire (Arnold et al. 2007). Il a été aussi observé que les macrophages M1 migrent plus efficacement vers les progéniteurs myogéniques confirmant une étude précédente qui montre que les macrophages migrent vers la zone blessée du muscle (Robertson et al. 1993). Enfin, les progéniteurs myogéniques migrent vers d'autres précurseurs ou vers les macrophages M2 mais très peu vers les macrophages M1 (Saclier, Yacoub-Youssef, et al. 2013), indiquant des interactions privilégiées entre les différents types de macrophages et les progéniteurs myogéniques.

Les macrophages sécrètent une grande variété de molécules, cytokines et facteurs de croissance. Certains d'entre eux ont été identifiés comme ayant des effets sur la prolifération des progéniteurs myogéniques tels que l'IL-6 (Cantini et al. 1995, Serrano et al. 2008) ou TNF α (Li 2003, Szalay, Rázga, and Duda 1997). Il a été démontré que les macrophages M1 empêchent la myogenèse à travers la sécrétion en grande quantité de TNF α , IL-6 et IL-1 β (Saclier, Yacoub-Youssef, et al. 2013). Le VEGF (vascular endothelial growth factor) est capable de stimuler la croissance des progéniteurs myogéniques (Saclier, Yacoub-Youssef, et al. 2013, Christov et al. 2007) et de favoriser la greffe des progéniteurs myogéniques transplantés dans le muscle squelettique (Lescaudron et al. 1999). Le G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor), qui est principalement sécrété par les macrophages M1 (Hamilton, Ohmori, and Tebo 2002), stimule la prolifération des progéniteurs myogéniques et est essentiel au processus de réparation

musculaire (Hara et al. 2011). Les progéniteurs myogéniques expriment un large éventail de récepteurs pour chémokines (Griffin et al. 2010), et les macrophages activés sécrètent des panels spécifiques de chémokines (Martinez et al. 2008, Mosser and Edwards 2008). Il est donc très probable que l'attraction réciproque entre les macrophages et les progéniteurs myogéniques implique l'action de chémokines. En effet, les macrophages expriment *in vivo* CXCL12 (De Paepe et al. 2004) et les progéniteurs myogéniques expriment le récepteur à CXCL12, CXCR4 (C-X-C motif chemokine receptor 4). De plus, CXCL12 augmente la migration des progéniteurs myogéniques, et la déplétion de CXCR4 dans ces mêmes précurseurs empêche leur fusion (Griffin et al. 2010). IGF-1 est un régulateur important de la masse musculaire (Musarò 2005). D'après une étude récente, les macrophages seraient la principale source d'IGF-1 dans les muscles en régénération (Lu et al. 2011). La sous-population de macrophages intramusculaires anti-inflammatoires Ly6C⁻ exprime fortement IGF-1 qui stimule la régénération musculaire (Lu et al. 2011) et affaiblit l'inflammation des muscles endommagés (Pelosi et al. 2007). De même, le blocage de la production d'IGF-1 par les macrophages réduit la capacité des cellules musculaires à se protéger contre l'atrophie (Dumont and Frenette 2010). Ces résultats fournissent une liste d'effecteurs moléculaires sécrétés par les macrophages à un temps donné de la régénération qui sont essentiels à la régulation des étapes séquentielles de la myogenèse incluant : l'expansion, la migration, la différenciation et la fusion des progéniteurs myogéniques en nouvelles structures multinucléées.

2. 1. 4. Transition du phénotype des macrophages au cours de la régénération musculaire

Plusieurs groupes ont démontré que le muscle squelettique blessé recrute par voie sanguine les monocytes Ly6C⁺ mais pas les monocytes Ly6C⁻ (Saclier, Cuvellier, et al. 2013). La déplétion des monocytes, seulement à partir de 2 jours après l'induction de la lésion, n'altère pas la régénération musculaire, indiquant qu'aucun monocyte n'est recruté en provenance du sang dans les muscles blessés après 2 jours post-dommage (Arnold et al. 2007). De plus, dans des souris déficientes pour une enzyme impliquée dans la maturation des macrophages, la régénération musculaire est altérée tandis que le nombre de macrophages ne varie pas (Kohno et al. 2011). Ces observations argumentent l'idée que les monocytes sont recrutés très tôt après la blessure puis subissent une maturation dans le tissu musculaire. Ensembles, ces résultats montrent que le muscle endommagé recrute par voie sanguine seulement la sous-population de monocytes pro-inflammatoires Ly6C⁺ qui est convertie en monocytes anti-inflammatoires Ly6C⁻ dans les muscles squelettiques au cours de la régénération.

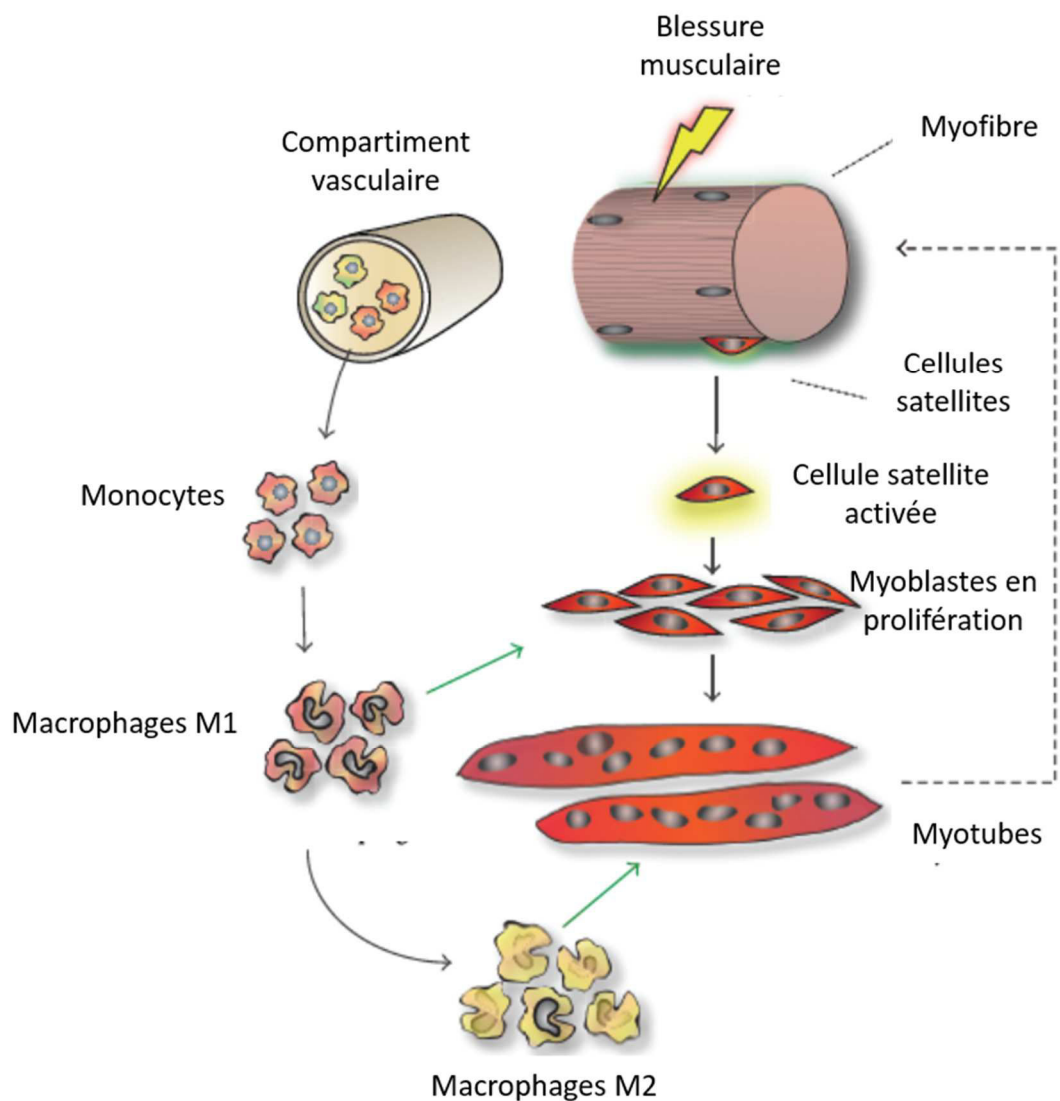


Figure 21. Polarisation des macrophages au cours de la réparation du muscle squelettique.

En réponse à une blessure, les cellules satellites sont activées, commencent à proliférer en tant que myoblastes puis fusionnent et se différencient en myotubes qui plus tard croîtront pour remplacer les myofibres endommagés. D'autres types cellulaires influencent le devenir de la régénération, en particulier les cellules inflammatoires en provenance du système sanguin. Par extravasation, les monocytes pro-inflammatoires envahissent rapidement les zones musculaires endommagées où ils se différencient en macrophages M1. Ces cellules phagocytent les débris cellulaires et les myofibres endommagés et produisent des cytokines stimulatrices de la prolifération des myoblastes. Dans les stades tardifs de la régénération, les macrophages M1 sont convertis localement en macrophages M2 qui stimulent la différenciation et la fusion des myoblastes. (Kharraz et al. 2013)

Les mécanismes moléculaires et cellulaires responsables de la transition du phénotype pro-inflammatoire vers le phénotype anti-inflammatoire des macrophages sont peu connus. L'augmentation de la signalisation pro-inflammatoire entraîne des défauts dans la régénération musculaire (Ruffell et al. 2009). D'autres études montrent qu'interférer dans la séquence des états de polarisation des macrophages altère aussi la réparation du muscle. Notamment, il semble essentiel que la phase pro-inflammatoire se produise avant la phase de transition vers un phénotype anti-inflammatoire. En effet, l'inhibition de l'IFN γ perturbe la fonction des macrophages et altère la régénération musculaire (Cheng et al. 2008). L'injection intramusculaire de l'IL-10 très tôt après la blessure diminue l'efficacité de la réparation du muscle, probablement en empêchant la prolifération des progéniteurs myogéniques (Perdiguero et al. 2011). A l'inverse, la neutralisation de l'IL-10 au cours des phases tardives de la régénération altère aussi la régénération (Perdiguero et al. 2011). La transition du phénotype des macrophages est partiellement contrôlée par la MAPK1 (mitogen-activated protein kinase phosphatase 1) (Perdiguero et al. 2011).

En résumé, les macrophages pro-inflammatoires M1 présents très tôt dans les muscles squelettiques blessés stimulent la prolifération des progéniteurs myogéniques. A partir de 3-4 jours post-blessure, les macrophages M1 sont convertis en macrophages anti-inflammatoires M2 dont le rôle est de stimuler la myogenèse des progéniteurs myogéniques (Fig. 21). Ces interactions cellulaires dépendent à la fois du contact ainsi que de la sécrétion d'un panel de facteurs solubles spécifique du type d'activation des macrophages. Ces résultats indiquent que les macrophages M1 et M2 ont des rôles distincts dans la régénération musculaire. Nous pouvons alors nous demander s'ils pourraient également réguler différemment l'adipogenèse et la fibrogenèse intramusculaires.

2. 2. Régulation de l'adipogenèse musculaire par les macrophages

L'absence ou l'altération du métabolisme des macrophages a des conséquences importantes sur la formation d'adipocytes dans le muscle squelettique. L'administration d'un inhibiteur au M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) et la réduction de la prolifération et de la différenciation des monocytes-macrophages induisent la formation d'adipocytes et le développement de dépôts de collagène intramusculaires dans un contexte de régénération (Segawa et al. 2008). L'incubation de MSCs isolées à partir de muscles squelettiques de souris

avec un milieu conditionné de macrophages entraîne une réduction de la différenciation des MSCs en adipocytes (Malerba et al. 2009). Les muscles dystrophiques sont envahis par des macrophages et pourraient alors contribuer localement au développement de dépôts d'adipocytes entre les fibres musculaires (Kharraz et al. 2013). En effet, des interventions thérapeutiques qui contrôlent la transition des macrophages M1 en macrophages M2 ont un effet bénéfique dans des modèles d'animaux dystrophiques et pourraient aussi réguler l'adipogenèse musculaire (Zordan et al. 2013, Rigamonti et al. 2013, Cordani et al. 2014). Les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de l'adipogenèse musculaire par les macrophages sont cependant peu connus.

2. 3. Régulation de la fibrose musculaire par les macrophages

La nature, la durée et l'intensité de la réponse inflammatoire dans les muscles en régénération influencent l'issue du processus de réparation tissulaire ainsi que de la fibrose musculaire, en particulier au cours de la progression de certaines dystrophies (Tidball 2005, Tidball and Villalta 2010, Wynn 2008). Par exemple, l'interférence de la réponse inflammatoire après une lésion aiguë affecterait négativement la phagocytose des fibres endommagées et mortes et par conséquent entraverait la formation du nouveau tissu musculaire, alors que la modulation de la forte inflammation chronique dans les muscles dystrophiques pourrait être bénéfique en réduisant la dégénérescence et la fibrose musculaire tout en améliorant la régénération (Segawa et al. 2008). Le rôle crucial des macrophages dans la régulation de la fibrogenèse des muscles dystrophiques a été démontré suite à la déplétion *in vivo* de macrophages dans des souris et dans des modèles d'animaux où le recrutement des macrophages est altéré (Segawa et al. 2008, Suelves et al. 2007, Wehling, Spencer, and Tidball 2001). Ces études sont étayées par d'autres travaux réalisés sur les souris *mdx* en utilisant des agents anti-inflammatoires agissant sur des cytokines telles que TNF α , ou sur d'autres voies pro-inflammatoires majeures comme celle de NF- κ B (Pelosi et al. 2007, Peterson and Guttridge 2008, Radley, Davies, and Grounds 2008). La conclusion générale de ces recherches est que la modulation de l'activité des macrophages peut améliorer la progression de la dystrophie musculaire.

Dans le cas de la fibrose tissulaire, les macrophages M2a sont considérés comme les plus importants, notamment de par leur production de molécules pro-fibrotiques comme le TGF β et CCL17 (voir paragraphe 3.1 3. 1.2). Il a été montré que CCL17, en se fixant sur son récepteur CXCR4, augmente la fibrose dans des modèles de souris atteintes de maladie pulmonaire (Yogo

et al. 2009). De plus, le nombre de macrophages M2a augmente dans le diaphragme des souris *mdx* tout au long de la progression de la maladie (Vidal et al. 2008). De manière similaire, la déplétion du fibrinogène dans les souris *mdx* entraîne la réduction de la fibrose et une diminution du nombre de macrophages M2a dans le diaphragme (Serrano et al. 2011). Dans les patients DMD, la fibrose musculaire est aussi associée à une augmentation du nombre de macrophages alternatifs (Desguerre et al. 2009).

Quand la régénération musculaire échoue comme chez les patients DMD, des adipocytes, des myofibroblastes et des macrophages envahissent les muscles dystrophiques. Différentes cellules d'origine mésenchymateuses ainsi que les cellules satellites sont capables de se différencier in vitro en adipocytes en présence de facteurs induisant l'adipogenèse (insuline, dexaméthasone, 3-isobutyl-1-méthylxanthine). Nous pouvons citer les MECs, les péricytes, les mésoangioblastes et les PICs (voir chapitre 1). Les myofibroblastes peuvent aussi avoir plusieurs origines telles que des cellules en provenance de la circulation ou de sites voisins qui, une fois dans le muscle, subissent une reprogrammation dans la zone endommagée. En réponse à des effecteurs spécifiques comme le TGF β , des fibroblastes résidant dans le muscle squelettique sont aussi une source des myofibroblastes. Bien qu'un nouveau marqueur des fibroblastes musculaires TCF4 (transcription factor 4) ait été récemment découvert (Mathew et al. 2011), il est difficile d'isoler une population pure de fibroblastes résidant dans les muscles squelettiques à cause du manque de marqueurs de surface spécifiques.

Récemment, il a été démontré que les dégénérescences adipogéniques et fibrotiques pourraient avoir en commun des précurseurs musculaires, les progéniteurs fibro-adipogéniques (FAPs). Grâce à leur caractère bipotent, les FAPs pourraient contribuer à la formation des dépôts adipeux et fibrotiques in vivo.

3. Les progéniteurs fibro-adipogéniques, FAPs

3. 1. Identification des FAPs

En 2009-2010, une population de progéniteurs adipogéniques résidant dans le muscle squelettique a été identifiée chez l'humain par deux équipes françaises dont la nôtre (Vauchez et al. 2009, Lecourt et al. 2010, Pisani, Clement, et al. 2010, Pisani, Dechesne, et al. 2010). Les

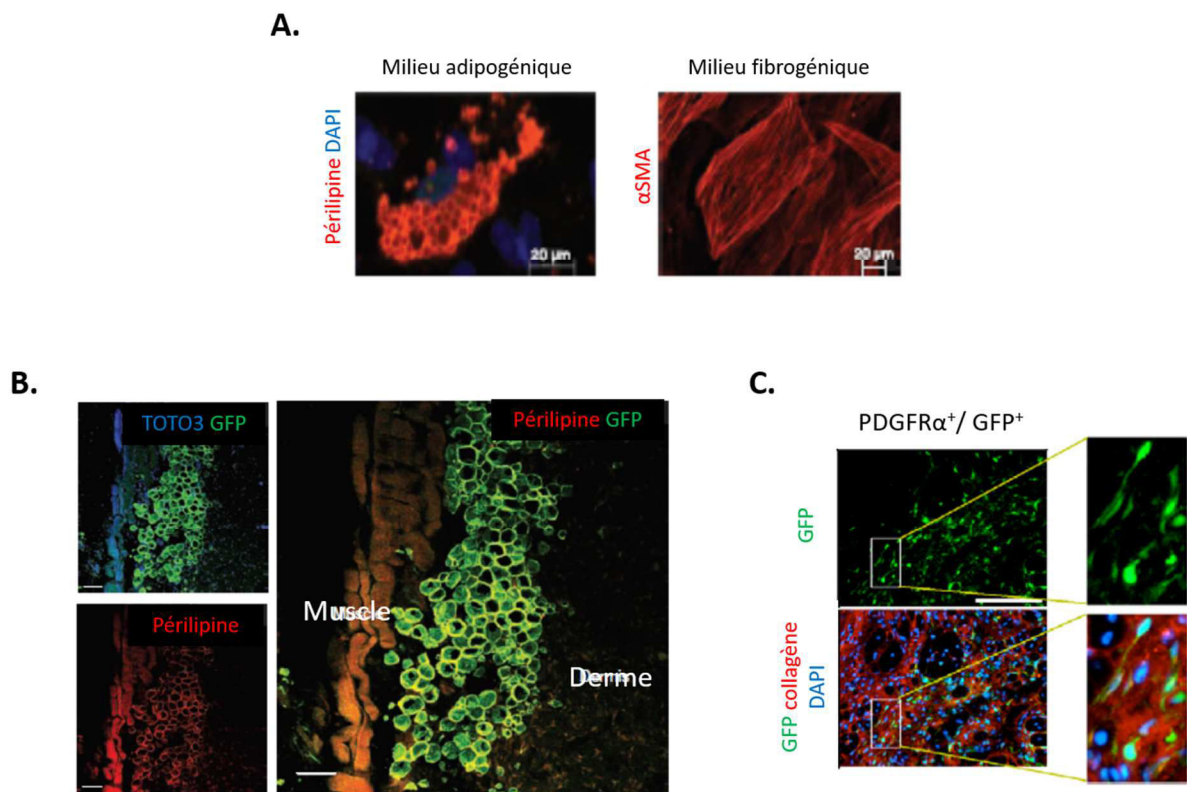


Figure 22. Potentiels de différenciation *in vitro* et *in vivo* des FAPs. (A). Après confluence, des FAPs isolés à partir de muscles humains sains ont été cultivés dans un milieu adipogénique (à gauche) ou dans un milieu fibrogénique (à droite). Les adipocytes ont été révélés par immunofluorescence avec un anticorps anti-perilipin. Les myofibroblastes sont visualisés par immunofluorescence avec un anticorps anti- α SMA. Barre d'échelle : 20 μ m. (Arrighi et al. 2015) (B). Des FAPs fraîchement isolés de muscles de souris exprimant la GFP ont été injectés de manière sous-cutanée dans des souris n'exprimant pas la GFP. Trois semaines plus tard, l'analyse de coupes longitudinales de muscles par microscopie confocale a révélé que les adipocytes GFP⁺ exprimant la perilipin sont localisés entre le muscle et le derme. Barre d'échelle : 50 μ m. (Joe et al. 2010) (C). Des FAPs isolés à partir de souris exprimant la GFP ont été injectés dans des muscles TA de souris n'exprimant pas la GFP. Deux semaines après la transplantation, des coupes transversales de muscles TA ont été analysées pour l'expression de la GFP et du collagène. Les FAPs GFP⁺ sont présents dans les zones musculaires exprimant fortement le collagène. Barre d'échelle : 100 μ m. (Uezumi et al. 2011)

progéniteurs musculaires adipogéniques se différencient en adipocytes blancs qui possèdent essentiellement les mêmes fonctions que les adipocytes issus des progéniteurs du tissu adipeux (Arrighi et al. 2015) (**Fig. 22A**). Cependant, les adipocytes d'origine musculaire sont résistants à l'insuline pour le transport du glucose, et la signalisation induite par l'insuline y est altérée (Arrighi et al. 2015). Le potentiel adipogénique de ces progéniteurs humains a également été démontré *in vivo* par notre équipe (Pisani, Dechesne, et al. 2010). De plus, outre leur potentiel adipogénique, ces cellules génèrent des myofibroblastes qui expriment α SMA et sécrètent des protéines de l'ECM en réponse au TGF β 1 (Arrighi et al. 2015, Uezumi et al. 2014) (**Fig. 22A**). Comme ces progéniteurs sont capables de se différencier en adipocytes, en myofibroblastes mais pas en myotubes, le nom de FAPs (fibro-adipogenic progenitors) leur a été donné. A noter que les FAPs humains possèdent aussi des potentiels ostéogéniques et chondrogéniques (Vauchez et al. 2009, Lecourt et al. 2010).

De tels progéniteurs fibro-adipogéniques ont aussi été identifiés dans les muscles squelettiques de souris (Joe et al. 2010, Uezumi et al. 2010). Dix jours après l'induction de la différenciation adipogénique, 90% des FAPs de souris se sont différenciés en adipocytes (Uezumi et al. 2010). De plus, une analyse clonale a révélé que 80% des clones possèdent un potentiel adipogénique (Uezumi et al. 2010). Par contre, une autre étude clonale a montré que 35% des colonies formées contiennent des adipocytes (Joe et al, 2010). Ces résultats contradictoires pourraient être dûs aux méthodes de purification des FAPs de souris et aux conditions de culture différentes entre les deux études. Comme pour les FAPs humains, l'adipogenèse des FAPs a été prouvée *in vivo* dans des modèles de souris où un environnement favorable à l'adipogenèse a été généré dans les muscles. Après isolation puis injection intramusculaire des FAPs marqués à la GFP (green fluorescent protein), des adipocytes GFP⁺ sont formés dans des muscles en régénération des souris receveuses n'exprimant pas la GFP (Uezumi et al. 2010, Joe et al. 2010) (**Fig. 22B**). En plus de leur potentiel adipogénique, les FAPs de souris sont capables de se différencier *in vitro* en myofibroblastes. Effectivement, 65% des colonies de FAPs contenaient des cellules exprimant la protéine α SMA (Joe et al. 2010). D'une manière intéressante, à la fois des adipocytes et des myofibroblastes peuvent être formés à partir d'un même clone démontrant la bipotentialité des FAPs (Joe et al. 2010). En réponse au TGF β , les FAPs expriment fortement une des protéines de l'ECM, le collagène de type I, et également α SMA (Uezumi et al. 2011). Des résultats similaires ont été récemment obtenus en stimulant les FAPs murins par la myostatine (Dong et al. 2016). Alors que les adipocytes sont facilement identifiables *in situ*, l'identification des myofibroblastes sur des coupes histologiques musculaires est plus compliquée de par l'absence de marqueurs de surface

FAPs de souris	FAPs humains
PDGFR α ⁺	ALDH ⁺
Sca-1 ⁺	PDGFR α ⁺
Tie2 ⁺	CD15 ⁺
CD29 ⁺	CD34 ⁺
CD90 ⁺	CD105 ⁺
CD13 ⁺	CD90 ⁺
CD34 ⁺	CD13 ⁺
	CD49 ⁺
	CD44 ⁺
	CD166 ⁺
	CD201 ⁺
α 7-integrin ⁻	
CD31 ⁻	CD56 ⁻
CD45 ⁻	CD82 ⁻
SM/C-2.6 ⁻	CD318 ⁻

Tableau 5. Phénotypes immunologiques des FAPs de souris et humains. Les marqueurs exprimés à la surface des FAPs sont en bleu et ceux qui ne le sont pas en rouge.

spécifiques. La conclusion que les FAPs sont les progéniteurs des myofibroblastes musculaires est essentiellement basée sur leur potentiel fibroblastique *in vitro*. Néanmoins, beaucoup de cellules PDGFR α^+ s'accumulent dans les zones de fibrose des muscles de souris dystrophiques (Uezumi et al. 2011) (**Fig. 22C**). De plus, la modulation de la quantité de FAPs dans des muscles de souris endommagés influence la fibrogenèse musculaire (Lemos et al. 2015, Fiore et al. 2016). Ces résultats suggèrent fortement l'implication *in vivo* des FAPs dans la formation des dépôts fibrotiques intramusculaires. Les FAPs de souris peuvent aussi se différencier en ostéoblastes et en cellules musculaires lisses dans des conditions de culture adéquates (Uezumi et al. 2010).

Les FAPs humains (Arrighi et al. 2015, Uezumi et al. 2014, Pisani, Clement, et al. 2010, Pisani, Dechesne, et al. 2010) et murins (Uezumi et al. 2010, Uezumi et al. 2011, Joe et al. 2010) sont incapables de former des myotubes *in vitro* et des myofibres *in vivo*. Les FAPs humains n'expriment pas le marqueur myogénique CD56 (Arrighi et al. 2015) et les FAPs de souris n'expriment pas les marqueurs des cellules satellites Pax7, MyoD et Myf5 (Uezumi et al. 2010). Ces résultats montrent que les FAPs ne dérivent pas du lignage myogénique.

3. 2. Purification des FAPs

In situ, les FAPs humains expriment les marqueurs de surface CD34 et possèdent une forte activité aldéhyde déshydrogénase (CD34⁺/ALDH⁺) (Pisani, Dechesne, et al. 2010, Pisani, Clement, et al. 2010, Vauchez et al. 2009) (**Tab. 5**). Après quelques jours de culture, ces cellules n'expriment plus CD34 et acquièrent l'expression de CD15 (Pisani, Dechesne, et al. 2010, Pisani, Clement, et al. 2010, Lecourt et al. 2010). Cependant, CD34 et CD15 ne sont pas des marqueurs spécifiques des FAPs humains. En effet, la molécule antigénique de carbohydrate CD15 présente sur certaines glycoprotéines est aussi exprimée par les cellules immatures du lignage monocyttaire et du lignage granulocytaire (van Lochem et al. 2004). Quant à la protéine CD34, elle est présente à la surface des précurseurs précoces du lignage myéloïde et lymphoïde. De plus, les cellules musculaires exprimant CD15 sont quasiment inexistantes dans la population totale des cellules fraîchement isolées à partir de biopsies musculaires humaines (Lecourt et al. 2010), et l'expression du marqueur CD34 est perdue une fois les cellules mises en culture (Vauchez *et al.*, 2009). Pour détecter la présence de ces précurseurs adipogéniques *in situ* chez l'homme, il était donc important de découvrir un autre marqueur plus sélectif de ces progéniteurs qui soit également conservé *in vitro*. Récemment, l'équipe d'Uezumi a démontré que les FAPs humains expriment le marqueur de surface PDGFR α (Uezumi et al.

2014). En accord avec ces résultats, notre équipe a démontré que CD15 et PDGFR α marquent la même population de progéniteurs musculaires fibro-adipogéniques indiquant que l'anticorps anti-PDGFR α peut être utilisé pour purifier les FAPs à partir de biopsies musculaires humaines (Arrighi et al. 2015). Ces progéniteurs humains expriment à leur surface plusieurs marqueurs mésenchymateux tels que CD13, CD34, CD44, CD49, CD90, CD105 et CD166 (Pisani, Clement, et al. 2010, Pisani, Dechesne, et al. 2010, Lecourt et al. 2010, Uezumi et al. 2014) (**Tab. 5**). Récemment, un nouveau marqueur de surface de ces cellules a été découvert CD201, qui n'est pas exprimé par les progéniteurs myogéniques (Uezumi et al. 2016).

Deux méthodes par cytométrie en flux sont utilisées pour purifier les FAPs à partir de biopsies musculaires de souris. La première stratégie est basée sur les absences d'expression du marqueur endothélial CD31, du marqueur hématopoïétique CD45 et du marqueur myogénique SM/C-2.6 (Uezumi et al. 2010). D'une manière intéressante, les FAPs CD31⁻/CD45⁻/SM/C-2.6⁻ exprimant le marqueur de surface mésenchymateux PDGFR α sont capables de donner des adipocytes *in vitro* (**Tab. 5**). Les FAPs de souris expriment également le gène *Tie2* (Uezumi et al. 2010, Biswas and Goldhamer 2016) décrit pour identifier les progéniteurs mésenchymateux, les cellules endothéliales et une sous-population de cellules hématopoïétiques (De Palma et al. 2005). De plus, l'analyse phénotypique de ces FAPs fraîchement isolés indique qu'ils sont similaires à des MSCs puisque la majorité de ces cellules exprime à leur surface CD29, Sca-1 et CD90, CD13 et CD34 (Uezumi et al. 2010). La seconde méthode pour isoler les FAPs musculaires est basée sur l'expression du marqueur de surface Sca-1 (Joe et al. 2010). Les FAPs Lin⁻/Sca-1⁺ exprimant aussi CD34, génèrent spontanément des adipocytes *in vitro* dans des conditions de culture adipogéniques (**Tab. 5**). A noter que des progéniteurs adipogéniques exprimant les mêmes marqueurs de surface ont été récemment identifiés dans des dépôts de tissus adipeux blancs suggérant que des cellules similaires peuvent être présentes dans d'autres tissus (Rodeheffer, Birsoy, and Friedman 2008, Tang et al. 2008, Joe et al. 2009). De plus, les FAPs Lin⁻/Sca-1⁺ n'expriment pas le marqueur myogénique α 7-integrin (Joe et al. 2010). Cette dernière étude a permis ainsi de développer deux stratégies, en utilisant l'expression positive de CD34 ou l'expression négative de l' α 7-integrin, pour purifier les progéniteurs adipogéniques résidant dans le muscle squelettique de souris.

Qu'ils soient humains ou murins, les FAPs peuvent être isolés par cytométrie en flux grâce au marqueur de surface PDGFR α . Cette protéine membranaire est aussi présente à la surface des cellules PIC, possédant un potentiel adipogénique (Pannérec et al. 2013), et d'une

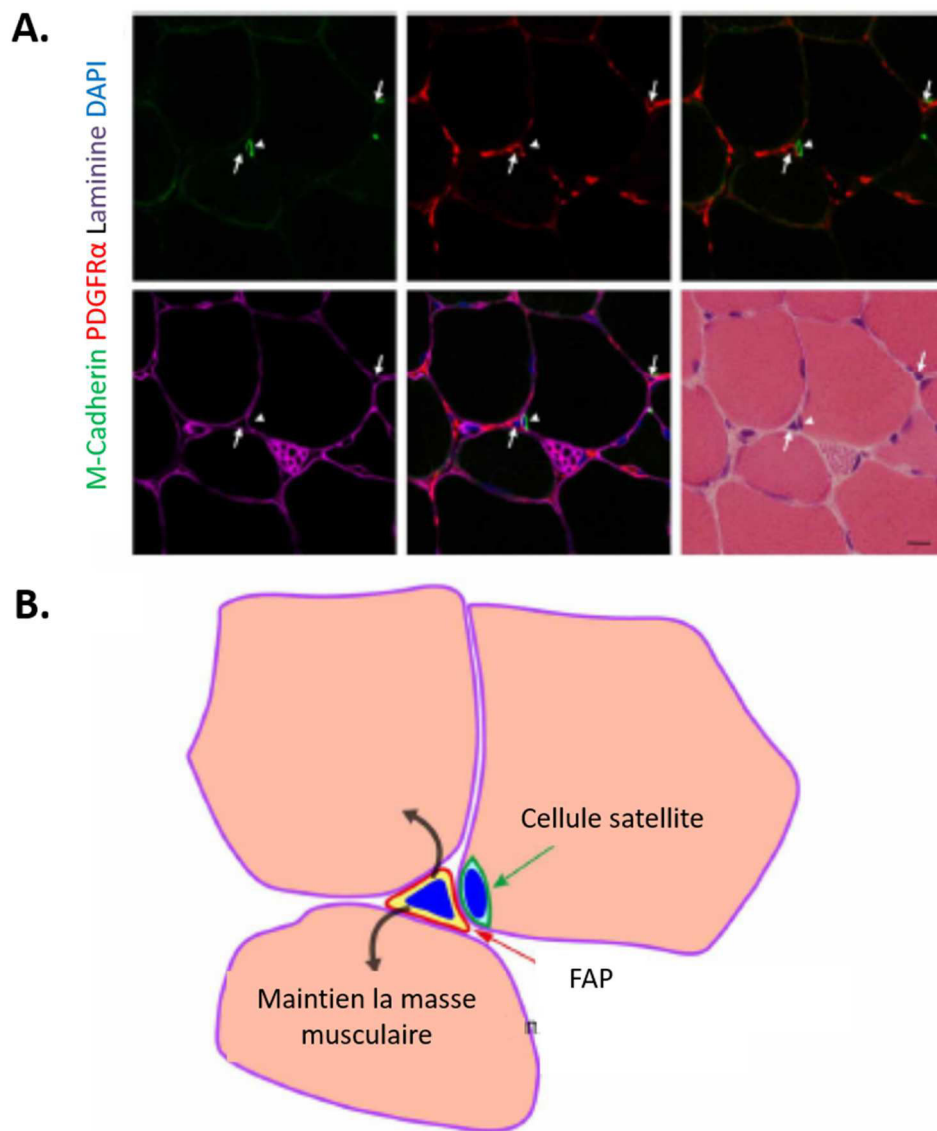


Figure 23. Localisation des FAPs PDGFR α ⁺ dans les muscles normaux au repos. (A). Coupes histologiques transversales de TA de souris sujettes à une immunofluorescence pour M-Cadherin, PDGFR α , laminin ou colorées à l'hématoxyline éosine. Les flèches indiquent les FAPs et les têtes de flèche montrent les cellules satellites. Barre d'échelle : 10 μ m. **(B).** Vue schématique de l'emplacement des cellules satellites et des FAPs dans le muscle. Les FAPs résident dans l'espace interstitiel et maintiennent la masse musculaire dans des conditions physiologiques normales. (Uezumi, Ikemoto-Uezumi, and Tsuchida 2014)

fraction des fibroblastes musculaires TCF4⁺ (Murphy et al. 2011). Cette observation suggère que ces populations cellulaires du muscle pourraient être identiques.

3. 3. Localisation des FAPs

Contrairement aux cellules satellites situées sous la lamina basale des myofibres, les FAPs sont localisés dans l'espace interstitiel entre les fibres musculaires indiquant que les cellules satellites et les cellules PDGFR α^+ représentent bien des populations cellulaires distinctes (Uezumi et al. 2010) (**Fig. 23A et 23B**). Des FAPs sont aussi retrouvés autour des vaisseaux sanguins mais sont différentes des cellules des muscles lisses vasculaires car elles n'expriment pas α SMA (Uezumi et al. 2010). Enfin, des FAPs résident en dehors de la membrane basale des capillaires mais n'expriment pas le marqueur des péricytes NG2 suggérant qu'ils n'appartiennent pas à la population des péricytes musculaires (Uezumi et al. 2010). Dans le muscle squelettique humain, les FAPs sont aussi localisés dans les espaces interstitiels et périvasculaires et sont plus fréquemment observés dans le périmysium que dans l'endomysium (Uezumi et al. 2014).

3. 4. Rôles des FAPs dans la régénération et la dégénérescence musculaire

Des expériences d'incorporation de bromodéoxyuridine ont montré que la prolifération des FAPs de souris est plus rapide que celle des cellules satellites au cours des 72 premières heures suivant la blessure musculaire (Joe et al. 2010). Leur nombre retourne à celui mesuré dans les tissus non endommagés 6-7 jours après le début du dommage en même temps que le commencement de la régénération musculaire initiée par les cellules satellites (Joe et al. 2010). Dans les muscles, le déclin rapide du nombre de FAPs après la blessure est causé par apoptose (Lemos et al. 2015). Cependant, dans des conditions favorisant la dégénération telles que les dystrophies musculaires, le processus apoptotique des FAPs n'est pas déclenché induisant l'accumulation de ces progéniteurs dans le tissu musculaire (Lemos et al. 2015). En effet, une augmentation du nombre de cellules PDGFR α^+ est observée dans les muscles murins (Contreras et al. 2016, Cordani et al. 2014) et humains (Uezumi et al. 2014, Pisani, Clement, et al. 2010) dystrophiques comparés aux muscles de souris et de patients sains.

Les FAPs murins régulent positivement la régénération musculaire en interagissant avec les progéniteurs myogéniques. En utilisant un système de co-culture *in vitro*, il a été montré que

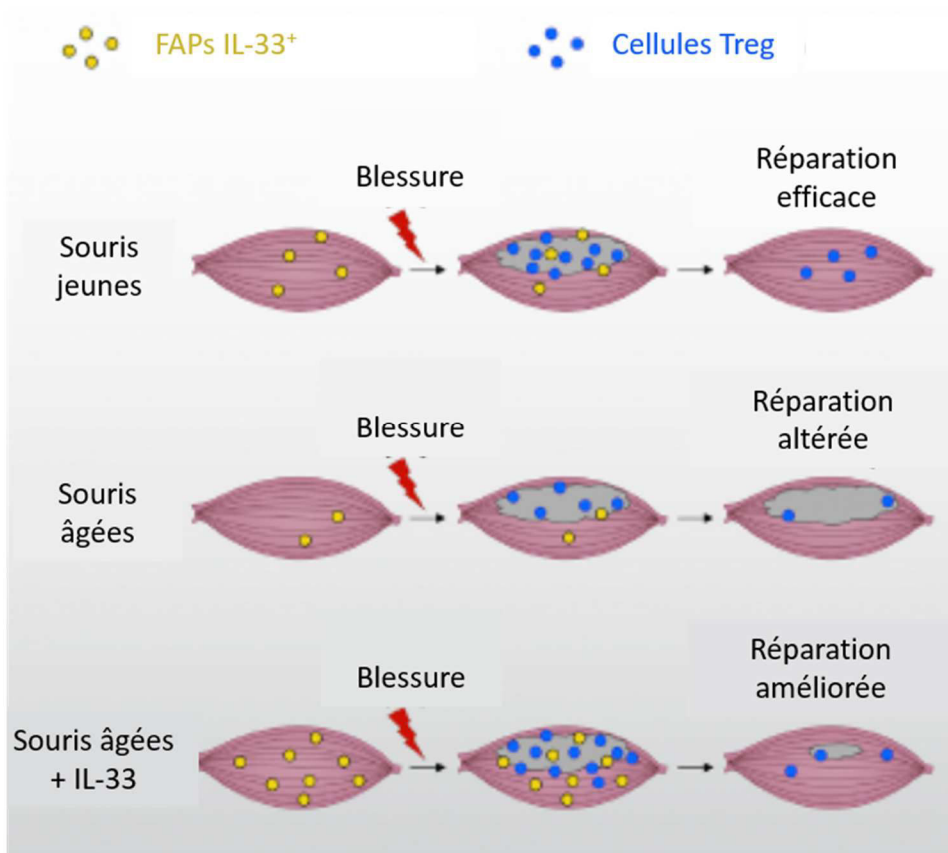


Figure 24. Rôle de la sécrétion de l'IL-33 par les FAPs au cours de la régénération musculaire. L'efficacité de la régénération musculaire dépend de la sécrétion de l'IL-33 par les FAPs qui favorise l'accumulation de cellules Treg. Le vieillissement est associé à une diminution de la capacité régénérative des muscles squelettiques. Cette altération de la réparation est induite par la baisse du nombre de FAPs produisant l'IL-33 qui a pour conséquence de diminuer la quantité de cellules Treg dans les muscles âgés. L'injection intramusculaire d'IL-33 dans les muscles âgés restaure une forte concentration de cellules Treg et améliore la réparation musculaire. (Kuswanto et al. 2016)

les FAPs murins activent la prolifération des cellules satellites quiescentes (Fiore et al. 2016) et favorisent la formation des myotubes à partir de myoblastes (Joe et al. 2010). Cependant, les FAPs isolés à partir de muscles dystrophiques de souris *mdx* répriment la myogenèse des cellules satellites (Mozzetta et al. 2013). Les facteurs pro-myogéniques sécrétés par les FAPs au cours de la régénération musculaire sont en cours d'investigation. L'IL-6 semble être un candidat sérieux (Farup et al. 2015) tout comme la follistatine (Mozzetta et al. 2013). Les FAPs expriment dix fois plus de follistatine que les cellules satellites et pourraient donc être une source de production de ce facteur dans les muscles (Mozzetta et al. 2013). La follistatine est l'antagoniste physiologique d'un régulateur négatif de la masse musculaire, la myostatine (Lee and McPherron 2001). En plus d'empêcher l'atrophie des fibres musculaires, la follistatine pourrait influencer la capacité régénérative des myofibres en ciblant directement les cellules satellites. Chez l'homme âgé, la réduction de la prolifération des cellules satellites lors d'un exercice physique est associée à une augmentation de la localisation de la myostatine dans les cellules satellites des muscles âgés (McKay et al. 2012). Ces résultats suggèrent que les molécules de follistatine libérées par les FAPs pourraient jouer un rôle dans la régulation des progéniteurs myogéniques dans les muscles des souris mais aussi dans les muscles humains. En plus de stimuler la myogenèse des cellules satellites, les FAPs sont impliqués dans la clairance des débris nécrotiques, un processus qui est nécessaire pour une régénération complète du tissu musculaire (Heredia et al. 2013).

Récemment, il a été rapporté que les FAPs murins interagissent avec des cellules médiatrices de l'inflammation, les cellules T régulatrices (Treg), au cours de la régénération (Kuswanto et al. 2016). Comme les neutrophiles et les macrophages, les cellules Treg s'accumulent dans le muscle squelettique en réponse à une blessure et favorisent la réparation musculaire (Villalta et al. 2014). L'accumulation des cellules Treg dans les muscles de souris jeunes et saines est régulée par la sécrétion de l'IL-33 par les FAPs (Kuswanto et al. 2016). Dans des muscles de souris âgées, le nombre de FAPs exprimant l'IL-33 est réduit après une blessure, entraînant une baisse de la quantité de cellules Treg et une régénération musculaire altérée qui peut être restaurée par simple injection intramusculaire de la protéine recombinante IL-33 (Kuswanto et al. 2016) (**Fig. 24**).

Le microenvironnement du muscle squelettique influence le devenir des FAPs. En effet, la transplantation de FAPs provenant de muscles dégénérés dans des muscles normaux en régénération empêche la différenciation adipogénique de ces cellules (Uezumi et al. 2010). Des expériences de co-cultures ont indiqué que le contact avec les myofibres est requis pour inhiber l'adipogenèse des FAPs suggérant que les cellules musculaires produisent une niche qui

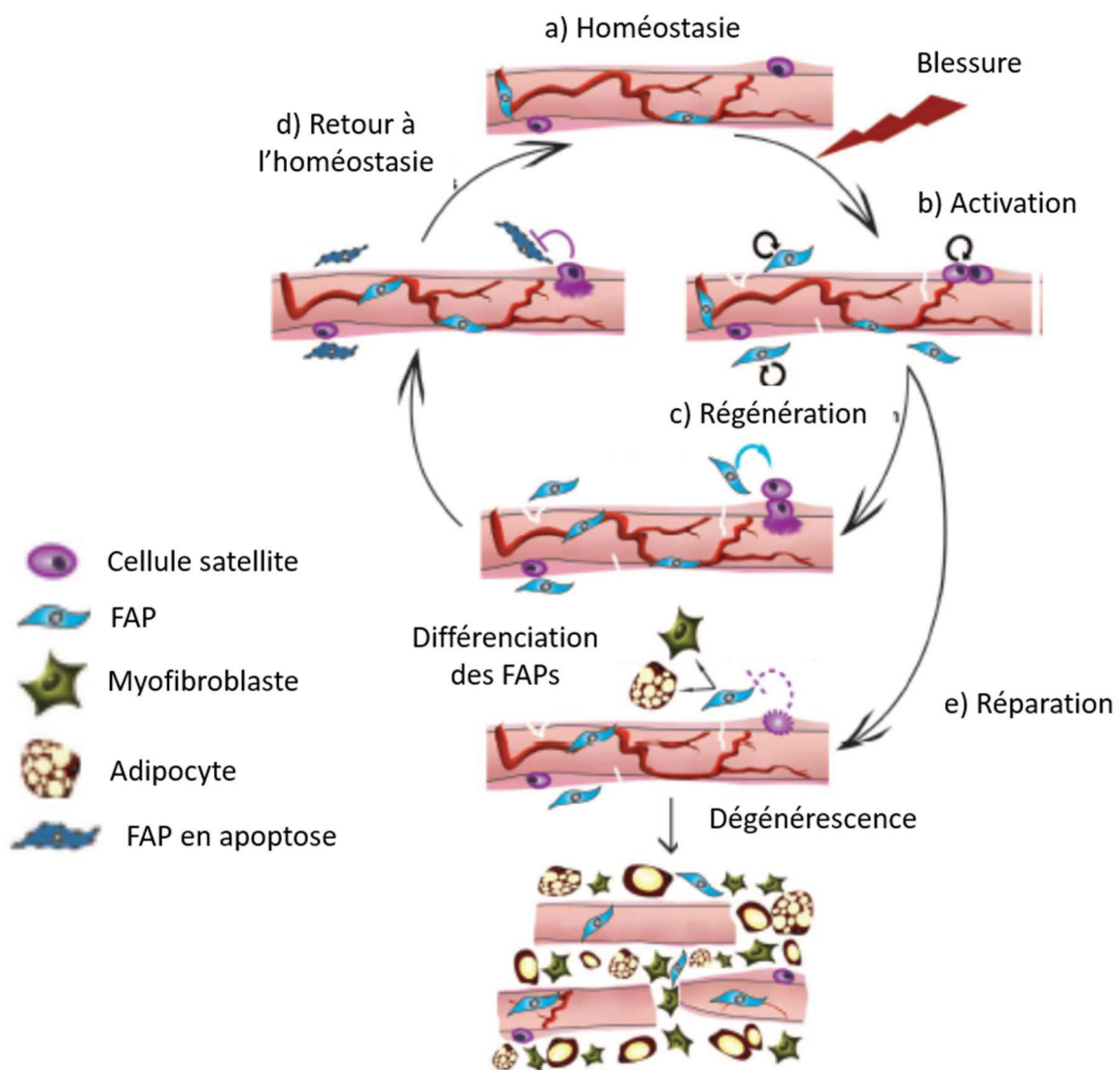


Figure 25. Rôles multiples des FAPs au cours de la régénération musculaire. (A). Les FAPs et MPs sont quiescents. **(B).** En réponse à un dommage, les FAPs et les MPs sont activés et se divisent. **(C).** Au cours de la régénération, les FAPs sécrètent des facteurs pour soutenir la différenciation des MPs. **(D).** Si la régénération est un succès, les MPs inhibent la différenciation des FAPs et favorisent leur apoptose. **(E).** Si la régénération est un échec, les signaux inhibiteurs des MPs sur les FAPs ne sont plus présents menant à la différenciation des FAPs en adipocytes et en myofibroblastes. (Natarajan, Lemos, and Rossi 2010)

maintient les FAPs à un état indifférencié (Uezumi et al. 2010). Basé sur toutes ces découvertes, un modèle a été établi dans lequel les fibres musculaires interagissent avec les FAPs pour les maintenir dans le tissu à l'état non différencié (Rodeheffer 2010, Natarajan, Lemos, and Rossi 2010). Après un dommage musculaire, les FAPs sont induits à proliférer sans se différencier, produisent des facteurs qui contribuent à la réparation des fibres musculaires et à la restauration de la masse musculaire. Lorsqu'une blessure musculaire entraîne une dégénérescence, les FAPs se différencient en adipocytes et possiblement en myofibroblastes (**Fig. 25**).

3. 5. Mécanisme moléculaire de la régulation des FAPs au cours de la régénération

3. 5. 1. Régulation des FAPs par les molécules systémiques et locales

Des facteurs et des molécules régulant la différenciation et la prolifération des FAPs ont déjà été identifiés. Par exemple, l'oxyde nitrique, qui est une molécule de signalisation contrôlant la structure et certaines fonctions des muscles, est capable d'inhiber *in vitro* la différenciation en adipocytes des FAPs mais pas leur potentiel fibrotique (Cordani et al. 2014). L'inhibition de l'adipogenèse par l'oxyde nitrique induit une augmentation de l'expression du micro-ARN-27b entraînant une diminution de l'expression de PPAR γ (Cordani et al. 2014). Les glucocorticoïdes, dont la dexaméthasone, déclenchent la différenciation adipogénique des FAPs et stimulent leur prolifération *in vitro* et *in vivo* (Dong, Silva, and Zhang 2014). Dans les muscles sains endommagés, les glucocorticoïdes stimulent l'adipogenèse des FAPs en inhibant la signalisation de l'IL-4 (Dong, Silva, and Zhang 2014). La signalisation du TGF β est décrite pour induire *in vitro* la différenciation fibroblastique des FAPs murins (Uezumi et al. 2011) et humains (Uezumi et al. 2014, Arrighi et al. 2015). D'une manière intéressante, TGF β 1 peut empêcher l'induction de l'adipogenèse des FAPs sous des conditions de culture adipogénique pour favoriser la fibrogenèse, indiquant que les FAPs sont très sensibles à la signalisation du TGF β et que l'activation de cette voie détermine leur bipotentialité (Arrighi et al. 2015). Tout comme le TGF β 1, le PDGFAA peut aussi stimuler la prolifération et la fibrogenèse des FAPs murins (Uezumi et al. 2011) et humains (Uezumi et al. 2014).

3. 5. 2. Régulation des FAPs par les cellules immunitaires

Une étude a identifié des signaux paracrines générés par les cellules immunitaires pouvant réguler le lignage fibro-adipogénique : c'est notamment le cas de l'IL-4 sécrétée par les

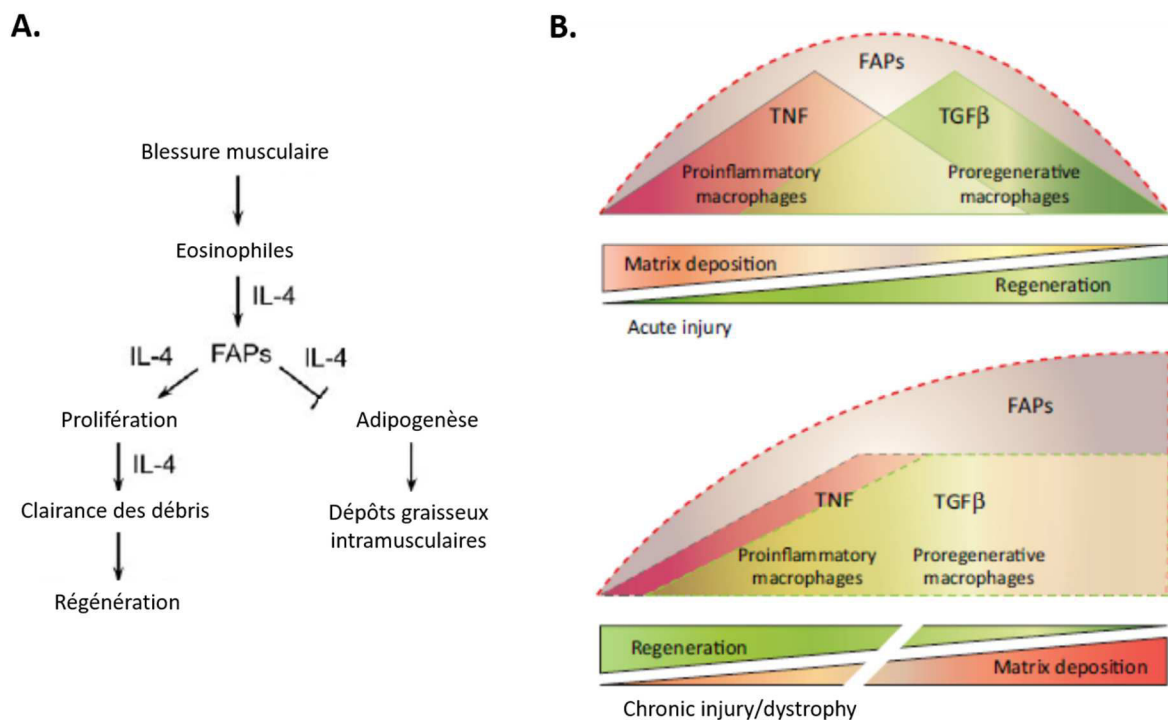


Figure 26. Régulation des FAPs murins par les cellules immunitaires. (A). Modèle de régulation des FAPs par l'IL-4 sécrétée par les éosinophiles. Les éosinophiles sont recrutés dans le muscle squelettique en réponse à une blessure et sécrètent de l'IL4. En présence de l'IL-4, les FAPs prolifèrent en tant que fibroblastes pour supporter la myogenèse en phagocytant les débris nécrotiques. En l'absence des molécules IL-4, les FAPs n'ont plus leur rôle de « nettoyeurs » et se différencient en adipocytes, ce qui contribue à l'accumulation de débris cellulaires et à l'infiltration de dépôts graisseux intramusculaires. (Heredia et al. 2013) **(B).** Régulation de la clairance et de la survie des FAPs dans les muscles en réponse à un dommage aigu ou chronique. Un dommage musculaire aigu entraîne l'infiltration séquentielle de macrophages pro- et anti-inflammatoires qui produisent respectivement les cytokines TNF et TGFβ. Une accumulation transitoire de FAPs est aussi observée dans les muscles blessés. L'action pro-apoptotique du TNF sur les FAPs est requise pour restaurer un nombre basal de ces progéniteurs et éviter l'infiltration massive d'ECM, ce qui aboutit au succès de la régénération musculaire. Les dommages chroniques des dystrophies musculaires perturbent l'apparition séquentielle des deux phénotypes de macrophages dans les muscles, ce qui entraîne une production simultanée de TNF et de TGFβ. Puisque le TGFβ empêche l'action apoptotique du TNF sur les FAPs, ces cellules persistent menant à un défaut de la régénération et à une accumulation permanente d'ECM. (Muñoz-Cánoves and Serrano 2015)

éosinophiles (Heredia et al. 2013). Les éosinophiles sont rapidement présents au site musculaire endommagé et sont une source abondante d'IL-4/IL-13 dans le muscle squelettique (Heredia et al. 2013). L'activation de la signalisation IL-4/IL-13 favorise la prolifération des FAPs pour supporter la myogenèse tout en inhibant leur différenciation en adipocytes (Heredia et al. 2013) (**Fig. 26A**). Ces cytokines sont aussi requises pour le rôle phagocytaire des FAPs (Heredia et al. 2013).

Il a été récemment démontré que les fonctions et le devenir des FAPs sont régulés *via* la sécrétion de cytokines pro- et anti-inflammatoires par les macrophages qui infiltrent les muscles endommagés (Lemos et al. 2015). Dans cette étude, les auteurs ont observé que l'expansion des FAPs est précédée par une infiltration intramusculaire des macrophages pro-inflammatoires. De plus, les souris transgéniques, dans lesquelles l'infiltration intramusculaire des macrophages est réduite, présentent une accumulation de FAPs provoquant la formation excessive de dépôts fibrotiques dans le tissu et l'échec de la régénération musculaire. Les signaux produits par les macrophages et régulant la clairance des FAPs au cours de la réparation musculaire impliquent TNF α et TGF β 1. TNF α déclenche l'apoptose des FAPs et ce facteur est exprimé par les macrophages pro-inflammatoires localisés à proximité des FAPs au cours de la phase d'expansion. Le blocage de TNF α augmente la survie des FAPs et les dépôts d'ECM dans les muscles blessés révélant le rôle crucial de TNF α dans la clairance des FAPs. Les macrophages anti-inflammatoires favorisent la formation de myofibres et sécrètent du TGF β 1. L'injection locale de ce facteur au moment où la concentration de TNF α est maximale entraîne l'accumulation des FAPs dans les muscles blessés. L'inhibition pharmacologique de TGF β 1 a augmenté le nombre de FAPs apoptotiques et, par conséquent, diminué leur nombre dans les muscles. Ces résultats suggèrent qu'un changement local et régulé dans le temps d'un microenvironnement riche en TNF α puis en TGF β 1 est critique pour le succès de la régénération musculaire. Enfin, le blocage de la signalisation TGF β 1 par une molécule de synthèse anti-fibrotique, nilotinib, a réduit le nombre de FAPs et la fibrose des muscles dystrophiques des souris *mdx*. Contrairement aux muscles sains, les macrophages des muscles dystrophiques co-expriment TNF α et TGF β 1, suggérant que la perte de la polarisation des macrophages pourrait induire le développement de tissus fibrotiques dans les muscles DMD en maintenant la survie des FAPs. En résumé, les macrophages influencent le devenir des FAPs et la formation des dépôts fibrotiques en régulant l'apoptose et la survie des FAPs par la sécrétion de TNF α et de TGF β 1 respectivement (**Fig. 26B**). Pour que la réparation du muscle blessé soit efficace, ces signaux doivent être séquentiels dans le temps. Dans des conditions dystrophiques, les profils d'expression de TNF α et TGF β 1 se chevauchent.

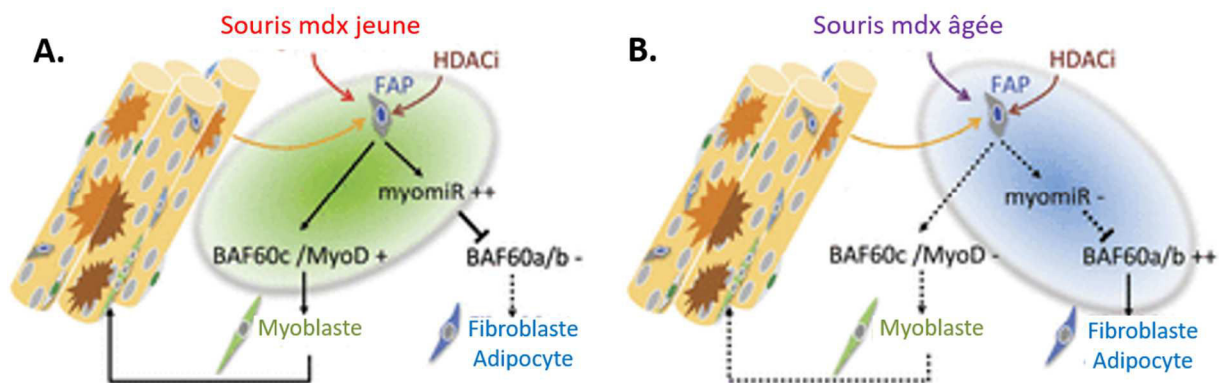


Figure. 27. Mécanisme épigénétique de la plasticité myogénique des FAPs des muscles de souris *mdx* jeunes. (A). Dans les souris *mdx* jeunes, les HDACi induisent l'augmentation de l'expression des micro-ARNs myogéniques (myomiR) ainsi que celle de BAF60C dans les FAPs. En conséquence, les expressions des sous-unités BAF60A et BAF60B du complexe SWI/SNF chutent et engagent les FAPs dans la myogenèse au détriment de la fibro-adipogenèse. (B). Dans les souris *mdx* âgées, les FAPs sont insensibles aux HDACi et le réseau transcriptionnel myomiR/BAF60C est inactif. Les FAPs continuent à exprimer les sous-unités BAF60A et BAF60B et sont incapables de générer des myotubes. Les cellules satellites ont un noyau vert, les myoblastes ont un cytoplasme vert, les FAPs ont un noyau bleu et les fibroblastes ont un cytoplasme bleu. Les traits continus représentent une forte activation alors que les traits en pointillés représentent une faible activation. (Faralli and Dilworth 2014)

3. 5. 3. Régulation épigénétique des FAPs

Deux études récentes ont montré que les FAPs des muscles dystrophiques des souris *mdx* peuvent soit supporter la régénération dans les stades précoces de la maladie, soit contribuer au développement des dépôts fibrotiques et graisseux intramusculaires dans les stades tardifs de la dystrophie (Mozzetta et al. 2013, Saccone et al. 2014). Ces fonctions sont régulées au niveau épigénétique par un réseau impliquant les micro-ARNs spécifiques du muscle, les miR-1.2, miR-133 et miR-206 (Saccone et al. 2014). Ces micro-ARNs myogéniques ciblent un complexe du remodelage de la chromatine SWI/SNF (switch/sucrose non fermentable) qui est composé d'une sous-unité BAF60 (BRG1/BRM-associated factor 60) dont trois variants existent, BAF60A, BAF60B et BAF60C. Le complexe SWI/SNF/BAF60C active le programme myogénique des cellules musculaires (Forcales et al. 2012), tandis que les complexes SWI/SNF/BAF60A ou BAF60B déterminent le devenir non myogénique des cellules. L'expression des micro-ARNs myogéniques est corrélée avec la capacité des FAPs à supporter la myogenèse des cellules satellites et, de façon inattendue, à adopter un phénotype myogénique au dépend du lignage fibro-adipogénique (Saccone et al. 2014). Les cibles des micro-ARNs myogéniques sont les deux sous-unités BAF60A et BAF60B entraînant la formation du complexe alternatif SWI/SNF/BAF60C qui favorise l'engagement des FAPs vers le lignage myogénique (Saccone et al. 2014).

Il est important de constater que ce réseau intracellulaire est contrôlé par les HDACs (Mozzetta et al. 2013) dont l'activité est élevée dans les muscles DMD (Colussi et al. 2008). Les FAPs de souris *mdx* jeunes sont sensibles aux inhibiteurs des HDACs (HDACi, HDAC inhibitor), ce qui leur permet de former le complexe SWI/SNF/BAF60C et donc d'acquérir un potentiel myogénique et de supporter très efficacement la myogenèse des cellules satellites (Saccone et al. 2014) (**Fig. 27**). Les FAPs de souris *mdx* âgées perdent leur sensibilité aux HDACi (Mozzetta et al. 2013). Les HDACs répriment l'expression des micro-ARNs myogéniques, ce qui favorise la formation du complexe SWI/SNF/BAF60A/BAF60B et déclenche le phénotype fibro-adipogénique des FAPs (Saccone et al. 2014). De plus, contrairement aux FAPs de souris *mdx* jeunes, les FAPs de souris *mdx* âgées ne participent pas à la stimulation de la différenciation des cellules satellites (Mozzetta et al. 2013). Ces résultats montrent que l'altération de la régulation des FAPs par les HDACs contribue à l'accumulation des dépôts fibrotiques et adipogéniques et à l'échec de la réparation des muscles dystrophiques.

Pour résumer, l'activité des FAPs est régulée par des interactions physiques ou non avec le lignage myogénique aussi bien que par des cytokines libérées par des cellules immunitaires. De plus, des réseaux intracellulaires contrôlent les fonctions du lignage fibro-adipogénique dans les muscles en régénération. Un dysfonctionnement de la régulation des FAPs pourrait détériorer sérieusement l'homéostasie musculaire en affectant les fonctions des muscles squelettiques. Finalement, la dérégulation de l'activité des FAPs contribuerait à l'accumulation d'adipocytes et de myofibroblastes observée dans les muscles dystrophiques et sarcopéniques.

OBJECTIFS DE LA THESE

Le muscle squelettique est composé de fibres multinucléées qui sont formées au cours de l'embryogenèse et qui subissent une croissance post-natale (Yin, Price, and Rudnicki 2013). Une population de progéniteurs musculaires, les cellules satellites, est localisée entre la lamina basale et la membrane plasmique des fibres musculaires (Mauro 1961). Les cellules satellites sont quiescentes dans les muscles adultes dans des conditions physiologiques normales, mais peuvent être rapidement activées en réponse à un traumatisme pour supporter la réparation musculaire (Cornelison and Wold 1997, Halevy et al. 2004). Bien que la majorité des cellules satellites se différencient et fusionnent avec les myofibres nouvellement formées, une petite proportion de ces cellules sort du cycle cellulaire pour reconstituer le pool de cellules satellites grâce à leur propriété d'auto-renouvellement et pour permettre au muscle de supporter les blessures infligées durant la vie entière de l'individu (Olguin and Olwin 2004). Il est admis que les cellules satellites constituent la majorité des cellules souches musculaires impliquées dans la régénération des muscles squelettiques.

Cependant, depuis une dizaine d'années, de nombreux progéniteurs myogéniques résidant dans les muscles squelettiques mais n'étant pas en position satellite ont été identifiés (Ceafalan, Popescu, and Hinescu 2014). Parmi eux, nous pouvons citer les MDSCs les cellules SPs, les cellules PW1⁺, les progéniteurs associés aux vaisseaux et les cellules CD133⁺. Toutes ces populations cellulaires affichent un potentiel myogénique *in vitro* et *in vivo* et certaines d'entre elles sont présentement utilisées en essais cliniques pour traiter des patients dystrophiques. Bien que ces études ont clairement établi que les progéniteurs musculaires non satellites participent au processus de réparation musculaire, la contribution directe de ces cellules à la régénération et à la myogenèse post-natale n'a pas été fermement démontrée. Récemment trois laboratoires ont généré des modèles de souris dans lesquels la suppression des cellules satellites peut être induite dans le but de tester l'efficacité de la régénération musculaire en l'absence des cellules satellites (Lepper, Partridge, and Fan 2011, Sambasivan et al. 2011, Murphy et al. 2011). Ces trois études montrent que l'élimination des cellules satellites dans les muscles de souris adultes altère la régénération musculaire induite par un dommage. De plus, le dysfonctionnement et/ou la perte numérique des cellules satellites observés notamment dans les muscles de patients DMD ou au cours du vieillissement entraînent un défaut de la régénération musculaire. Ensemble, ces résultats mènent à la conclusion que les cellules satellites sont essentielles pour que la réparation des muscles soit efficace. Sur la base de ces données, les cellules musculaires myogéniques et non satellites ne joueraient pas un rôle dans la génération de nouvelles fibres musculaires. Néanmoins, nous pouvons émettre l'hypothèse que la présence des cellules satellites serait nécessaire pour engager les progéniteurs

musculaires non satellites dans le lignage myogénique. Par conséquent, l'absence des cellules satellites impacterait de manière importante la niche des cellules souches du muscle squelettique, empêchant ainsi la myogenèse des progéniteurs musculaires non satellites et la compensation des effets néfastes sur la régénération générés par la perte des cellules satellites.

Des études récentes révèlent que des cellules non myogéniques envahissent les muscles squelettiques en réponse à une blessure et sécrètent des facteurs qui favorisent le recrutement des progéniteurs musculaires à potentiel myogénique. Par exemple, les macrophages pro-inflammatoires M1 et anti-inflammatoires M2 induisent la migration et le recrutement des mésoangioblastes au cours de la régénération musculaire (Lolmede et al. 2009). La myogenèse des mésoangioblastes est différenciellement régulée par les différents types de macrophages polarisés (Bosurgi et al. 2012). Les macrophages polarisés contrôlent également le lignage des MPs (Saclier, Cuvellier, et al. 2013). Les macrophages M1 sont les premiers à infiltrer les muscles endommagés pour phagocyter les débris cellulaires et stimuler la prolifération des cellules satellites. Au cours de la phase de régénération, le phénotype M1 est converti en phénotype M2 dans le but de supporter la myogenèse des cellules satellites grâce à la sécrétion de cytokines spécifiques. Comme les macrophages, les progéniteurs musculaires fibro-adipogéniques non myogéniques, FAPs, sont capables de stimuler la myogenèse des cellules satellites (Joe et al. 2010). Il a été suggéré que ces deux populations cellulaires non myogéniques, FAPs et macrophages, jouent un rôle important dans le contrôle de l'équilibre entre myogenèse et fibro-adipogenèse au cours de l'homéostasie et de la régénération musculaire. Ces données dévoilent un nouveau modèle dynamique dans lequel les interactions entre les populations cellulaires myogéniques et non myogéniques favorisent et dirigent la croissance et la réparation musculaire.

Des progéniteurs adipogéniques exprimant le marqueur de surface CD34 ont été détectés dans l'espace interstitiel et péri-vasculaire des muscles squelettiques humains par deux équipes françaises dont la nôtre (Pisani, Clement, et al. 2010, Pisani, Dechesne, et al. 2010, Vauchez et al. 2009, Lecourt et al. 2010). Une fois mis en cultures, ces progéniteurs sont capables de générer *in vitro* et *in vivo* des adipocytes multi-loculés. Quelques années plus tard, le potentiel fibrogénique *in vitro* de ces progéniteurs adipogéniques humains a été identifié par l'équipe d'Uezumi et par notre laboratoire (Arrighi et al. 2015, Uezumi et al. 2014). Bien que la caractérisation des FAPs des souris soit avancée, celle des FAPs humains est très incomplète. **Le premier objectif de ma thèse se focalise sur la caractérisation des FAPs isolés à partir de muscles humains.**

Après un dommage, les FAPs de souris prolifèrent rapidement et stimulent la différenciation myogénique des cellules satellites, puis leur nombre diminue quelques jours après l'enclenchement du processus de la régénération (Joe et al. 2010). Cette observation démontre que le nombre de FAPs est finement régulé au cours de la régénération musculaire pour éviter qu'ils persistent et que leur différenciation en cellules adipogéniques et en myofibroblastes ne gêne le succès de la réparation tissulaire. Cependant, la régulation des FAPs humains au cours de la régénération musculaire est très peu documentée. **Le deuxième objectif de ma thèse traite des interactions cellulaires entre les FAPs et les cellules satellites, et sur la régulation des FAPs par les macrophages chez l'homme.**

La dégénérescence fibro-adipogénique est une caractéristique commune de certaines situations physiopathologiques affectant les muscles squelettiques et cardiaques incluant les désordres musculaires liés à l'âge et les myopathies telles que la DMD (Serrano et al. 2011). Les FAPs persistent dans les muscles de patients DMD indiquant que le contrôle de la prolifération et/ou de la clairance des FAPs est altéré dans les muscles dystrophiques (Uezumi et al. 2014). Au vue de ces résultats, nous pouvons émettre l'hypothèse que la dérégulation de la prolifération et/ou de la différenciation des FAPs pourrait être à l'origine des infiltrations adipogéniques et fibrotiques observées dans les muscles dystrophiques ou âgés. **Pour répondre à cette hypothèse, les travaux de ma thèse portent sur les FAPs humains extraits à partir de biopsies musculaires à la fois de donneur sains de tout âge et de patients DMD.**

RESULTATS

Chapitre 1. Characterization of adipocytes derived from fibro/adipogenic progenitors resident in human skeletal muscle

1. Objectifs de l'étude

Deux types de tissus adipeux coexistent chez les mammifères, le tissu adipeux blanc et le tissu adipeux brun, qui sont tous les deux impliqués dans la balance énergétique et ont des fonctions opposées (Enerbäck 2010a). Le tissu adipeux blanc est principalement impliqué dans le stockage et la mobilisation de l'énergie sous forme de triglycérides. A l'inverse, le tissu adipeux brun brûle les graisses et est spécialisé dans la dépense énergétique. Dans cet organe thermogénique, les adipocytes bruns convertissent les nutriments en chaleur par la respiration découplée qui implique la protéine UCP1 spécifiquement exprimée dans les adipocytes bruns. Chez le nouveau-né, le tissu adipeux brun représente une toute petite fraction du tissu adipeux total et est dispersé dans le corps (Enerbäck 2010b). Il diminue avec l'âge et est difficilement distinguable du tissu adipeux blanc (Heaton 1972). Cependant, des dépôts de tissus adipeux bruns sont observés dans les couches profondes des organes et peuvent être augmentés chez les personnes exposées au froid (Huttunen, Hirvonen, and Kinnula 1981). Les tissus adipeux sont constitués d'adipocytes matures, qui représentent plus de 90 % du volume tissulaire, et d'une fraction vasculaire stromale qui est composée de pré-adipocytes, de fibroblastes, de cellules musculaires lisses et vasculaires, de cellules endothéliales, de macrophages, de lymphocytes et d'ASCs (adipose stroma cells) (Barba et al. 2013).

Chez l'homme, le tissu adipeux est divisé en deux compartiments différents d'un point de vue métabolique et fonctionnel, le tissu adipeux sous-cutané et le tissu adipeux viscéral. Grâce aux techniques d'imagerie à haute sensibilité telles que la tomographie et l'imagerie à résonance magnétique, il est possible de détecter et de mesurer d'autres dépôts adipeux qui constituent également le tissu adipeux du corps humain. Le tissu adipeux est présent dans plusieurs organes et tissus et en particulier dans les muscles squelettiques où l'on peut distinguer le tissu adipeux intermusculaire (IMAT, intermuscular adipose tissue), le tissu adipeux parasosseux et le tissu adipeux péri-musculaire. L'IMAT inclut les gouttelettes de triglycérides dans les fibres musculaires, les adipocytes présents entre les faisceaux des myofibrilles (adipocytes

intermusculaires) et ceux localisés entre les myofibrilles (adipocytes intramusculaires) (Vettor et al. 2009). La présence d'adipocytes intramusculaires est une caractéristique des muscles déficients pour les cellules satellites comme démontré chez les souris mutantes où les gènes *Pax7*, *MyoD* et myogénine ont été éliminés (Kuang et al. 2006, Rudnicki et al. 1992, Hasty et al. 1993). C'est aussi une caractéristique histopathologique des dystrophies musculaires, des myopathies inflammatoires, du vieillissement tissulaire, de l'obésité, du diabète et d'autres désordres métaboliques (Sciorati et al. 2015).

De nombreuses cellules, présentes dans le muscle squelettique ou originaires de la moelle osseuse, peuvent contribuer à la formation des dépôts d'adipocytes intramusculaires : les cellules satellites, les PICs, les MECs, les péricytes, les mésoangioblastes et les fibroblastes (Sciorati et al. 2015). Depuis peu, il est admis que les FAPs sont la principale source d'adipocytes dans les muscles squelettiques pour plusieurs raisons. Ils sont localisés dans l'espace interstitiel entre les fibres musculaires (Uezumi et al. 2014), peuvent proliférer abondamment en réponse à une blessure (Joe et al. 2010), et possèdent un fort potentiel adipogénique une fois greffés dans des muscles de souris préalablement endommagés (Joe et al. 2010, Uezumi et al. 2010). Jusqu'à présent, la caractérisation des adipocytes issus de la différenciation des FAPs humains s'est limitée à l'expression de marqueurs adipogéniques et aucune analyse fonctionnelle n'a encore été réalisée. **Dans cette étude, nous avons complété la caractérisation des FAPs humains au niveau de leur immunophénotype et de leurs potentiels de différenciation. Pour la première fois, nous avons étudié la nature des adipocytes formés suite à la différenciation des FAPs humains ainsi que leur fonctionnalité.**

Pour cela, nous avons choisi de comparer fonctionnellement les adipocytes issus de la différenciation des FAPs humains (FAPs-As) à ceux des adipocytes provenant de la différenciation des ASCs du tissu adipeux sous-cutané humain (ASCs-As). Ce choix est justifié de par le fait que l'adipogenèse *in vitro* des ASCs et des FAPs est induite par les mêmes molécules, et que la caractérisation des ASCs et des adipocytes issus de leur différenciation est bien établie (Barba et al. 2013).

2. Article

Arrighi N, Moratal C, Clément N, Giorgetti-Peraldi S, Peraldi P, Loubat A, Kurzenne JY, Dani C, Chopard A, Dechesne CA. Publié en avril 2015 dans *Cell Death and Disease*.

Characterization of adipocytes derived from fibro/adipogenic progenitors resident in human skeletal muscle

N Arrighi^{1,2,3}, C Moratal^{1,2,3}, N Clément^{1,2,3}, S Giorgetti-Peraldi^{1,4}, P Peraldi^{1,2,3}, A Loubat^{1,2,3}, J-Y Kurzenne⁵, C Dani^{1,2,3}, A Chopard^{1,6} and CA Dechesne^{*,1,2,3}

A population of fibro/adipogenic but non-myogenic progenitors located between skeletal muscle fibers was recently discovered. The aim of this study was to determine the extent to which these progenitors differentiate into fully functional adipocytes. The characterization of muscle progenitor-derived adipocytes is a central issue in understanding muscle homeostasis. They are considered as being the cellular origin of intermuscular adipose tissue that develops in several pathophysiological situations. Here fibro/adipogenic progenitors were isolated from a panel of 15 human muscle biopsies on the basis of the specific cell-surface immunophenotype CD15⁺/PDGFR α ⁺CD56⁻. This allowed investigations of their differentiation into adipocytes and the cellular functions of terminally differentiated adipocytes. Adipogenic differentiation was found to be regulated by the same effectors as those regulating differentiation of progenitors derived from white subcutaneous adipose tissue. Similarly, basic adipocyte functions, such as triglyceride synthesis and lipolysis occurred at levels similar to those observed with subcutaneous adipose tissue progenitor-derived adipocytes. However, muscle progenitor-derived adipocytes were found to be insensitive to insulin-induced glucose uptake, in association with the impairment of phosphorylation of key insulin-signaling effectors. Our findings indicate that muscle adipogenic progenitors give rise to *bona fide* white adipocytes that have the unexpected feature of being insulin-resistant.

Cell Death and Disease (2015) 6, e1733; doi:10.1038/cddis.2015.79; published online 23 April 2015

Adipose tissue consists of several distinct anatomical compartments. It is not completely clear how all of them are formed despite the current high interest in understanding adipose tissue specificities. One intriguing compartment is the so-called intermuscular adipose tissue (IMAT), which can be found between muscle fibers.^{1,2} Adipocytes accumulate and replace a large proportion of muscle fibers in muscular dystrophies,³ and muscle adiposity was even shown to be an accurate measurement of the severity of Duchenne muscular dystrophy.⁴ IMAT accumulation has also been reported in type II diabetes,^{5,6} aged muscles,^{7–9} denervation,¹⁰ and in chronic disuse-induced muscle atrophy.^{11,12} IMAT accumulation also occurs in muscles of healthy younger individuals after only 4 weeks of immobilization.¹¹ In pathological and nonpathological models, IMAT accumulation is linked to insulin resistance.^{5,13,14} The fat infiltration of muscle has not been markedly investigated for many years, whereas this process likely has deep impacts on muscle function because of the profound alterations induced in muscle structure and the important interplay between muscle and adipose tissues – which are both known to be very active factor-secreting tissues.¹⁵

Muscle regeneration is supported by the extensively characterized satellite cells, which are myogenic progenitors

laying along muscle fibers.¹⁶ In addition, a few groups have recently identified adipogenic progenitors resident in skeletal muscle. Among them are progenitors identified on the basis of specific cell-surface marker expressions, which can thus be physically separated by cell sorting. In humans, muscle adipogenic progenitors have been separated by flow cytometry as a CD15⁺CD56⁻ subpopulation by us and others.^{17–20} CD56, the neural cell adhesion molecule 1, is known to be expressed by muscle satellite cells (which have the CD15⁻CD56⁺ immunophenotype). CD15 is an antigenic carbohydrate molecule found in several glycoproteins. Before its implication in the muscle adipogenic lineage, it was essentially known to be present in hematopoietic and neural cells. The CD15⁺CD56⁻ adipogenic progenitors express the mesenchymal stem or progenitor cell markers CD13, CD34, CD44, CD49, CD90, and CD105. They are negative for the lineage markers CD31, CD45, CD106, CD117, CD133, and STRO-1.^{18–20}

In parallel in mice, muscle fibro/adipogenic progenitors (FAPs) have been identified as lin⁻(α 7 integrin)⁻Sca-1⁺CD34⁺ cells²¹ and muscle mesenchymal progenitors with the immunophenotype CD31⁻CD45⁻SM/C-2.6⁻PDGFR α ⁺ have been shown to contribute to fat cell formation in skeletal muscle.²² Further studies indicated that the two mouse immunophenotypes in fact specifically label the same

¹UFR Sciences, Université Nice Sophia Antipolis, Nice F-06108, France; ²CNRS, UMR7277, F-06108 Nice, France; ³INSERM U1091, F-06108 Nice, France; ⁴INSERM U1065, Mediterranean Research Centre for Molecular Medicine, Team: Cellular and Molecular Physiopathology of Obesity and Diabetes, Nice, France and ⁵Hôpitaux Pédiatriques de Nice CHU-Lenval, Nice, France

*Corresponding author: C Dechesne, Institut de Biologie Valrose, Université Nice Sophia Antipolis, 28 Avenue de Valombrose, F-06108 Nice, France. Tel +33 493 37 70 38; Fax +33 493 37 70 58; E-mail: dechesne@unice.fr

⁶Present address: INRA UMR866 Dynamique Musculaire et Métabolisme, Université de Montpellier, Montpellier, France.

Abbreviations: IMAT, intermuscular adipose tissue; FAP-As, fibro/adipogenic progenitor-derived adipocytes; ASC-As, adipose stroma cell-derived adipocytes

Received 20.11.14; revised 16.2.15; accepted 18.2.15; Edited by A Oberst

progenitors that should be recognized as skeletal muscle-resident mesenchymal progenitors.²³ Finally, PDGFR α has also been used very recently in human to isolate muscle mesenchymal progenitors, which are equivalent to the mouse FAPs.^{24,25}

Despite the physiological importance of adipocytes derived from human or mouse skeletal muscle, characterization of these terminally differentiated cells is essentially limited to the expression of adipogenic markers. No comprehensive analyses have been reported, and the extent to which muscle adipogenic progenitors differentiate into fully functional adipocytes is unknown.

Here we benefited from the recent identification of these progenitors to investigate their differentiation, as well as the functional characteristics and specificities of the derived adipocytes. The whole study has been performed in humans considering the functional importance of human IMAT. Muscle biopsies were taken from a panel of 15 donors. Canonical adipose stroma cells (ASCs) prepared from subcutaneous adipose tissue depots, and their derived adipocytes were used as references. In this study, we established first that the PDGFR α ⁺CD56⁻ muscle progenitors are identical to the CD15⁺CD56⁻ progenitors, which therefore, can be also considered as the human counterparts of the FAPs isolated in mice. Then, our cellular, molecular, and biochemical data showed that *bona fide* white adipocytes are derived from human muscle-resident progenitors. However, these adipocytes have an unexpected impairment in insulin signaling associated with insulin resistance with reduced glucose uptake.

Results

CD15 and PDGFR α specifically label the same human muscle FAP subpopulation. After culture expansion on a plastic support, muscle adipogenic progenitors were sorted by flow cytometry on the basis of the positive expression of CD15 and the negative expression of the myogenic marker CD56. As already observed, the proportions of CD15⁺CD56⁻ and CD15⁻CD56⁺ cells were biopsy dependent. To compare the CD15⁺CD56⁻ cell subpopulations with the PDGFR α ⁺CD56⁻ FAPs reported by Uezumi *et al.*,²⁴ we analyzed CD56⁻ muscle-derived cells with both anti-CD15 and anti-PDGFR α (also named CD140a) antibodies. Figure 1a shows that almost all CD56⁻ cells correspond to a single population that is positive for both CD15 and PDGFR α ($88 \pm 9\%$; $n = 6$). Expression of PDGFR α measured by quantitative RT-PCR decreased along differentiation of CD15⁺CD56⁻ adipogenic progenitors, whereas it was not found in CD15⁻CD56⁺ myogenic progenitors (Figure 1b). The expression of CD15, measured by flow cytometry, followed the same pattern. We compared the differentiation potentials of cell subpopulations sorted according to CD15, PDGFR α , and CD56 expressions, and submitted to the appropriate differentiation medium. Differentiated cells were characterized by their phenotypes and the expression of specific markers assessed with immunofluorescence or quantitative RT-PCR (Figure 1c). No differences were seen between the CD15⁺ and PDGFR α ⁺ cells. The CD15⁻/PDGFR α ⁻CD56⁺ cells differentiated only into myotubes and the CD15⁺/PDGFR α ⁺CD56⁻ cells

differentiate into adipocytes or fibroblast-like cells, but not into myotubes. Together, CD15 and PDGFR α label the same human muscle-proliferating progenitors, which have a fibro/adipogenic potential without myogenic potential. Anti-CD15 and anti-PDGFR α antibodies can be alternatively used to sort human muscle FAPs.

Time course of adipogenic differentiation and adipocyte phenotype.

Muscle FAPs and ASCs were submitted to the same adipogenic differentiation conditions. Throughout differentiation, they both exhibited very close morphological appearances, characteristic of adipocytes with the cytoplasm accumulating growing lipid droplets (Figure 2a). Hereafter, adipocytes derived from FAPs will be designated as FAP-As and adipocytes derived from ASCs as ASC-As. A similar time course of adipogenic differentiation was observed for the two cell types, and oil red O-triglyceride-specific staining was obtained from day 3 of differentiation. A canonical image of *in vitro* fully mature adipocytes was noted after about 2 weeks of differentiation and was preserved for several weeks. This could be observed up to 80 days (Supplementary Figure 2). FAP-As as well as ASC-As were filled by a decreasing number of larger and larger lipid droplets. However, adipocyte areas and lipid droplet areas were significantly reduced in FAP-As (Figure 2b). The number of lipid droplets remained equally distributed in both types of adipocytes.

Therefore, muscle FAPs differentiate into adipocytes under the same culture conditions as ASCs, with the same kinetics and acquire a very close phenotype. We only noticed a smaller size of adipocytes associated with smaller lipid droplets for FAP-As.

Induction and inhibition of adipogenic differentiation.

The expression of early and late main canonical markers of adipocyte differentiation was examined with quantitative RT-PCR to assess the molecular mechanisms involved in adipogenic differentiation. No significant difference was found between FAP-As and ASC-As for the expression levels of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ , CEBP β , FABP4, CD36, adipsin, adiponectin, and leptin (Figure 2c). This quantitative result is in accordance with the oil red O staining shown in Figure 2a. Unexpectedly, lipoprotein lipase (LPL) was found to be significantly more expressed in FAP-As. Expression of the early markers PPAR γ and CEBP β was detected right at the beginning of differentiation, whereas terminal markers such as FABP4 were detected only at day 3 of differentiation (Supplementary Figure 3). This was similar for FAP-As and ASC-As. Thus, muscle FAPs gave rise to adipocytes according to a differentiation pattern very similar if not identical to that of ASCs in terms of adipogenic marker identity, kinetics, and expression level.

As muscle FAPs were found to follow the same differentiation pathways as ASCs, we wondered whether the pathways known for inhibiting adipogenesis of adipose tissue progenitors were also functional in muscle adipogenic progenitors. We treated these progenitors with TNF α or cytokines from the transforming growth factor (TGF) β family, that is, TGF β 1 and activin A²⁶⁻²⁸ (Supplementary Figure 4). These factors drastically inhibited differentiation of muscle FAPs, with no or only very little adipocyte formation. This showed that

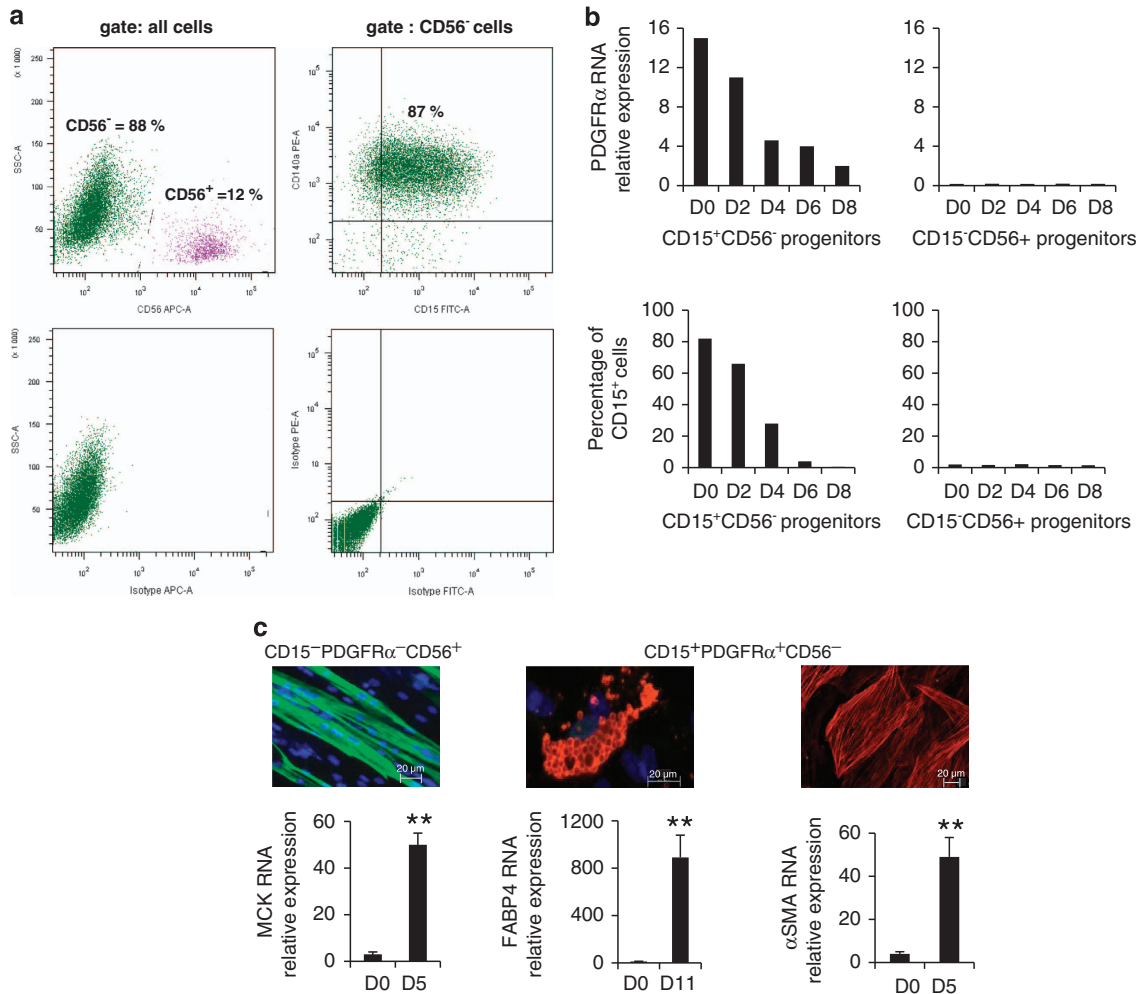


Figure 1 CD15 and PDGFR α are specific markers of human FAPs. (a) Representative results from flow cytometry analysis of adherent human muscle cells. The CD56 negative cells (left upper panel) were labeled with both anti-CD15 and anti-PDGFR α (CD140a; right upper panel). The lower panels represent the respective isotype negative labelings. Percentages of the fractions are indicated. (b) Kinetic expression of PDGFR α and CD15 shown for a representative muscle biopsy (FAP biopsy 7). PDGFR α expression was measured by quantitative RT-PCR and CD15 expression was measured by flow cytometry. At day D0, the cells were confluent and proliferation medium was replaced by differentiation medium. Measurements were done every 2 days until day D8. (c) After confluence (D0), cells were put under differentiation conditions. Myotubes were labeled with antimyosin heavy-chain antibodies and muscle creatine kinase (MCK) expression was compared with quantitative RT-PCR between days D0 and D5. Adipocytes were stained with oil red O and FABP4 expression was compared with quantitative RT-PCR between days D0 and D11. Fibroblast-like cells were labeled with anti- α smooth muscle actin and its expression was compared with quantitative RT-PCR between days D0 and D5. Quantitative RT-PCR results are mean \pm S.E. of the mean ($n=3$; FAP biopsies 2, 9, and 10). ** $P<0.01$. FITC, fluorescein isothiocyanate; PE, phycoerythrin; SSC, side scatter detector

adipogenesis is negatively regulated in FAPs by same crucial molecules as those involved for ASCs.

Muscle FAP cells differentiate into white adipocytes. We investigated the white or brown nature of FAP-As, as brown adipocyte progenitors have also been described in human muscle.²⁹ The expression of uncoupling protein one (UCP1), which is the major brown adipocyte marker, was assessed in FAP-As prepared from muscle samples obtained from 10 donors. A lack of expression or only a very weak expression was found (Figure 2d). The expression was always much lower than UCP1 expression found in adipocytes derived from some of the ASCs samples. Note that FAP-As included young and adult donors, which showed that the lack of UCP1 expression could not be ascribed to an age effect.

Triglyceride synthesis, storage, and lysis. As adipogenic activities have been found to be age dependent,^{30,31} FAP-As derived from donors <9 years of age were used to match ages of ASC references.

Triglyceride biosynthesis was assayed with glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activity and no significant difference was observed between FAP-As and ASC-As (Figure 3a). Lipolysis, that is, triglyceride degradation, was assayed by glycerol release induced with forskolin, used as a nonselective β -adrenoreceptor agonist (Figure 3b). FAP-As had also an activity similar to ASC-As. Finally, the ability to accumulate intracellular lipids was measured by the triglyceride content. Once more, no difference was observed between the two types of adipocytes (Figure 3c).

Regarding the effect of age, GPDH activity, amount of released glycerol, and triglyceride content were altered in

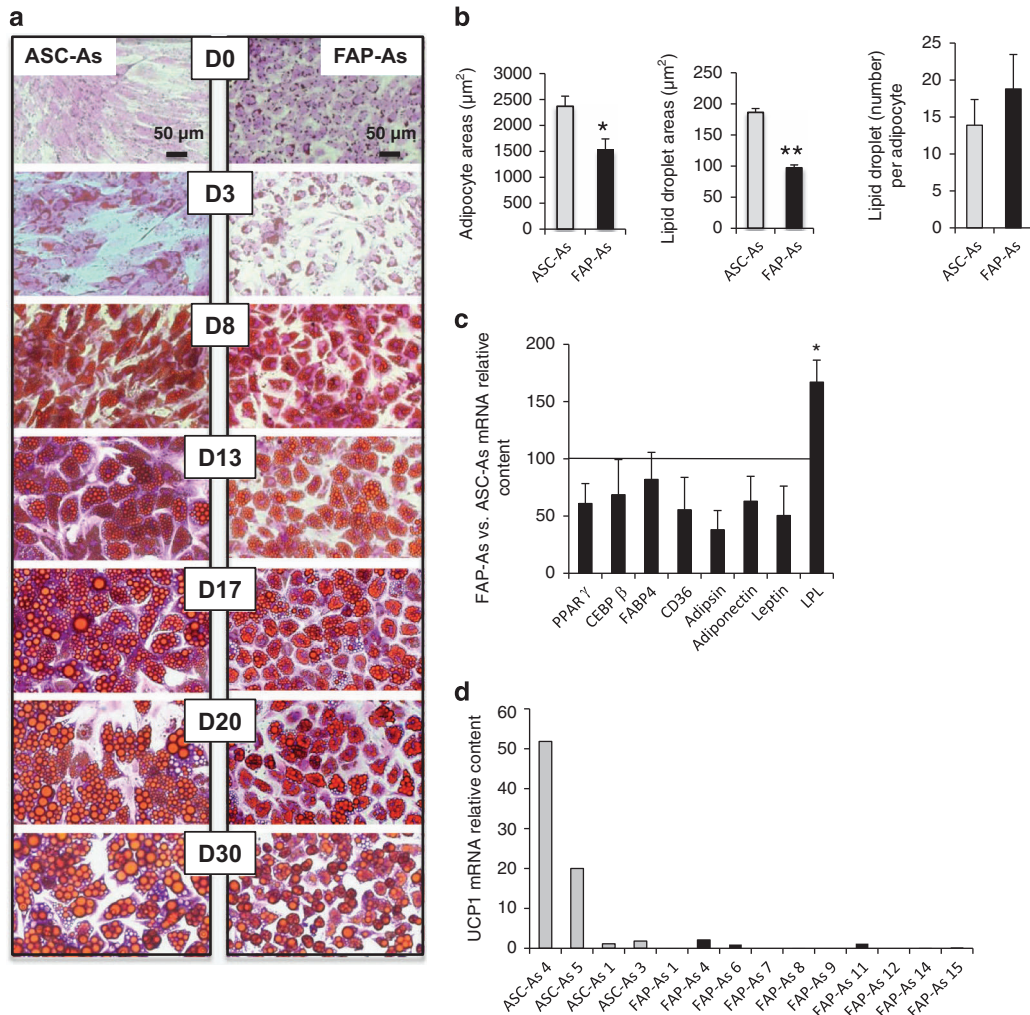


Figure 2 Adipogenic differentiation. (a) FAPs and ASCs were grown to confluence in adjacent culture wells and then treated with differentiation-inducing medium. Cells were fixed and assayed for intracellular lipid droplets with oil red O staining from day 0 (start of differentiation induction) to day 30, as indicated. Cell cultures were counterstained with crystal violet. Pictures were visualized by light microscopy with $\times 200$ magnification. Fields representative of whole cell culture wells are shown and were obtained with ASC biopsy 4 and FAP biopsy 6. Scale bar = $50 \mu\text{m}$. (b) Adipocyte and lipid droplet sizes (μm^2) were analyzed using ImageJ software in cultures after 2 weeks of adipogenic differentiation. Lipid droplet quantity was estimated by the intracellular droplet number counted per adipocyte. ASC-As are represented in gray bars ($n=3$; ASCs biopsies 1, 3, and 4) and FAP-As in black bars ($n=3$; FAP biopsies 4, 6, and 7). Results are mean \pm S.E. of the mean for three independent measurements. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (c) FAP-As mRNA content of classical early (PPAR γ and CEBP β) and late (FABP4, CD36, adipsin, adiponectin, leptin, and LPL) adipogenic markers was quantified by quantitative RT-PCR. The results are expressed as ratios (%) to respective ASC-As mRNA contents, which are represented by the horizontal line. FAP-As ($n=3$; FAP biopsies 4, 6, and 7) and ASC-As ($n=3$; ASC biopsies 1, 2, and 4) were strictly maintained under the same culture conditions. Results are mean \pm S.E. of the mean for three independent ratio measurements * $P < 0.05$. (d) UCP1 expression was measured with quantitative RT-PCR in FAP-As, which were prepared from a panel of biopsies ($n=10$; FAP biopsies 1, 4, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 14, and 15) in comparison with ASCs-As from biopsies 1, 3, and 4. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

adipocytes derived from adult FAP donors (from 14 to 59 years of age) as compared with young FAP donors (less than 9 years of age; data not shown). These biochemical activities indicate that FAP-As fulfill the fundamental lipid-related functions of adipocytes.

Impaired glucose transport. One key feature of adipocytes is that they are insulin-sensitive cells. Insulin induces translocation of the glucose transporter Glut4 to the plasma membrane, resulting in glucose uptake. We compared insulin-stimulated glucose uptake in FAP-As and ASC-As. It was assessed through [^3H]2-deoxy-D-glucose uptake. As expected, insulin induced a clear stimulation of glucose uptake in ASC-As (Figure 4a). However, glucose uptake

remained unchanged after insulin treatment in FAP-As, suggesting that FAP-As are insulin-resistant adipocytes.

Quantitative RT-PCR experiments demonstrated that FAP-As and ASC-As express similar levels of insulin receptor (IR) and Glut4 mRNAs (Figure 4b). This ruled out the possibility that the difference in glucose uptake is linked to a modification in the expression of these genes.

Insulin-stimulated glucose uptake is one of the end points of the insulin-signaling pathway, which is controlled by a cascade of phosphorylation events. We used western blot to analyze the phosphorylation status of key molecules of the insulin-signaling pathway, that is, IR, IRS-1, Akt, 42/44 MAP kinases (MAPK; Figure 4c and d). Insulin did not modify the phosphorylation status of these proteins in FAP-As, whereas,

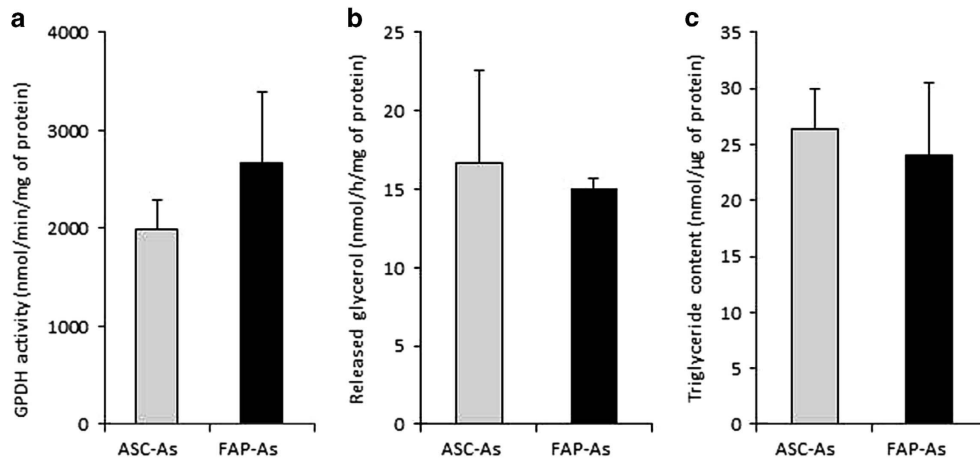


Figure 3 Triglyceride synthesis, storage, and lysis. Biochemical activities were measured in FAP-As and ASC-As prepared from age-matching donors (<9 years). (a) Triglyceride synthesis was assessed with GPDH activity. (b) Lipolysis was assayed by glycerol released. (c) Lipid storage was estimated through triglyceride content measurement. ASC-As values are represented with gray bars ($n=3$; ASC biopsies 1, 2, and 4), FAP-As values in black bars ($n=3$; FAP biopsies 4, 6, and 7). Results are mean \pm S.E. of the mean for three independent measurements. No significant differences were found between ASC-As and FAP-As

as expected, insulin induced an increase in the phosphorylation of the same proteins in ASC-As, revealing the activation of the insulin-signaling pathway in ASC-As. These differences between FAP-As and ASC-As observed in protein phosphorylation paralleled the differences found for glucose uptake. In FAP-As, the total inhibition of IR tyrosine phosphorylation, which is a very early insulin-signaling event, could explain why all subsequent steps are blunted, from IRS-1 tyrosine phosphorylations to glucose transport.

Protein tyrosine phosphatases are negative regulators of insulin signaling.³² So far, PTP1B and SHP2, two protein tyrosine phosphatases, have been proposed to act on IR and IRS-1. Their mRNA contents were examined by quantitative RT-PCR. As shown in Figure 4e and f, no significant difference was found between FAP-As and ASC-As. Dysregulation of these protein tyrosine phosphatases does not seem to be involved in FAP-As insulin insensitivity for glucose uptake.

Together, these results show that glucose uptake in FAP-As is insensitive to insulin and associated with a lack of insulin induction for key phosphorylations in the insulin-signaling pathway.

Discussion

Adipose tissue is spread in different compartments and one of them can be found inside muscle tissue, as fatty infiltrations between muscle fibers bundles, and constitutes the so-called IMAT. This very particular localization and therefore the intimate contact between adipocytes and muscle fibers is likely crucial for muscle homeostasis. Nevertheless, the specificity for intermuscular adipocytes is poorly documented. A few studies have been performed in cattle, but no studies have been reported in humans to our knowledge. The recently identified adipogenic progenitors resident in skeletal muscle are the main IMAT contributors, considering their localization, proliferative capacities, abundance, and adipogenic potential after engraftment in muscle.^{20–22} Our study was conducted in humans regarding the potential clinical impact of IMAT for muscle homeostasis and repair. We found that FAP-As

exhibited key cellular and functional properties of adipocytes derived from subcutaneous adipose tissue, but interestingly they also had their own specificities.

A first point is that the CD15⁺CD56⁻ progenitors that we previously identified and the PDGFR α ⁺CD56⁻ progenitors identified by Uezumi *et al.*²⁴ constitute the same fibro/adipogenic cell population. Our results fully confirm that the CD15⁺CD56⁻ immunophenotype is highly specific to human muscle FAPs. CD15 and PDGFR α should be considered as two unrelated FAP markers. CD15 is expressed on a variety of glycoproteins, glycolipids, and proteoglycans, and there are no available data on a possible co-localization with PDGFR α . Thus, both CD15⁺CD56⁻ and PDGFR α ⁺CD56⁻ immunophenotypes allow prospective *in vitro* isolation of human FAPs. Muscle and adipose tissue progenitor cells could differentiate in the same culture medium, indicating close if not similar biochemical requirements. They followed similar differentiation kinetics and gave rise to adipocytes with very close phenotypes. FAP-As are smaller than ASC-As, and *in vivo* IMAT adipocytes are smaller than adipocytes of subcutaneous depots.^{33–35} Canonical early and late molecular markers of differentiation described in the adipose lineage exhibited similar profiles in muscle-differentiating progenitors. This indicates that the same stimulating molecular regulation of adipogenesis is shared by the fat muscle compartment, particularly regarding the expression of the key gene *PPAR γ* . Furthermore, our data on adipogenesis inhibition extend this similarity to the negative regulation by TNF α and TGF β family. Moreover, the same level of expression of mature adipocyte markers such as FABP4 or adiponin strongly suggests that FAP-As and ASC-As have similar phenotypes. This is in agreement with FAP-As and ASC-As general appearances, characterized by the presence of multiple lipid droplets in cytosol. At a functional level, no significant differences were observed between FAP-As and ASC-As for the experimental measurement of triglycerides synthesis, content, and degradation. In addition, the impact of aging, which was found to lower triglyceride synthesis and degradation values in FAP-As, is in line with age-related changes described for ASC-As.³⁶

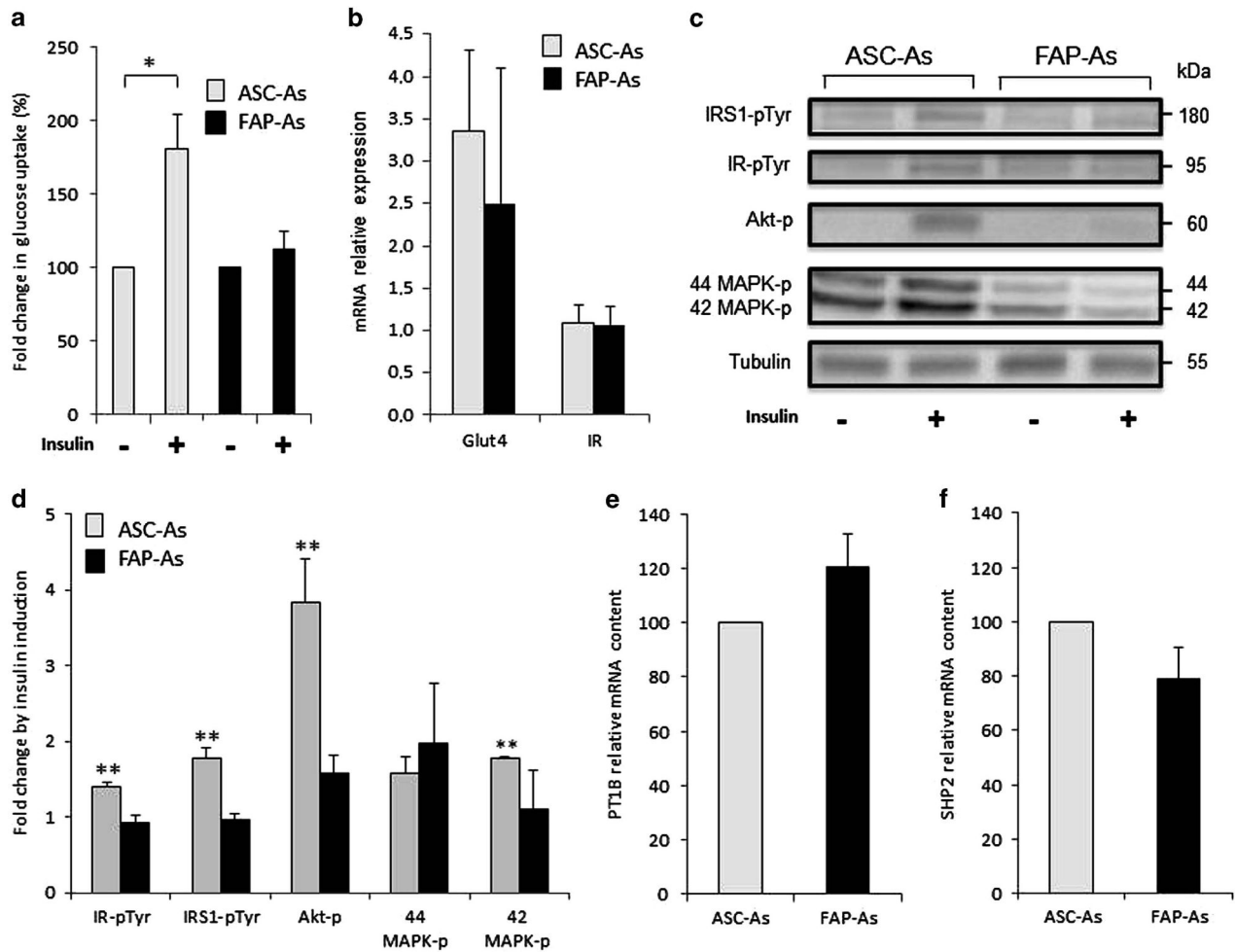


Figure 4 Impaired glucose transport and alterations in insulin signaling. (a) Insulin-stimulated glucose transport was determined using nonmetabolizable [3 H]2-deoxy-D-glucose. The results are expressed as a percentage of glucose transport measured in the absence of insulin separately for ASC-As and FAP-As. ASC-As values are represented with gray bars ($n=4$; ASC biopsies 1, 2, 3, and 4) and FAP-As values with black bars ($n=8$; FAP biopsies 3, 4, 5, 6, 7, 13, 14, and 15). (b) mRNA relative expression of Glut4 and IR measured by quantitative RT-PCR. $n=3$ for ASC-As (ASC biopsies 1, 3, and 4) and FAP-As (FAP biopsies 4, 6, and 7). The results are mean \pm S.E. of the mean for three independent measurements. (c) Phosphorylations were compared in adipocytes without insulin treatment and with 100 nM insulin stimulation, for 20 min. Cell lysates were subjected to immunoblotting with specific antibodies. Representative blots are shown. (d) Immunoblot signals were quantified and normalized with tubulin signals. Phosphorylated-form contents are expressed as fold change induced by insulin relative to the absence of insulin treatment. The phosphorylations concern IR tyrosines, IRS-1 tyrosines, Akt-Thr³⁰⁸, 42 MAPK-Thr²⁰², and 44 MAPK-Tyr²⁰⁴. ASC-As values ($n=3$; ASC biopsies 1, 2, and 4) are represented with gray bars and FAP-As values in black bars ($n=6$; FAP biopsies 1, 2, 8, 9, 10, and 12; except for 42 and 44 MAPK where $n=4$; FAP biopsies 1, 2, 8, and 9). Data are expressed as mean \pm S.E. of the mean. (e and f) Relative mRNA contents of PTLB and SHP2 were measured by quantitative RT-PCR and expressed as a percentage of values found in ASC-As. For ASC-As, $n=5$ (ASC biopsies 1, 2, 3, 4, and 5); for FAP-As, $n=7$ (FAP biopsies 2, 4, 6, 8, 9, 10, and 12). The results are mean \pm S.E. of the mean for three independent measurements. * $P<0.05$ and ** $P<0.01$.

Thus, the values of crucial basic functions in FAP-As are very close to those found for ASC-As. Together, our molecular, cellular, and biochemical results show that FAP-As are *bona fide* adipocytes.

Brown adipocytes have been largely described in rodents³⁷ and also more recently in humans.³⁸ In addition, ectopic brown adipocytes have been found in mouse skeletal muscle.³⁹ The very low level of UCP1 detected with some FAP biopsies might be an insignificant signal or due to contamination by scarce brown adipocyte progenitors. Such progenitors can be scattered in white adipose tissue, which could have been mixed with muscle biopsies⁴⁰ or they can be residents in skeletal muscle, although brown adipocytes progenitors have mainly been described in primary cultures derived from human

fetus biopsies.²⁹ We concluded that the muscle lineage investigated in this study is a white adipocyte lineage.

The other main finding is that FAP-As have a specific singularity. Unlike classical adipocytes, FAP-As were not sensitive to insulin in our *in vitro* experiments. This cannot be explained by an insufficient amount of insulin in our assays as it was used at high concentration (100 nM). The exact underlying molecular mechanisms of insulin resistance are still unclear. Here we show that the insensitivity to insulin is not mediated by altered expression of Glut4 or IR. Therefore, we investigated insulin signaling and found that the first steps of the pathway were modified. The addition of insulin failed to increase tyrosine phosphorylation of IR itself and consistently the cellular substrate IRS-1 did not undergo tyrosine

phosphorylation. No insulin signal could thus be transmitted inside muscle adipocytes, as shown by the very weak induction of phosphorylation of Akt on threonine 308, one of the phosphorylations implying activation of this crucial protein kinase. The noninduction of phosphorylation of 42/44 MAPK by insulin confirms the impairment of insulin signaling and suggests that insulin-dependent pathways other than the regulation of glucose uptake, such as proliferation or survival, may be disturbed.

We did not find the reason for the lack of induction of IR and IRS-1 phosphorylations, but we can rule out dephosphorylations of these proteins that would be mediated by upregulations of the two important tyrosine phosphatases PTP1B and SHP2. Alternative mechanisms remain to be identified to account for the insulin-resistant status of FAP-As.

Only a few recent studies document relationships between IMAT accumulation and insulin resistance. They all conclude on a positive correlation between these two parameters.^{41–44} However, there are no reports on the status of insulin sensitivity of IMAT in healthy subjects. We cannot definitely rule out that FAP-As insulin resistance was caused by our *in vitro* culture conditions. However, this would unlikely imply that the culture conditions would have different impacts on FAP-As and ASC-As, which were found to be very close regarding the other investigated parameters. Therefore our data strongly suggest that IMAT could be a very particular fat compartment, insensitive to insulin glucose uptake. This original feature opens the way for new exciting investigations. The main insulin-targeted tissues are liver, skeletal muscle, and fat tissue. A first point to consider is that IMAT is a minor fat compartment in healthy individuals and therefore its impact on regulation of circulating glucose is likely insignificant. A second point is the particular location of IMAT. It is the only fat compartment intimately bound to skeletal muscle. Many cross talks have been described in these two tissues, particularly in relation with the energy consumption of muscle and the energy storage of adipose tissue. It is thought that excess of fatty acids, that is, a basic fuel for muscle fibers, is stored in adipocytes to prevent cellular deleterious effects. The proximity of adipocytes should be advantageous for muscle regarding lipid storage and it is essential that IMAT fulfills this function. However, as muscle fibers, which represent a much greater tissue mass in healthy conditions than the associated IMAT, are endowed with insulin sensitivity for glucose uptake, we can assume that they are sufficient to absorb excess glucose from the local circulation, which brings blood to both muscle and intramuscular fat cells. Insulin sensitivity for IMAT would be insignificant because of its scarcity and its embedding in muscle tissue. This might be different in obese, immobilized, or aged individuals with a less favorable IMAT/muscle mass ratio, with the risk of exacerbating insulin resistance. It can also be speculated that the insulin resistance of IMAT would prevent local competition between muscle and IMAT for glucose uptake. Glucose would thus be directed mainly toward muscle for its energy needs.

FAPs have remarkable properties. They are mesenchymal progenitors²³ also endowed with a fibrogenic potential. In addition, they are important actors of muscle repair as they activate differentiation of satellite cells, which in turn inhibit differentiation of FAPs into adipocytes under healthy

conditions.^{21,25,45} No equivalent population has been described in adipose tissue compartments. It has recently been shown that adipogenic progenitors from subcutaneous adipose tissue can also differentiate into fibrogenic cells.⁴⁶ However, stimulation of the myogenic potential of satellite cells, as well as the inhibition of differentiation into adipocyte by satellite cells, are restricted to muscle FAPs and were not found with adipogenic progenitors from at least subcutaneous adipose tissues (unpublished observations). Thus, unlike other adipogenic progenitors, FAPs show specific cross talks with myogenic progenitors resident in skeletal muscle and give rise to adipocytes that are independent of insulin for their glucose uptake. Muscle adipogenic lineage has thus specific impacts on muscle physiology at both levels of undifferentiated progenitors and terminally differentiated adipocytes. At this point, we do not have enough clues to speculate on relationships between the resistance to insulin signaling and interactions with myogenic progenitors. An indication would come from the comparison of muscle adipogenic lineage properties under healthy and pathophysiological conditions. There is no more inhibition of adipogenic differentiation of FAPs in aging (unpublished observations) and likely in muscle dystrophies, as fat infiltrates muscle fibers. In addition, in aging, FAPs lose their capacity to support myogenic differentiation of satellite cells.⁴⁷ Investigations on the status of insulin resistance of FAP-As under these pathophysiological conditions would reveal whether the impairment of FAP cross talks with satellite cells is linked to the lack of FAP-As' insulin sensitivity.

In conclusion, FAP-As exhibit several canonical features of ASC-As with the notable exception of a lack of sensitivity to insulin. Therefore, FAP cells recently identified in mouse and human skeletal muscle, and isolable on the basis of specific cell-surface markers by flow cytometry, could give rise to a genuine but specific fat compartment. This potential sheds new light on muscle homeostasis and cross talks between adipose and muscle tissues.

Materials and Methods

Progenitor cells. Tissue samples were obtained as *res nullius* from surgeries on healthy donors without obesity or diabetes. All protocols were approved by the Centre Hospitalier Universitaire de Nice Review Board, according to the rules of the French Regulatory Health Authorities. Biopsies were obtained from 15 muscle donors and 5 adipose tissue donors (Table 1). Biopsies from age-matched donors under 9 years old were used for all experiments. In addition, adult donor muscle specimens were used when indicated.

Skeletal muscle cells were isolated by a standard method.⁴⁸ Briefly, skeletal muscle was minced into 1 mm³ fragments and digested at 37 °C, first using Liberase (Roche Diagnostics, Meylan, France, <http://roche.fr/portal/eipi/france/roche/fr/recherche/home>) for 1 h and then using 0.25% trypsin-EDTA (Lonza Verviers, Verviers, Belgium) for 20 min. The cell suspension was homogenized, filtered through 40- μ m cell strainers (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), and plated in growth culture medium.

For ASCs, about 200 mg/ml of adipose tissue was dissociated for 10–20 min in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin, 2 mg/ml collagenase A, and 20 mg/ml BSA. The crude stromal vascular fraction was separated by low speed centrifugation (200 g, 10 min). The adipocyte fraction was discarded and pelleted cells were seeded at 1000–3500 cells/cm² in growth culture medium.

Cell culture. Cell culture media, serum, buffer, and trypsin were purchased from Lonza Verviers (http://www.lonza.com/group/en/company/sites/europe/lonza_verviers_sprl.html) and cell culture reagents from Sigma-Aldrich Chimie (Saint-Quentin Fallavier, France, <http://www.sigmaaldrich.com/france/contactez-nous.html>).

Table 1 Muscle and adipose tissue biopsies

Biopsy reference	Gender of donor	Age of donor	Origin
ASCs			
ASCs 1	Male	9 years	Subcutaneous
ASCs 2	Male	9 years	Subcutaneous
ASCs 3	Male	6.5 years	Subcutaneous
ASCs 4	Female	19 months	Subcutaneous
ASCs 5	Male	4 months	Subcutaneous
FAPs			
FAPs 1	Female	1 year	Quadriceps
FAPs 2	Male	1 year	Gluteus maximus
FAPs 3	Female	1 year	Abdominal
FAPs 4	Male	14 months	Inguinal
FAPs 5	Male	21 months	Inguinal
FAPs 6	Female	2 years	Inguinal
FAPs 7	Male	2 years	Abdominal
FAPs 8	Male	19 months	Inguinal
FAPs 9	Male	4 years	Abdominal
FAPs 10	Male	8 years	Inguinal
FAPs 11	Male	14 years	Deltoid
FAPs 12	Female	17 years	Gluteus maximus
FAPs 13	Male	46 years	Vastus lateralis
FAPs 14	Female	51 years	Gluteus medius
FAPs 15	Male	59 years	Quadriceps

The growth culture medium for muscle progenitor cells was Ham's F10 medium supplemented with 20% fetal bovine serum. The growth culture medium for adipose tissue progenitors was low-glucose DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum. The two media were complemented with 10 mM Hepes, 10^{-6} M dexamethasone, 2.5 ng/ml basic fibroblast growth factor, 100 U/ml penicillin, and 100 mg/ml streptomycin.

Adipogenic differentiation was induced 2 days after confluence (designated as day 0) by switching to DMEM/Ham's F12 50/50 (v/v) complemented with $1 \mu\text{M}$ dexamethasone, 0.1 mM 1-methyl-3-isobutylmethyl-xanthine (MIX), 860 nM insulin, $10 \mu\text{g/ml}$ transferrin, 0.2 nM triiodothyronine, and 100 nM rosiglitazone (PPAR γ agonist). Three days later, cells were placed in the same medium lacking MIX and dexamethasone. Cells were studied after 2 weeks of adipogenic differentiation, except when indicated. Myogenic differentiation was induced at confluence in Ham's F10 complemented with $10 \mu\text{g/ml}$ insulin, $5 \mu\text{g/ml}$ transferrin, and 2% horse serum. Fibrogenic differentiation was done in Ham's F10 complemented with 1% horse serum and 5 ng/ml TGF β -1.

Fluorescence analyses. They were performed as previously described.¹⁸ Immunofluorescence analyses of adherent cells were carried out with antimyosin heavy chains (Developmental Studies Hybridoma Bank) and anti- α smooth muscle actin (Sigma-Aldrich) antibodies. Living cells were sorted by flow cytometry according to labeling with anti-CD56-APC, anti-CD15-FITC, and CD140a-PE (PDGFR α) antibodies (BD Biosciences). We used a BD FACSAria II sorter equipped with four lasers (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA, <http://www.bdbiosciences.com/us/s/contactus>) and the BD FACSDiva software. For CD15-FITC, fluorescence was excited with the 488 nm laser and measured with a 530/30 bandpass filter. For CD140a-PE, fluorescence was excited with the 561 nm laser and measured with a 586/15 bandpass filter. For CD56-APC, fluorescence was excited with the 633 nm laser and measured with a 670/14 bandpass filter. Fluorescence minus one (FMO) controls were performed to insure that the FITC fluorescence did not spread into the PE fluorescence (Supplementary Figure 1). The fluorescence spreads were always < 1%. Gates created after compensation with the appropriate FMO controls were the same as those created with single-staining controls.

Adipocyte morphometry analysis. Differentiated adipocytes were PBS-washed, fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min, treated for 15 min with oil red O (60% of a stock solution at 0.5% w/v in isopropanol and 40% distilled water), and counterstained with crystal violet. Images were recorded with a TE-2000U bright-field optical microscope (Nikon, Tokyo, Japan). Cell and lipid droplet areas were analyzed using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

At least 300 adipocytes from each sample were measured. Areas were measured in μm^2 by the software. The amount of lipid droplets was counted per cell. Incomplete droplets located at the edge of the image were excluded.

Gene expression analysis. Total RNA was extracted using TRI-reagent (Euromedex, Souffelweyersheim, France, <http://www.euromedex.com/>). RNA was treated with DNase I (Promega, Charbonnières, France) for 30 min before reverse transcription. First-strand cDNA was generated on $1 \mu\text{g}$ of RNA with Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Promega) in the presence of 12.5 ng/l random primers for 1 h at 37 °C. Integrity of cDNA was checked by amplification of 18S rRNA with classical PCR. For quantitative PCR (qPCR), the final reaction volume was $10 \mu\text{l}$ including specific primers ($0.3 \mu\text{M}$), 8 ng reverse-transcribed RNA, and $10 \mu\text{l}$ SYBR Green Master Mix (Ozyme, Montigny Le Bretonneux, France). The qPCR conditions were as follows: 2 min at 50 °C, 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C, 1 min at 60 °C. qPCR assays were run on a StepOneplus Real-time PCR system (Applied Biosystems, Courtabouef, France). Quantification was performed using the comparative- ΔCt method. The house-keeping gene TATA box-binding protein was used as reference. All primer sequences were designed using Primer Express software (Applied Biosystems). Primers were validated by testing the PCR efficiency using standard curves (85% < efficiency < 115%). The 5'-3' sequences of forward and reverse primers were, respectively, GTTGGTGAGCGATTGTCT and GGCCTCACTAAACCATCCAA for 18S RNA, CTGCGTGGCTGGTGTATGAG and CAGGTCGTCTCCACCCTTGA for MCK, TGCCTGCATGGGCAAGTGA and CTGGCAGCGGAAACG for αSMA , AGCCTCATGAAGAGCCTTCCA and TCGGAAAGAAACCCTTGA for PPAR γ , ATGGGATGGAAAATCAACCA and TGCTTGCTAAATCAGGGAAA for FABP4, AACCAACCGCACATGCAGAT and GGCAGAGGGAGAAGCAGAGAGT for CEBP β , AGGGAGACCGAGCGCTTTC and TGCATCTCCACACACCAAAACC for leptin, GGGAAAGTCACTGCGACATGAT and ACGTCCGATTCAAATACAGCATAGA for CD36, AGGGTCAACCAAGCAACAAG and TAGTGGCCCATGCTGATCT for adipin, GCAGTCTGTGGTTCTGATTCCATAC and GCCCTTGAGTCTGGTTCCTC for adiponectin, TGGAGGTACTTTTCAGCCAGGAT and TCGTGGGAGCACTTCA CTAGCT for LPL, CATTCCCTGGTTTCATCGTG and ATAGCCTCCGCAAC ATAC for Glut4, TGCTGCTCCTGTCCAAAGAC and GAGATGGCCTGGGGACGAAA for IR, TGATGGCCCAACTGTGCAATG and CCAGGATCCAAGTCGCAAG for UCP1, TGA TCC AGA CAG CCG ACC A and ATG AAT TTG GCA CCT TCG for PTP1B, GACTTTTGGCGGATGGTGTTC and CGGCGCTTTCTTGACGTTCTCT for SHP2, and CACGAACCACGGCACTGATT and TTTTCTTGCTGCCAGTCTGG AC for TBP.

Western blots. Adipocytes were deprived of insulin for 72 h in DMEM/Ham's F12 50/50 (v/v) complemented with 0.2% BSA and then stimulated for 20 min with 100 nM insulin. They were collected with a rubber policeman in $200 \mu\text{l}$ RIPA buffer (150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 5 mM NaF, 2.5 mM $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$, 2 mM sodium vanadate, 5 mM EDTA, protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics), and 50 mM Tris-HCl, pH 8.0). The protein content was determined according to the BCA method (Pierce BCA Protein Assay Kit, ThermoFisher, Rockford, IL, USA; #23227).

Equal amounts of protein were resolved by 7.5% SDS-PAGE under reducing conditions and transferred to Immobilon-P membranes (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). A unit of $20 \mu\text{g}$ of proteins was used for insulin-signaling measurements. For immunoblotting assays, the primary antibodies were mouse anti-phosphotyrosine (Upstate, Hertfordshire, UK), rabbit anti-phospho-Akt (Thr308; Ozyme), rabbit anti-Akt (Ozyme), mouse anti-phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) and mouse anti- β -tubulin (Sigma-Aldrich). The bound primary antibody was detected by horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Promega) and visualized with an electrochemical luminescence detection kit (Millipore). Chemiluminescence was observed and quantified using a ChemoDoc XRS plus (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). The band intensity was measured using the Quantity One software (Bio-Rad).

GPDH activity, lipolysis, triglyceride content, and glucose uptake. GPDH activity was measured as described previously⁴⁹ and expressed in mU/mg of protein.

Lipolysis was assessed by measuring glycerol release from differentiated cells as follows: after 72 h of insulin depletion, the cells were maintained in 2% BSA for 3 h of incubation at 37 °C in the presence or absence of $10 \mu\text{M}$ forskolin; glycerol assays were then performed.

For the measurement of triglyceride content, cells were washed twice with PBS and then lysed with 5% NP40 in water. Glycerol and triglyceride were quantified using Free Glycerol Reagent (Sigma, Lyon, France; F6428) and the Triglyceride Quantification Kit (Biovision, Mountain View, CA, USA; #K622-100) according to the manufacturers' instructions. The protein concentration was determined with the Pierce BCA Protein Assay Kit (#23227).

Insulin-stimulated glucose transport was determined by measuring the amount of nonmetabolizable [³H]2-deoxy-D-glucose transported into adipocytes, as already described.⁵⁰ After overnight serum depletion, fully differentiated adipocytes were washed with Krebs–Ringer phosphate buffer (10 mM phosphate buffer, pH 7.4, 1.25 mM MgSO₄, 1.25 mM CaCl₂, 136 mM NaCl, and 4.7 mM KCl) and incubated without or with insulin (100 nM) for 20 min in Krebs–Ringer phosphate buffer supplemented with 0.2% BSA. Identical levels of adipogenic differentiation with or without insulin treatment were validated with ImageJ software analysis of total adipocyte areas on culture well pictures. Glucose transport was determined by the addition of 2-[³H] deoxyglucose (0.1 mM, 0.5 μCi/ml). The reaction was stopped after 3 min at 37 °C by washing the cells with ice-cold PBS. Cells were lysed in RIPA buffer and glucose uptake was assessed by scintillation counting. The results were normalized for protein content measured by BCA assay.

Statistical analysis. Differences between data groups were evaluated for significance using the two-tailed unpaired Student's *t*-test. A *P*-value < 0.05 was considered significant. The data are presented as mean ± S.E. of the mean of independent measurements. The number of measurements is indicated in figure legends.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements. This work was supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM), (through grants #15294, #16063, and #17708 and a PhD fellowship for CM), the Centre National d'Etudes Spatiales (CNES), and the French Government (National Research Agency, ANR) through the 'Investments for the Future' Program reference #ANR-11-LABX-0028-01. We thank David Manley for English correction of the manuscript. We greatly acknowledge the Plateforme de Cytométrie – Institut de Biologie Valrose, University Nice Sophia Antipolis and CytoMed, the IRCAN Flow Cytometry Facility. The CytoMed materials were supported by the Conseil Général 06, FEDER, Ministère de l'Enseignement Supérieur and INSERM.

1. Bodine SC. Disuse-induced muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol* 2013; **45**: 2200–2208.
2. Vettor R, Milan G, Franzin C, Sanna M, De Coppi P, Rizzuto R et al. The origin of intermuscular adipose tissue and its pathophysiological implications. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; **297**: E987–E998.
3. Hosoyama T, Ishiguro N, Yamanouchi K, Nishihara M. Degenerative muscle fiber accelerates adipogenesis of intramuscular cells via RhoA signaling pathway. *Differentiation* 2009; **77**: 350–359.
4. Wren TA, Bluml S, Tseng-Ong L, Gilsanz V. Three-point technique of fat quantification of muscle tissue as a marker of disease progression in Duchenne muscular dystrophy: preliminary study. *AJR Am J Roentgenol* 2008; **190**: W8–W12.
5. Goodpaster BH, Thaete FL, Kelley DE. Thigh adipose tissue distribution is associated with insulin resistance in obesity and in type 2 diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr* 2000; **71**: 885–892.
6. Goodpaster BH, Krishnaswami S, Resnick H, Kelley DE, Haggerty C, Harris TB et al. Association between regional adipose tissue distribution and both type 2 diabetes and impaired glucose tolerance in elderly men and women. *Diabetes Care* 2003; **26**: 372–379.
7. Song MY, Ruts E, Kim J, Janumala I, Heymsfield S, Gallagher D. Sarcopenia and increased adipose tissue infiltration of muscle in elderly African American women. *Am J Clin Nutr* 2004; **79**: 874–880.
8. Cree MG, Newcomer BR, Katsanos CS, Sheffield-Moore M, Chinkes D, Aarsland A et al. Intramuscular and liver triglycerides are increased in the elderly. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; **89**: 3864–3871.
9. Ryall JG, Schertzer JD, Lynch GS. Cellular and molecular mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and weakness. *Biogerontology* 2008; **9**: 213–228.
10. Dulor JP, Cambon B, Vigneron P, Reyne Y, Nougues J, Castella L et al. Expression of specific white adipose tissue genes in denervation-induced skeletal muscle fatty degeneration. *FEBS Lett* 1998; **439**: 89–92.

11. Manini TM, Clark BC, Nalls MA, Goodpaster BH, Ploutz-Snyder LL, Harris TB. Reduced physical activity increases intermuscular adipose tissue in healthy young adults. *Am J Clin Nutr* 2007; **85**: 377–384.
12. Trudel G, Ryan SE, Rakhra K, Uthoff HK. Extra- and intramuscular fat accumulation early after rabbit supraspinatus tendon division: depiction with CT. *Radiology* 2010; **255**: 434–441.
13. Goodpaster BH, Thaete FL, Simoneau JA, Kelley DE. Subcutaneous abdominal fat and thigh muscle composition predict insulin sensitivity independently of visceral fat. *Diabetes* 1997; **46**: 1579–1585.
14. Goodpaster BH, Wolf D. Skeletal muscle lipid accumulation in obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes. *Pediatr Diabetes* 2004; **5**: 219–226.
15. Trayhurn P, Drevon CA, Eckel J. Secreted proteins from adipose tissue and skeletal muscle - adipokines, myokines and adipose/muscle cross-talk. *Arch Physiol Biochem* 2011; **117**: 47–56.
16. Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* 1961; **9**: 493–495.
17. Vauchez K, Marolleau JP, Schmid M, Khattar P, Chapel A, Catelain C et al. Aldehyde dehydrogenase activity identifies a population of human skeletal muscle cells with high myogenic capacities. *Mol Ther* 2009; **17**: 1948–1958.
18. Pisani DF, Clement N, Loubat A, Plaisant M, Sacconi S, Kurzenne JY et al. Hierarchization of myogenic and adipogenic progenitors within human skeletal muscle. *Stem Cells* 2010; **28**: 2182–2194.
19. Lecourt S, Marolleau JP, Fromigue O, Vauchez K, Andriamanalijaona R, Ternaux B et al. Characterization of distinct mesenchymal-like cell populations from human skeletal muscle in situ and in vitro. *Exp Cell Res* 2010; **316**: 2513–2526.
20. Pisani DF, Dechesne CA, Sacconi S, Delplace S, Belmonte N, Cochet O et al. Isolation of a highly myogenic CD34-negative subset of human skeletal muscle cells free of adipogenic potential. *Stem Cells* 2010; **28**: 753–764.
21. Joe AW, Yi L, Natarajan A, Le Grand F, So L, Wang J et al. Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat Cell Biol* 2010; **12**: 153–163.
22. Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N, Takeda S, Tsuchida K. Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat Cell Biol* 2010; **12**: 143–152.
23. Judson RN, Zhang RH, Rossi FM. Tissue-resident mesenchymal stem/progenitor cells in skeletal muscle: collaborators or saboteurs? *FEBS J* 2013; **280**: 4100–4108.
24. Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N, Ikemoto-Uezumi M, Nakatani M, Morita M et al. Identification and characterization of PDGFRα⁺ mesenchymal progenitors in human skeletal muscle. *Cell Death Dis* 2014; **5**: e1186.
25. Uezumi A, Ikemoto-Uezumi M, Tsuchida K. Roles of nonmyogenic mesenchymal progenitors in pathogenesis and regeneration of skeletal muscle. *Front Physiol* 2014; **5**: 68.
26. Gustafson B, Gogg S, Hedjazifar S, Jenndahl L, Hammarstedt A, Smith U. Inflammation and impaired adipogenesis in hypertrophic obesity in man. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; **297**: E999–E1003.
27. Margoni A, Fotis L, Papavassiliou AG. The transforming growth factor-beta/bone morphogenetic protein signalling pathway in adipogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 2012; **44**: 475–479.
28. Zaragosi LE, Wdziekonski B, Villageois P, Keophiphath M, Maumus M, Tchkonja T et al. Activin a plays a critical role in proliferation and differentiation of human adipose progenitors. *Diabetes* 2010; **59**: 2513–2521.
29. Crisan M, Castella L, Lehr L, Carmona M, Paoloni-Giacobino A, Yap S et al. A reservoir of brown adipocyte progenitors in human skeletal muscle. *Stem Cells* 2008; **26**: 2425–2433.
30. Hartman AD. Adipocyte fatty acid mobilization in vivo: effects of age and anatomical location. *Lipids* 1985; **20**: 255–261.
31. Sypniewska G, Xu XF, Hager A, Lindahl A, Bjorntorp P. Effects of age, obesity and growth-hormone on adipogenic activity in human plasma. *Int J Obes* 1987; **11**: 263–273.
32. Asante-Appiah E, Kennedy BP. Protein tyrosine phosphatases: the quest for negative regulators of insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; **284**: E663–E670.
33. Smith SB, Crouse JD. Relative contributions of acetate, lactate and glucose to lipogenesis in bovine intramuscular and subcutaneous adipose tissue. *J Nutr* 1984; **114**: 792–800.
34. Zhou G, Wang S, Wang Z, Zhu X, Shu G, Liao W et al. Global comparison of gene expression profiles between intramuscular and subcutaneous adipocytes of neonatal landrace pig using microarray. *Meat Sci* 2010; **86**: 440–450.
35. Kouba M, Sellier P. A review of the factors influencing the development of intermuscular adipose tissue in the growing pig. *Meat Sci* 2011; **88**: 213–220.
36. Cartwright MJ, Tchkonja T, Kirkland JL. Aging in adipocytes: potential impact of inherent, depot-specific mechanisms. *Exp Gerontol* 2007; **42**: 463–471.
37. Klingenspor M. Cold-induced recruitment of brown adipose tissue thermogenesis. *Exp Physiol* 2003; **88**: 141–148.
38. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; **293**: E444–E452.
39. Almind K, Manieri M, Sivitz WI, Cinti S, Kahn CR. Ectopic brown adipose tissue in muscle provides a mechanism for differences in risk of metabolic syndrome in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 2366–2371.
40. Champigny O, Riquier D. Evidence from in vitro differentiating cells that adrenoceptor agonists can increase uncoupling protein mRNA level in adipocytes of adult humans: an RT-PCR study. *J Lipid Res* 1996; **37**: 1907–1914.

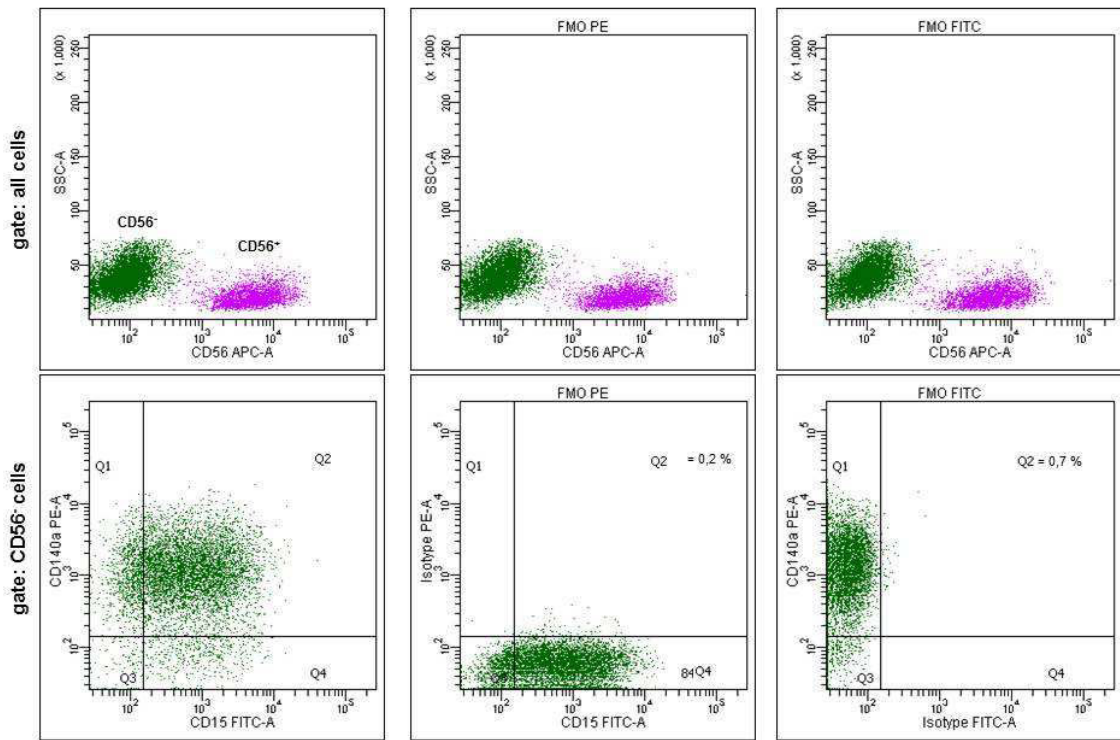
41. Lee S, Kim Y, White DA, Kuk JL, Arslanian S. Relationships between insulin sensitivity, skeletal muscle mass and muscle quality in obese adolescent boys. *Eur J Clin Nutr* 2012; **66**: 1366–1368.
42. Goss AM, Gower BA. Insulin sensitivity is associated with thigh adipose tissue distribution in healthy postmenopausal women. *Metabolism* 2012; **61**: 1817–1823.
43. Zoico E, Rossi A, Di Francesco V, Sepe A, Oliosio D, Pizzini F *et al*. Adipose tissue infiltration in skeletal muscle of healthy elderly men: relationships with body composition, insulin resistance, and inflammation at the systemic and tissue level. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2010; **65**: 295–299.
44. Boettcher M, Machann J, Stefan N, Thamer C, Haring HU, Claussen CD *et al*. Intermuscular adipose tissue (IMAT): association with other adipose tissue compartments and insulin sensitivity. *J Magn Reson Imaging* 2009; **29**: 1340–1345.
45. Uezumi A, Ito T, Morikawa D, Shimizu N, Yoneda T, Segawa M *et al*. Fibrosis and adipogenesis originate from a common mesenchymal progenitor in skeletal muscle. *J Cell Sci* 2011; **124**: 3654–3664.
46. Bourlier V, Sengenès C, Zakaroff-Girard A, Decaunes P, Wdziekonski B, Galitzky J *et al*. TGFβ family members are key mediators in the induction of myofibroblast phenotype of human adipose tissue progenitor cells by macrophages. *PLoS One* 2012; **7**: e31274.
47. Mozzetta C, Consalvi S, Saccone V, Tierney M, Diamantini A, Mitchell KJ *et al*. Fibroadipogenic progenitors mediate the ability of HDAC inhibitors to promote regeneration in dystrophic muscles of young, but not old Mdx mice. *EMBO Mol Med* 2013; **5**: 626–639.
48. Vilquin JT, Marolleau JP, Sacconi S, Garcin I, Lacassagne MN, Robert I *et al*. Normal growth and regenerating ability of myoblasts from unaffected muscles of facioscapulohumeral muscular dystrophy patients. *Gene Ther* 2005; **12**: 1651–1662.
49. Massiera F, Saint-Marc P, Seydoux J, Murata T, Kobayashi T, Narumiya S *et al*. Arachidonic acid and prostacyclin signaling promote adipose tissue development: a human health concern? *J Lipid Res* 2003; **44**: 271–279.
50. Tanti JF, Cormont M, Gremeaux T, Le Marchand-Brustel Y. Assays of glucose entry, glucose transporter amount, and translocation. *Methods Mol Biol* 2001; **155**: 157–165.



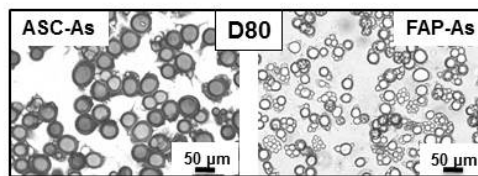
Cell Death and Disease is an open-access journal published by **Nature Publishing Group**. This work is licensed under a **Creative Commons Attribution 4.0 International License**. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Supplementary Information accompanies this paper on Cell Death and Disease website (<http://www.nature.com/cddis>)

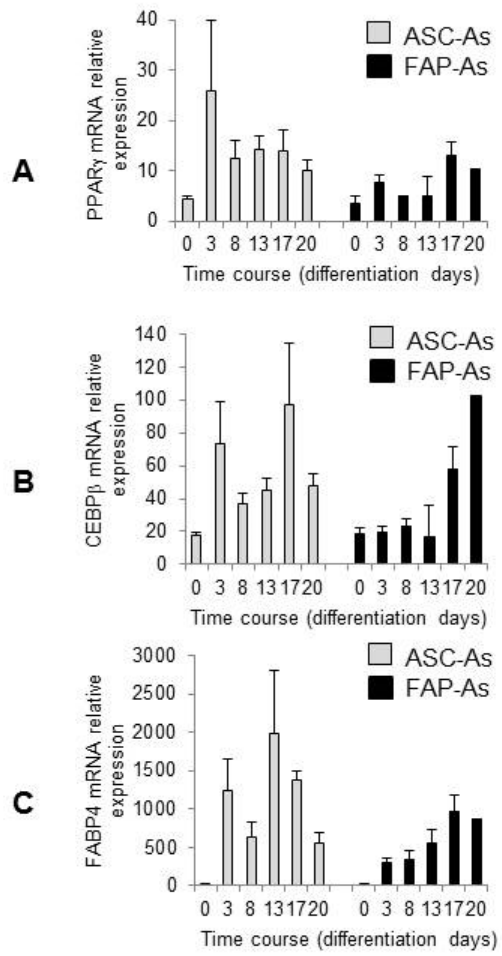
Supplemental Figure 1



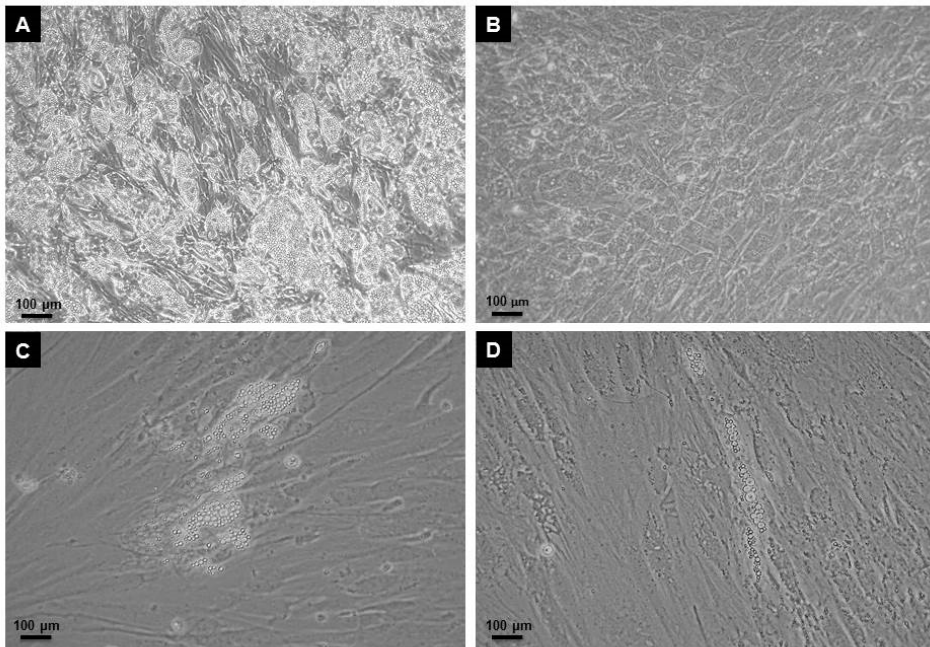
Supplemental Figure 2



Supplemental Figure 3



Supplemental Figure 4



Supplemental Figure 1. Fluorescence minus one (FMO) controls

The data were obtained with the representative FAPs biopsy 2. First column : the CD56⁺ cells (upper panel) were analyzed with both anti-CD15-FITC and anti-PDGFR α (CD140a)-PE (lower panel). Second column: CD140a-PE was replaced by the appropriate anti-IgG2aK-PE isotype as negative control. Third column: CD15-FITC was replaced by the appropriate anti-IgM K-FITC isotype as negative control. Percentages of unspecific fluorescence are indicated in quadrants 2.

Supplemental Figure 2. Long term adipocyte differentiation

FAP-As and ASC-As were kept in differentiation-inducing medium during 80 days. In the left panel cells were stained with Oil Red O. Pictures were visualized by light microscopy with x 200 magnification. Representative fields obtained with ASC biopsy 4 and FAP biopsy 6 are shown.

Supplemental Figure 3. Time course of adipogenic markers expression

PPAR γ (A), CEBP β (B), and FABP4 (C) relative mRNA expressions were monitored by quantitative RT-PCR in FAP-As (n = 3; FAP biopsies 11, 14, and 15) and ASC-As (n = 3; ASC biopsies 2, 3, and 4) at days 0 (switch to differentiation-inducing medium), 3, 8, 17, and 20. No significant differences were found between FAP-As and ASC-As. The results are mean \pm standard error of the mean for 3 independent measurements.

Supplemental Figure 4. Inhibition of adipogenic differentiation

Muscle adipogenic progenitors were grown to confluence and then treated with differentiation-inducing medium for 7 days. Adjacent culture wells were compared for no cytokine treatment (A), TGF- β 1 (5 ng / ml) (B), TNF- α (10 ng / ml) (C), and activin A (100 ng/ml) (D). Intracellular lipid droplets were assayed with Oil Red O staining and visualized by light microscopy with 100 \times magnification. Scale bar = 100 μ m. Cells from the representative FAP biopsy 9 are shown.

3. Conclusion

En culture, les cellules PDGFR α ⁺ ou CD15⁺ purifiées à partir de biopsies musculaires humaines représentent la même population cellulaire nommée FAPs. Ces progéniteurs sont capables de générer des myofibroblastes α SMA⁺ en réponse au TGF β 1. Sous des conditions de culture pro-adipogéniques, les FAPs se différencient exclusivement en adipocytes blancs (FAPs-As) et non en adipocytes bruns car ils n'expriment pas la protéine UCP1. Les FAPs-As sont plus petits que ceux issus de la différenciation des progéniteurs adipogéniques du tissu adipeux (ASCs-As) du fait de la réduction de la taille des gouttelettes lipidiques. L'adipogenèse des FAPs est régulée par les mêmes effecteurs que ceux régulant la différenciation adipogénique des ASCs. La synthèse des triglycérides et la lipolyse sont identiques pour les deux types d'adipocytes. Néanmoins, les FAPs-As sont résistants à l'absorption du glucose induite par l'insuline. Pour conclure, les FAPs-As se différencient en adipocytes blancs fonctionnels mais sont résistants à l'insuline.

A mon arrivée au laboratoire, j'ai pris en cours cette étude qui était déjà bien avancée. J'ai notamment participé à la caractérisation phénotypique des FAPs humains (expression de PDGFR α), à l'établissement de leurs potentiels de différenciation en adipocytes blancs et en myofibroblastes ainsi que de la signalisation impliquée dans la régulation de leur adipogenèse.

Chapitre 2. Fibrogenic potential of progenitors resident in human healthy and DMD muscles

1. Objectifs de l'étude

La fibrose tissulaire est une synthèse excessive de protéines de l'ECM telles que le collagène 1, la fibronectine et le CTGF (connective tissue growth factor). La plupart des tissus peuvent être affectés par ce phénomène qui apparaît généralement après des dommages successifs. Quand elle est contenue, la fibrose est bénéfique à la réparation tissulaire. Cependant, les fonctions des tissus sont altérées lorsque la fibrose envahit le tissu et persiste dans le temps. La fibrose est impliquée dans diverses pathologies sévères telles que la fibrose pulmonaire idiopathique et la fibrose tubulo-interstitielle rénale (Serrano et al. 2011). La communauté scientifique a attribué le rôle fibrogénique à des cellules spécialisées, appelées myofibroblastes, qui sont absentes de la plupart des tissus sains (Duffield et al. 2013). Les myofibroblastes partagent des propriétés avec les cellules musculaires lisses et les fibroblastes. Ils contiennent des fibres de stress exprimant la protéine contractile α SMA et produisent des protéines de l'ECM. Les myofibroblastes sont activés pour supporter la réparation tissulaire puis désactivés ou éliminés par apoptose après le remodelage du tissu endommagé. Grâce à leur expression de l' α SMA et à leur sécrétion de facteurs, les myofibroblastes favorisent le processus de cicatrisation. La fibrose est causée par la persistance pathologique des myofibroblastes dans le tissu. La différenciation cellulaire en myofibroblastes est régulée par diverses voies de signalisation dont celle de TGF β qui est reconnue comme étant la principale signalisation profibrotique (Desmoulière et al. 1993).

Les muscles striés peuvent également être touchés par la dégénérescence fibrotique comme observée dans certaines situations physiopathologiques incluant les désordres musculaires liés à l'âge ainsi que la DMD (Serrano et al. 2011). Cette myopathie est causée par une mutation sur le gène *DMD* qui code pour la protéine dystrophine, composant structural des fibres musculaires (Emery 2002). Cette mutation provoque la perte de l'intégrité des myofibres et entraîne la nécrose permanente des cellules musculaires. Les cycles répétés de dégénérescence/régénération induisent une déficience de la réparation tissulaire et une

accumulation de dépôts fibrotiques dans les muscles dystrophiques. De telles infiltrations contribuent à l'altération des fonctions musculaires et sont considérées comme des freins à l'efficacité des thérapies cellulaires et géniques. Dans les muscles de souris, en plus des FAPs, d'autres cellules souches mésenchymateuses sont considérées comme des précurseurs myofibroblastiques, notamment les fibroblastes, les péricytes, les cellules épithéliales et les cellules endothéliales (Kramann, DiRocco, and Humphreys 2013). De plus, quelques études démontrent que des cellules satellites murines peuvent acquérir *in vitro* et *in vivo* un potentiel fibrogénique au dépend de leur capacité myogénique (Pessina et al. 2015, Brack et al. 2007, Biressi et al. 2014).

Chez l'homme, les progéniteurs musculaires impliqués dans le développement de la fibrose des muscles dystrophiques sont encore inconnus. A ce jour, une seule équipe a étudié *in vitro* le potentiel fibrogénique des progéniteurs myogéniques (MPs, myogenic progenitors) et des FAPs humains de donneurs sains (Uezumi et al. 2014). **Dans cet article, nous avons examiné, pour la première fois, le potentiel *in vivo* et *in vitro* des MPs et FAPs extraits à partir de muscles humains sains ou DMD.**

Pour cela, les cellules sont injectées dans des muscles de souris immunodéficientes préalablement blessés de manière à créer un environnement pro-fibrotique comme celui observé dans les muscles DMD. L'avantage de ce modèle de blessure musculaire est que l'étude des devenir des FAPs et des MPs est réalisée dans un contexte physiopathologique.

2. Article

Moratal C, Clément N, Arrighi N, Schaub S, Dani C and Dechesne CA. Article soumis dans *eLife*.

1 **Fibrogenic potential of progenitors resident in human healthy and DMD muscles**

2

3

4 Claudine Moratal^{1,2}, Noémie Clément^{1,2,3}, Nicole Arrighi¹, Sébastien Schaub¹, Christian
5 Dani^{1,4}, Claude A. Dechesne¹

6

7 ¹Université Côte d'Azur, CNRS, Inserm, iBV, Faculté de Médecine 06107 Nice Cedex 2,
8 France

9 ² CM and NC equally contributed to the study

10 ³ present address: Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Marseille, France

11 ⁴ Corresponding author: iBV, Institut de Biologie Valrose, Univ. Nice Sophia Antipolis, Tour
12 Pasteur (11ème étage); 28 avenue de Valombrose, 06107 Nice Cedex 2, France. E-mail:
13 dani@unice.fr

14

15

16 Competing interests: The authors declare that no financial and non-financial competing
17 interests exist.

18

19

20 **ABSTRACT**

21

22 In Duchenne muscular dystrophy (DMD), muscle repair progressively fails while fibro-
23 adipogenic deposition infiltrates interstitial spaces. PDGFR α -positive cells resident in
24 muscles have been recognized as a main source of the fibro/adipogenic deposition in mice,
25 but very little is known in humans. In the present study, we used *in vivo* engraftments in
26 mouse regenerating muscles to investigate the fibrogenic potential of PDGFR α -positive
27 progenitors and myogenic progenitors from human muscles. With progenitors derived from
28 healthy muscles, only PDGFR α -positive progenitors revealed a clear capacity to contribute to
29 muscle fibrosis. In contrast, DMD myogenic progenitors showed a fibrogenic potential similar
30 to that of PDGFR α -positive progenitors. The results were correlated with *in vitro* cell-
31 autonomous properties of both progenitors. In DMD muscles, together myogenic progenitors
32 and PDGFR α -positive progenitors were found in fibrotic endomysium. Our results shed new
33 light on the cellular basis of fibrosis in DMD muscles and provide new elements for the
34 treatment of muscle disorders.

35

36

37

38 **INTRODUCTION**

39

40 Skeletal muscle tissues can regenerate to a high degree after injury. This allows maintenance
41 of muscle integrity despite the extent of damage and micro-damage that occurs during our
42 lifetime.

43 Post-natal muscle regeneration has been extensively analyzed for decades. It involves repair
44 of injured myofibers and new myofiber formation. This requires complex cooperation
45 between several cellular players. Central myogenic progenitors (MPs) are satellite cells in
46 close contact with myofibers and located under the basal lamina (Mauro, 1961). Their
47 activation, proliferation and fusion into multinucleated fibers are regulated by interactions
48 with surrounding cells. Inflammatory cells, which are rapidly very abundant at fiber injury
49 sites, remove fiber debris, secrete numerous cytokines and growth factors and then support
50 extracellular matrix remodeling to initiate fiber formation (Saclier et al., 2013). They are part
51 of the initial inflammatory response and of the following repair phase. Vascular cells share
52 crucial crosstalk with satellite cells to coordinate angiogenesis and myofiber repair (Abou-
53 Khalil et al., 2010)(Tidball, 2005). Moreover, a population of adipogenic progenitors resident
54 in muscle has been identified in humans (Vauchez et al., 2009) (Pisani et al., 2010a) (Lecourt
55 et al., 2010) (Pisani et al., 2010b) and mice (Joe et al., 2010) (Uezumi et al., 2010). In
56 humans, we showed that they could differentiate into functional white adipocytes (Arrighi et
57 al., 2015). In mice, it has been established that they are rapidly recruited after muscle damage
58 and are important players in muscle regeneration since they facilitate myogenic differentiation
59 of satellite cells (Joe et al., 2010). They are also able to differentiate into fibrogenic cells and
60 have been designated as fibro/adipogenic progenitors (FAPs), which are considered as being

61 the main contributors to fat accumulation and fibrosis in mouse skeletal muscle (Uezumi et
62 al., 2011).

63 Tissue fibrosis corresponds to the disproportionate synthesis of extracellular matrix, with high
64 accumulation of specific proteins, including collagen 1, fibronectin, connective tissue growth
65 factor, and matrix metalloproteinase-2. In fact, most tissues can be affected, usually after
66 various kinds of repeated injuries. When fibrosis is restrained it is generally beneficial and
67 compensates for injury alterations. However, tissue functions can be altered when fibrosis
68 becomes more spatiotemporally extended. Fibrosis is involved in many severe pathological
69 conditions, such as idiopathic pulmonary fibrosis or tubule-interstitial kidney fibrosis.
70 Regarding striated muscles, fibro-adipogenic degeneration is commonly found in several
71 physiopathological situations affecting cardiac and skeletal muscles, including aging and
72 muscle disorders such as DMD (Serrano et al., 2011). In this pathology, due to the lack of the
73 subsarcolemmal protein dystrophin, the continuous myofiber necrosis induces incessant
74 myofiber regeneration, which gradually fails, while fat and fibrotic tissues increasingly
75 infiltrate muscles. Such infiltrations contribute to muscle functional impairment and are
76 considered as an efficiency limitation for cell and gene therapy. There is general consensus in
77 the literature attributing a key fibrogenic role to specialized cells, designated as
78 myofibroblasts, which are not present in most healthy tissues (Duffield et al., 2013).
79 Myofibroblasts share properties with smooth muscle cells and fibroblasts. They contain stress
80 fibers expressing α -smooth muscle actin (α SMA), which confers contractility, and they
81 produce abundant extracellular matrix. They promote wound contraction thanks to the
82 presence of α SMA, and secrete key factors required in the wound-healing process.
83 Myofibroblasts are activated for tissue repair and are normally de-activated or disappear
84 through apoptosis after restoration of healthy tissue organization. Fibrosis is due to the
85 pathological persistence of myofibroblasts. Differentiation into myofibroblasts is regulated by

86 several signaling pathways and TGF β recognized as a main inductor (Desmouliere et al.,
87 1993). Accordingly, inhibition of the TGF β -1 signaling pathway is a well-documented anti-
88 fibrotic target. FAPs and inflammatory cells are a main source of TGF β in mouse dystrophic
89 muscles (Pessina et al., 2015). In mouse muscles, in addition to FAPs, several mesenchymal
90 cells are considered as myofibroblast precursors, including fibroblasts, pericytes, epithelial
91 and endothelial cells (Kramann et al., 2013). Moreover, a few studies have demonstrated that
92 mouse cells can switch from the myogenic lineage to the fibrogenic lineage. In particular, this
93 process has been suggested for satellite cells from aged mice and *mdx* mice, mainly on the
94 basis of *in vitro* enhanced expression of fibrogenic mRNAs or fibroblast-specific markers
95 (Brack et al., 2007) (Biressi et al., 2014) (Pessina et al., 2015).

96

97 In humans, few investigations on the involvement of muscle progenitors in dystrophic muscle
98 fibrosis have been reported to date. To our knowledge, there is only one report on an *in vitro*
99 study of the fibrogenic potential of human MPs and mouse FAP-equivalent progenitors after
100 separation by flow cytometry. This investigation was based only on fibrogenic mRNA
101 expression (Uezumi et al., 2014). For convenience, mouse FAP-equivalent human progenitors
102 are hereafter designated as FAPs, which is consistent with the presented results. As in mice,
103 MPs and FAPs can be isolated from the whole adherent cell population obtained by enzymatic
104 digestion of human muscle samples. MPs express the cell surface marker neural cell adhesion
105 molecule 1 (CD56), but do not express the PDGFR α receptor (CD140a) or the carbohydrate
106 molecule CD15 that is bound to several surface glycoproteins. Conversely, FAPs do not
107 express CD56, but instead express CD140a and CD15 (Arrighi et al., 2015). The purpose of
108 the present study was to investigate the fibrogenic potential of human MPs and FAPs on the
109 basis of *in vivo* experiments to analyze cell fates in a physiopathological context. Both
110 progenitors derived from healthy and DMD muscle samples were transplanted in injured

111 mouse muscles. While with healthy progenitors only FAPs exhibited fibrogenic potential, the
112 fibrogenic potentials of DMD MPs and DMD FAPs were equivalent, showing that
113 pathological conditions deeply modify the fibrogenic potential of muscle progenitors. The
114 results were correlated with *in vitro* cell-autonomous properties of both progenitors in terms
115 of phenotype transformation into myofibroblasts and fibrogenic marker expression. Our
116 results highlight a new cellular basis for human skeletal muscle fibrogenesis.

117

118

119

120

121

122 **RESULTS**

123

124 MPs and FAPs were prepared from a total of 25 muscle biopsies coming from healthy
125 children, teenagers, adults and DMD teenagers. Distribution of the biopsies is listed in Table
126 1.

127

128

129 ***In vivo* fibrogenic potential of healthy progenitors**

130

131 The fibrogenic potentials of human MPs and FAPs were separately challenged using
132 engraftments into mouse fibrotic muscles. We applied a fibrosis injury model in *Tibialis*
133 *anterior* muscles from Rag2^{-/-} γ c^{-/-} immunodeficient mice (supplemental Fig. 1A). The same
134 number of human MPs and FAPs were transplanted and we verified, according to the
135 expression of the human specific housekeeping gene 36B4, that equivalent quantities of MPs
136 and FAPs had been engrafted when the muscles were sampled (supplemental Fig. 1B).

137 MPs and FAPs were identified in muscle sections on the basis of their nuclei, using a human
138 specific anti-Lamin A/C antibody 4 weeks after injury and cell injection (Fig. 1A). In MP-
139 injected muscles, human nuclei were detected in regenerated areas either inside or between
140 fibers, most of them likely in satellite cells. The majority of them were associated with
141 myofibers expressing human β spectrin. As expected, this confirmed the MPs myogenic
142 potential, which actively participated in muscle repair. Importantly, the localization of human
143 MPs-derived cells was independent of the fibrotic areas. Conversely, FAP-derived nuclei
144 were all detected in fibrotic areas. These zones were characterized by disorganisation of the
145 muscle architecture, with an irregular size of fibers that were separated by a wide
146 endomysium. Such phenotype alteration indicated an abundant extracellular matrix

147 deposition, as shown by the high organised collagen content visualized by second-harmonic
148 generation imaging. To explore the contribution of human progenitors to fibrosis within
149 mouse muscles, human specific expression of fibrosis markers was assessed by quantitative
150 RT-PCR (Fig. 1B). Human extracellular matrix components such as *COL1A1*, *FNI*, *CTGF*
151 and *MMP2* were dramatically more expressed in FAP-injected muscles than in MP-injected
152 muscles. These *in vivo* data indicated that, in contrast to FAPs, MPs displayed no fibrogenic
153 potential when derived from healthy muscles.

154

155

156 ***In vitro* fibrogenic potential of healthy progenitors**

157

158 We investigated whether the marked differences found *in vivo* between MPs and FAPs were
159 caused by the mouse muscle microenvironment or corresponded to progenitor cell-
160 autonomous potentials. MPs and FAPs, prepared from healthy adult muscles, were
161 comparatively cultured under fibrogenic differentiation conditions. As expected, in the
162 absence of TGF β -1, MPs gave rise to typical myosin-positive polynucleated myotubes and
163 FAPs generated typical perilipin 1-positive adipocytes that were filled of oil droplets (Fig.
164 2A). The addition of TGF β -1 inhibited these differentiations and α SMA-positive cells were
165 formed from both progenitors, but they were essentially elongated cells for MPs and spread
166 out cells for FAPs. These wide cells exhibited stress-fibers with a typical myofibroblast
167 phenotype. The emergence of TGF β -1-dependent α SMA-labelled stress fibers is a general
168 hallmark for myofibroblast differentiation.

169 This induction of α SMA expression was also observed via quantitative RT-PCR (Fig. 2B). In
170 fact, the use of α SMA as a myofibroblast marker for myogenic cells raises a specificity
171 problem since this protein is also transiently expressed during myogenesis during myoblast

172 elongation and first fusion steps (Lancioni et al 2007). Importantly, the myofibroblast
173 phenotype was confirmed by TGF β -1 induction of the other characteristic fibrogenic markers
174 *COL1A1*, *FNI* and *CTGF* (Fig. 2B). Much lower induction was found in MPs compared to
175 FAPs. In accordance, the mediating TGF β -1/Smad signaling pathway was activated by
176 TGF β -1 treatment in FAPs and MPs, but stimulation was clearly stronger in FAPs, as shown
177 by the phosphorylation of Smad2 (Fig. 2C). The *in vitro* results were thus in accordance with
178 the *in vivo* FAP-specific fibrogenic potential.

179

180 In differentiation medium even without TGF β -1, FAPs derived into myofibroblasts scattered
181 among a majority of adipocytes, as revealed by α SMA and perilipin 1 co-labelling (Fig. 3A).
182 We wondered whether there was a relation between FAP adipogenic and fibrogenic
183 potentials. We used cells prepared from five healthy teenagers' biopsies and quantified the
184 expression of adipogenic and fibrogenic markers after differentiation under the appropriate
185 respective culture conditions. Significant inverse correlations were noted between the
186 fibrogenic potential, measured on the basis of *COL1A1* and *FNI* expression, and the
187 adipogenic potential, measured according to *PLINI* expression (Fig. 3B). FAPs expressing the
188 highest fibrogenic marker levels poorly differentiated into adipocytes. Clonal analysis was
189 performed as a further analysis of the FAP fate. After amplification, each clonal cell
190 population was fractionated in two culture wells and separately submitted to adipogenic or
191 fibrogenic culture conditions. Considering only differentiating clones (n = 36), more than half
192 of the FAP clones differentiated both into adipocytes and myofibroblasts, about one third
193 differentiated into myofibroblasts and the remaining clones differentiated into adipocytes
194 (Fig. 3C). FAPs were thus a mixture of fibro-adipogenic bi-potent cells, fibrogenic mono-
195 potent cells and adipogenic mono-potent cells.

196

197 Similar investigations were carried out with MPs. In the absence of TGF β -1, MP-derived
198 myotube cultures exhibited a mixture of α SMA-positive myotubes and α SMA-negative large
199 myotubes (Fig. 4A). As mentioned above, this is consistent with the transient expression of
200 α SMA at the beginning of myotube formation. In addition, these cultures also contained very
201 few strongly α SMA-positive cells with a myofibroblast morphology, including stress fibers
202 (Fig. 4A-B). These cells very weakly expressed the myogenic marker CD56 (Fig. 4B). They
203 were much less common than in FAP cultures (range 1/100 to 1/1000). They were also found
204 in the presence of TGF β -1, although their identification was more difficult because of the
205 very high proportion of α SMA-positive unicellular cells (data not shown). Flow cytometry
206 quantifications consistently showed that proliferating MPs, which are CD56 positive and
207 PDGFR α negative cells, contained a very minor population of CD56^{low} cells (range 1/100)
208 (Fig. 4C). TGF β -1 treatment increased the size of this population (see gates R4) and
209 decreased the CD56 signal intensity of the CD56^{high} population.

210 Clonal analysis, performed with the same procedure as that used for FAPs indicated that
211 almost all MP differentiating clones were similar. The study of 23 clones showed that 22
212 clones were mono-potent myogenic clones (differentiating only into myosin heavy chain-
213 positive myotubes) and one clone was a mono-potent fibrogenic clone (differentiating only
214 into α SMA-positive and myofibroblast-like cells). It cannot be ruled out that this single clone
215 was a culture artefact or due to FAP contamination of the starting MP populations.

216 Overall, these data indicated that, in contrast to FAPs, healthy MPs did not display an *in vitro*
217 fibrogenic potential.

218

219

220 **MPs and FAPs from DMD**

221

222 The abundant fibrotic degeneration which characterizes DMD led us to examine the
223 fibrogenic potential of DMD muscle progenitors. The study was conducted from a collection
224 of paravertebral muscle samples from six DMD teenagers and six healthy age-matched
225 controls. All individuals were between 13- and 19-years old. All the biopsies showed typical
226 fibro-adipogenic infiltration separating myofibers of irregular size (Fig. 5A).

227 Surprisingly, DMD MP differentiating cultures contained many more myofibroblasts than
228 healthy adult MPs. This was observed in the absence and presence of TGF β -1. The proportion
229 was comparable to the proportion found in FAPs (Fig. 5B). Fibrogenic conversion was
230 measured by quantitative RT-PCR and TGF β -1 induction of fibrogenic marker expression
231 was not significantly higher in DMD FAPs compared to DMD MPs (Fig. 5C). Consistently
232 with fibrogenic marker induction, the extent of TGF β -1 induction of Smad2 phosphorylation
233 was much closer for DMD FAPs and DMD MPs than for healthy FAPs and healthy MPs
234 (compare Fig. 5D with Fig. 2C). Finally, the much higher amount of myofibroblasts in
235 differentiated DMD MPs than in differentiated healthy MPs was associated with substantial
236 differences in CD56 expression by proliferating DMD MPs. The comparison of CD56-
237 positive cell populations analyzed by flow cytometry shown in Fig. 4C (healthy MPs) and
238 Fig. 5E (DMD MPs) indicated that the proportion of CD56^{low} cells was much higher in DMD
239 MPs (over 10%) and that the effect of TGF β -1 treatment was much more drastic in DMD
240 MPs, with more than 30% of CD56^{low} cells. Note that DMD MPs differentiated into myotubes
241 in the absence of TGF β -1, like healthy MPs (data not shown).

242

243 The fibrogenic potential equivalence for DMD MPs and DMD FAPs found *in vitro* prompted
244 us to investigate their *in vivo* features.

245 First, we compared the localisation MPs and FAPs in DMD teenager muscle biopsies. FAPs
246 were traced with anti-PDGFR α antibodies on cryostat sections. In healthy muscles, FAPs

247 displayed characteristic shapes with a small peri-nuclear core prolonged by long arms (Fig.
248 6A). They were found to be dispersed between muscle fibers and accumulated around vessels,
249 outside of the vascular endothelium expressing CD31 and outside of the vascular wall
250 expressing α SMA. Major differences were observed in DMD muscles, characterized by high
251 accretion of FAPs between muscle fibers in large collagen-filled fibrotic spaces (Fig. 6C).
252 This was in agreement with the data reported by the Tsuchida group (Uezumi et al., 2014). As
253 in healthy muscles, in DMD muscles FAPs also accumulated around blood vessels (not
254 shown). MPs were traced with an anti-CD56 antibody on cryostat sections. In healthy
255 muscles, MPs were found only in satellite cell positions, as expected (Fig. 7). In DMD
256 muscles, they were found not only in satellite cell positions but also in the large interstitial
257 spaces separating myofibers, which is characteristic of dystrophic muscles. These spaces were
258 invaded by fibrillary collagen, as shown by second-harmonic generation imaging (Fig. 7).
259 Thus, in DMD muscles, unlike healthy muscles, some FAPs and MPs had left the niche
260 occupied in healthy muscles and were scattered within the fibrotic infiltrations. We wondered
261 if the localization of MPs in fibrotic areas was associated with an immunophenotype change.
262 Co-labelling of DMD sections with anti-CD56 and anti-PDGFR α showed that most of the
263 MPs did not acquire PDGFR α expression, but a very small population of MPs located in the
264 endomysium expressed both CD56 and PDGFR α (Fig. 8).
265 We then used progenitors prepared from two DMD patients to assess their *in vivo* capacities
266 after engraftment in mouse regenerating muscles. We used the same mouse muscle fibrotic
267 model as above and compared the potentials of DMD progenitors and age-matched healthy
268 progenitors. They were traced with human specific Lamin A/C antibodies, as well as human
269 specific β spectrin antibody for MPs. As expected, healthy MPs gave rise to muscle fibers or
270 likely integrated satellite cell niches (supplemental Fig. 2). Surprisingly, DMD MPs had a
271 very different fate. They only generated a few small myofibers (Fig. 9A). Instead, they

272 concentrated in the wide endomysium of fibrotic collagen-filled areas, as visualized by second
273 harmonic generation imaging, as also noted with healthy FAPs (see Fig.1A). No difference
274 was noticed between DMD FAPs and age-matched healthy FAPs (Fig. 9A). DMD MPs were
275 also detected with human specific anti-Lamin A/C antibodies, which labelled the nuclear
276 membrane. Most MP nuclei were found in the wide collagen-rich endomysium colonised by
277 mouse FAPs, as be detected by second-harmonic generation imaging and anti-PDGFR α
278 antibodies, respectively (supplemental Fig. 3). The localisation of human progenitors injected
279 in mouse muscles was associated with the expression of human fibrogenic markers. *COL1A1*,
280 *FNI* and *MMP2* were clearly expressed in muscles injected with DMD MPs, while almost no
281 expression was found in muscles injected with healthy MPs (Fig. 9B). Very interestingly,
282 there was no significant difference for the three marker expressions when comparing muscles
283 injected with DMD MPs or DMD FAPs. These data thus indicated that DMD MPs could have
284 the same fibrogenic potential as DMD FAPs.

285

286

287

288

289

290 **DISCUSSION**

291

292 Fibrosis is a pathological deposition of extracellular matrix after injury. It is a hallmark of
293 muscular dystrophies such as DMD. Several cells can potentially contribute to fibrotic
294 invasion of muscle. Interstitial fibroblasts synthesize extracellular matrix components under
295 healthy conditions (Zou et al., 2008). Under acute and chronic damage, myofibroblasts secrete
296 large quantities of extracellular matrix proteins that gradually replace muscle fibers and result
297 in impairment of muscle function. The cellular origin of myofibroblasts is still under debate
298 and most of studies have been conducted in mice. Despite their pathological importance, the
299 cellular mechanisms that sustain fibrosis in human muscles largely remain to be elucidated. In
300 this study, we investigated *in vivo* and *in vitro* the fibrogenic potential of MPs and FAPs,
301 which have crucial roles in muscle regeneration. We investigated whether their potentials
302 would be modified by DMD.

303

304 We previously showed that human PDGFR α positive and CD56 negative muscle progenitor
305 cells can give rise to functional adipocytes (Arrighi et al., 2015). Here we show that these
306 progenitors specifically accumulate in fibrotic areas after injection in injured mouse muscles.
307 In this *in vivo* context, they strongly expressed extracellular matrix genes. Such gene
308 expression does not require the complex *in vivo* cellular environment since similar expression
309 was found *in vitro* after induction by the potent fibrogenic cytokine TGF β -1. Since, in
310 addition, TGF β -1 induced full transformation towards a myofibroblast phenotype with stress
311 fibers and expression of α SMA protein, PDGFR α positive and CD56 negative mesenchymal
312 progenitors should be considered as the human equivalent of mouse FAPs. This conclusion, in
313 accordance with previously reported *in vitro* results (Uezumi et al., 2014), stresses the
314 importance of human FAPs in muscle dystrophies which involve fibro-adipogenic

315 intramuscular infiltration. Clonal analysis revealed that human FAPs were not a homogeneous
316 population, but a mix of adipogenic, fibrogenic and fibro-adipogenic cell subsets. It could be
317 speculated that bi-potent fibro-adipogenic cells are upstream progenitors which can give rise
318 to the two kinds of mono-potent progenitors. TGF β -1 is likely a crucial factor in regulating
319 the FAP fate since it inhibits FAP adipogenic differentiation and induces FAP fibrogenic
320 differentiation. A recent study in mice also showed that myostatin, a member of the TGF β
321 family expressed in muscle, stimulated fibrogenic differentiation of mouse FAPs (Dong et al.
322 2016).

323

324 MPs are generally not considered as fibrogenic cells and, accordingly, healthy MPs only
325 contributed to myofibers regeneration after injection in mouse fibrotic muscles. Note,
326 however, that *in vitro* expression of α SMA and extracellular matrix genes from healthy MPs
327 was significantly stimulated by TGF β -1, although this stimulation is much lower than that
328 observed with FAPs (see Fig. 2B). Similarly, we found that the fraction of CD56^{low} MPs was
329 increased with TGF β -1. Note also that a very low number of α SMA-positive myofibroblast-
330 like cells were reproducibly found in of MP population cultures. These data could be due to
331 culture artefacts, but they also suggest that healthy MPs have a low fibrogenic potential that is
332 only detectable in the simplified *in vitro* context. However, it is unlikely that the very limited
333 amount of myofibroblast-like cells or CD56^{low} cells could account for the level of TGF β -1
334 induced extracellular matrix gene expression. This therefore indicates that virtually all
335 healthy MPs did not give rise to myofibroblasts and constituted a mono-potent myogenic cell
336 population, which can express a significant level of extracellular matrix genes.

337

338 DMD noticeably altered the MP potential. Reaching levels similar to those of FAPs, DMD
339 MPs acquired myofibroblast phenotypes, increased fibrogenic gene expression and activated

340 TGF β -1/Smad2 signaling under TGF β -1 treatment. Moreover, there was a notable decrease in
341 CD56 myogenic marker expression in DMD MPs. Most importantly, *in vivo*, after
342 engraftment in regenerating mouse muscles, DMD MPs localized in the same interstitial niche
343 as FAPs adopted a fibrogenic fate similar to that of FAPs. Finally, in DMD muscles, they
344 could leave the satellite cell niche to relocate in fibrotic interstitial areas like FAPs. Therefore,
345 the similarity of fibrotic features observed *in vitro* between DMD FAPs and DMD MPs was
346 also seen *in vivo*. Note also that CD56-tracing of MPs in DMD muscle may underestimate the
347 amount of fibrogenic MPs since *in vitro* exposure of DMD MPs to TGF β -1 causes a marked
348 decrease in CD56 expression (see Fig. 5E) and since the TGF β pathway is strongly induced in
349 DMD muscles (Chen et al., 2005). The only discrepancy between the *in vitro* and *in vivo*
350 results was that fibrogenic marker expression was similar *in vitro* between healthy MPs and
351 DMD MPs (compare Fig. 2B and 5C) but *in vivo* only DMD MPs, largely failed to regenerate
352 muscle, localize in fibrotic areas and strongly express fibrogenic markers after engraftment in
353 mouse muscles. We speculate that since the complex *in vivo* situation could not be replicated
354 in the culture dishes, many cellular and molecular signals other than merely TGF β -1
355 induction are responsible for MP differentiation in the *in vivo* context. Moreover, regenerating
356 mouse muscle also provides a physiological environment that inevitably differs from that of
357 true human DMD muscle.

358 The exact role of endogenous DMD MPs dispersed between collagen fibers remains to be
359 investigated. The plasticity of MPs, as well as endothelial and hematopoietic cells, towards a
360 mesenchymal progenitor multipotent status associated with a fibrogenic fate has recently been
361 documented in DMD (Pessina et al., 2015). This is in accordance with the increase in CD56^{low}
362 cells found within DMD MPs. However, this transition seemed to be relatively limited since
363 only a very small amount of MPs turned out to express PDGFR α in fibrotic DMD muscles.
364 Thus, as indicated by our other data, it could be speculated that part of endogenous MPs

365 contributes to DMD fibrosis, instead of participating in myofiber regeneration. It would also
366 now be necessary to define the exact cellular basis of the DMD MP fibrogenic potential. This
367 potential might be shared by all MPs delocalized in the fibrotic endomysium or only MPs that
368 have gained PDGFR α expression and/or CD56^{low} MPs.

369 What factors can regulate the fibrogenic potential of FAPs and DMD MPs? It is striking that
370 we found negative correlations within biopsies between the adipogenic and fibrogenic
371 potentials of FAPs (Fig. 3B). This suggests that a balance between adipogenic and fibrogenic
372 potentials exists within FAPs, respectively. The molecular mechanisms have to be elucidated.
373 Autocrine and paracrine TGF β cytokines are likely involved and, more generally, the
374 inflammatory environment of the chronically regenerating DMD muscle. Intrinsic aging of
375 progenitors could also be considered. Indeed, it can be hypothesized that the fibrogenic fate is
376 a default fate. In this case, after a certain extent of proliferation, FAPs and MPs would shift
377 towards fibrogenic transformation. This could be particularly important for DMD MPs which
378 undergo many rounds of proliferation to continuously form new myofibers. This hypothesis is
379 supported by the fact that the TGF β -1 fold-change induction of fibrogenic markers reached
380 the same levels for DMD teenager MPs and healthy adult MPs, while it remained lower for
381 DMD teenager FAPs compared to healthy adult FAPs (compare Fig. 2B and 5C,
382 respectively). DMD teenagers MPs have already undergone so many rounds of mitosis that
383 they would present characteristics similar to MPs from healthy older individuals. This is in
384 agreement with our observation of the low proliferation rate of most of the DMD MPs used in
385 this study, although DMD MPs kept their *in vitro* myogenic potential. Finally, another point
386 should be mentioned. Dystrophin has recently been shown to be expressed in proliferating
387 MPs, whereas it is essentially known to be a myogenic terminal differentiation marker
388 expressed in myofibers (Dumont et al., 2015). It cannot be ruled out that the lack of

389 dystrophin may also modify the MP cell-autonomous phenotype in a regenerating
390 environment.

391

392 For FAPs, the shift towards a fibrogenic fate at the expense of the adipogenic fate is in
393 agreement with the fibrotic change in DMD muscles but raises the question of the abundance
394 of adipocytes in DMD. This apparent contradiction could be explained by our findings on the
395 simultaneous occurrence of adipogenic and fibrogenic subsets within the FAP population.
396 These subsets could each increase the adipogenic compartment as well as the fibrotic
397 compartment of DMD muscles. It should not be excluded that other adipogenic progenitors
398 may also contribute to muscle adipocytes.

399

400 Together, our *in vivo* data confirmed that, in humans, PDGFR α -positive and CD56-negative
401 muscle mesenchymal progenitors, which have already been characterized for their adipogenic
402 potential, could also differentiate into myofibroblasts. This FAP population is composed of
403 three population subsets with fibro-adipogenic, adipogenic and fibrogenic potential,
404 respectively. Conversely, MPs constitute a homogenous myogenic cell population. In healthy
405 conditions, human MPs do not give rise to myofibroblasts, although they have a significant
406 potential to express extracellular matrix genes *in vitro*. This potential is exacerbated *in vitro*
407 and *in vivo* for DMD MPs, which give rise to myofibroblasts, similarly to FAPs. These
408 findings provide new elements to help develop regenerative medical strategies to control
409 skeletal muscle fibrosis.

410

411 **MATERIALS AND METHODS**

412

413 **Skeletal muscle samples and progenitor cell amplification**

414 Samples were obtained as *res nullus* from surgeries performed on healthy donors with the
415 approval of the Centre Hospitalier Universitaire de Nice Review Board, according to the rules
416 of the French Regulatory Health Authorities. DMD and age-matched control biopsies were
417 obtained from Myobank-AFM Institut de Myology, Paris, France. Donor's data are presented
418 in Table 1, which includes the number of biopsies used in the presented data. Progenitor cells
419 were prepared by enzymatic digestion of muscle samples as previously described (Arrighi et
420 al). Cell culture reagents were purchased from Lonza Sales Ltd (Basel, Switzerland) and
421 Sigma-Aldrich Chimie (Saint-Quentin Fallavier, France). Cells were grown as adherent cells
422 in Ham's F10, 20% fetal bovine serum, 10 mM HEPES, 2.5 ng/ml basic fibroblast growth
423 factor 2, 1 μ M dexamethasone, 100 U/ml penicillin, and 100 mg/ml streptomycin. Progenitors
424 were sorted at passage 2 or 3 by flow cytometry as CD140a (PDGFR α)-positive cells and
425 CD56-negative for FAPs, and CD56-positive and CD140a-negative cells for MPs. Anti-CD56
426 APC and anti-CD140a PE antibodies were purchased from BD-Biosciences (Le Pont de
427 Claix, France). Cell separations were performed using a BD FACSAria II sorter with BD
428 FACS Diva software as previously described (Arrighi et al., 2015). The sorting efficiency was
429 checked immediately after cell sorting. Cells were used until passage 10. Cell cloning was
430 done with the same sorter which distributed one cell per well in 96-well plates. The cloning
431 yield ranged from 8% to 24% according to biopsies. Cells were grown on glass cover slips for
432 immunofluorescence analysis.

433

434 **Mouse experiments**

435 They were performed in accordance with our institutional ethics committee guidelines
436 (Comité régional d'éthique en matière d'expérimentation animale – Côte d'Azur). *Rag2^{-/-}γC^{-/-}*
437 immunodeficient mice were maintained, and used under specific pathogen-free conditions, at
438 the local animal core facility of Institute for Research on Cancer and Aging. Mice were used
439 between 3 and 6 months of age. Fibrosis was induced by laceration of *Tibialis anterior*
440 muscles (Menetrey et al., 1999). Two parallel and partial cuts were made in the central part of
441 the muscles. Human cell implantations were carried out as previously described (Goudenege
442 et al., 2009). Each MP or FAP population was injected in the two *Tibialis anterior* muscles of
443 two mice, for a total of four muscles per cell population. The first injection of 500 000 cells
444 per muscle was followed by muscle injury with laceration 1 day later, and 500 000 cells were
445 again injected 1 day later. Mice were sacrificed 4 weeks after the second injection and *Tibialis*
446 *anterior* muscles were dissected and frozen in liquid nitrogen-cooled isopentan. The muscles
447 were cut into 5-μm transversal cryosections. Sections from six different levels along the
448 muscles were used for immunohistochemistry and sections between the six levels were pooled
449 for RNA extraction.

450

451 **FAP and MP differentiation**

452 Both myogenic and adipogenic differentiations were induced after confluence in DMEM 1.5
453 g/l glucose/Ham's F12/Ham's F10 (25/25/50; v/v), 10 mM HEPES, 1% horse serum (v/v), 7.5
454 μg/ml insulin, 7.5 μg/ml transferrin, 0.1 nM triiodothyronine, 50 nM rosiglitazone, 50 μM 1-
455 methyl-3-isobutylmethyl-xanthine, and 500 nM dexamethasone. Three days later, the medium
456 was changed and the two later components were omitted. Fibrogenic differentiation was
457 induced in the same medium complemented with 5 ng/ml TGFβ-1. Adipogenic differentiation
458 lasted 10 to 14 days, fibrogenic differentiation lasted 4 or 5 days and myogenic differentiation
459 lasted 7 days. For staining, cells were fixed for 10 min in 4% paraformaldehyde, washed in

460 PBS and treated for 15 min with a filtered solution of triglyceride-specific Oil Red O (60% of
461 a stock solution at 0.5% Oil Red O powder w/v in isopropanol and 40% distilled water) or
462 Crystal Violet (0.1% w/v in distilled water). All steps were performed at room temperature.

463

464 **Immunofluorescence analysis and histological staining**

465 Cells or cryosections were fixed for 10 min in 4% paraformaldehyde. For
466 immunofluorescence labeling, nonspecific signals were blocked with 3% bovine serum
467 albumin for 30 min. For cellular internal antigens, a 30 min permeabilization step with 2%
468 Triton X-100 was added. Specific antibodies were purchased from Novocastra Ltd.
469 (Newcastle upon Tyne, U.K.) for myosin heavy chain and Lamin A/C, Research Diagnostic
470 (Concord, MA, USA) for perilipin 1, BD-Biosciences (Le Pont de Claix, France) for α
471 smooth muscle actin (α SMA), laminin, human PDGFR α (CD140a), CD56 and CD31. For
472 mouse analysis, anti-PDGFR α (clone D1E1E) was purchased from Cell Signaling
473 Technology. The secondary Alexa Fluor $\text{\textcircled{R}}$ 488 and 594 conjugated antibodies were
474 purchased from Life Technologies SAS (Saint Aubin, France). Cells or sections were
475 mounted in Mowiol and visualized under an Axiovert microscope (Carl Zeiss, Le Pecq,
476 France) with oil immersion and images were captured with AxioVision software (Zeiss). For
477 histological staining, muscle cryosections were stained with hematoxylin/eosin, Sirius Red or
478 Masson's Trichrome according to the procedures provided by Sigma-Aldrich Chimie (Saint-
479 Quentin Fallavier, France).

480

481 **Second Harmonic Generation (SHG) imaging**

482 Imaging was performed on an LSM 780 NLO inverted Axio Observer.Z1 confocal
483 microscope (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany) using a Plan Apo 25X multi-
484 immersion (oil, glycerol, water) NA 0.8 lense. Fluorescence images were acquired using a

485 laser 561 nm (resp. 633 nm) for Alexa 594 (resp. DRAQ5). The SHG light source was a Mai
486 Tai DeepSee (Newport Corp., Irvine, CA, USA) tuned at 880 nm. Forward SHG signals were
487 detected with an Oil condenser (1.4 NA), 440/40 nm bandpass filter and transmission PMT.
488 Backward SHG was collected on GaAsP (BIG) non-descanned module with 440/10 nm
489 (internal control, not shown). 1 pxl=168 nm.

490

491 **Western blots**

492 Cells were collected with a rubber policeman in 200 µl of RIPA buffer [150 mM NaCl, 1%
493 Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 5 mM NaF, 2.5 mM Na₄P₂O₇, 2 mM
494 sodium vanadate, 5 mM EDTA, protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Meylan,
495 France), and 50 mM Tris-HCl, pH 8.0]. The protein content was determined with the Pierce
496 BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France). Immobilon-P membranes
497 (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) were probed with anti-tubulin (1:5000, Sigma-
498 Aldrich Chimie, Saint-Quentin Fallavier, France), anti-phospho- Smad2 (Ser465/467, 1:1000,
499 Cell Signaling Technology), anti-Smad2/3 (1:1000, Cell Signaling Technology). The bound
500 primary antibody was detected with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody
501 (Promega, Charbonnières les Bains, France) and visualized with an electrochemical
502 luminescence detection kit (Merck Millipore, Fontenay sous Bois, France).
503 Chemiluminescence was observed and quantified using a ChemiDoc XRS+ system with
504 Quantity One software (Bio-rad, Marnes la coquette, France).

505

506 **Gene expression**

507 RNA analyses were performed as previously described (Arrighi et al., 2015). TATA box
508 binding proteins (TBP) or 36B4 genes were used for normalization of real-time RT-PCR
509 experiments. Primer sequences are listed in Table 2. They were used to quantify the

510 expression of muscle creatine kinase (MCK), myogenin (MYOG), sarcoglycan, delta
511 (SGCD), fatty acid binding protein 4 (FABP4), perilipin 1 (PLIN1), α smooth muscle actin
512 (α SMA), collagen 1A1 (COL1A1), connective tissue growth factor (CTGF), fibronectin 1
513 (FN1), matrix metalloproteinase 2 (MMP2), platelet-derived growth factor receptor, alpha
514 polypeptide (PDGFR α), transforming growth factor, beta 1 (TGF β -1), TATA box binding
515 protein (TBP), and 36B4.

516

517 **Statistical analysis**

518 Significant differences between two groups of data were assessed with the unpaired Student's
519 *t*-test. Correlations were calculated with Pearson's coefficient using InStat3 software. A *p*-
520 value <0.05 was considered significant. The data are presented as the mean \pm standard error of
521 the mean of at least three independent samples.

522 **ACKNOWLEDGEMENTS**

523

524 The Association Française contre les Myopathies (AFM) supported this study through the
525 grants #16063 and #17708 and provided a PhD fellowship for CM. The experiments
526 involving DMD muscles and progenitors were also supported by the Duchenne Parent Project
527 NL. We greatly acknowledge Myobank-AFM Institut de Myology, Paris, France for the DMD
528 and control biopsies. We also greatly acknowledge the Plateforme de Cytométrie and the
529 Plateforme d’Histologie Experimentale of the Institut de Biologie Valrose, CNRS UMR7277-
530 INSERM U1091-UNS, Nice, France, and the Animal core facility of the Institute for
531 Research on Cancer and Aging, CNRS UMR7284-INSERM U1081-UNS Nice, France. We
532 also thank Samah Rekima from Institut de Biologie Valrose, Nice, for her histology
533 assistance.

534

535 **REFERENCES**

536

537

538 Abou-Khalil, R., R. Mounier, and B. Chazaud, 2010, Regulation of myogenic stem cell
539 behavior by vessel cells: the "menage a trois" of satellite cells, periendothelial cells
540 and endothelial cells: *Cell Cycle*, v. 9, p. 892-6.

541 Arrighi, N., C. Moratal, N. Clement, S. Giorgetti-Peraldi, P. Peraldi, A. Loubat, J. Y.
542 Kurzenne, C. Dani, A. Chopard, and C. A. Dechesne, 2015, Characterization of
543 adipocytes derived from fibro/adipogenic progenitors resident in human skeletal
544 muscle: *Cell Death Dis*, v. 6, p. e1733.

545 Biressi, S., E. H. Miyabara, S. D. Gopinath, P. M. Carlig, and T. A. Rando, 2014, A Wnt-
546 TGF β 2 axis induces a fibrogenic program in muscle stem cells from dystrophic mice:
547 *Sci Transl Med*, v. 6, p. 267ra176.

548 Brack, A. S., M. J. Conboy, S. Roy, M. Lee, C. J. Kuo, C. Keller, and T. A. Rando, 2007,
549 Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases
550 fibrosis: *Science*, v. 317, p. 807-10.

551 Chen, Y. W., K. Nagaraju, M. Bakay, O. McIntyre, R. Rawat, R. Shi, and E. P. Hoffman,
552 2005, Early onset of inflammation and later involvement of TGF β in Duchenne
553 muscular dystrophy: *Neurology*, v. 65, p. 826-34.

554 Desmouliere, A., A. Geinoz, F. Gabbiani, and G. Gabbiani, 1993, Transforming growth
555 factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue
556 myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts: *J Cell Biol*, v. 122,
557 p. 103-11.

558 Dong, J., Y. Dong, Z. Chen, W. E. Mitch and L. Zhang, 2016, The pathway to muscle

559 fibrosis depends on myostatin stimulating the differentiation of fibro/adipogenic
560 progenitor cells in chronic kidney disease: *Kidney Int.* S0085-2538(16)30404-5.

561 Duffield, J. S., M. Lupper, V. J. Thannickal, and T. A. Wynn, 2013, Host responses in tissue
562 repair and fibrosis: *Annu Rev Pathol*, v. 8, p. 241-76.

563 Dumont, N. A., Y. X. Wang, J. von Maltzahn, A. Pasut, C. F. Bentzinger, C. E. Brun, and M.
564 A. Rudnicki, 2015, Dystrophin expression in muscle stem cells regulates their polarity
565 and asymmetric division: *Nat Med*, v. 21, p. 1455-63.

566 Goudenege, S., D. F. Pisani, B. Wdziekonski, J. P. Di Santo, C. Bagnis, C. Dani, and C. A.
567 Dechesne, 2009, Enhancement of myogenic and muscle repair capacities of human
568 adipose-derived stem cells with forced expression of MyoD: *Mol Ther*, v. 17, p. 1064-
569 72.

570 Joe, A. W., L. Yi, A. Natarajan, F. Le Grand, L. So, J. Wang, M. A. Rudnicki, and F. M.
571 Rossi, 2010, Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that
572 facilitate myogenesis: *Nat Cell Biol*, v. 12, p. 153-63.

573 Kramann, R., D. P. DiRocco, and B. D. Humphreys, 2013, Understanding the origin,
574 activation and regulation of matrix-producing myofibroblasts for treatment of fibrotic
575 disease: *J Pathol*, v. 231, p. 273-89.

576 Lecourt, S., J. P. Marolleau, O. Fromigue, K. Vauchez, R. Andriamanalijaona, B. Ternaux, M.
577 N. Lacassagne, I. Robert, K. Boumediene, F. Chereau, P. Marie, J. Larghero, M.
578 Fiszman, and J. T. Vilquin, 2010, Characterization of distinct mesenchymal-like cell
579 populations from human skeletal muscle in situ and in vitro: *Exp Cell Res*, v. 316, p.
580 2513-26.

581 Mauro, A., 1961, Satellite cell of skeletal muscle fibers: *J Biophys Biochem Cytol*, v. 9, p.
582 493-5.

583 Menetrey, J., C. Kasemkijwattana, F. H. Fu, M. S. Moreland, and J. Huard, 1999, Suturing
584 versus immobilization of a muscle laceration. A morphological and functional study in
585 a mouse model: *Am J Sports Med*, v. 27, p. 222-9.

586 Pessina, P., Y. Kharraz, M. Jardí, S. Fukada, A. L. Serrano, E. Perdiguero, and P. Muñoz-
587 Cánoves, 2015, Fibrogenic Cell Plasticity Blunts Tissue Regeneration and Aggravates
588 Muscular Dystrophy: *Stem Cell Reports*, v. 4, p. 1046-60.

589 Pisani, D. F., N. Clement, A. Loubat, M. Plaisant, S. Sacconi, J. Y. Kurzenne, C. Desnuelle,
590 C. Dani, and C. A. Dechesne, 2010a, Hierarchization of myogenic and adipogenic
591 progenitors within human skeletal muscle: *Stem Cells*, v. 28, p. 2182-94.

592 Pisani, D. F., C. A. Dechesne, S. Sacconi, S. Delplace, N. Belmonte, O. Cochet, N. Clement,
593 B. Wdziekonski, A. P. Villageois, C. Butori, C. Bagnis, J. P. Di Santo, J. Y. Kurzenne,
594 C. Desnuelle, and C. Dani, 2010b, Isolation of a highly myogenic CD34-negative
595 subset of human skeletal muscle cells free of adipogenic potential: *Stem Cells*, v. 28,
596 p. 753-64.

597 Saclier, M., S. Cuvellier, M. Magnan, R. Mounier, and B. Chazaud, 2013,
598 Monocyte/macrophage interactions with myogenic precursor cells during skeletal
599 muscle regeneration: *Febs j*, v. 280, p. 4118-30.

600 Serrano, A. L., C. J. Mann, B. Vidal, E. Ardite, E. Perdiguero, and P. Muñoz-Cánoves, 2011,
601 Cellular and molecular mechanisms regulating fibrosis in skeletal muscle repair and
602 disease: *Curr Top Dev Biol*, v. 96, p. 167-201.

603 Tidball, J. G., 2005, Inflammatory processes in muscle injury and repair: *Am J Physiol Regul*
604 *Integr Comp Physiol*, v. 288, p. R345-53.

605 Uezumi, A., S. Fukada, N. Yamamoto, M. Ikemoto-Uezumi, M. Nakatani, M. Morita, A.
606 Yamaguchi, H. Yamada, I. Nishino, Y. Hamada, and K. Tsuchida, 2014, Identification

607 and characterization of PDGFR α + mesenchymal progenitors in human skeletal
608 muscle: *Cell Death Dis*, v. 5, p. e1186.

609 Uezumi, A., S. Fukada, N. Yamamoto, S. Takeda, and K. Tsuchida, 2010, Mesenchymal
610 progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in
611 skeletal muscle: *Nat Cell Biol*, v. 12, p. 143-52.

612 Uezumi, A., T. Ito, D. Morikawa, N. Shimizu, T. Yoneda, M. Segawa, M. Yamaguchi, R.
613 Ogawa, M. M. Matev, Y. Miyagoe-Suzuki, S. Takeda, K. Tsujikawa, K. Tsuchida, H.
614 Yamamoto, and S. Fukada, 2011, Fibrosis and adipogenesis originate from a common
615 mesenchymal progenitor in skeletal muscle: *J Cell Sci*, v. 124, p. 3654-64.

616 Vauchez, K., J. P. Marolleau, M. Schmid, P. Khattar, A. Chapel, C. Catelain, S. Lecourt, J.
617 Larghero, M. Fiszman, and J. T. Vilquin, 2009, Aldehyde dehydrogenase activity
618 identifies a population of human skeletal muscle cells with high myogenic capacities:
619 *Mol Ther*, v. 17, p. 1948-58.

620 Zou, Y., R. Z. Zhang, P. Sabatelli, M. L. Chu, and C. G. Bönnemann, 2008, Muscle
621 interstitial fibroblasts are the main source of collagen VI synthesis in skeletal muscle:
622 implications for congenital muscular dystrophy types Ullrich and Bethlem: *J*
623 *Neuropathol Exp Neurol*, v. 67, p. 144-54.

624 **FIGURE LEGENDS**

625

626 **Figure 1. Engraftment of healthy human MPs and FAPs in mouse injured *Tibialis***
627 ***anterior* muscles. (A)** MPs and FAPs were separately injected into mouse muscles. Muscle
628 cryosections were analyzed 4 weeks later by immunofluorescence to detect mouse and human
629 laminin (green) and the human specific Lamin A/C (red), which stains the nuclear envelop.
630 Human and mouse fibrillar collagen was visualized in blue by second-harmonic generation
631 imaging. MP nuclei (top panel) were disseminated in myofiber regenerating areas, mostly
632 within new fibers that expressed human specific β spectrin (red) at the plasma membrane
633 (arrows). FAP nuclei (bottom panel) were concentrated in blue fibrotic areas. **(B)** Expression
634 of human specific fibrotic genes in mouse muscles injected with MPs or FAPs was measured
635 by quantitative RT-PCR relative to human specific 36B4 gene expression. Cells were
636 prepared from two healthy adult muscle biopsies and each cell population was injected in
637 muscles from two mice (N = 8). The p-values are indicated for the comparison of MPs versus
638 FAPs. h: human specific labelling; h/m: human/mouse labelling.

639

640 **Figure 2. Fibrogenic differentiation of healthy MPs and FAPs.** MPs and FAPs were
641 placed in differentiation medium in the presence or not of TGF β -1. **(A)** MP cultures were
642 labelled green with anti-myosin heavy chains (MHC) or anti- α SMA antibodies. FAP cultures
643 were labelled red with anti-perilipin 1 or anti- α SMA antibodies. Nuclei were stained blue
644 with DAPI. **(B)** Quantitative RT-PCR assays were performed for α SMA, COL1A1, FN1 and
645 CTGF mRNAs. The results are represented as fold induction by TGF β -1. MPs and FAPs from
646 six healthy adult biopsies were analyzed. The p-values are indicated for the comparison of
647 MPs versus FAPs. **(C)** After 1 h of TGF β -1 treatment or not, total protein extracts were

648 analyzed by Western blotting using antibodies against phospho-Smad2 (P-Smad2), Smad2
649 and tubulin. A representative immunoblot is shown.

650

651 **Figure 3. Differentiation potentials of healthy FAPs.** (A) FAP cultures in differentiation
652 medium without TGF β -1 were co-labelled with anti- α SMA (green) and anti-perilipin 1 (red)
653 antibodies. Three views are presented. (B) FAPs were prepared from five healthy teenagers'
654 biopsies and submitted in parallel to adipogenic or fibrogenic differentiation medium and
655 analyzed by quantitative RT-PCR for expression of the adipogenic marker PLIN1 and the
656 TGF β -1 induction of the fibrogenic markers COL1A1, FN1, and α SMA. Marker expression
657 correlations between the five biopsies were calculated. Linear correlation coefficient r and p -
658 values are indicated. (C) Each FAP clone was divided into two wells. The first well was
659 submitted to differentiation medium without TGF β -1, the second well was submitted to
660 differentiation medium with TGF β -1. Cells were then co-labelled with anti- α SMA (green)
661 and anti-perilipin 1 (red) antibodies or stained with Oil Red O which labels lipid droplets. As
662 illustrated, three types of clones were found and the histograms indicate their relative
663 proportions. Overall, 36 differentiating clones were analysed. Two healthy children biopsies
664 and one healthy adult biopsy were used.

665

666 **Figure 4. Differentiation potentials of healthy MPs.** MPs were cultured under
667 differentiation conditions. (A) MP populations were differentiated without TGF β -1. They
668 were labelled with anti- α SMA antibodies (red) and showed positive (*) and negative (arrow
669 head) multinucleated myotubes, as well as a very small number of cells with α SMA-positive
670 stress fibers (arrow). (B) MP populations were differentiated without TGF β -1. CD56 (red)
671 and α SMA (green) co-labelling indicated that cells with α SMA-positive stress fibers (arrow)
672 had low CD56 expression. (C) Representative flow-cytometry analysis of MPs without or

673 with TGF β -1 treatment. Live cells from R1 gate (left panels) were analyzed with anti-CD56-
674 APC antibodies and anti-CD140a-PE antibodies (right panels). The percentages of CD56^{high}
675 (gate R3), CD56^{low} (gate R4) and CD140a-positive (gate R2) populations are indicated. **(D)**
676 Each MP clone was divided in two wells. The first well was submitted to differentiation
677 medium without TGF β -1, the second well was submitted to differentiation medium with
678 TGF β -1. Cells were labelled with anti-myosin heavy chain (MHC; green) and anti- α SMA
679 (red) antibodies. Overall three healthy children biopsies and one healthy teenager biopsy were
680 used. Nuclei were stained blue with DAPI.

681

682 **Figure 5. MPs and FAPs derived from DMD muscle biopsies.** **(A)** Three DMD muscle
683 transversal eosin-stained paraffin sections showed the presence of myofibers (dark pink)
684 separated by adipocytes (white) and large fibrotic infiltrations (clear pink). Scale bar = 50 μ m.
685 **(B)** DMD MPs and DMD MPs were differentiated in the presence of TGF β -1 and stained
686 with immunofluorescence using anti- α SMA antibody (red). Nuclei were visualized with
687 DAPI. **(C)** TGF β -1 induction of the fibrotic markers α SMA, COL1A1 and FN1 was
688 compared by quantitative RT-PCR between MPs and FAPs prepared from six DMD
689 teenagers' biopsies. **(D)** Cells were treated or not with 5 ng/ml TGF β -1 and total protein
690 extracts were analyzed by Western blotting using antibodies against phospho-Smad2 (P-
691 Smad2), Smad2 and tubulin. A representative immunoblot is shown. **(E)** Representative flow-
692 cytometry analysis of DMD MPs without or with TGF β -1 treatment. Live cells from gate R1
693 (left panels) were analyzed with anti-CD56-APC antibodies and anti-CD140a-PE antibodies
694 (right panels). The percentages of CD56^{high}, CD56^{low} and CD140a-positive populations are
695 indicated.

696

697 **Figure 6. FAP cellular localization in muscles.** Cryostat transversal sections were labelled
698 with anti-PDGFR α - antibody (CD140a, red), CD31 (green) or α SMA (green). The left panel
699 includes sections from healthy muscles and cell nuclei were visualized with DAPI (blue); the
700 right panel includes sections from DMD muscles and cell nuclei were visualized with Draq5
701 (green). (A) PDGFR α -positive FAPs were localized in the thin interstitial spaces between
702 myofibers (*). (B) PDGFR α -positive FAPs were found outside the blood vessel walls. CD31
703 is a marker of vascular endothelial cells and α SMA labelled the smooth muscle cells of vessel
704 walls. (C) For DMD muscles, fibrillar collagen was visualized by second-harmonic
705 generation imaging. Fibrillar collagen and PDGFR α -positive FAPs accumulated in the large
706 interstitium that separated myofibers (*). The analysis was performed with three healthy
707 teenager biopsies and 4 DMD teenager biopsies. Representative views are shown.

708

709 **Figure 7. MP localization in DMD muscles.** Cryostat transversal sections were labelled with
710 anti-CD56 antibody (red) and counterstained with DRAQ5 (green). Fibrillar collagen was
711 visualized in blue by second-harmonic generation imaging. The left panel shows control
712 views from healthy muscles. The right panel shows views from DMD muscles. CD56
713 unicellular positive cells were found only in satellite cell positions for healthy muscles; for
714 DMD muscles, they were also found within the interstitial spaces filled with fibrillary
715 collagen (arrows) between myofibers. Representative views from experiments performed with
716 two healthy teenager biopsies and four DMD teenager biopsies are shown.

717

718 **Figure 8. PDGFR α expression by DMD MPs.** Cryostat transversal sections of DMD
719 muscles were labelled with anti-CD56 antibody (green), anti-CD140a (PDGFR α) (red) and
720 counterstained with DAPI (blue). Very few cells in the endomysium were positive for both

721 markers (arrow). As expected, myofibers (*) were labelled with anti-CD56 antibodies.
722 Analysis was performed on four DMD teenager biopsies.

723

724 **Figure 9. Engraftment of DMD MPs and DMD FAPs in mouse injured *Tibialis anterior***
725 **muscles. (A)** Muscle cryosections were analyzed by immunofluorescence 4 weeks after cell
726 injections for the expression of human specific Lamin A/C (red) at the nuclear envelope,
727 human specific β spectrin (red) at the myofiber plasma membrane (arrows) and mouse/human
728 laminin (green). Human or mouse fibrillar collagen was visualized in blue by second-
729 harmonic generation imaging. Section areas from muscles injected with DMD MPs, DMD
730 FAPs and healthy FAPs are shown. h: human specific labelling; h/m: human/mouse labelling.
731 **(B)** Expression of the human specific fibrogenic markers COL1A1, FN1 and MMP2 was
732 measured by quantitative RT-PCR relative to human specific 36B4 gene expression. Two
733 healthy teenager biopsies and two DMD teenager biopsies were analyzed. Each cell
734 population was injected in the two *Tibialis anterior* muscles from two mice (N = 8). The p-
735 values are indicated for the comparison healthy versus DMD and DMD MPs versus DMD
736 FAPs.

737

738 **Table 1. Muscle biopsies**

739

740 **Table 2. Quantitative PCR primers**

741

742 **Supplemental Figure 1. Mouse muscle fibrosis model. (A)** Fibrotic areas, characterized by
743 collagen deposition between myofibers, were present 4 weeks after laceration of *Tibialis*
744 *anterior* muscles. They were visualized on cryostat muscle sections in red with Sirius Red
745 staining or light blue with Masson's Trichrome staining. **(B)** Expression of the human specific

746 (h) 36B4 gene relative to the human/mouse (h/m) TBP gene in mouse muscles injected with
747 MPs or FAPs was measured by quantitative RT-PCR. Cells were prepared from two healthy
748 adult muscle biopsies and each cell population was injected in muscles from two mice (N =
749 8). The p-value is indicated for the comparison MPs versus FAPs.

750

751 **Supplemental Figure 2. Engraftment of DMD MPs and healthy MPs in mouse.** Mouse
752 *Tibialis anterior* muscles were taken 4 weeks after MP injection and analyzed on cryosections
753 by immunofluorescence. Human nuclei were labelled with anti-human specific Lamin A/C
754 antibodies (red) and human myofibers were labelled at the plasma membrane with anti-human
755 specific β spectrin antibodies (red). Nuclei were counterstained with DAPI. In regenerating
756 areas, human healthy MP-derived nuclei (arrow) and myofibers (arrow head) were found
757 among mouse myofibers (*). Two healthy teenagers' biopsies were used.

758

759 **Supplemental Figure 3. Engraftment of DMD MPs.** Transversal sections of fibrotic mouse
760 *Tibialis anterior* muscles injected with DMD MPs were labelled with human/mouse anti-
761 PDGFR α antibodies (red) and human specific anti-Lamin A/C (green). Examples of
762 myofibers are indicated with a white star (*). (A) Fibrillar collagen was visualized by second-
763 harmonic generation imaging (blue). The quasi-totality of DMD MPs, detected with
764 perinuclear Lamin A/C, were found in the wide endomysium around myofibers in injured
765 areas. This endomysium was colonized by PDGFR α -positive mouse FAPs and filled with
766 collagen. (B) Higher magnification views show that Lamin A/C-positive DMD MPs were
767 dispersed in the wide endomysium colonized by PDGFR α -positive mouse FAPs. Two healthy
768 teenagers' biopsies were used. h: human specific labelling; h/m: human/mouse labelling.

769

770

Figure 1

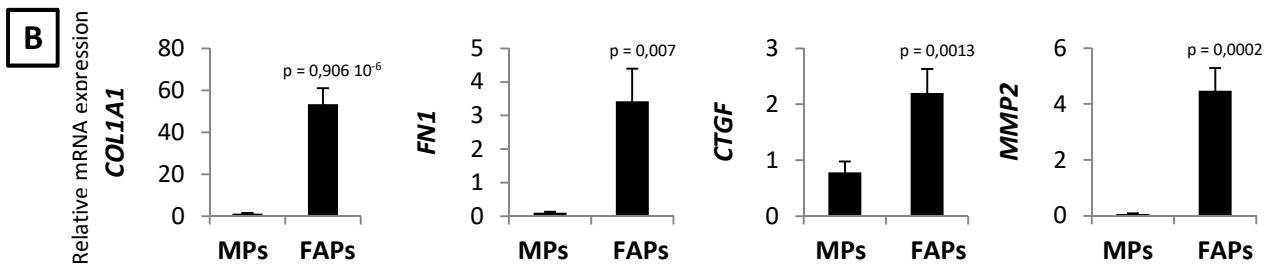
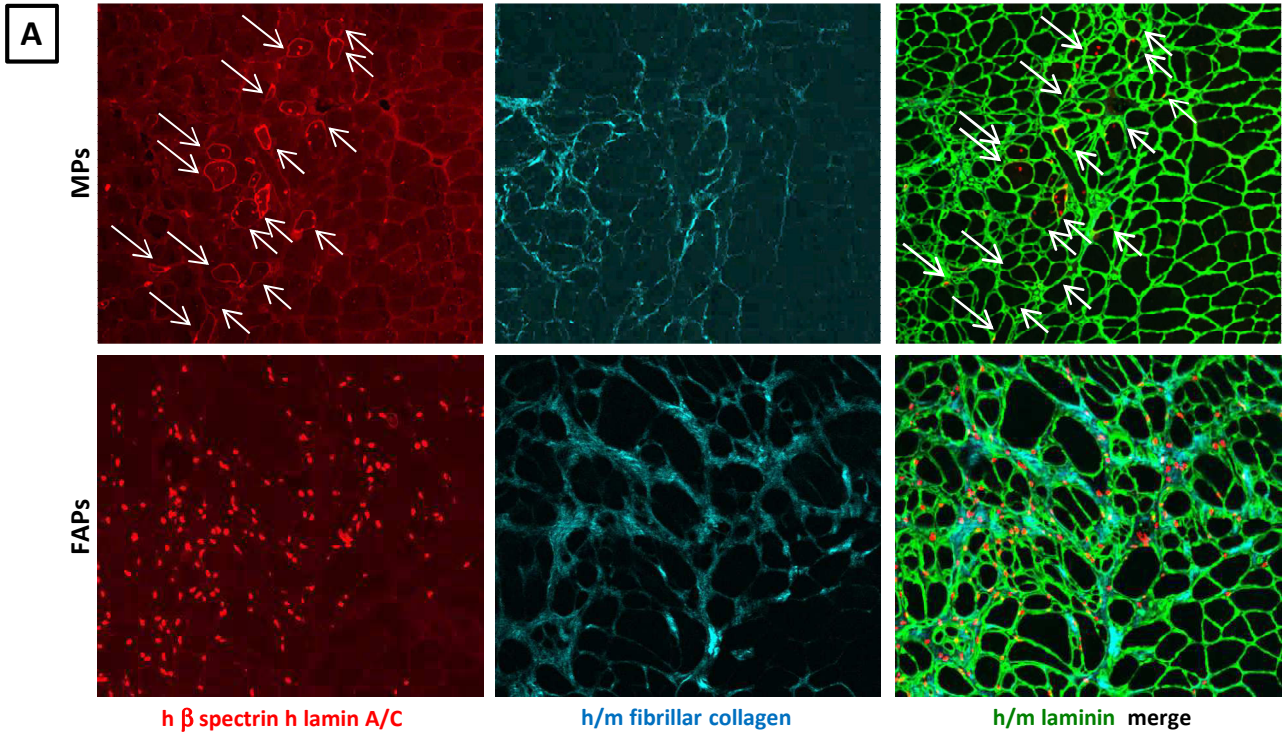


Figure 2

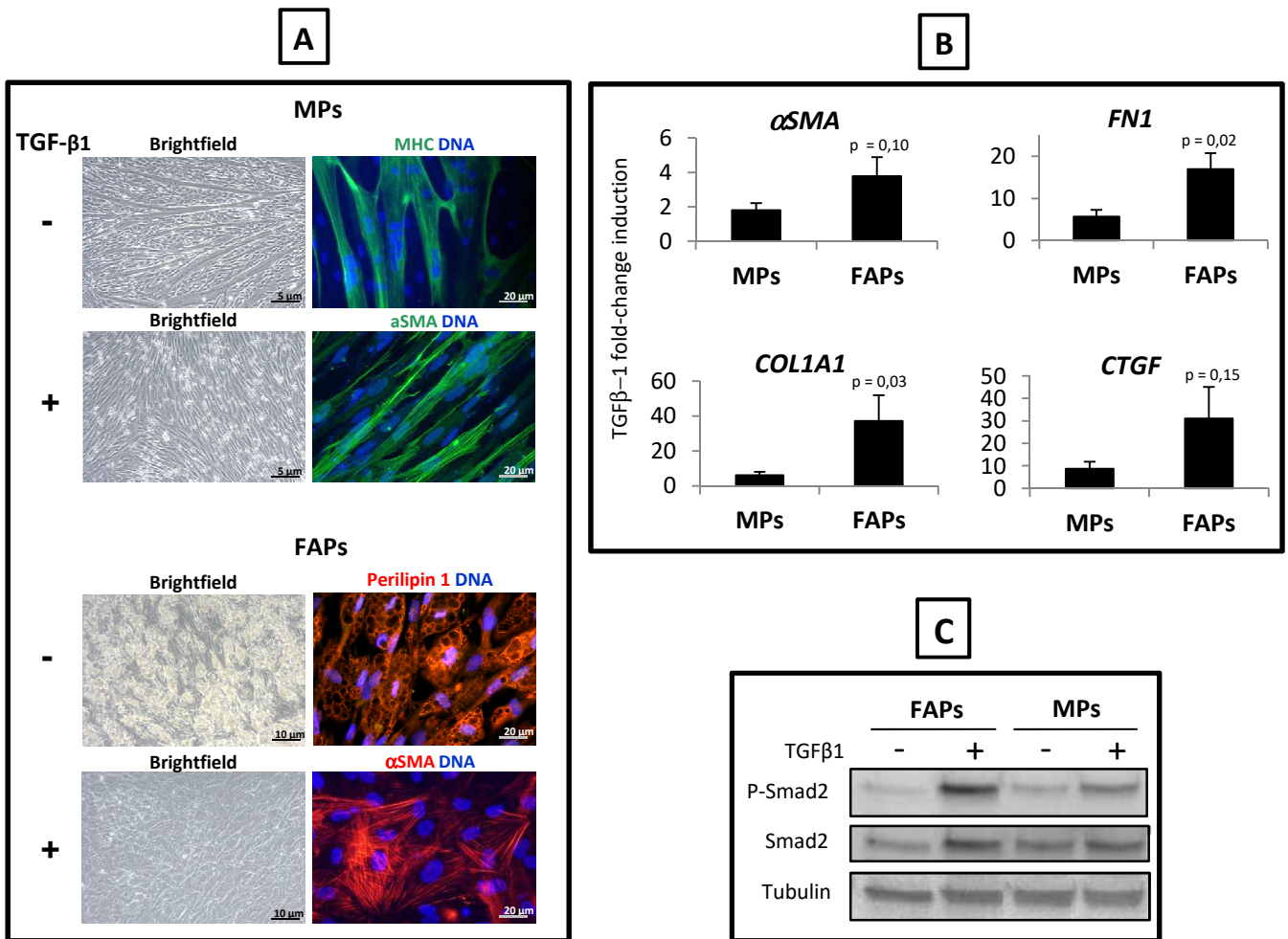


Figure 3

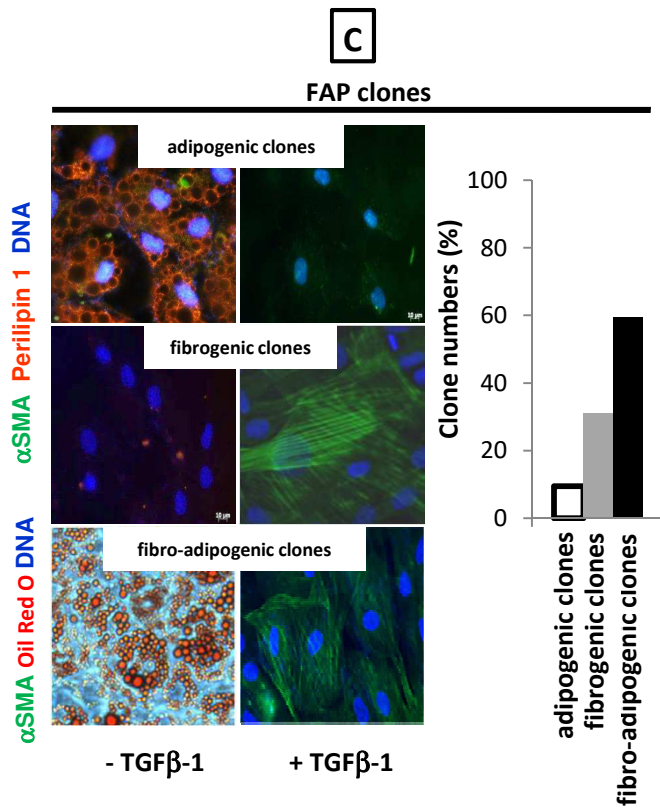
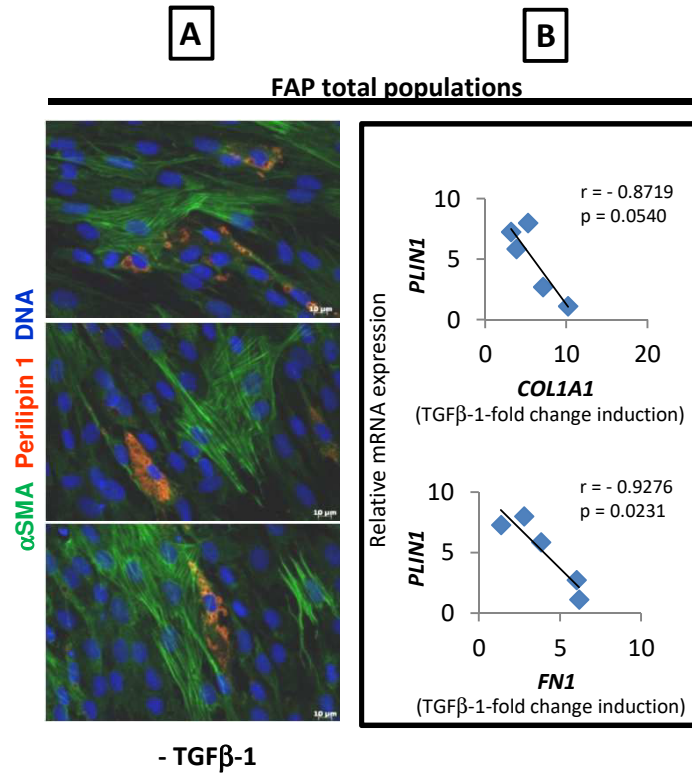


Figure 4

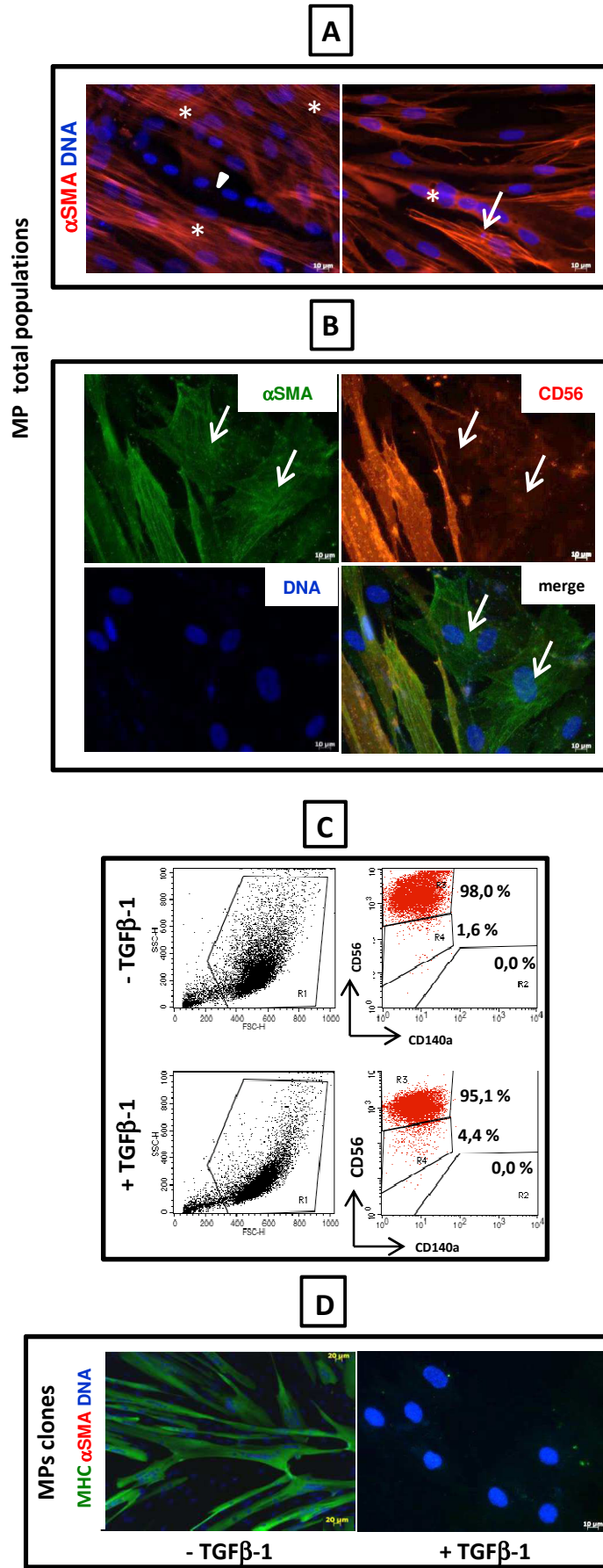


Figure 5

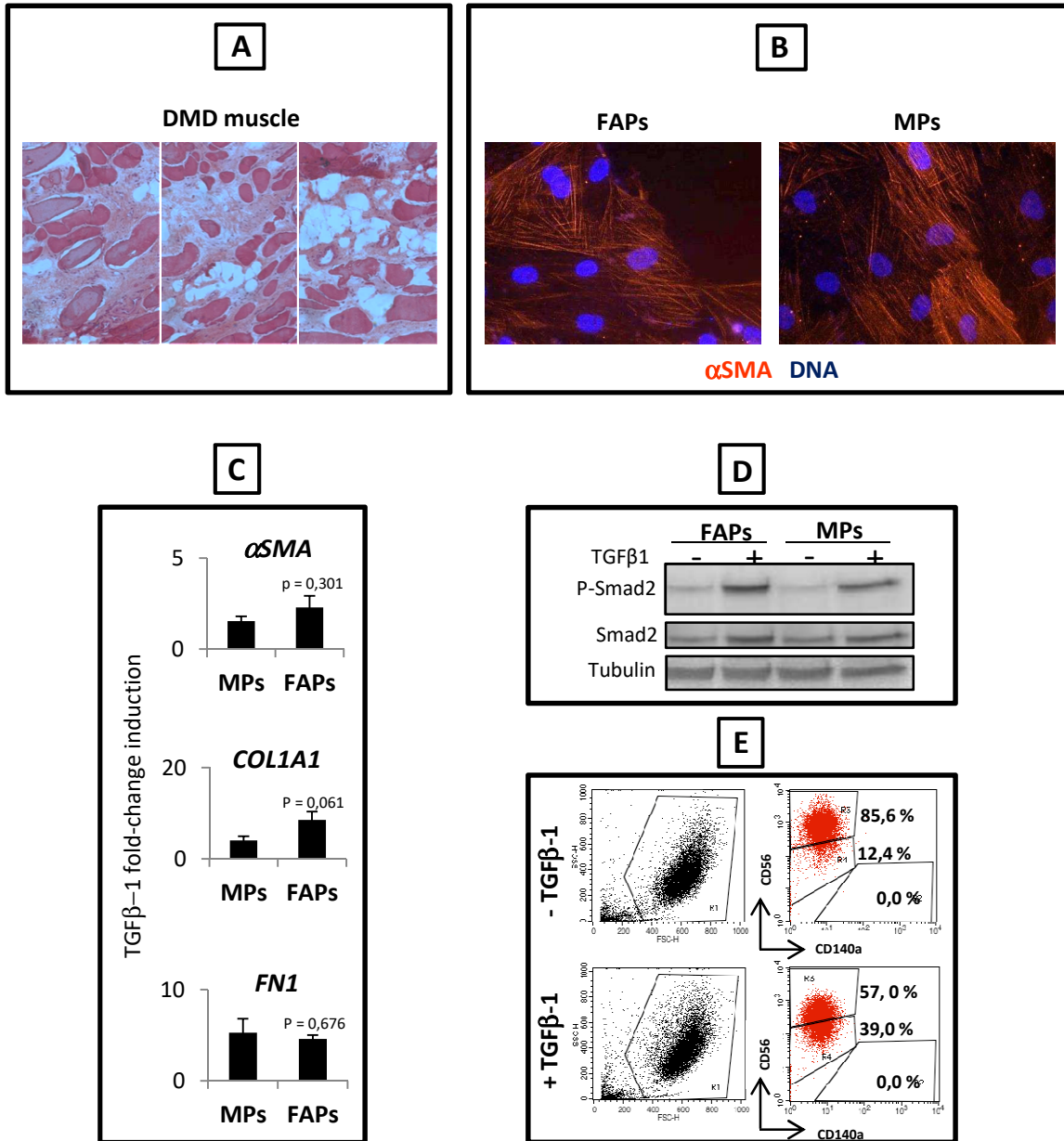
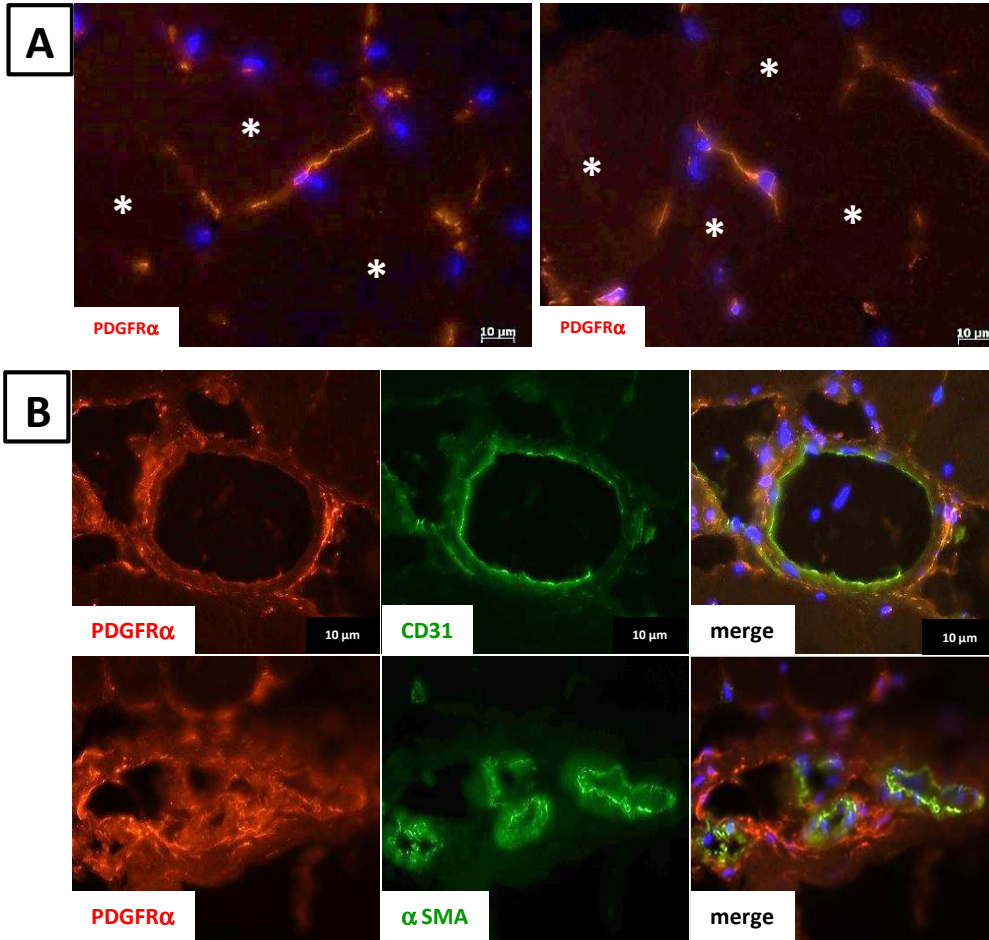


Figure 6

Healthy



DMD

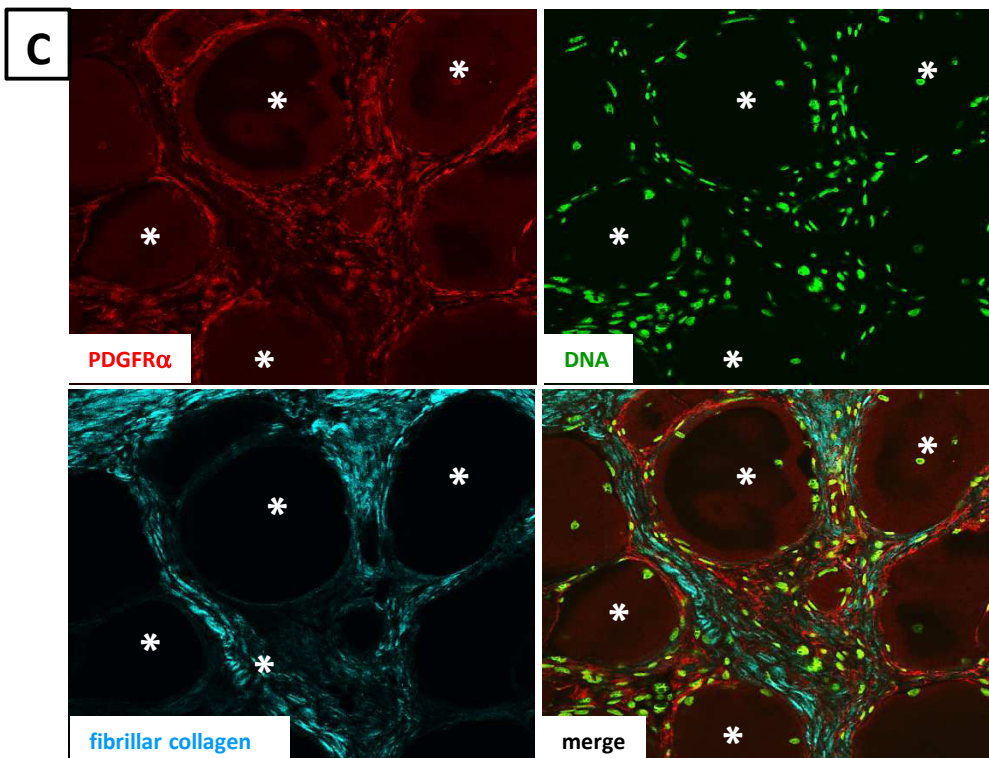
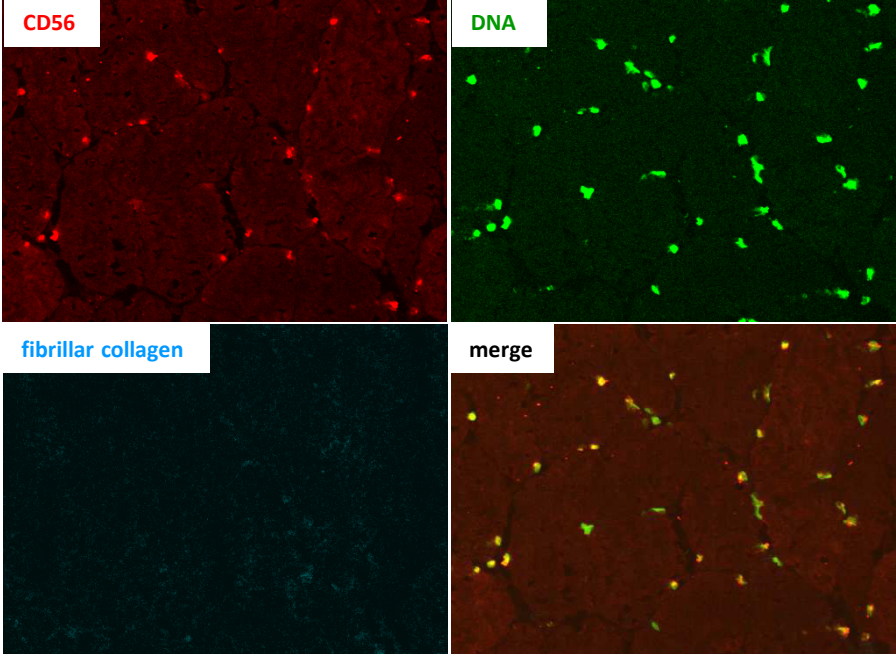


Figure 7

healthy



DMD

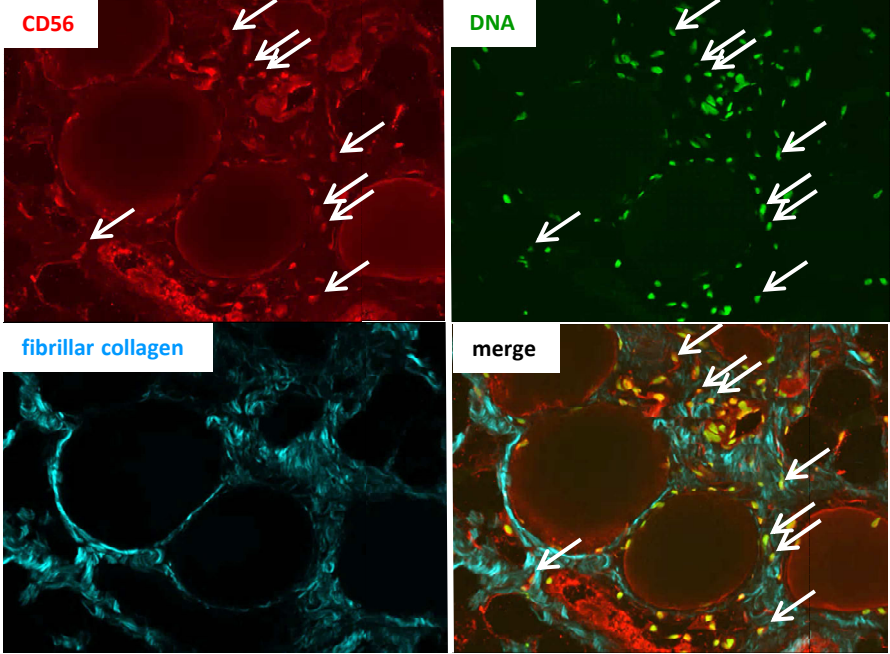


Figure 8

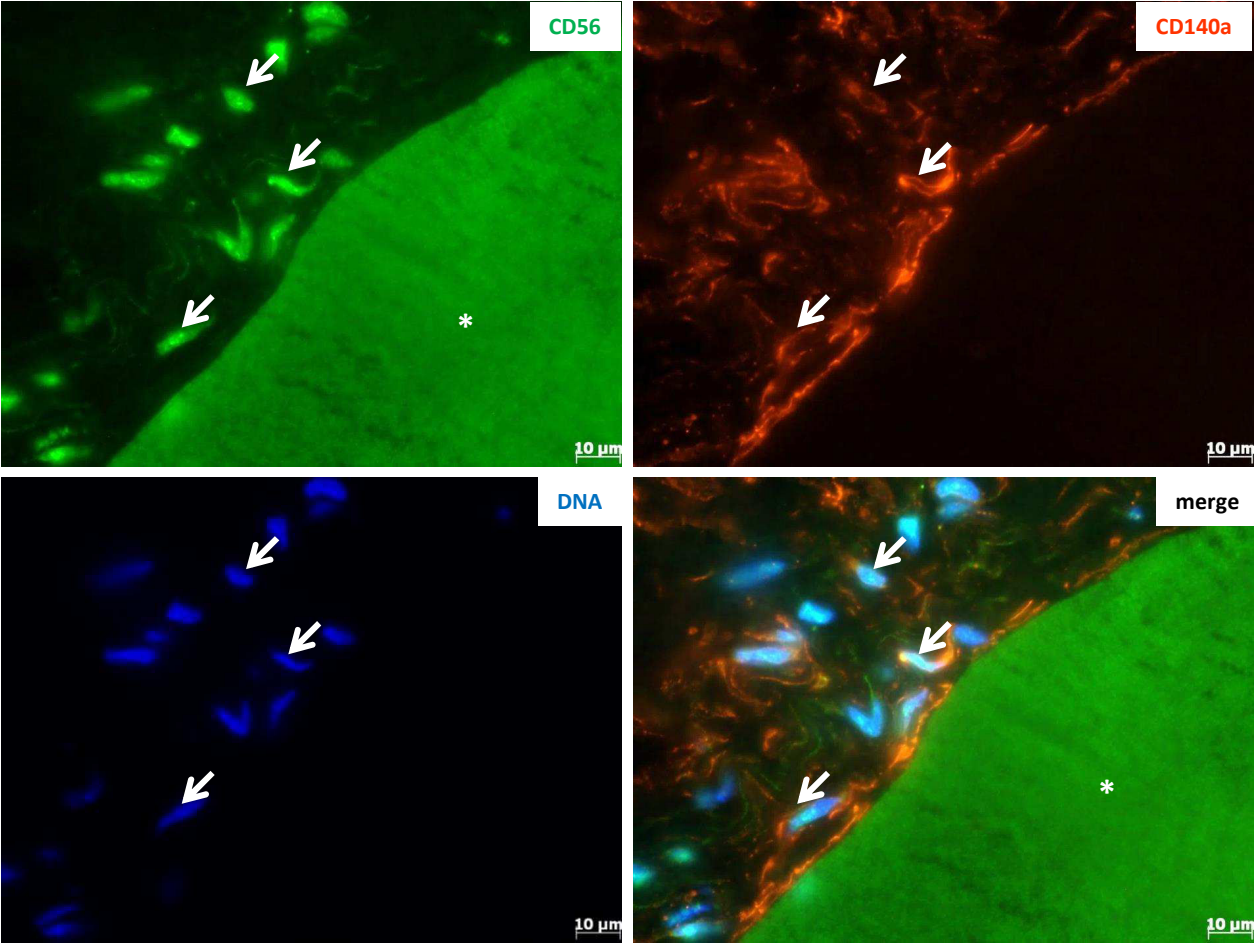
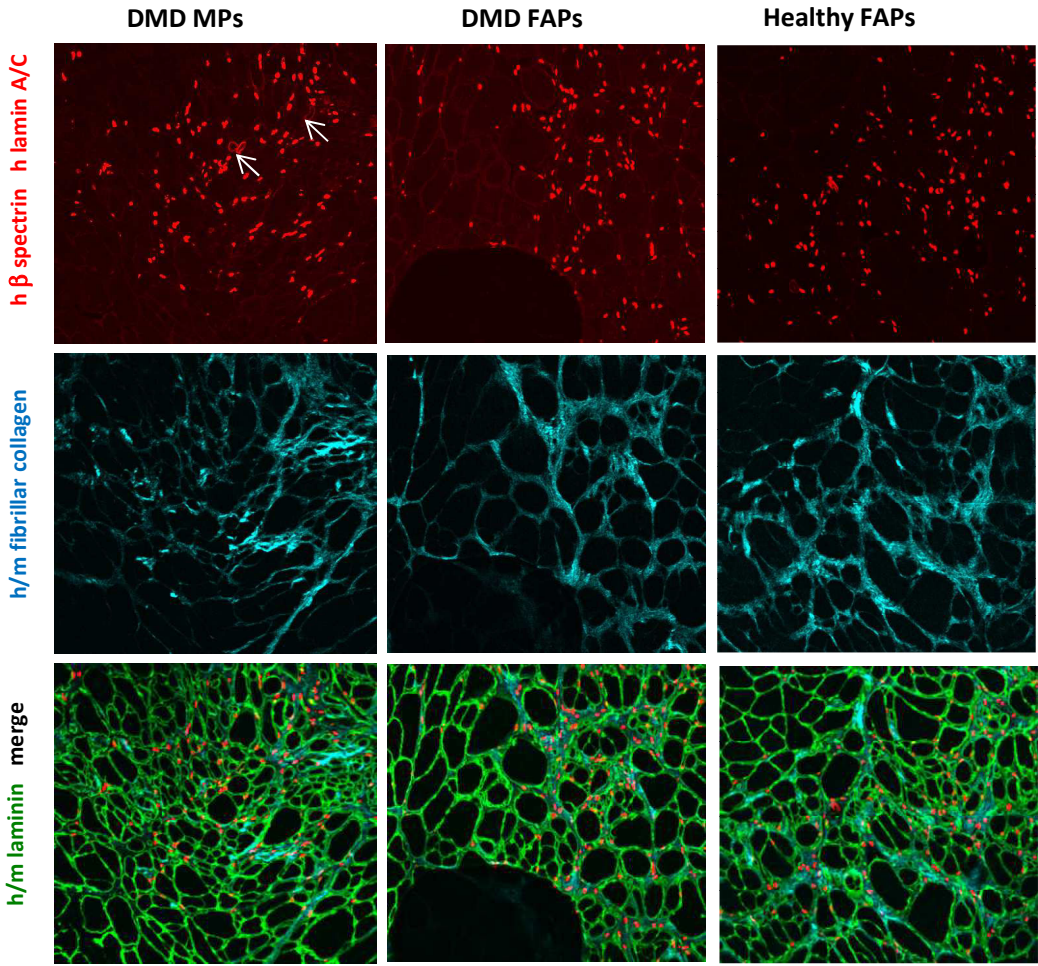


Figure 9

A



B

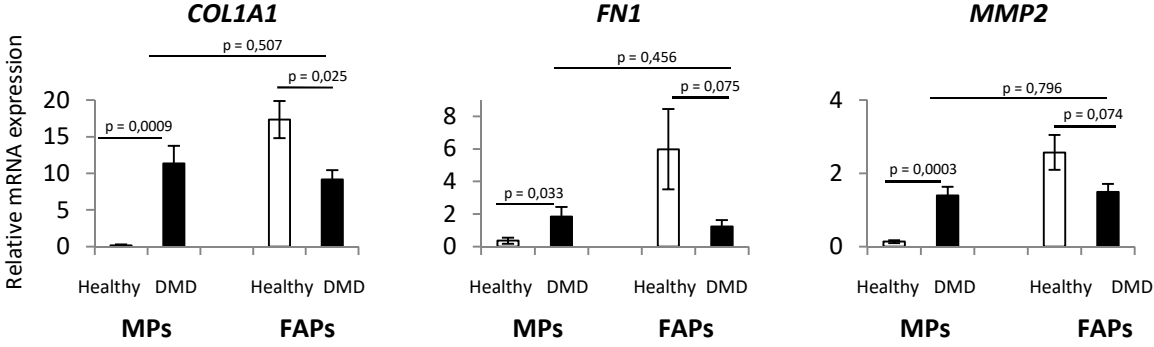


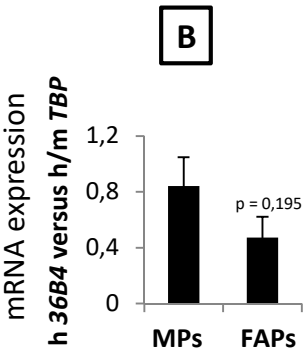
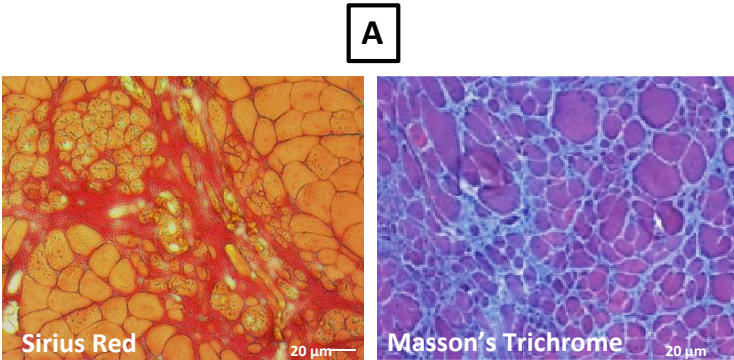
Table 1. Muscle biopsies

Donors				
name	gender	age (years)	muscle origin	use (figure number)
healthy children				
B1	male	1	quadiceps	3
B2	female	0,9	quadiceps	4
B3	female	1,5	quadiceps	4
B4	male	8	abdominal wall	3
B5	male	3	intercostal	4
healthy teenagers				
B6	male	14	paravertebral	3,7
B7	female	17	paravertebral	3,6
B8	male	17	gluteus maximus	3, 4, 6, 7, 9, sup 2
B9	female	14	paravertebral	2, 3, 5, 9, sup 2
B10	male	19	paravertebral	3,5
B11	male	16	paravertebral	6
healthy adults				
B12	male	42	deltoid	2, sup 2
B13	female	43	quadiceps	1, 2, sup 1, sup 2
B14	male	30	abdominal	2, sup 2
B15	male	51	gluteus maximus	2, sup 2
B16	male	28	vastus lateralis	1, 2, sup 1, sup 2
B17	female	32	quadiceps	2, sup 2
B18	male	45	gluteus medius	3
DMD teenagers				
B19	male	14	paravertebral	5, 6, 7, 8, 9, sup 2, sup 3
B20	male	15	paravertebral	5, 6, 7, 8, 9, sup 2, sup 3
B21	male	15	paravertebral	5
B22	male	16	paravertebral	5, 6
B23	male	11	tensor fasciae latae	5, 6, 7, 8
B24	male	15	paravertebral	5
B25	male	13	paravertebral	5, 7, 8

Table 2. PCR primers

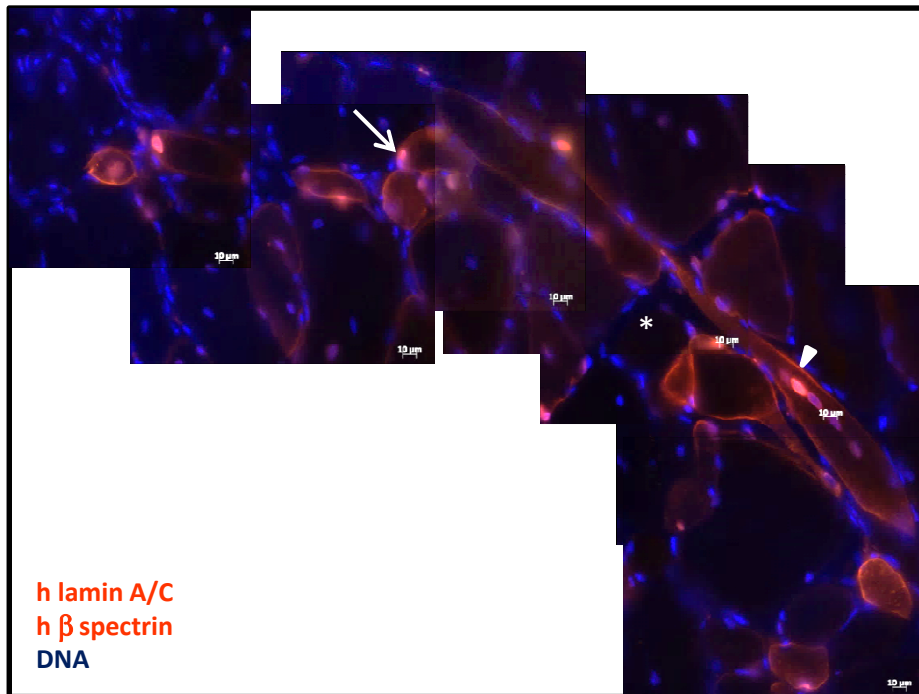
Quantitative PCR primers		
	forwards	reverse
mouse		
αsma	ACGCTGAAGTATCCGA	CATTTTCTCCCGGTTGG
Col1A1	TCATCGTGGCTTCTCTGGTC	GACCGTTGAGTCCGTCTTTG
Ctgf	TCCACCCGAGTTACCAA	TTAGGTGTCCGGATGC
human		
MCK	CTGCGTGGCTGGTGATGAG	CAGGTCGTCTCCACCCTTGA
MYOG	CACCTCCAGGATACAGACAGC	TGGTGGCGGTGTAAGGAG
SGCD	CGGGAGTGTTGAGTGAAGGG	CTCCGGTGGTGAAGTACTG
FABP4	TGTGCAGAAATGGGATGGAAA	CAACGTCCCTTGGCTTATGCT
PLIN1	ACCATCTCCACCCGCCTC	GATGGGAACGCTGATGCTGT
αSMA	TGCCTGATGGGCAAGTGA	CTGGGCAGCGGAAAACG
COL1A1	ACCTGCGTGTACCCCACTCA	CCGCCATACTCGAACTGGAA
CTGF	GCAGGCTAGAGAAGCAGAGC	ATGTCTTCATGCTGGTGCAG
FN1	CTGGCCGAAAATACATTGTA	CCACAGTCGGGTCAGGAG
MMP2	ATGACAGCTGCACCACTGAG	ATTTGTTGCCAGGAAAGTG
PDGFRα	AGGTGGTTGACCTTCAATGG	TTTGATTTCTCCAGCATTGTG
TGFβ-1	GGAAACCCACAACGAAATCTATGA	GAGAGCAACACGGGTTTCAGGTA
TBP	ACGCCAGCTTCGGAGAGTTC	CAAACCGCTTGGGATTATATTCG
36B4	TCTACAACCCTGAAGTGCTTGAT	CAATCTGCAGACAGACACTGG

Supplemental Figure 1

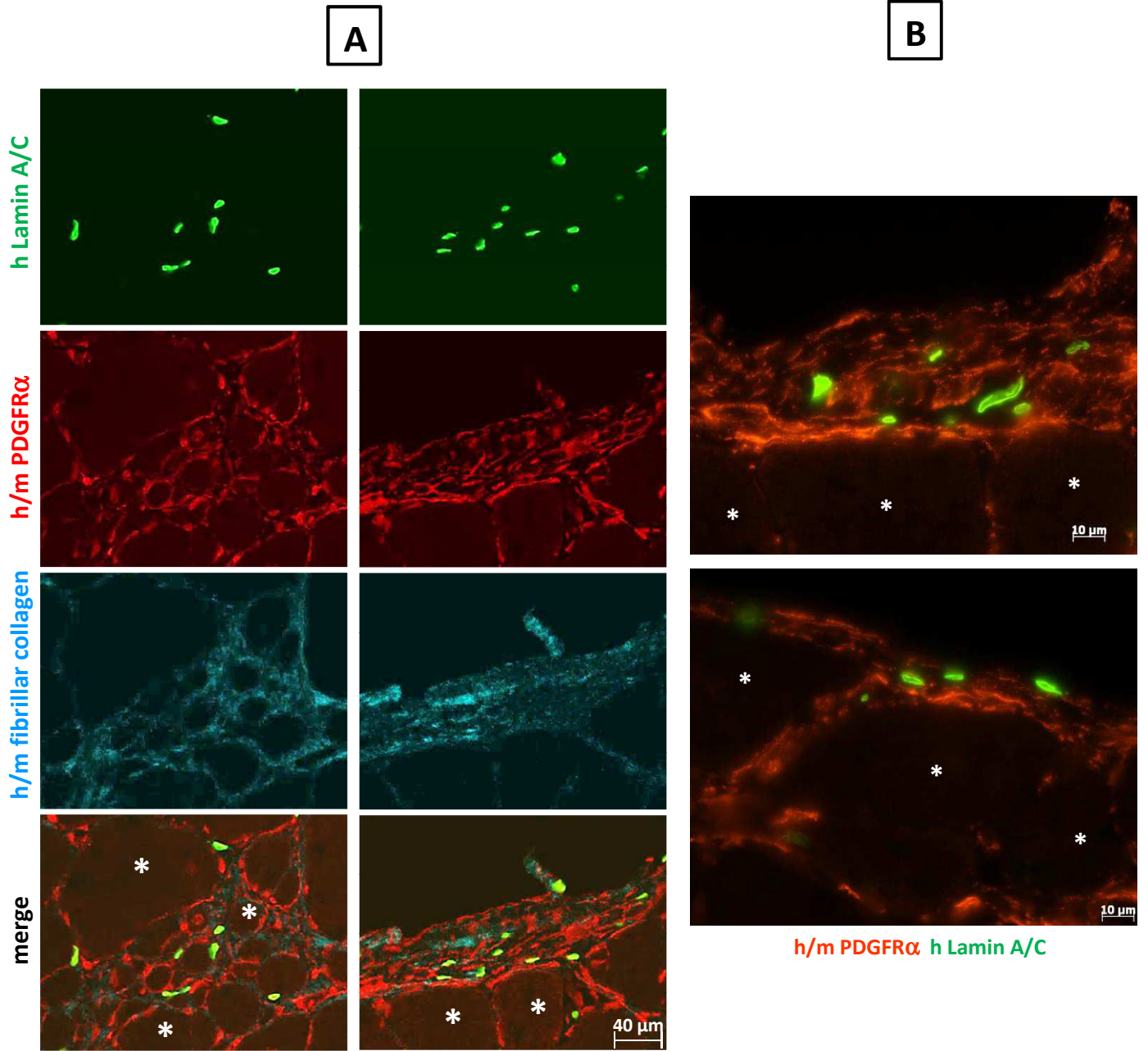


Supplemental Figure 2

Healthy MPs



Supplemental Figure 3



3. Conclusion

Une fois injectés dans les muscles TA des souris, les FAPs humains sains sont localisés dans les zones de fibrose alors que les MPs y sont absents et génèrent des myofibres. De plus, les FAPs produisent en quantité beaucoup plus importante que les MPs des protéines de l'ECM dans les muscles murins. En réponse au TGF β 1, seulement les FAPs se sont différenciés *in vitro* en myofibroblastes exprimant la protéine contractile α SMA. Les expériences de clonage ont montré que 90% des FAPs ont un potentiel fibroblastique alors que la quasi-totalité des clones MPs sont exclusivement myogéniques. Ces données *in vivo* et *in vitro* indiquent que les FAPs de muscles humains sains sont fibrogéniques contrairement aux MPs. De manière surprenante, le potentiel fibrogénique *in vitro* des FAPs DMD et MPs DMD sont identiques. Suite à leur injection dans les muscles de souris, les MPs DMD échouent à générer des myofibres et sont localisés préférentiellement dans les zones de fibroses tout comme les FAPs DMD. Ces données montrent que les MPs dystrophiques humains acquièrent un potentiel fibrogénique au détriment de leur capacité myogénique. En accord avec ces résultats, des progéniteurs myogéniques CD56⁺ sont retrouvés dans l'endomysium fibrotique des muscles DMD et une petite quantité de ces progéniteurs expriment le marqueur de surface PDGFR α . En plus de démontrer le potentiel fibrogénique *in vivo* des FAPs sains et des MPs DMD, ces résultats apportent de nouveaux éléments quant à l'origine myogénique des dépôts fibrotiques des muscles dystrophiques.

Chapitre 3. Crosstalks between myogenic and fibro-adipogenic progenitors from healthy and dystrophic skeletal muscles in humans

1. Objectifs de l'étude

La régénération musculaire est un phénomène complexe qui implique une collaboration finement régulée entre deux catégories de cellules : les cellules satellites et les cellules interstitielles avoisinantes (Ceafalan, Popescu, and Hinescu 2014). Par contact direct ou par la sécrétion de facteurs solubles, plusieurs types de cellules interstitielles maintiennent la niche des cellules satellites dans les muscles normaux et/ou recrutent différents pools de progéniteurs myogéniques au cours de la régénération musculaire. La niche musculaire des cellules satellites est un microenvironnement polarisé composé de la lamina basale qui entoure la fibre musculaire. Le côté basal des cellules satellites est ancré dans la lamina basale grâce aux laminines. Le côté apical des cellules satellites est adjacent à la myofibre où il est fixé à la lamina basale *via* la molécule d'adhésion cellulaire M-cadhérine (Kuang et al. 2007). L'intégrité et la composition de cette niche influence le processus de réparation musculaire en fournissant les signaux et les substrats adéquats aux cellules satellites (Ceafalan, Popescu, and Hinescu 2014). Ces signaux sont représentés par des facteurs solubles sécrétés par les cellules avoisinantes ainsi que par le contact direct avec la myofibre qui maintiennent l'état quiescent des cellules satellites. Le contact direct avec certaines cellules immunitaires et les facteurs libérés par ces cellules sont requis pour l'activation, la prolifération et la différenciation des cellules satellites (Chazaud et al. 2003, Saclier, Cuvellier, et al. 2013). L'autre support de la niche des cellules satellites est le réseau capillaire (Abou-Khalil, Mounier, and Chazaud 2010). En effet, des interactions entre les cellules satellites et les cellules endothéliales existent pour supporter l'angiogenèse et la myogenèse très probablement à travers la sécrétion de facteurs solubles (Christov et al. 2007). Enfin, il a été décrit que les fibroblastes TCF4⁺ résidant dans le muscle squelettique sont cruciaux pour réguler l'expansion des cellules satellites et éviter leur différenciation prématurée au cours de la régénération musculaire (Murphy et al. 2011).

Les cellules interstitielles qui pourraient réguler le microenvironnement des cellules satellites sont les cellules immunitaires, les FAPs, les cellules vasculaires et les cellules nerveuses périphériques (Ceafalan, Popescu, and Hinescu 2014). Les FAPs fournissent une source de cytokines qui régulent l'activité des cellules satellites (Heredia et al. 2013, Uezumi et al. 2010, Joe et al. 2010, Mozzetta et al. 2013). Par exemple, l'IL-6 et la follistatine libérées par les FAPs stimulent la myogenèse des cellules satellites (Joe et al. 2010, Mozzetta et al. 2013). En retour, les cellules satellites inhibent l'adipogenèse des FAPs (Uezumi et al. 2010). Cependant, l'environnement des muscles dystrophiques perturbe les interactions cellulaires entre les FAPs et les cellules satellites. En effet, les FAPs isolés à partir de muscles de souris *mdx* répriment la myogenèse des cellules satellites (Mozzetta et al. 2013). Ces interactions altérées pourraient être une cause de la faible efficacité de la prise de greffe des myoblastes pour traiter les patients DMD. Avant de chercher le type de cellules souches le plus approprié pour la thérapie cellulaire, il est essentiel de comprendre et d'identifier le microenvironnement nécessaire à la préservation et à la différenciation des cellules souches (Ceafalan, Popescu, and Hinescu 2014). A l'heure actuelle, les interactions cellulaires entre les FAPs et les cellules satellites sont peu documentées et les seules données disponibles ont été réalisées chez la souris.

Pour la première fois à partir de progéniteurs humains sains et dystrophiques, nous avons étudié les interactions cellulaires entre les FAPs et les progéniteurs myogéniques (MPs, myogenic progenitors). Une attention particulière a été portée sur le mécanisme moléculaire de la régulation des FAPs par le lignage myogénique.

2. Article

Moratal C, Arrighi N, Kurzenne JY, Dani C and Dechesne CA. En préparation.

Cross-talks between fibro-adipogenic progenitors and myogenic progenitors isolated from healthy and dystrophic skeletal muscles in humans

C Moratal¹, N Arrighi¹, JY Kurzenne², C Dani¹ and CA Dechesne^{*,1}

¹Univ. Nice Sophia Antipolis, CNRS, Inserm, iBV, 06100 Nice, France

²Hôpitaux pédiatriques de Nice CHU-Lanval, Nice, France

*Corresponding author: CA Dechesne, iBV, Institut de Biologie Valrose, Univ. Nice Sophia Antipolis; Tour Pasteur; UFR Médecine; 28, avenue de Valombrose, 06107 Nice Cedex2, France. Tel +33 493 37 70 38; Fax +33 493 37 70 58; E-mail: dechesne@unice.fr

Keywords: adipogenesis; fibrogenesis; myogenesis; DMD; cellular signaling pathways; Smad2; GLI1, Akt.

Abbreviations: FAPs, fibro-adipogenic progenitors; MPs, myogenic progenitors; ASCs, adipose stroma cells; DMD, Duchenne muscular dystrophy; TGF- β , transforming growth factor-beta; TNF α , tumor necrosis factor alpha; FABP4, fatty acid binding protein 4; COL1A1, collagen type I alpha 1; α SMA, alpha smooth muscle actin; MCK, muscle creatine kinase; MYOG, myogenin; SGCD, delta sarcoglycan; FN1, fibronectin 1; PLIN1, perilipin 1; ECM, extra-cellular matrix.

ABSTRACT

Fibro-adipogenic progenitors (FAPs) resident in the interstitial space of human skeletal muscles were recently found. Their pro-myogenic role on myogenic progenitors (MPs) was established in mice but their involvement in muscle regeneration and their regulation are still not investigated in humans. Here we show bidirectional interactions between FAPs and MPs derived from human muscular biopsies. First, FAPs secrete factors that inhibit MPs proliferation while FAPs and FAPs-derived adipocytes stimulate myogenesis. Second, soluble molecules released by MPs activate the PI3Kinase/Akt pathway resulting in the stimulation of FAPs proliferation. Third, factors secreted by MPs-derived myotubes promote FAPs fibrogenesis at the expense of adipogenesis that is highly inhibited; these cell crosstalks are mediated by TGF β and Hedgehog pathways. Altogether, these results show that cellular interactions between the myogenic and fibro-adipogenic lineages largely contribute to the muscle repair mechanisms. They could prevent intramuscular adipocyte infiltrations and could promote the formation of extracellular matrix to support myogenesis during muscle regeneration. In muscles from aged donors or from patients with Duchenne muscular dystrophy the long-term secretion of extracellular matrix components give rise to damaging fibrotic depositions. Interestingly, FAPs-MPs crosstalks are disrupted for progenitors isolated from such donors.

INTRODUCTION

Adult skeletal muscle possesses a powerful regenerative capacity dependent on satellite cells which are myogenic progenitor (MPs). They reside beneath the basal lamina, closely juxtaposed to the muscle fibers (Mauro 1961). After injury, quiescent satellite cells become activated, proliferate and fuse to existing damaged fibers for repair or to one another for new myofiber formation. Muscle regeneration is a complex phenomenon that requires a close collaboration between satellite cells and populations such as bone-marrow or muscle-derived stem cells, mesoangioblasts, pericytes and immune cells (Pannérec, Marazzi, and Sassoon 2012, Yin, Price, and Rudnicki 2013, Bentzinger et al. 2013, Ceafalan, Popescu, and Hinescu 2014, Saclier et al. 2013). Among interstitial cells supporting muscle regeneration, fibro-adipogenic progenitors (FAPs) located between skeletal muscle fibers were recently identified by us and other groups (Vauchez et al. 2009, Pisani, Clement, et al. 2010, Pisani, Dechesne, et al. 2010, Lecourt et al. 2010, Arrighi et al. 2015). Human FAPs can be isolated by flow cytometry and express specific surface markers such as CD34, CD15 and PDGFR α but are negative for CD56, the neural cell adhesion molecule 1, which is known to be expressed by muscle MPs (Uezumi et al. 2014, Arrighi et al. 2015, Pisani, Clement, et al. 2010, Pisani, Dechesne, et al. 2010, Vauchez et al. 2009, Lecourt et al. 2010). FAPs also express mesenchymal stem or progenitor cell markers such as CD13, CD44, CD49, CD73, CD90, CD105 and CD201 (Uezumi et al. 2016, Lecourt et al. 2010, Uezumi et al. 2014, Vauchez et al. 2009, Pisani, Clement, et al. 2010). They are negative for the lineage markers CD31, CD45, CD106, CD117, CD133, CD146 and STRO-1 (Pisani, Clement, et al. 2010, Lecourt et al. 2010, Uezumi et al. 2014). When isolated from human muscle, FAPs have an intrinsic adipogenic potential manifested in culture by exposure to adipogenic conditions (Pisani, Clement, et al. 2010, Pisani, Dechesne, et al. 2010, Lecourt et al. 2010, Arrighi et al. 2015, Uezumi et al. 2014) and can differentiate into fibrogenic cells in response to TGF β 1 (Uezumi et al. 2014, Arrighi et al. 2015).

Despite the presence of muscle regenerative and pro-regenerative cell populations, skeletal muscle integrity can be debilitated by the deposition of adipose and fibrotic tissues in a variety of pathological conditions including Duchenne muscular dystrophy (DMD). DMD is a rare disease caused by mutations in the dystrophin encoding-gene, which result in protein loss with an incidence of 1 out of 3600–6000 newborn males (Emery 2002). Dystrophin mutations result in skeletal muscle fiber damage and necrosis, followed by progressive substitution of fibers with connective and adipose tissues that terminally leads to death in early adulthood

(Emery 2002). The muscle fat includes both acellular lipid droplets within the fibers and interstitial adipocytes characterized by drops of triglycerides and cholesterol ester and by the expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ 2 (PPAR γ 2), perilipin (PLIN1), leptin, adiponectin and fatty acid-binding protein 4 (FABP4) (Vettor et al. 2009, Sciorati et al. 2015). Intra- and interfiber fat is usually white, but brown adipocytes have also been identified in mice (Schulz et al. 2011). Fibrosis is an excess accumulation of extracellular matrix (ECM), and is present in numerous skeletal muscle conditions resulting in significant muscle weakness and decreased passive range of motion (Chapman, Meza, and Lieber 2016). Myofibroblasts are contractile ECM-producing cells expressing α -smooth muscle actin (α SMA) and are recognized as major cell players for installation of fibrosis, but their cellular origin is still controversial. FAPs have been proposed to be a crucial source of intramuscular fibro-adipogenesis; however, the regulation of this pathogenic progression is just beginning to be unveiled (Natarajan, Lemos, and Rossi 2010, Judson, Zhang, and Rossi 2013).

Our knowledge of FAPs is essentially based on data obtained in mice. During normal repair, FAPs expansion is transient and followed by a rapid reduction in their number (Joe et al. 2010). These progenitors have an important positive role in tissue regeneration and expand to generate paracrine factors, like follistatin, that support myoblast differentiation without secondary effect on MPs proliferation (Joe et al. 2010, Mozzetta et al. 2013). Recent studies in mice have identified paracrine cues from myogenic lineage or innate immune cells that *in vivo* regulate FAPs lineage and activity. Lemos *et al.* provided new insights into how macrophages influence the fate of FAPs and matrix accumulation in damaged muscle, by tightly regulating the balance of pro-apoptotic and pro-survival signals driven by TNF α and TGF β 1, respectively (Lemos et al. 2015). For successful regeneration, these signals need to appear in two sequential separate waves; however in chronic conditions, such as in dystrophic muscle, this sequence is lost, leading to timely overlap of TNF α and TGF β 1 contradictory signaling (Lemos et al. 2015, Muñoz-Cánoves and Serrano 2015). Heredia *et al.* demonstrated that FAPs proliferate as fibroblasts through the action of IL-4 secreted by eosinophils, to support myogenesis by facilitating the clearance of necrotic debris (Heredia et al. 2013). However, in IL-4 absence, FAPs fail to clear necrotic muscle fibers and differentiate into adipocytes, contributing to the persistence of cellular debris and fatty degeneration of skeletal muscle. Dong *et al.* showed that glucocorticoids stimulate FAPs to differentiate into adipocytes in injured muscles. This process is blocked by IL-4, suggesting that interfering with IL-4 signaling could prevent adipogenesis in muscle (Dong, Silva, and Zhang 2014).

Uezumi and collaborators proved that satellite cell-derived muscle fibers exert an inhibitory effect on the adipogenesis of PDGFR α ⁺ cells by directly interacting with them (Uezumi et al. 2010).

In humans to our knowledge, studies on the regulation of FAPs are very limited. *In vitro* assays indicated a pro-mitotic role of PDGFAA on human FAPs proliferation (Uezumi et al. 2014), and an anti-adipogenic action of members from TGF β family and TNF α on human FAPs differentiation (Arrighi et al. 2015).

Here we investigated, for the first time, the *in vitro* effects of cellular interactions between PDGFR α ⁺/CD56⁻ FAPs lineage and PDGFR α ⁻/CD56⁺ MPs lineage isolated from human muscles of healthy young, aged or DMD donors. With cell-to-cell contacts in co-cultures or conditioned-media experiments, we report that FAPs stimulate the myogenesis and inhibit proliferation of MPs via the secretion of soluble molecules. In the opposite direction we show that (i) MPs stimulate FAPs proliferation, interaction mediated by over-activation of PI3Kinase/Akt pathway, (ii) MPs-derived myotubes impede adipogenesis and promote fibrogenesis of FAPs involving the stimulation of Smad2/TGF β and GLI1/Hedgehog signaling pathways. Remarkably, these FAPs/MPs crosstalks depend on donors' age and are altered for progenitors derived from DMD muscles. Our results in humans shed new lights on the cellular regulation of intramuscular fibro-adipogenic lineage by myogenic lineage and stress the importance of FAPs in healthy and dystrophic muscle repair. These findings provide new data to elaborate strategies to prevent fibrotic and adipogenic infiltrations that impair in particular the efficiency of gene and cellular therapies for muscle dystrophies.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and antibodies

Cell culture media, serum, buffer, and trypsin were purchased from Lonza Verviers (http://www.lonza.com/group/en/company/sites/europe/lonza_verviers_sprl.html) and cell culture reagents from Sigma-Aldrich Chimie (Saint-Quentin Fallavier, France, <http://www.sigmaaldrich.com/france/contactez-nous.html>).

Fluorochrome-conjugated antibodies for flow cytometric analysis were purchased from BD Biosciences (BD Biosciences, San Diego, <http://wwwbdbiosciences.com>) (CD56-APC 345812; CD140a-PE 556002).

Monoclonal antibodies for immunofluorescence analysis were purchased as indicated: anti-myogenin (SC-12732) from Santa-Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, <http://www.scbt.com>), anti- α SMA (A 5228) from Sigma-Aldrich Chimie (Saint-Quentin Fallavier, France, <http://www.sigmaaldrich.com/france/contactez-nous.html>), Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG from Molecular Probes (Eugene, OR, <http://probes.invitrogen.com>).

Antibodies for immunoblot analysis were purchased as indicated: anti-phospho-Akt (Thr308, 9275), anti-Akt (9272), anti-phospho-p44/42 (Thr202/Tyr 204, 9106), anti-p44/42 (9102), anti-phospho-p38 (Thr180/Tyr182, 9211), anti-p38 (9212), anti-phospho-Smad2 (Ser465/467, 3101), anti-Smad2/3 (3102) from Cell Signaling Technology (<https://www.cellsignal.com>).

Human recombinant TGF β 1 (100-21) was purchased from Peprotech (<https://www.peprotech.com/fr-FR>) and used at 5 ng/ml. Specific inhibitors wortmannin (W1628) and SB431542 (S4317) were purchased from Sigma-Aldrich Chimie (Saint-Quentin Fallavier, France, <http://www.sigmaaldrich.com/france/contactez-nous.html>) and used at 200 nM and 5 μ M, respectively. Cyclopamine was purchased from Calbiochem and used at 5 μ M.

Skeletal muscle progenitors and adipose stromal cells isolations

Tissue samples were obtained as *res nullius* from surgeries or diagnostic biopsies. All protocols for healthy skeletal muscle from donors aged 1 to 10 years were approved by the Centre Hospitalier Universitaire de Nice Review Board, according to the rules of the French Regulatory Health Authorities. Samples were placed in F10 medium and transferred to the laboratory. Frozen healthy and DMD samples from donors aged 12 to 20 years were provided by the Myobank of the Institut de Myologie, AFM-Téléthon.

Skeletal muscle cells were isolated by a standard method (Vilquin et al. 2005). Briefly, healthy or DMD skeletal muscles were minced into 1 mm³ fragments and digested at 37°C, first using Liberase (Roche Diagnostics, Meylan, France, <http://roche.fr/portal/eipf/france/roche.fr/recherche/home>) for 1 hour and then using 0.25% trypsin-EDTA (Lonza Verviers, Verviers, Belgium) for 20 minutes. The enzymatic reaction was stopped by adding 10% fetal bovine serum (FBS). The suspension was homogenized, and finally cells were pelleted by centrifugation and plated in growth culture medium.

The isolation of adipose stromal cells (ASCs) was described in materials and methods of (Arrighi et al. 2015).

FAPs and MPs cells separation by flow cytometry

They were performed as previously described (Arrighi et al. 2015). Adherent cells derived from the digestion and amplification of healthy and DMD skeletal muscle biopsies were sorting by flow cytometry with the BD FACSAria II sorter equipped with 4 lasers (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA, <http://www.bd.com>) and the FACSDiva software. Briefly, about 2 000 000 cells were labelled with anti-CD56-APC and CD140a-PE (PDGFR α) antibodies or the relevant isotype control in PBS 1X, EDTA 2mM and 10% FBS for 30 minutes at 4°C. The labelled-cell suspension was filtered through 40- μ m cell strainers (BD Biosciences), pelleted by centrifugation and resuspended in PBS/EDTA/FBS for isolation by the flow cytometer. For CD140a-PE, fluorescence was excited with the 561 nm laser and measured with a 586/15 bandpass filter. For CD56-APC, fluorescence was excited with the 633 nm laser and measured with a 670/14 bandpass filter. Unlike MPs, FAPs are negative for myogenic marker CD56 and positive for PDGFR α (**Sup. Fig. 1**).

Cell culture

The growth culture medium (GM) was Ham's F10 medium supplemented with 20% FBS, 10 mM Hepes, 10⁻⁶ M dexamethasone, 2.5 ng/ml basic fibroblast growth factor, 100 U/ml penicillin, and 100 mg/ml streptomycin. Myogenic and adipogenic differentiations were induced by switching to differentiation medium (DM): Ham's F10/F12/low-glucose DMEM with 2mM glutamine (2v/1v/1v) supplemented with 1% horse serum (Gibco), 500 nM dexamethasone, 50 μ M 1-methyl-3-isobutylmethyl-xanthine (MIX), 7.5 μ g/ml insulin, 7.5 μ g/ml transferrin, 0.1 nM triiodothyronine, and 50 nM rosiglitazone (PPAR γ agonist). Three days later, cells were placed in the same medium lacking MIX and dexamethasone. This differentiation medium (DM) was replaced every 3 days and cells were collected after 10 days

of differentiation to analyze fibrogenesis and adipogenesis, or 7 days for myogenesis. Fibrogenic differentiation was obtained with the above DM complemented with 5ng/ml TGF β 1.

For co-cultures experiments, 100 000 healthy or DMD FAPs and 100 000 healthy or DMD MPs were seeded in a well of a 12-well plate. One day later GM was replaced by DM.

Production of conditioned-media

To generate conditioned-medium from proliferating-MPs or -FAPs (MPs or FAPs CM) used in proliferation experiments, CD56⁺ or PDGFR α ⁺ cells were cultured in GM and at 60-80 % of confluence treated with fresh GM for 1 day. To generate conditioned-medium from undifferentiated MPs or FAPs (MPs or FAPs CM) used in differentiation experiments, CD56⁺ or PDGFR α ⁺ cells were cultured in GM and at 80 % of confluence treated with cytokines-free DM containing 1 % horse serum for 1 day. To generate conditioned-medium from differentiated myotubes or adipocytes CMs (Myotubes CM or Adipocytes CM) used for differentiation experiments, confluent CD56⁺ or PDGFR α ⁺ cells were differentiated with the DM and at day 6 or 10 treated with cytokines-free DM medium for 1 day. At the same time, control CM (CTRL CM) was obtained by incubating growth or differentiation medium without cells in the incubator and collected 24 hours later. After collecting, all these conditioned-media were spined at 2000 rpm, then stocked at -20°C. They are used without dilution. The cocktail of myo-adipogenic cytokines was added before freezing in all conditioned-media employed in differentiation experiments.

MTT assays

Cells were seeded at 1500 cells/well in a 96-well plate in the presence of adequate conditioned-medium. 10 μ l of 5 mg/ml thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich) was added in wells and the plate was incubated at 37°C for 4 hours in culture hood. Then, the medium was removed and MTT crystals were dissolved in 150 μ l of DMSO/isopropanol (v/v). The plate was incubated at room temperature for 10 minutes with gently agitation, and absorbance was read at 570 nm, and 620 nm which is the reference filter. Each condition was done in triplicate.

Oil red O staining

Differentiated adipocytes were PBS-washed, fixed in 4% paraformaldehyde for 10 minutes, treated for 15 minutes with Oil red O (60% of a stock solution at 0.5% in isopropanol and 40% distilled water), and counterstained with crystal violet. Images were recorded with a TE-2000U bright-field optical microscope (Nikon, Tokyo, Japan).

Immunofluorescence analysis

Cells plated on slides were fixed with histofix 4% (Carl Roth) for 10 minutes, permeabilized with 0.1 % Triton X-100 for 10 minutes, and then sequentially incubated with primary antibody (Sigma-Aldrich) over night at 4°C then with secondary antibody for 45 minutes at room temperature. All steps were done at room temperature and a PBS wash was performed three times between all steps. Cells were finally mounted in Mowiol containing DAPI and visualized with an Axiovert microscope (Carl Zeiss, Le Pecq, France) under oil immersion and pictures were captured and treated with AxioVision software (Carl Zeiss).

RNA extraction and Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction

Total RNA was extracted using TRI-reagent (Euromedex, Souffelweyersheim, France, <http://www.euromedex.com/>). The protocols of RNA extraction and RT-qPCR were previously mentioned (Arrighi et al. 2015). The house-keeping gene TATA box-binding protein (*TBP*) was used as reference. The 5'-3' sequences of forward and reverse primers were, respectively, ACGCCAGCTTCGGAGAGTTC and CAAACCGCTTGGGATTATATTCG for *TBP*, ATGGGATGGAAAATCAACCA and TGCTTGCTAAATCAGGGAAAA for *FABP4*, AGGGTCACCCAAGCAACAAAG and TACGTGGCCCATGCTGATCT for *adipsin*, ACCATCTCCACCCGCCTC and GATGGGAACGCTGATGCTGT for *PLIN1*, ACCTGCGTGTACCCCACTCA and CCGCCATACTCGAACTGGAA for collagen 1A1 (*COL1A1*), CTGGCCGAAAATACATTGTAAA and CCACAGTCGGGTCAGGAG for fibronectin 1 (*FNI*), TGCCTGCATGGGCAAGTGA and CTGGGCAGCGGAAACG for α SMA, CTGCGTGGCTGGTGATGAG and CAGGTCGTCTCCACCCTTGA for muscle creatine kinase (*MCK*), CAGCTCCCTCAACCAGGAG and GCTGTGAGAGCTGCATTCG for myogenin (*MYOG*), CGGGAGTGTTGAGTGAAGGG and CTCCGGTGGTGAGTGTACTG for δ -sarcoglycan (*SGCD*), TGCAAAGCCTTCAGCAATG and TTTTCGCAGCGAGCTAGGAT for *GLII*.

Immunoblot analysis

Cells were lysed in RIPA buffer consisting of 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 5 mM NaF, 2.5 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 1% NP40, 2 mM sodium vanadate and protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics). The protein content was determined according to the BCA method (Pierce BCA Protein Assay Kit, ThermoFisher Scientific, #23227). Cell lysates were centrifuged at 13000g for 10 minutes at 4°C and the supernatants were recovered.

10 µg of proteins were resolved by 7.5% SDS-PAGE under reducing conditions and transferred to Immobilon-P membranes (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). The membranes were probed with the bound primary antibody that was detected by horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Promega) and visualized with an electrochemical luminescence detection kit (Bio-Rad). The band intensity was measured using the Quantity One software (Bio-Rad).

Statistical analysis

Differences between data groups were evaluated for significance using the two-tailed unpaired Student's t-test. A P-value < 0.05 was considered significant. The data are presented as mean ± S.E. of the mean of independent measurements. The number of measurements is indicated in figure legends.

RESULTS

All progenitor populations were validated before use according to their differentiation potentials under the appropriate culture conditions (**Sup. Fig. 2A and 2B**). FAPs differentiated into adipocytes and α SMA⁺ myofibroblasts with stress fibers. MPs exclusively generated myotubes. As expected, the expressions of fibrogenic markers were higher in FAPs than in MPs (**Sup. Fig. 2B**). Interestingly, unlike MPs (data not shown), the differentiation fate of FAPs is influenced by donor's age (**Sup. Fig. 2C**). Young FAPs (< 30 years) expressed less *FABP4* and *COL1A1* than FAPs from aged donors (> 60 years).

Regulation of MPs proliferation and differentiation by FAPs

We examined the roles of fibro-adipogenic lineage on proliferation and differentiation of MPs isolated from young donors (< 30 years). Firstly, MPs proliferation decreased after 3 days in the presence of proliferating FAPs conditioned-medium (**Fig. 1A**). Interestingly, this inhibition of proliferation was associated with an increase of MYOG-positive MPs number suggesting that FAPs could induce MPs differentiation into myotubes (**Fig. 1B**). Secondly, MPs were co-cultured with FAPs to evaluate the effects of FAPs and FAPs-derived adipocytes on MPs differentiation. Larger multinucleated myotubes were observed in FAPs/MPs co-cultures than in MPs mono-cultures as indicated by the intensity of crystal violet staining in co-cultures (**Fig. 1C**). Consistent with this observation, myogenic genes were more expressed in co-cultures (**Fig. 1D**). Finally, to investigate the importance of cell contacts between FAPs and MPs, conditioned-media from proliferating FAPs or FAPs-derived adipocytes were generated and added on MPs mono-cultures (**Fig. 1E**). As in co-cultures, myogenic genes were approximately two-times more expressed in MPs cultured with both FAPs and adipocytes conditioned-media than in MPs cultured with control conditioned-medium. Thus, undifferentiated FAPs increased MPs differentiation into myotubes, and this effect was unchanged by the presence of adipocytes. All together, these results show that soluble molecules secreted by FAPs can inhibit MPs proliferation and stimulate MPs myogenesis.

MPs stimulate FAPs proliferation via a PI3K/Akt pathway-dependent mechanism

Unlike MPs regulation by FAPs, FAPs control by the myogenic lineage is poorly understood. Interestingly, the proliferation of FAPs isolated from young donors (< 30 years) was found to be accelerated in the presence of proliferating-MPs conditioned-medium ; this effect started as soon as day 1 and was maintained for 2 more days (**Fig. 2A**). To examine the mediating molecular mechanisms, we compared the activations of ERK1/2 and PI3K/Akt signaling pathways, which are the chief mechanisms for controlling cell proliferation (Mendoza, Er, and Blenis 2011). We observed that conditioned-medium of MPs significantly increased two times Akt phosphorylation after 15 minutes of culture (**Fig. 2B**). However, no significant variation of ERK1/2 was observed in the same condition (**Sup. Fig. 3A**). To test the involvement of PI3K/Akt pathway in the regulation of FAPs proliferation by MPs, a specific chemical inhibitor was added on FAPs cultured with control and MPs conditioned-media. FAPs proliferation and Akt phosphorylation was then analyzed 2 days later by MTT assay or 15 minutes later by Western blot respectively (**Fig. 2C**). Wortmannin (PI3K inhibitor) decreased FAPs proliferation without induction of cell mortality (data not shown), and reduced Akt phosphorylation in FAPs cultured with control conditioned-medium. These results indicate that PI3K/Akt pathway activation is essential to FAPs growth. The stimulatory effect of MPs conditioned-medium on FAPs proliferation was abolished with the inhibitor and was associated with an important decrease of Akt phosphorylation suggesting that the PI3K/Akt pathway activation is central for the stimulation of FAPs proliferation by MPs. To note, the inhibitor also induced a diminution of ERK1/2 phosphorylations. Therefore, we checked whether the inhibitory effect observed on FAPs proliferation with the PI3K inhibitor was not caused by inhibition of ERK1/2 phosphorylations (**Sup. Fig. 3B**). U0126 (MEK1/2 inhibitor) did not decrease the stimulation of FAPs proliferation induced by conditioned-medium of MPs. To the contrary, U0126 slightly inhibited the basal FAPs proliferation. Taken together, these results show that MPs can stimulate FAPs proliferation via an over-activation of PI3K/Akt pathway and regardless the ERK1/2 signaling.

Functions of satellite cells can be disrupted with ageing, and this could be due to cell-intrinsic mechanism or extrinsic changes in the environment (Carlson and Faulkner 1989, Grounds 1998, Lee et al. 2013). Thus, we hypothesized that cell interactions between MPs and FAPs derived from aged human donors (> 60 years) could be different from those observed for young progenitors. Conditioned-medium from aged proliferating-MPs was added on aged FAPs and cell proliferation was evaluated by MTT assay for 3 days (**Fig. 2D**).

Unlike young progenitors, no increase of aged FAPs proliferation was observed with conditioned-medium of aged MPs. Moreover, Akt phosphorylation was not significantly increased in FAPs cultured in the presence MPs conditioned-media (**Fig. 2E**). These results strengthened the conclusion that stimulation of FAPs proliferation by MPs requires the intrinsic over-activation of PI3K/Akt pathway for young progenitors and demonstrated that this regulation depends on donor's age.

MPs-derived myotubes inhibit adipogenesis and stimulate fibrogenesis of FAPs

We also investigated the roles of myogenic lineage in the control of FAPs differentiation into adipocytes and myofibroblasts for progenitors isolated from young donors (< 30 years).

With progenitors derived from young donors, FAPs adipogenesis was strongly decreased in FAPs/MPs co-cultures. The number of mature adipocytes and mRNA expressions of specific adipogenic markers strongly decreased in co-cultures compared to FAPs mono-cultures (**Fig. 3A**). To define the respective roles of myoblasts and/or myotubes in the regulation of FAPs adipogenesis in co-cultures, conditioned-media from undifferentiated MPs or MPs-derived myotubes were generated and added on FAPs mono-cultures. Adipogenesis was significantly decreased in FAPs cultured with conditioned-medium of myotubes whereas no effect was observed on FAPs with conditioned-medium of MPs (**Fig. 3B**). These results show that soluble factors secreted only by differentiated myotubes inhibit FAPs adipogenesis.

Similarly, the fibrogenic potential of FAPs was measured in young co-cultures and compared with FAPs or MPs mono-cultures. No TGF β 1 treatment was applied. Interestingly, a lot of α SMA⁺ myofibroblasts appeared in co-cultures and expressions of specific fibrogenic mRNAs, *COL1A1* and *FNI*, were significantly higher in co-cultures than in FAPs or MPs mono-cultures (**Fig. 3C**). It is important to note that MPs expressed less fibrogenic mRNAs than FAPs, except for α SMA, suggesting that myofibroblasts observed in co-cultures might be essentially generated by the differentiation of FAPs. This hypothesis was confirmed by the fact that FAPs can differentiate into myofibroblasts in the presence of myotubes conditioned-medium, unlike MPs cultured with FAPs or adipocytes conditioned-media. (**Fig. 3D and Sup. Fig. 4**). To note, no significant modification of FAPs fibrogenesis was found with undifferentiated MPs conditioned-medium. Altogether, these data show that MPs-derived myotubes secrete molecules stimulating FAPs fibrogenesis.

The regulation of FAPs differentiation by MPs was also analyzed with progenitors derived from aged donors (> 60 years). FAPs isolated from aged patients (> 60 years) were co-cultured with paired-age MPs or young MPs (< 30 years).

Adipogenesis was similar in aged co-cultures compared to aged FAPs mono-cultures suggesting that either aged MPs lost their inhibitory role or aged FAPs were insensitive to aged MPs stimuli (**Fig. 4A**). To determine the origin of the modifications of cell interactions in aged co-cultures, aged MPs were substituted by young MPs. In this culture condition, the inhibition of aged FAPs adipogenesis was restored (**Fig. 4B**).

Fibrogenic marker expressions were higher in aged co-cultures than in aged FAPs mono-cultures, but high expressions of fibrogenic mRNAs were also present in aged MPs mono-cultures, indicating that expression of aged MPs fibrogenic markers can be the main origin of expression of fibrogenic markers in aged co-cultures (**Fig. 4C**). Co-cultures of aged FAPs with young MPs induced a much stronger increase of aged FAPs fibrogenesis and expressions of fibrogenic mRNAs in young MPs were low and similar to aged FAPs, unlike aged MPs (**Fig. 4D**).

These results showed that aged myotubes do not secrete the same soluble factors than young myotubes, which causes the loss of aged FAPs regulation, while aged FAPs retain the same responsiveness to myotubes stimuli than young FAPs.

Finally, we evaluated if young MPs could also regulate the differentiations of non-muscular fibro-adipogenic progenitors such as adipose stroma cells (ASCs) prepared from subcutaneous adipose tissue depots. In ASCs/MPs co-cultures, adipogenesis and fibrogenesis were decreased and increased, respectively (**Sup. Fig. 5A and 5B**). Therefore regulatory functions of MPs on fibro-adipogenesis do not depend on the tissue localization of fibro-adipogenic progenitors.

MPs-derived myotubes regulate FAPs differentiations *via* the stimulation of Smad2 pathway in FAPs

We recently showed that adipogenesis is negatively regulated in FAPs at the expense of fibrogenesis by factors from TGF β family (Arrighi et al. 2015). We wondered whether this pathway was implicated in the regulation of FAPs differentiations by myotubes derived from young donors (< 30 years). We found that Smad2, downstream effector of TGF β signaling, was highly phosphorylated in FAPs cultured with myotubes conditioned-medium and not with

MPs conditioned-medium (**Fig. 5A**). Therefore, we wondered whether inhibition of Smad2 phosphorylation with SB431542 could alleviate the impaired adipogenesis and reduce the increased fibrogenesis in co-cultures and myotubes conditioned-medium treatments. First, the treatment of FAPs by SB431542 induced a stimulation of adipogenesis and an inhibition of fibrogenesis (**Sup. Fig. 6A**). Second, inhibition of adipogenesis and stimulation of fibrogenesis were cancelled for FAPs treated with SB431542 co-cultured with MPs or cultured with conditioned-medium of myotubes (**Fig. 5B and 5C**). The latter results indicate that the inhibition of Smad2 phosphorylation directly targets FAPs cells instead of altering the composition of myotubes conditioned-medium. Moreover, SB431542 treatment of FAPs cultured with control or myotubes conditioned-media did not corrupt other signaling pathways such as Akt, ERK1/2 and p38 suggesting that this inhibitor has a great specificity for Smad2 (**Sup. Fig. 6B**). This strengthens the essential role of TGF β pathway in the regulation of FAPs differentiation by MPs-derived myotubes

Then, we looked for factors released by myotubes that could regulate FAPs differentiations. Activin A and TGF β 1 were potential candidates because they are main activators of Smad2 pathway (Gressner 2011). Furthermore, we previously demonstrated that Activin A and TGF β 1 inhibit adipogenesis and stimulate fibrogenesis of FAPs (Arrighi et al. 2015). To investigate an involvement of TGF β and Activin A in FAPs/MPs interactions, specific neutralizing antibodies against TGF β or Activin A were used. Addition of anti-Activin A or anti-TGF β antibodies in FAPs mono-cultures did not disrupt FAPs adipogenesis or fibrogenesis indicating that FAPs could not secrete Activin A or TGF β that could influence their differentiations (**Sup. Fig. 6C**). Likewise, anti-Activin A or anti-TGF β did not influence fibro-adipogenesis of FAPs cultured with conditioned-medium of myotubes (**Fig. 6D**). This is associated with the strong Smad2 phosphorylation than in FAPs cultured with myotubes conditioned-medium without antibody (**Sup. Fig. 6D**). These results show that MPs-derived myotubes do not release Activin A or TGF β , and that myotubes regulate FAPs fibro-adipogenesis via other factors.

GLI1 expression is implicated in the regulation of FAPs differentiations by myotubes

In order to discover the targets of Smad2 that could be implicated in young FAPs/MPs interactions (< 30 years), we observed a significant expression decrease of *GLI1* mRNA induced by SB431542 treatment of FAPs/MPs co-cultures and FAPs cultured with myotubes

conditioned-medium (**Fig. 6A and 6B**). Interestingly, *GLII* was more expressed in FAPs cultured in the presence of myotubes conditioned-medium, which is the condition where an increase of fibrogenesis and a reduction of adipogenesis were noticed (**Fig. 6C**).

To investigate the potential role of *GLI1* in the regulation of FAPs differentiations by myotubes, we used during differentiation an inhibitor of Hedgehog pathway, cyclopamine that induces a drastic inhibition of *GLII* expression. Firstly, cyclopamin had no effect on adipogenesis and fibrogenesis of FAPs indicating that *GLII* expression is not essential for intrinsic differentiations of FAPs (**Sup. Fig. 7A**). Secondly, cyclopamine counteracted stimulation of FAPs fibrogenesis induced by co-cultures with MPs (see *COL1A1* and *FNI* in **Fig. 6D**) or by myotubes conditioned-medium (**Fig. 6E**). This effect is partial in cyclopamin-treated co-cultures with twice less expression of *COL1A1* (**Fig. 6D**) compared to 4-times more expression in co-cultures without the inhibitor (**Fig. 3C**). Thirdly, cyclopamine counteracted inhibition of FAPs adipogenesis in co-cultures (see *FABP4* and *PLINI* in **Fig. 6D**) but not in FAPs cultured with myotubes conditioned-medium (**Sup. Fig. 7B**). The restoration of adipogenesis in cyclopamine-treated co-cultures is complete with 4-times more expression of *PLINI* (**Fig. 6D**) compared to 4-times less expression in co-cultures without the inhibitor (**Fig. 3A**). While cyclopamine restored adipogenesis in co-cultures, the absence of adipogenesis rescue with conditioned-medium of myotubes could be due to the fact that the inhibitor may also modify the secretion of factors by myotubes in co-cultures. To address this hypothesis, we treated MPs by cyclopamine during their myogenic differentiation. Culture medium was collected 7 days later and called cyclopamine-treated myotubes conditioned-medium. When FAPs were cultured with this conditioned-medium an increase of *FABP4* expression was observed (**Fig. 6F**). The rescue of adipogenesis was partial since only one of tested adipogenic markers was significant. As expected, no difference on fibrogenesis was remarked when FAPs were cultured with conditioned-medium of cyclopamine-treated myotubes (**Sup. Fig. 7C**).

These results suggest that *GLI1* has crucial roles in FAPs/MPs interactions. (i) The increase of *GLII* expression in FAPs by factors secreted by myotubes lead to stimulation of FAPs fibrogenesis, and (ii) *GLII* expression in myotubes controls secretion of factors that inhibit FAPs adipogenesis.

Cell interactions between FAPs and MPs derived from DMD patients

Intramuscular fatty infiltration and fibrosis are prominent pathological features of muscle biopsies from patients with DMD (Marden et al. 2005, Zhou and Lu 2010). The above results indicate that disruption in FAPs/MPs interactions could be involved in the accumulation of adipocytes and myofibroblasts in muscles of DMD patients.

First, we observed that regulations of DMD MPs proliferation and myogenesis by DMD FAPs were similar to regulations found with healthy progenitors. Indeed, conditioned-medium of DMD proliferating-FAPs significantly inhibited DMD MPs proliferation, and DMD MPs myogenesis was stimulated in co-cultures (**Sup. Fig. 8A and 8B**).

Second, unlike healthy progenitors, conditioned-medium of DMD proliferating-MPs did not have a stimulatory effect on DMD FAPs proliferation but this effect was rescued when DMD FAPs were cultured with conditioned-medium of healthy proliferating-MPs (**Fig. 7A and B**). Moreover, no stimulation of healthy FAPs proliferation was observed in the presence of DMD proliferating-MPs conditioned-medium (**Fig. 7C**). These results suggest that DMD MPs secrete different factors than those secreted by healthy MPs, leading to a lack of proliferation regulation of healthy and DMD FAPs. Surprisingly, the significant increase of Akt phosphorylation was maintained in DMD FAPs cultured with conditioned-medium of DMD MPs, as observed above with healthy progenitors (**Sup. Fig. 9**). We can hypothesize that activation of other signaling pathways could interfere with the stimulation of Akt phosphorylation in DMD FAPs.

Third, DMD progenitors had the same impacts on DMD FAPs adipogenesis than found above with healthy progenitors, i.e. adipogenesis was inhibited. This was observed in FAPs/MPs co-cultures (**Fig. 7D**) and with FAPs differentiated in the presence of myotubes conditioned-medium (see *PLIN1* in **Fig. 7F**) However, fibrogenesis stimulation was clearly lower for DMD progenitors than for healthy progenitors. The stimulation of fibrogenic markers in co-cultures was not significant compared to DMD FAPs mono-cultures (see *COL1A1* in **Fig. 7E**) or similar to DMD MPs mono-cultures, if significantly higher than DMD FAPs mono-cultures (see *FNI* and *α SMA* in **Fig. 7E**). Consistently, no significant increase of *COL1A1* was obtained in conditioned-media experiments (**Fig. 7F**). This non-significant increase of fibrogenesis could be explained by a non-significant stimulation of *GLII* mRNA expression (see *GLII* in **Fig. 7F**). However, DMD myotubes conditioned-medium caused a stimulation of Smad2 phosphorylation in DMD FAPs similar to the stimulation observed with healthy progenitors (**Fig. 7G**). Finally, we assessed the impacts of healthy myotubes on DMD

FAPs fibro-adipogenesis in co-cultures (**Sup. Fig. 10A and B**) and conditioned-media experiments (**Sup. Fig. 10C and D**). As with DMD myotubes conditioned-medium and DMD co-cultures, adipogenesis was inhibited (**Sup. Fig. 10A and C**). Unlike results obtained with DMD MPs, DMD FAPs fibrogenesis was clearly stimulated in co-cultures (**Sup. Fig. 10B**) and with conditioned-medium of healthy myotubes (**Sup. Fig. 10D**). Nevertheless, no modulation of *GLII* expression in DMD FAPs was observed (see *GLII* in **Sup. Fig. 10D**) suggesting that the restoration of the stimulation of DMD FAPs fibrogenesis by healthy myotubes is independent of *GLII* expression. Thus, dystrophic myotubes secrete different factors than healthy myotubes resulting in several specificities in FAPs/MPs interactions with DMD progenitors.

DISCUSSION

Responding to injury, skeletal muscle undergoes a highly orchestrated degenerative and regenerative process for which satellite cells are the central actors. These MPs reside in a sublamina niche and are quiescent in uninjured muscles. Damages to the environment surrounding satellite cells results in the deterioration of the basal lamina and their exit of satellite cells from the quiescent state. Following an expansion stage, adult MPs-derived myoblasts begin differentiation and fusion to form new myofibers for repair. In addition to cells from the immediate niche surrounding satellite cells, local interstitial cells such as FAPs reside within skeletal muscle and have the potential to regulate satellite cell function and thus to contribute affect to muscle regeneration (Yin, Price, and Rudnicki 2013, Ceafalan, Popescu, and Hinescu 2014). In this study we examined the cross-talks between MPs and FAPs in humans. A particular interest was given to the regulation of FAPs by MPs, since FAPs have recently emerged as main actors of regeneration in healthy and dystrophic mouse muscles, which stressed the importance of studying the FAPs/MPs interactions in humans. Data in mice indicate that FAPs stimulate MPs myogenesis and MPs prevent FAPs adipogenesis (Joe et al. 2010, Uezumi et al. 2010). Here, we extended these findings to human progenitors, described human specificities and uncovered the role of FAPs/MPs interactions for the regulation of progenitors proliferation and fibrogenesis. We also found that the incidence of interactions is age dependent and largely modified with DMD progenitors. Moreover, we identified signaling pathways essential to mediate the effects of interactions.

Our data show that in humans FAPs have a pro-myogenic function on MPs through a paracrine mechanism. Similar results were obtained with culture of FAPs-derived adipocytes. It should be noted that adipogenic differentiation of FAPs never concerned the whole FAPs population, i.e. progenitors and adipocytes. Therefore, the conditioned medium coming from adipocyte cultures contained factors secreted by adipocytes and undifferentiated FAPs, which prevents to precisely delineate the role of adipocyte secretome. In the other direction, MPs-derived myotubes secrete factors which inhibit adipogenesis of FAPs. Interestingly, undifferentiated MPs had no effect on FAPs-adipogenic differentiation suggesting that proliferating MPs do not contribute to the incidence of FAPs/MPs cross-talks on cell differentiation. This role is restricted to MPs-derived myotubes. Unlike the data reported in mice, the anti-adipogenic effect of human myotubes on FAPs was not found mediated by cell-to-cell contact but clearly through a paracrine mechanism. Another important finding is the profibrogenic role of human MPs-derived myotubes on FAPs, which has not been

documented in mice. This other function of myotubes is of special interest and emphasizes the importance of the coordination between FAPs and MPs for muscle regeneration. Thus, myotubes negatively regulate the adipogenic differentiation of FAPs and positively regulate their fibrogenic differentiation, which shows that myotubes-secreted factors control a differentiation balance between fibrogenesis and adipogenesis within FAPs.

In order to identify the molecular mechanism of the regulation of FAPs differentiation, we showed the crucial role of a stimulation of TGF β signaling pathway in FAPs by myotubes-derived factors. Among canonical members of the TGF- β superfamily, TGF- β 1 and activin A are known to exert anti-adipogenic (Margoni, Fotis, and Papavassiliou 2012, Zaragosi et al. 2010, Dani 2013) and pro-fibrogenic effects (Meng et al. 2015, Ohga et al. 1996), through Smad2 pathway activation (Weiss and Attisano 2013). In accordance, we previously found in FAPs that TGF β 1 and activin A inhibit adipogenesis (Arrighi et al. 2015) and we showed here that TGF β 1 stimulates the differentiation into myofibroblasts. Therefore, we tested the involvement of these two factors in the regulation of FAPs differentiations by myotubes. We disproved this hypothesis since the immuno-blocking of TGF β and/or activin A did not counteract the effects of myotubes conditioned-medium on FAPs fibro-adipogenesis. Furthermore, no secretion of TGF β 1 by myogenic lineage was detected by Elisa assay (data not shown). Interestingly, recent studies demonstrated a regulation of intramuscular fibrosis (Li, Kollias, and Wagner 2008) and adipogenesis (Sun et al. 2016) by myostatin, another member of the TGF β superfamily. Myostatin is expressed almost exclusively in skeletal muscle and was first recognized as an endogenous inhibitor of muscle growth (McPherron, Lawler, and Lee 1997). While myostatin inhibits myocyte proliferation and differentiation, it stimulates fibroblasts to proliferate and to express ECM proteins such as collagen (Li, Kollias, and Wagner 2008). On the other hand, myostatin could act as extrinsic regulatory factor in regulating intramuscular adipogenesis (Sun et al. 2016). Indeed, myostatin inhibited porcine intramuscular preadipocyte differentiation in a dose-dependent manner. Very interestingly, myostatin can stimulate proliferation and conversion of mouse FAPs into myofibroblasts *in vitro* and *in vivo*. These results suggest that myostatin could be the TGF β -family factor released by myotubes which induces stimulation of FAPs fibrogenesis and inhibition of FAPs adipogenesis.

To go further in the signaling mechanism downstream of phosphorylated Smad2 induced by myotubes in FAPs, we examined the expression of *GLI1*. *GLI1* is a transcription factor mediator of Hedgehog signaling (Robbins, Fei, and Riobo 2012, Hui and Angers 2011) but was also reported to be an effector of functional Smad pathway (Dennler et al. 2007, Nye

et al. 2014). The chemical inhibition of Smad2 in FAPs decreased *GLI1* expression, indicating that GLI1 was also a target of activated Smad2 in FAPs and designating GLI1 as a potential candidate to positively mediate the effect of myotubes on FAPs differentiations. This was confirmed by (i) the upregulation of *GLI1* in FAPs submitted to myotube conditioned medium and (ii) especially the reduction of effects of myotubes on FAPs differentiation by cyclopamine. As expected, Smad2 phosphorylation in FAPs induced by myotubes was not disrupted by cyclopamine (data not shown). Together, these results show that GLI1 is a central factor for regulation of FAPs differentiations by myotubes-secreted factors and that GLI1 is activated by both Hedgehog and TGF β signaling pathways in this context. The importance of GLI1 in the regulation of FAPs by myotubes is reinforced by the finding that it also regulates the secretion of anti-adipogenic factors from myotubes. This prominence of GLI1 is in agreement with previous results showing that Hedgehog signaling pathway is upregulated upon mechanical and toxic injury (Piccioni et al. 2014, Straface et al. 2009) and its inhibition results in impaired regeneration after injury (Straface et al. 2009).

An additional incidence of FAPs/MPs cross-talks is the regulation of progenitor proliferation. FAPs were found to decrease MPs proliferation, whereas MPs were found to increase FAPs proliferation. Thus, proliferating MPs are actors of the regulation of FAPs proliferation. We found that phosphorylation of Akt mediates the MPs stimulation of FAPs proliferation. This is in accordance with previous data showing that PDGF-AA stimulates proliferation of FAPs through activation of PDGFR α on FAPs, inducing PI3K-Akt and MEK2-MAPK signaling pathways (Uezumi et al. 2014). Further investigations are needed to identify factors activating PI3K-Akt pathway in FAPs submitted to MPs secretome.

The above data provide cellular bases to better decipher the contribution of co-regulations between FAPs and MPs in human muscle regenerative process. The following model can be proposed for young and healthy progenitors (**Fig. 8**). During the cell proliferative phase of regeneration, FAPs and MPs become activated and MPs secrete pro-proliferating factors that target FAPs resulting in over-activation PI3K/Akt signaling. Rapidly MPs and FAPs accumulate. In a negative feedback loop, the growing number of FAPs increases the concentration of FAPs secretome which inhibits MPs proliferation and promotes the commitment of MPs into myogenesis. Thus, FAPs drive the proliferation/differentiation balance towards myogenic differentiation in MPs. The differentiation of MPs into myotubes limits the amount of undifferentiated MPs and consequently their stimulatory effect of FAPs proliferation. Along the cell differentiation step of muscle repair, factors secreted by newly-formed myotubes regulate the fibro-adipogenic differentiation balance in FAPs through the

stimulation of Smad2 phosphorylation and *GLI1* expression. These factors prevent FAPs differentiation into adipocytes, which would impair muscle repair. However, interestingly myotubes positively regulate the fibrogenic conversion of FAPs. The interest of the fibrogenic differentiation of FAPs resides in the need of myotubes for abundant ECM. *In vivo*, muscle ECM is essential for myoblast spreading, migration, alignment, contact guidance, terminal differentiation into myofibers and also modulation of growth factor activities and cell signaling (Vaz et al. 2012). To return to a homeostatic state, the muscle regenerative process involves a clearance of FAPs which is driven by factors secreted by macrophages such as TNF α (Lemos et al. 2015).

This model characterizes young healthy progenitors and is modified with aging and muscle dystrophy. The age dependence was found to be a crucial determining factor for progenitors proliferation and differentiation. With age, FAPs became more fibro-adipogenic, MPs did not stimulate Akt phosphorylation nor consequently FAPs proliferation anymore, and myotubes stopped to regulate the fibro-adipogenic potential of FAPs. In this last case it was the aging of MPs, and not FAPs, which was responsible for the lack of regulation. These results are in accordance with the functional decline of satellite cells described in sarcopenic muscles (Sousa-Victor et al. 2015, Sousa-Victor and Muñoz-Cánoves 2016). Thus, the age effect that we observed in FAPs/MPs cross-talks fit the accumulation of fibrous tissue and adipose tissue in aged muscles (Brack et al. 2007, Briocche et al. 2016). Thus with aging, perturbations in the above model result in fibro-adipogenic infiltrations that are favored at the expenses of muscle regeneration.

Finally, interactions between DMD FAPs and DMD MPs/myotubes were found partially modified. MPs proliferation and myogenesis were found to be regulated by FAPs as for healthy progenitors, but, importantly, DMD MPs lost the capacity to stimulate proliferation of DMD (or healthy) FAPs. In addition, DMD myotubes exhibited the same properties than healthy myotubes for regulation of FAPs adipogenic differentiation, but DMD myotubes lost most of their pro-fibrogenic potential on FAPs. Thus, the mutations in dystrophin gene, only expressed in the myogenic lineage, led to modifications of factors secreted by proliferating MPs and myotubes. Indirect effects to the lack of dystrophin should also be considered since the DMD MPs are submitted for years to chronic inflammatory regenerative/degenerative conditions, which have the potential to modify MPs intrinsic properties. The findings that the exposure to DMD myotubes conditioned medium led to a stimulation of FAPs Smad2 phosphorylation (as healthy myotubes) with almost no stimulation of *GLI1* expression (conversely to healthy myotubes) raises further questions. This point is reinforced by the fact

that healthy myotubes conditioned-medium stimulated expression of fibrogenic genes in DMD FAPs without stimulating *GLI1* (as for healthy FAPs). The signaling of fibrogenic differentiation is therefore modified in DMD FAPs. Expression of *GLI1* is not regulated by activation of Smad2 and stimulation of fibrogenic genes largely become *GLI1* independent. Since dystrophin is not expressed in FAPs, it can be speculated that the chronic DMD cellular environment somehow interferes with FAPs functional properties. However, the crucial FAPs pro-myogenic action on MPs is preserved as well as the myotubes anti-adipogenic action on FAPs mediated by Smad2. The DMD modifications in FAPs/MPs cross-talks can be seen as adaptations to the DMD features. FAPs are very abundant in DMD muscles (Uezumi et al. 2014) and the control of FAPs proliferation would be mediated by other stimulating signals than those of MPs. The excessive fibrosis of the DMD muscle could implicate a stimulation of FAPs fibrogenesis induced by the dystrophic microenvironment and not by factors released by myogenic lineage. For example, the increase of TGF β pathway activation in DMD muscles promotes the FAPs fibrogenesis (Pessina et al. 2015). As the FAPs pro-myogenic action on MPs, the myotube anti-adipogenic action on FAPs was not found to be modified with DMD cells. It can be speculated that this contributes to limit the large population of adipocytes present in DMD. The formation of these adipocytes would thus result from stimulatory cues independent of myotubes and inhibitory cues issued from myotubes.

Our findings shed lights on the importance of interactions between FAPs and MPs for human muscle regeneration. The bi-directional cooperativity between these two progenitors arises as an essential parameter for the coordinated regulation of their proliferation and differentiation in healthy and DMD muscle. The identification of Hedgehog and TGF β signaling pathways as important mediators provide molecular bases to evaluate the control of FAPs/MPs crosstalks as clinical tools to improve muscle repair in healthy, aging and dystrophic muscles.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. FAPs inhibit MPs proliferation and stimulate MPs differentiation into myotubes for progenitors isolated from young donors. (A). Proliferation of young MPs, cultured with control conditioned medium (Ctrl CM) or young FAPs conditioned medium (FAPs CM), was measured by MTT assays at days 1, 2 and 3. Results are shown as the values average for three distinct biopsies. (B). Young MPs cells were cultured with Ctrl CM or young FAPs CM for three days and labelled with anti-myogenin antibody and DAPI (scale bar: 20 μm). The percentage of myogenin positive cells (MYOG⁺) was calculated by comparison with the total number of nuclei. (C) and (D). Young MPs were cultured alone (MPs) or with young FAPs (FAPs/MPs) in a 50/50 proportion, and myogenesis was evaluated after 10 days of differentiation. (C). Myotubes were stained with Crystal Violet (scale bar: 100 μm). (D). mRNA expressions of myogenic markers (*MCK*, *MYOG* and *SGCD*) were measured by RT-qPCR. Results are shown as the values average for three distinct biopsies. (E). Young MPs were cultured in the presence of Ctrl, young undifferentiated-FAPs or FAPs-derived Adipocytes CM for 10 days and mRNA expressions of myogenic markers were measured by RT-qPCR. Results are shown as the values average for three distinct biopsies. ** P < 0.01; * P < 0.05; *p* values closed to significance are indicated.

Figure 2. The stimulation of FAPs proliferation via an intrinsic over-activation of Akt signaling induced by conditioned-medium from MPs depends on donor age. (A), (B) and (C). Young FAPs cells proliferated with control or young MPs conditioned-medium (Ctrl CM or MPs CM, respectively). (A). Proliferation of FAPs was measured by MTT assays at days 1, 2 and 3. Results are shown as the values average for five distinct biopsies. (B). 15 minutes after addition of the conditioned medium, Akt phosphorylation and tubulin expression were assessed by immunoblotting. Immunoblot signals were quantified and normalized with total Akt signals. Results are shown as the values average for three distinct biopsies. (C). Young FAPs cells proliferated with Ctrl CM or young MPs CM with or without wortmannin. Proliferation of FAPs was measured by MTT assays at day 2. Akt and ERK1/2 phosphorylations were assessed by immunoblotting 15 minutes after addition of the conditioned medium. Representative blots from three distinct biopsies are shown. (D) and (E). Aged FAPs (aFAPs) cells proliferated with control or aged MPs (aMPs) conditioned-medium (Ctrl CM or aMPs CM, respectively). (D). Proliferation of aFAPs was measured by MTT assays at days 1, 2 and 3. Results are shown as the values average for three distinct

biopsies. **(E)**. 15 minutes after addition of the conditioned medium, Akt phosphorylation and tubulin expression were assessed by immunoblotting. Immunoblot signals were quantified and normalized with total Akt signals. Results are shown as the values average for three distinct biopsies. * $P < 0.05$; ns = non-significant; p values closed to significance are indicated.

Figure 3. Young MPs-derived myotubes inhibit adipogenesis and stimulate fibrogenesis of young FAPs. (A) and (C). Young FAPs were cultured alone (FAPs) or with young MPs (FAPs/MPs) in a proportion 50/50 for 10 days in differentiation medium. **(B) and (D).** Young FAPs were cultured in the presence of Ctrl, young undifferentiated-MPs or MPs-derived Myocytes CM for 10 days. **(A) and (B).** FAPs adipogenesis was evaluated visualizing adipocytes by phase-contrast microscopy (left panels, scale bar 5 μm), and measuring mRNA expressions of adipogenic genes by RT-qPCR (right panels). Results are shown as the values average for three distinct biopsies. **(C) and (D).** FAPs fibrogenesis was examined by measuring expressions of fibrogenic mRNAs by RT-qPCR. Results are shown as the values average for three distinct biopsies. **(C).** Myofibroblasts were visualized by immunofluorescence with anti- αSMA antibody and DAPI (scale bar: 20 μm). *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$; p values closed to significance are indicated.

Figure 4. Regulation of aged FAPs (aFAPs) fibro-adipogenesis by aged MPs (aMPs) is lost but rescued with young MPs. Aged FAPs were cultured alone (aFAPs) or with aged MPs (aFAPs/aMPs) in a 50/50 proportion for 10 days in differentiation medium. **(A) and (B).** aFAPs adipogenesis was evaluated visualizing adipocytes by phase-contrast microscopy (left panels, scale bar: 5 μm), and measuring mRNA expressions of adipogenic genes by RT-qPCR (right panels). Results are shown as the values average for three distinct biopsies. **(C) and (D).** aFAPs fibrogenesis was examined by measuring expression of fibrogenic mRNAs by RT-qPCR. Results are shown as the values average for three distinct biopsies. *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$; p values closed to significance are indicated.

Figure 5. The regulation of young FAPs fate by young myotubes requires the activation of Smad2 pathway in FAPs that is non-dependent of Activin and TGF β . **(A).** Young FAPs were cultured in the presence of Ctrl or young MPs-derived Myocytes CM for 1 hour and total proteins were extracted. Smad2 phosphorylation and tubulin expression were assessed by immunoblotting. Immunoblot signals were quantified and normalized with total Smad2 signals. Results are shown as the values average for three distinct biopsies. **(B) to (D).**

Expressions of adipogenic (*FABP4* and *PLINI*) and fibrogenic (*COL1A1* and *FNI*) transcripts were measured by RT-qPCR after 10 days of differentiation in differentiation medium. **(B)**. Young FAPs were cultured with young MPs (FAPs/MPs) in a 50/50 proportion with or without SB431542. **(C)**. Young FAPs were cultured in the presence of Ctrl or young Myotubes CM with or without SB431542. **(D)**. Young FAPs were cultured in the presence of Ctrl or young Myotubes CM with or without neutralizing antibodies anti-TGF β (α TGF β at 1 μ g/ml) or anti-Activin A (α ActA at 1 μ g/ml). All results are shown as the values average for three distinct biopsies. *** P < 0.001; ** P < 0.01; * P < 0.05; ns = nonsignificant; *p* values closed to significance are indicated.

Figure 6. Roles of *GLII* expression in the regulation of young FAPs differentiation by young myotubes. (A) to (C). *GLII* mRNA expression was measured by RT-qPCR after 10 days of culture. **(A)**. Young FAPs were cultured with young MPs (FAPs/MPs) in a 50/50 proportion with or without SB431542. **(B)**. Young FAPs were cultured in the presence of Ctrl or young Myotubes CM with or without SB431542 **(C)**. Young FAPs were cultured in the presence of Ctrl, young undifferentiated-MPs or Myotubes CM. **(D) to (F)**. Transcripts of adipogenic (*FABP4*, *PLINI*) and fibrogenic (*COL1A1*, *FNI*) markers were measured by RT-qPCR after 10 days of culture. **(D)**. Young FAPs were cultured with young MPs (FAPs/MPs) in a 50/50 proportion and cyclopamine was added in differentiation medium. **(E)**. Young FAPs were cultured with young Myotubes CM without cyclopamine or with Myotubes CM supplemented with cyclopamine after collect of CM and before freezing. **(F)**. Young FAPs were cultured with young Myotubes CM supplemented with cyclopamine after collect and before freezing, or with CM from young myotubes derived from MPs treated by cyclopamine during their differentiation (cyclopamine-treated Myotubes CM). All results are shown as the values average for three distinct biopsies. *** P < 0.001; ** P < 0.01; * P < 0.05; ns = non-significant; *p* values closed to significance are indicated.

Figure 7. Regulations of FAPs by MPs are disrupted for DMD progenitors. (A) to (C). Proliferation of cells was measured by MTT assay at days 1, 2 and 3. DMD FAPs cells proliferated with Ctrl or DMD MPs CM **(A)**, or healthy MPs CM **(B)**. **(C)**. Healthy FAPs proliferated with Ctrl or DMD MPs. Results are shown as the values average for six **(A)** or three **(B and C)** distinct biopsies. **(D) and (E)**. DMD FAPs were cultured with DMD MPs (DMD FAPs/DMD MPs) in a 50/50 proportion for 10 days in differentiation medium. **(D)**. DMD FAPs adipogenesis was evaluated visualizing adipocytes by phase-contrast microscopy (left panels, scale bar: 5 μ m), and measuring

mRNA expressions of adipogenic genes by RT-qPCR (right panels). Results are shown as the values average for four distinct biopsies. **(E)**. DMD FAPs fibrogenesis was examined visualizing myofibroblasts by immunofluorescence with anti- α SMA antibody and DAPI (left panels, scale bar: 20 μ m), and measuring mRNA expression of fibrogenic genes by RT-qPCR (right panels). Results are shown as the values average for four distinct biopsies. **(F) and (G)**. DMD FAPs were cultured in the presence of Ctrl or DMD Myotubes CM for 10 days. **(F)**. mRNA expressions of *GLI1*, adipogenic (*PLIN1*) and fibrogenic (*COL1A1*) genes were measured by RT-qPCR. Results are shown as the values average for four distinct biopsies. **(G)**. After 1 hour of culture with CM, total proteins from DMD FAPs were extracted and Smad2 phosphorylation and tubulin expression were assessed by immunoblotting. *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$; ns = non-significant; p values closed to significance are indicated.

Figure 8. Schematic model of crosstalks between FAPs and MPs derived from young and healthy donors. Undifferentiated FAPs inhibit the MPs proliferation and stimulate MPs differentiation into myotubes. Undifferentiated MPs secrete factors that stimulate the FAPs proliferation. MPs-derived myotubes regulate the fibro-adipogenic fate of FAPs by increasing Smad2 phosphorylation and *GLI1* expression. Soluble factors secreted by MPs-derived myotubes stimulate the differentiation of FAPs into myofibroblasts but inhibit their adipogenesis.

Supplemental figure 1. Isolations of FAPs and MPs from human muscle biopsies by flow cytometry. Adherent cells from human skeletal muscles were isolated and amplified for flow cytometry analyses. **(A)** PDGFR α ⁺ cells are negative for CD56 (FAPs) and CD56⁺ cells are negative for PDGFR α (MPs). **(B)** The first panel represents the respective isotype negative labelings, and the two last panels represent the mono-labelings.

Supplemental figure 2. In vitro differentiation potentials of FAPs and MPs sorted-cells from healthy patients. These two distinct cell populations were cultured in myo-adipogenic medium for 10 days to measure myogenic and adipogenic potentials, or for 5 days with or without TGF β 1 to evaluate fibrogenic potential. In **A** and **B**, cells were isolated from human patients aged less than 30 years. **(A)**. For adipogenesis and myogenesis, cells were stained with Oil Red O and counterstained with Crystal Violet (top panel). For fibrogenesis, cells were labelled with anti- α SMA antibody and DAPI (middle and bottom panels). **(B)**. mRNA expressions of adipogenic (*FABP4*, *Adipsin* and *PLIN1*), myogenic (*MCK*, *MYOG* and *SGCD*) or fibrogenic markers (*COL1A1*, *FNI* and *α SMA*) were measured by RT-qPCR. For fibrogenic

markers, fold inductions by TGF β -1 are presented. Results are shown as the values average for five distinct biopsies for adipogenic and myogenic markers or for three distinct biopsies for fibrogenic markers. **(C)**. mRNA expressions of *FABP4* and *COL1A1* were measured by RT-qPCR in FAPs derived from four healthy patients aged less than 30 years (white bars) and for four healthy patients aged more than 60 years (black bars). Each column represents one independent biopsy. ** P < 0.01; * P < 0.05; *p* values closed to significance are indicated.

Supplemental figure 3. The stimulation of young FAPs proliferation by young MPs is non-dependent of ERK1/2 pathway. **(A)**. Young FAPs cells proliferated with control or young MPs conditioned-medium (Ctrl CM or MPs CM, respectively). 15 minutes after addition of the conditioned medium, ERK1/2 phosphorylations and tubulin expression were assessed by immunoblotting. Immunoblot signals were quantified and normalized with total ERK1/2 signals. Results are shown as the values average for three distinct biopsies. **(B)**. Young FAPs cells proliferated with Ctrl CM or young MPs CM with or without U0126. Proliferation of FAPs was measured by MTT assays at day 2. Results are shown as the values average for three distinct biopsies. *** P < 0.001; ns = non-significant; *p* values closed to significance are indicated.

Supplemental figure 4. Conditioned-media from young FAPs and FAPs-derived adipocytes do not influence fibrogenesis of young MPs. Young MPs were cultured in the presence of Ctrl, young undifferentiated-FAPs or FAPs-derived Adipocytes CM for 10 days, and fibrogenesis was evaluated by measuring mRNA expressions of *COL1A1* and *FNI* by RT-qPCR. Results are shown as the values average for three distinct biopsies.

Supplemental figure 5. Young MPs-derived myotubes inhibit adipogenesis and stimulate fibrogenesis of adipose stroma cells (ASCs). ASCs were cultured alone (ASCs) or with young MPs (ASCs/MPs) in a 50/50 proportion for 10 days in differentiation medium. **(A)**. ASCs adipocytes were stained with Oil Red O and counterstained with Crystal Violet. **(B)**. Adipogenic and fibrogenic differentiations of ASCs were quantified by measuring expressions of adipogenic (*FABP4*, *Adipsin*, *PLIN1*) and fibrogenic (*COL1A1*, *FNI*, *α SMA*) mRNAs by RT-qPCR. Results are shown as the values average for three distinct biopsies. ** P < 0.01; * P < 0.05; *p* values closed to significance are indicated.

Supplemental figure 6. Effects of SB431542 and anti-TGF β or anti-ActA antibodies on young FAPs fibro-adipogenesis and Smad2 phosphorylation. (A). Young FAPs cells were cultured for 10 days in differentiation medium with or without SB431542. Transcripts of adipogenic (*FABP4*, *PLIN1*) and fibrogenic (*COL1A1*, *FNI*) markers were measured by RT-qPCR. Results are shown as the values average for three distinct biopsies. (B). Young FAPs were cultured in the presence of Ctrl or young Myotubes CM with or without SB431542 for 1 hour in differentiation medium and total proteins were extracted. Smad2, Akt, ERK1/2 and p38 phosphorylations and tubulin expression were assessed by immunoblotting. (C). Young FAPs cells were cultured for 10 days in differentiation medium with or without anti-TGF β or anti-ActA. Transcripts of adipogenic (*FABP4*, *PLIN1*) and fibrogenic (*COL1A1*, *FNI*) markers were measured by RT-qPCR. Results are shown as the values average for three distinct biopsies. (D). Young FAPs were cultured in the presence of Ctrl or young Myotubes CM with or without anti-TGF β and/or anti-ActA at 1 μ g/ml for the two antibodies. Smad2 phosphorylation and tubulin expression were assessed by immunoblotting. *** P < 0.001; ** P < 0.01; * P < 0.05; ns = non significant.

Supplemental figure 7. Effects of cyclopamine on young FAPs fibro-adipogenesis in mono-cultures treated or not with young Myotubes conditioned-medium. Transcripts of adipogenic and fibrogenic markers were measured by RT-qPCR after 10 days of culture. (A). FAPs were cultured with or without cyclopamine. (B). Young FAPs were cultured with young Myotubes CM without cyclopamine or with Myotubes CM supplemented with cyclopamine after collect of CM and before freezing. (C). Young FAPs were cultured with young Myotubes CM supplemented with cyclopamine after collect and before freezing, or with CM from young myotubes derived from MPs treated by cyclopamine during their differentiation. All results are shown as the values average for three distinct biopsies. ns = non-significant; *p* values closed to significance are indicated.

Supplemental figure 8. Regulations of proliferation and differentiation of DMD MPs by DMD FAPs are similar to healthy progenitors regulations. (A). Proliferation of DMD MPs cultured with control or DMD FAPs conditioned-medium was measured by MTT assays 3 days later. Results are shown as the values average for three distinct biopsies. (B). DMD MPs were cultured with DMD FAPs (FAPs/MPs) in a 50/50 proportion, and myogenesis was evaluated after 10 days of differentiation by RT-qPCR for genes specifically expressed by

myotubes. Results are shown as the values average for four distinct biopsies. ** P < 0.01; * P < 0.05.

Supplemental figure 9. Stimulation of Akt phosphorylation in DMD FAPs proliferating with DMD MPs conditioned-medium. DMD FAPs cells proliferated with Ctrl or DMD MPs CM. 15 minutes after addition of the conditioned medium, Akt phosphorylation and tubulin expression were assessed by immunoblotting. Immunoblot signals were quantified and normalized with total Akt signals. Results are shown as the values average for three distinct biopsies. * P < 0.05.

Supplemental figure 10. Healthy MPs strongly inhibit adipogenesis and slightly stimulate fibrogenesis of DMD FAPs. Transcripts of *GLI1*, adipogenic (*FABP4*, *PLIN1*) and fibrogenic (*COL1A1*, *FNI*) genes were measured by RT-qPCR after 10 days of culture. **(A) and (B).** DMD FAPs were cultured alone (DMD FAPs) or with Healthy MPs (DMD FAPs/Healthy MPs) in a 50/50 proportion in differentiation medium. **(C) and (D).** DMD FAPs were cultured in the presence of Ctrl or Healthy Myotubes CM. *** P < 0.001; ** P < 0.01; * P < 0.05; ns = non-significant; *p* values closed to significance are indicated.

Acknowledgements: This work was supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM), (through grants #15294, #16063, and #17708 and a PhD fellowship for CM). We greatly acknowledge the Plateforme de Cytométrie – Institut de Biologie Valrose, University Nice Sophia Antipolis, and the Myobank of the Institut de Myologie, AFM-Téléthon.

REFERENCES

- Arrighi, N., C. Moratal, N. Clément, S. Giorgetti-Peraldi, P. Peraldi, A. Loubat, J. Y. Kurzenne, C. Dani, A. Chopard, and C. A. Dechesne. 2015. "Characterization of adipocytes derived from fibro/adipogenic progenitors resident in human skeletal muscle." *Cell Death Dis* 6:e1733. doi: 10.1038/cddis.2015.79.
- Bentzinger, C. F., Y. X. Wang, N. A. Dumont, and M. A. Rudnicki. 2013. "Cellular dynamics in the muscle satellite cell niche." *EMBO Rep* 14 (12):1062-72. doi: 10.1038/embor.2013.182.
- Brack, A. S., M. J. Conboy, S. Roy, M. Lee, C. J. Kuo, C. Keller, and T. A. Rando. 2007. "Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis." *Science* 317 (5839):807-10. doi: 10.1126/science.1144090.
- Brioche, T., A. F. Pagano, G. Py, and A. Chopard. 2016. "Muscle wasting and aging: Experimental models, fatty infiltrations, and prevention." *Mol Aspects Med* 50:56-87. doi: 10.1016/j.mam.2016.04.006.
- Carlson, B. M., and J. A. Faulkner. 1989. "Muscle transplantation between young and old rats: age of host determines recovery." *Am J Physiol* 256 (6 Pt 1):C1262-6.
- Ceafalan, L. C., B. O. Popescu, and M. E. Hinescu. 2014. "Cellular players in skeletal muscle regeneration." *Biomed Res Int* 2014:957014. doi: 10.1155/2014/957014.
- Chapman, M. A., R. Meza, and R. L. Lieber. 2016. "Skeletal muscle fibroblasts in health and disease." *Differentiation*. doi: 10.1016/j.diff.2016.05.007.
- Dani, C. 2013. "Activins in adipogenesis and obesity." *Int J Obes (Lond)* 37 (2):163-6. doi: 10.1038/ijo.2012.28.
- Dennler, S., J. André, I. Alexaki, A. Li, T. Magnaldo, P. ten Dijke, X. J. Wang, F. Verrecchia, and A. Mauviel. 2007. "Induction of sonic hedgehog mediators by transforming growth factor-beta: Smad3-dependent activation of Gli2 and Gli1 expression in vitro and in vivo." *Cancer Res* 67 (14):6981-6. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0491.
- Dong, Y., K. A. Silva, and L. Zhang. 2014. "Glucocorticoids increase adipocytes in muscle by affecting IL-4 regulated FAP activity." *FASEB J* 28 (9):4123-32. doi: 10.1096/fj.14-254011.
- Emery, A. E. 2002. "The muscular dystrophies." *Lancet* 359 (9307):687-95. doi: 10.1016/S0140-6736(02)07815-7.
- Gressner, O. A. 2011. "Intracrine signaling mechanisms of activin A and TGF- β ." *Vitam Horm* 85:59-77. doi: 10.1016/B978-0-12-385961-7.00004-4.
- Grounds, M. D. 1998. "Age-associated changes in the response of skeletal muscle cells to exercise and regeneration." *Ann N Y Acad Sci* 854:78-91.
- Heredia, J. E., L. Mukundan, F. M. Chen, A. A. Mueller, R. C. Deo, R. M. Locksley, T. A. Rando, and A. Chawla. 2013. "Type 2 innate signals stimulate fibro/adipogenic progenitors to facilitate muscle regeneration." *Cell* 153 (2):376-88. doi: 10.1016/j.cell.2013.02.053.
- Hui, C. C., and S. Angers. 2011. "Gli proteins in development and disease." *Annu Rev Cell Dev Biol* 27:513-37. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154048.
- Joe, A. W., L. Yi, A. Natarajan, F. Le Grand, L. So, J. Wang, M. A. Rudnicki, and F. M. Rossi. 2010. "Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis." *Nat Cell Biol* 12 (2):153-63. doi: 10.1038/ncb2015.
- Judson, R. N., R. H. Zhang, and F. M. Rossi. 2013. "Tissue-resident mesenchymal stem/progenitor cells in skeletal muscle: collaborators or saboteurs?" *FEBS J* 280 (17):4100-8. doi: 10.1111/febs.12370.
- Lecourt, S., J. P. Marolleau, O. Fromigué, K. Vauchez, R. Andriamanalijaona, B. Ternaux, M. N. Lacassagne, I. Robert, K. Boumédiène, F. Chéreau, P. Marie, J. Larghéro, M. Fiszman, and J. T. Vilquin. 2010. "Characterization of distinct mesenchymal-like cell populations from human skeletal muscle in situ and in vitro." *Exp Cell Res* 316 (15):2513-26. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.04.020.

- Lee, A. S., J. E. Anderson, J. E. Joya, S. I. Head, N. Pather, A. J. Kee, P. W. Gunning, and E. C. Hardeman. 2013. "Aged skeletal muscle retains the ability to fully regenerate functional architecture." *Bioarchitecture* 3 (2):25-37. doi: 10.4161/bioa.24966.
- Lemos, D. R., F. Babaeijandaghi, M. Low, C. K. Chang, S. T. Lee, D. Fiore, R. H. Zhang, A. Natarajan, S. A. Nedospasov, and F. M. Rossi. 2015. "Nilotinib reduces muscle fibrosis in chronic muscle injury by promoting TNF-mediated apoptosis of fibro/adipogenic progenitors." *Nat Med* 21 (7):786-94. doi: 10.1038/nm.3869.
- Li, Z. B., H. D. Kollias, and K. R. Wagner. 2008. "Myostatin directly regulates skeletal muscle fibrosis." *J Biol Chem* 283 (28):19371-8. doi: 10.1074/jbc.M802585200.
- Marden, F. A., A. M. Connolly, M. J. Siegel, and D. A. Rubin. 2005. "Compositional analysis of muscle in boys with Duchenne muscular dystrophy using MR imaging." *Skeletal Radiol* 34 (3):140-8. doi: 10.1007/s00256-004-0825-3.
- Margoni, A., L. Fotis, and A. G. Papavassiliou. 2012. "The transforming growth factor-beta/bone morphogenetic protein signalling pathway in adipogenesis." *Int J Biochem Cell Biol* 44 (3):475-9. doi: 10.1016/j.biocel.2011.12.014.
- MAURO, A. 1961. "Satellite cell of skeletal muscle fibers." *J Biophys Biochem Cytol* 9:493-5.
- McPherron, A. C., A. M. Lawler, and S. J. Lee. 1997. "Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member." *Nature* 387 (6628):83-90. doi: 10.1038/387083a0.
- Mendoza, M. C., E. E. Er, and J. Blenis. 2011. "The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation." *Trends Biochem Sci* 36 (6):320-8. doi: 10.1016/j.tibs.2011.03.006.
- Meng, X. M., P. M. Tang, J. Li, and H. Y. Lan. 2015. "TGF- β /Smad signaling in renal fibrosis." *Front Physiol* 6:82. doi: 10.3389/fphys.2015.00082.
- Mozzetta, C., S. Consalvi, V. Saccone, M. Tierney, A. Diamantini, K. J. Mitchell, G. Marazzi, G. Borsellino, L. Battistini, D. Sassoon, A. Sacco, and P. L. Puri. 2013. "Fibro/adipogenic progenitors mediate the ability of HDAC inhibitors to promote regeneration in dystrophic muscles of young, but not old Mdx mice." *EMBO Mol Med* 5 (4):626-39. doi: 10.1002/emmm.201202096.
- Muñoz-Cánoves, P., and A. L. Serrano. 2015. "Macrophages decide between regeneration and fibrosis in muscle." *Trends Endocrinol Metab* 26 (9):449-50. doi: 10.1016/j.tem.2015.07.005.
- Natarajan, A., D. R. Lemos, and F. M. Rossi. 2010. "Fibro/adipogenic progenitors: a double-edged sword in skeletal muscle regeneration." *Cell Cycle* 9 (11):2045-6. doi: 10.4161/cc.9.11.11854.
- Nye, M. D., L. L. Almada, M. G. Fernandez-Barrena, D. L. Marks, S. F. Elswa, A. Vrabel, E. J. Tolosa, V. Ellenrieder, and M. E. Fernandez-Zapico. 2014. "The transcription factor GLI1 interacts with SMAD proteins to modulate transforming growth factor β -induced gene expression in a p300/CREB-binding protein-associated factor (PCAF)-dependent manner." *J Biol Chem* 289 (22):15495-506. doi: 10.1074/jbc.M113.545194.
- Ohga, E., T. Matsuse, S. Teramoto, H. Katayama, T. Nagase, Y. Fukuchi, and Y. Ouchi. 1996. "Effects of activin A on proliferation and differentiation of human lung fibroblasts." *Biochem Biophys Res Commun* 228 (2):391-6. doi: 10.1006/bbrc.1996.1672.
- Pannérec, A., G. Marazzi, and D. Sassoon. 2012. "Stem cells in the hood: the skeletal muscle niche." *Trends Mol Med* 18 (10):599-606. doi: 10.1016/j.molmed.2012.07.004.
- Pessina, P., Y. Kharraz, M. Jardí, S. Fukada, A. L. Serrano, E. Perdiguero, and P. Muñoz-Cánoves. 2015. "Fibrogenic Cell Plasticity Blunts Tissue Regeneration and Aggravates Muscular Dystrophy." *Stem Cell Reports* 4 (6):1046-60. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.04.007.
- Piccioni, A., E. Gaetani, V. Neri, I. Gatto, M. Palladino, M. Silver, R. C. Smith, I. Giarretta, E. Pola, L. Hlatky, and R. Pola. 2014. "Sonic hedgehog therapy in a mouse model of age-associated impairment of skeletal muscle regeneration." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 69 (3):245-52. doi: 10.1093/gerona/glt076.
- Pisani, D. F., N. Clement, A. Loubat, M. Plaisant, S. Sacconi, J. Y. Kurzenne, C. Desnuelle, C. Dani, and C. A. Dechesne. 2010. "Hierarchization of myogenic and adipogenic progenitors within human skeletal muscle." *Stem Cells* 28 (12):2182-94. doi: 10.1002/stem.537.

- Pisani, D. F., C. A. Dechesne, S. Sacconi, S. Delplace, N. Belmonte, O. Cochet, N. Clement, B. Wdziekonski, A. P. Villageois, C. Butori, C. Bagnis, J. P. Di Santo, J. Y. Kurzenne, C. Desnuelle, and C. Dani. 2010. "Isolation of a highly myogenic CD34-negative subset of human skeletal muscle cells free of adipogenic potential." *Stem Cells* 28 (4):753-64. doi: 10.1002/stem.317.
- Robbins, D. J., D. L. Fei, and N. A. Riobo. 2012. "The Hedgehog signal transduction network." *Sci Signal* 5 (246):re6. doi: 10.1126/scisignal.2002906.
- Saclier, M., S. Cuvellier, M. Magnan, R. Mounier, and B. Chazaud. 2013. "Monocyte/macrophage interactions with myogenic precursor cells during skeletal muscle regeneration." *FEBS J* 280 (17):4118-30. doi: 10.1111/febs.12166.
- Schulz, T. J., T. L. Huang, T. T. Tran, H. Zhang, K. L. Townsend, J. L. Shadrach, M. Cerletti, L. E. McDougall, N. Giorgadze, T. Tchkonja, D. Schrier, D. Falb, J. L. Kirkland, A. J. Wagers, and Y. H. Tseng. 2011. "Identification of inducible brown adipocyte progenitors residing in skeletal muscle and white fat." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (1):143-8. doi: 10.1073/pnas.1010929108.
- Sciorati, C., E. Clementi, A. A. Manfredi, and P. Rovere-Querini. 2015. "Fat deposition and accumulation in the damaged and inflamed skeletal muscle: cellular and molecular players." *Cell Mol Life Sci* 72 (11):2135-56. doi: 10.1007/s00018-015-1857-7.
- Sousa-Victor, P., L. García-Prat, A. L. Serrano, E. Perdiguero, and P. Muñoz-Cánoves. 2015. "Muscle stem cell aging: regulation and rejuvenation." *Trends Endocrinol Metab* 26 (6):287-96. doi: 10.1016/j.tem.2015.03.006.
- Sousa-Victor, P., and P. Muñoz-Cánoves. 2016. "Regenerative decline of stem cells in sarcopenia." *Mol Aspects Med*. doi: 10.1016/j.mam.2016.02.002.
- Straface, G., T. Aprahamian, A. Flex, E. Gaetani, F. Biscetti, R. C. Smith, G. Pecorini, E. Pola, F. Angelini, E. Stigliano, J. J. Castellot, D. W. Losordo, and R. Pola. 2009. "Sonic hedgehog regulates angiogenesis and myogenesis during post-natal skeletal muscle regeneration." *J Cell Mol Med* 13 (8B):2424-35. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00440.x.
- Sun, W. X., M. V. Dodson, Z. H. Jiang, S. G. Yu, W. W. Chu, and J. Chen. 2016. "Myostatin inhibits porcine intramuscular preadipocyte differentiation in vitro." *Domest Anim Endocrinol* 55:25-31. doi: 10.1016/j.domaniend.2015.10.005.
- Uezumi, A., S. Fukada, N. Yamamoto, M. Ikemoto-Uezumi, M. Nakatani, M. Morita, A. Yamaguchi, H. Yamada, I. Nishino, Y. Hamada, and K. Tsuchida. 2014. "Identification and characterization of PDGFR α + mesenchymal progenitors in human skeletal muscle." *Cell Death Dis* 5:e1186. doi: 10.1038/cddis.2014.161.
- Uezumi, A., S. Fukada, N. Yamamoto, S. Takeda, and K. Tsuchida. 2010. "Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle." *Nat Cell Biol* 12 (2):143-52. doi: 10.1038/ncb2014.
- Uezumi, A., M. Nakatani, M. Ikemoto-Uezumi, N. Yamamoto, M. Morita, A. Yamaguchi, H. Yamada, T. Kasai, S. Masuda, A. Narita, Y. Miyagoe-Suzuki, S. Takeda, S. Fukada, I. Nishino, and K. Tsuchida. 2016. "Cell-Surface Protein Profiling Identifies Distinctive Markers of Progenitor Cells in Human Skeletal Muscle." *Stem Cell Reports* 7 (2):263-78. doi: 10.1016/j.stemcr.2016.07.004.
- Vauchez, K., J. P. Marolleau, M. Schmid, P. Khatrar, A. Chapel, C. Catelain, S. Lecourt, J. Larghéro, M. Fiszman, and J. T. Vilquin. 2009. "Aldehyde dehydrogenase activity identifies a population of human skeletal muscle cells with high myogenic capacities." *Mol Ther* 17 (11):1948-58. doi: 10.1038/mt.2009.204.
- Vaz, R., G. G. Martins, S. Thorsteinsdóttir, and G. Rodrigues. 2012. "Fibronectin promotes migration, alignment and fusion in an in vitro myoblast cell model." *Cell Tissue Res* 348 (3):569-78. doi: 10.1007/s00441-012-1364-1.
- Vettor, R., G. Milan, C. Franzin, M. Sanna, P. De Coppi, R. Rizzuto, and G. Federspil. 2009. "The origin of intermuscular adipose tissue and its pathophysiological implications." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297 (5):E987-98. doi: 10.1152/ajpendo.00229.2009.

- Vilquin, J. T., J. P. Marolleau, S. Sacconi, I. Garcin, M. N. Lacassagne, I. Robert, B. Ternaux, B. Bouazza, J. Larghero, and C. Desnuelle. 2005. "Normal growth and regenerating ability of myoblasts from unaffected muscles of facioscapulohumeral muscular dystrophy patients." *Gene Ther* 12 (22):1651-62. doi: 10.1038/sj.gt.3302565.
- Weiss, A., and L. Attisano. 2013. "The TGFbeta superfamily signaling pathway." *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2 (1):47-63. doi: 10.1002/wdev.86.
- Yin, H., F. Price, and M. A. Rudnicki. 2013. "Satellite cells and the muscle stem cell niche." *Physiol Rev* 93 (1):23-67. doi: 10.1152/physrev.00043.2011.
- Zaragosi, L. E., B. Wdziekonski, P. Villageois, M. Keophiphath, M. Maumus, T. Tchkonja, V. Bourlier, T. Mohsen-Kanson, A. Ladoux, C. Elabd, M. Scheideler, Z. Trajanoski, Y. Takashima, E. Z. Amri, D. Lacasa, C. Sengenès, G. Ailhaud, K. Clément, A. Bouloumie, J. L. Kirkland, and C. Dani. 2010. "Activin a plays a critical role in proliferation and differentiation of human adipose progenitors." *Diabetes* 59 (10):2513-21. doi: 10.2337/db10-0013.
- Zhou, L., and H. Lu. 2010. "Targeting fibrosis in Duchenne muscular dystrophy." *J Neuropathol Exp Neurol* 69 (8):771-6. doi: 10.1097/NEN.0b013e3181e9a34b.

Figure 1

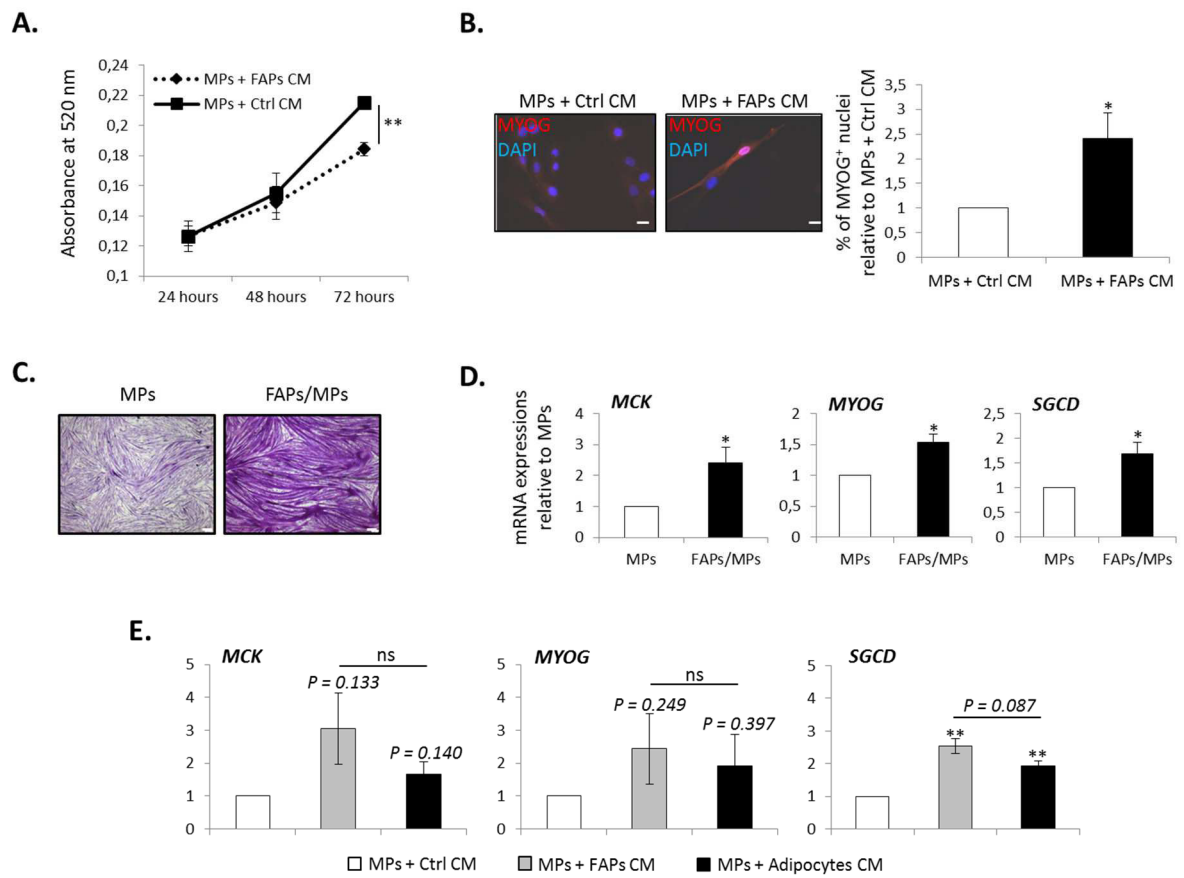


Figure 2

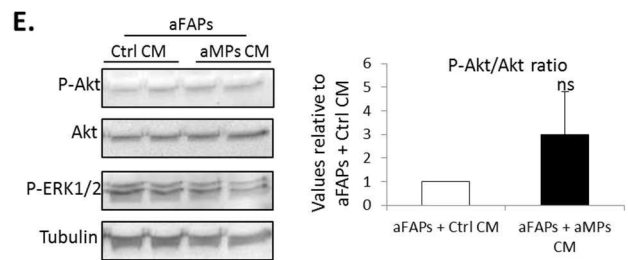
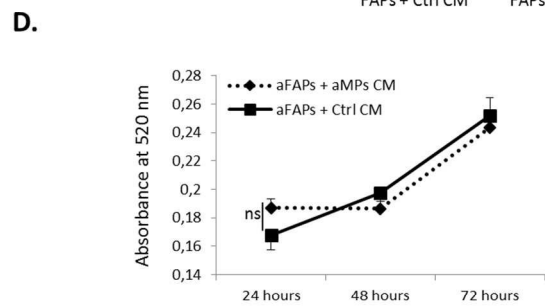
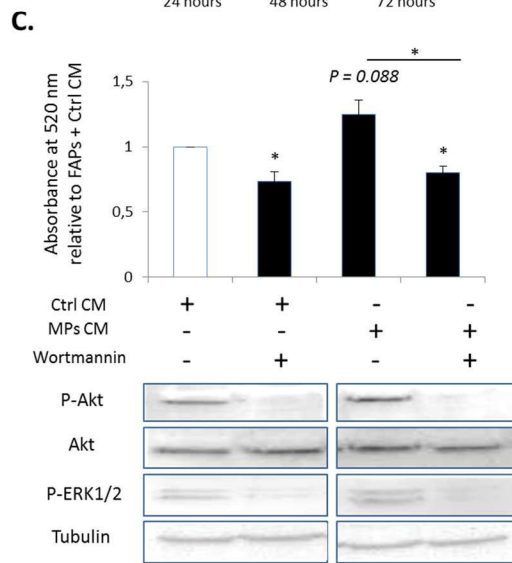
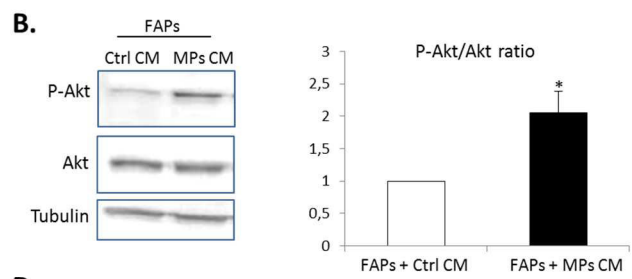
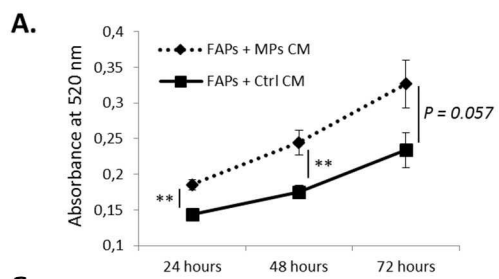


Figure 3

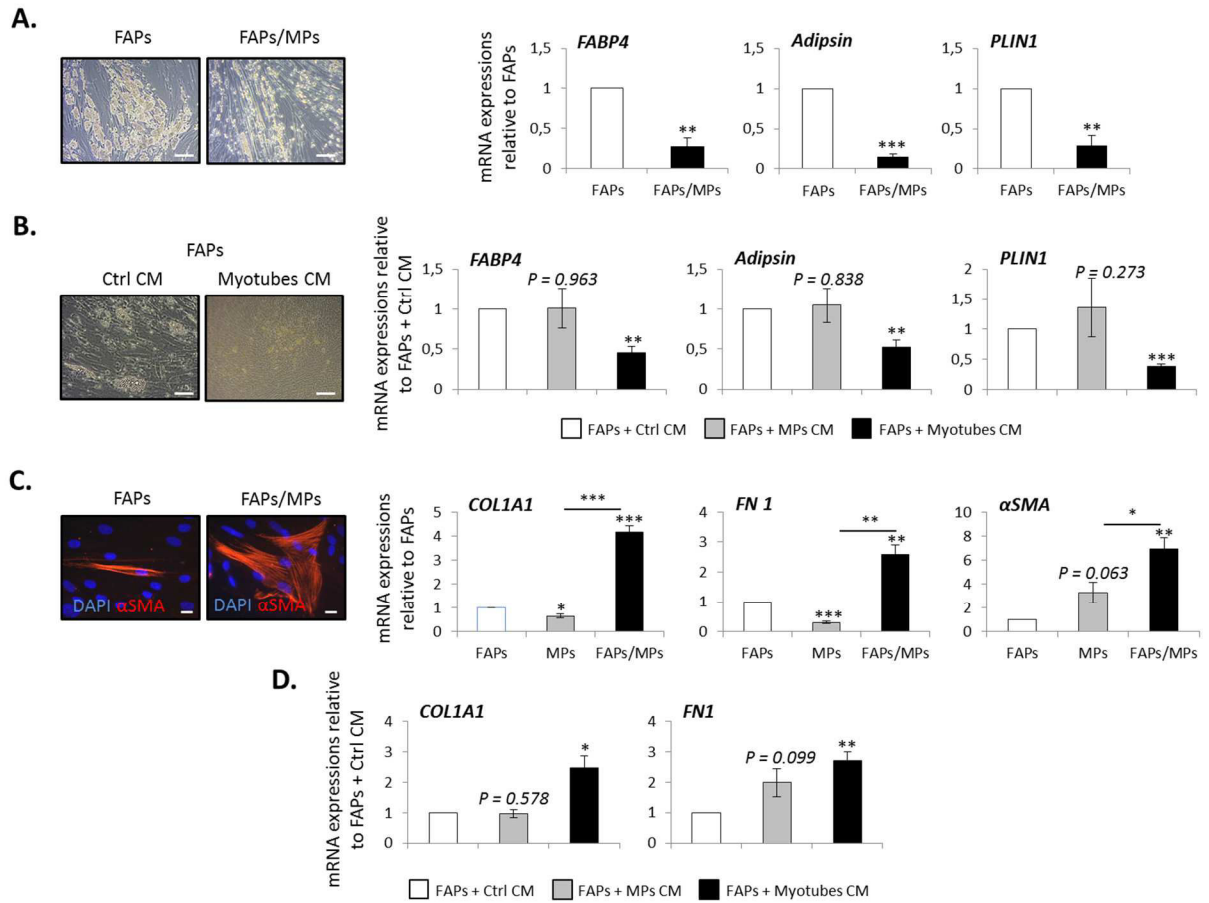


Figure 4

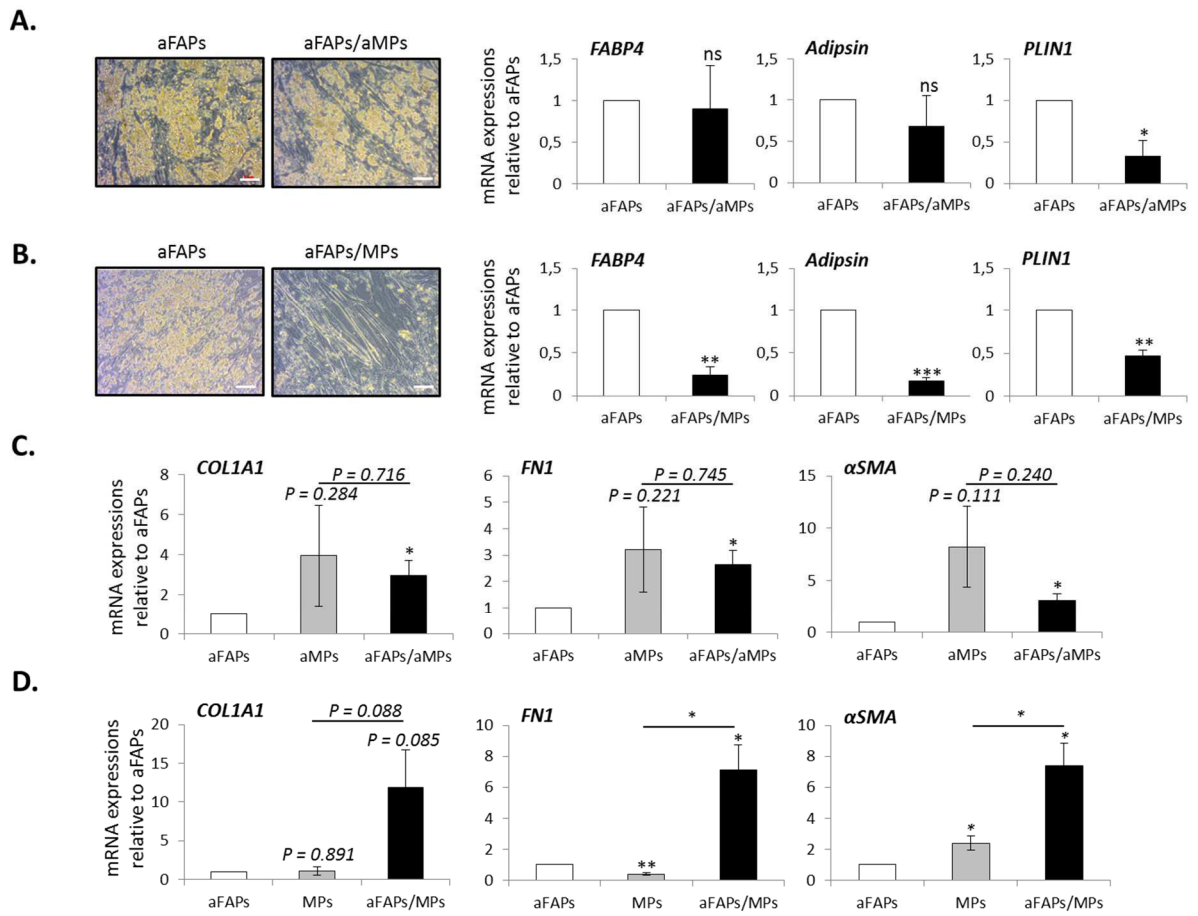


Figure 5

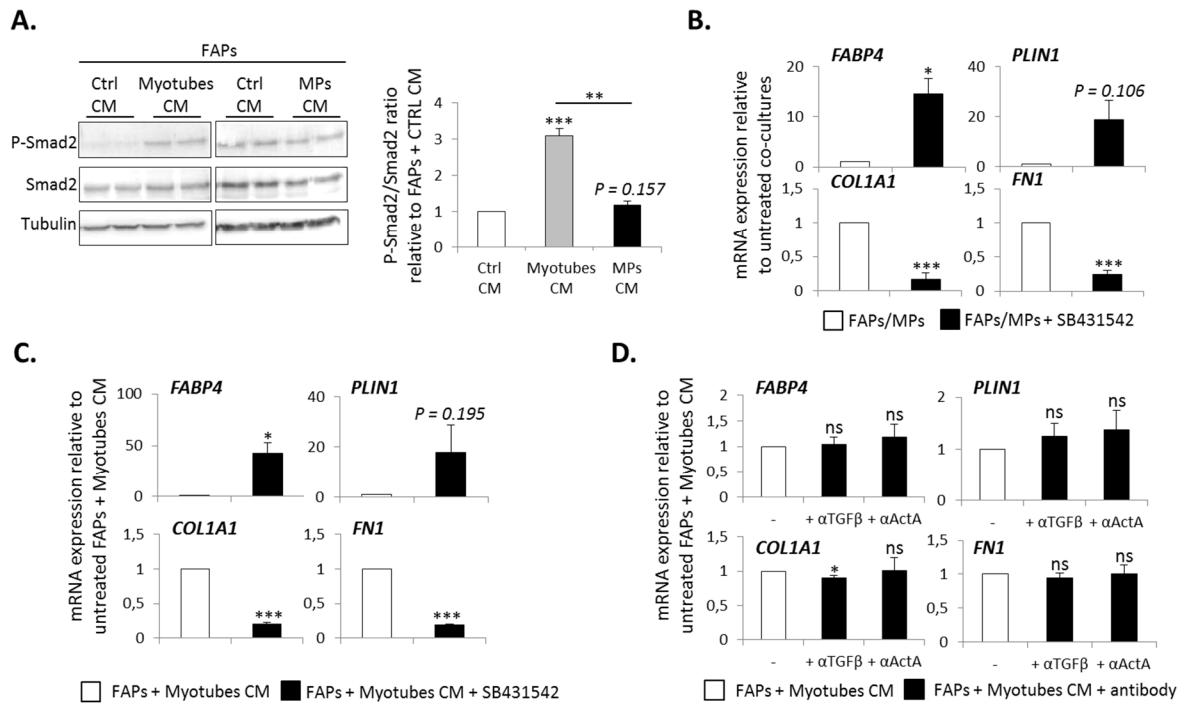


Figure 6

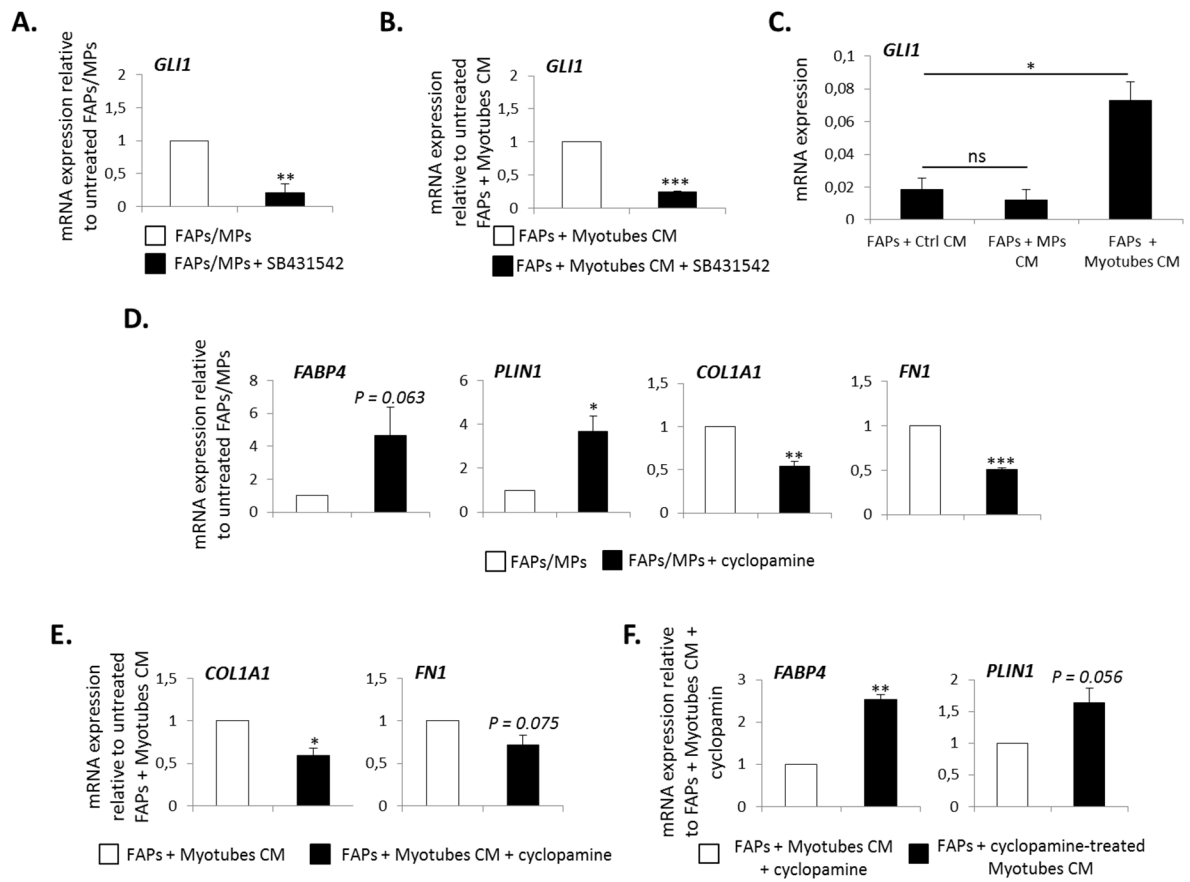


Figure 7

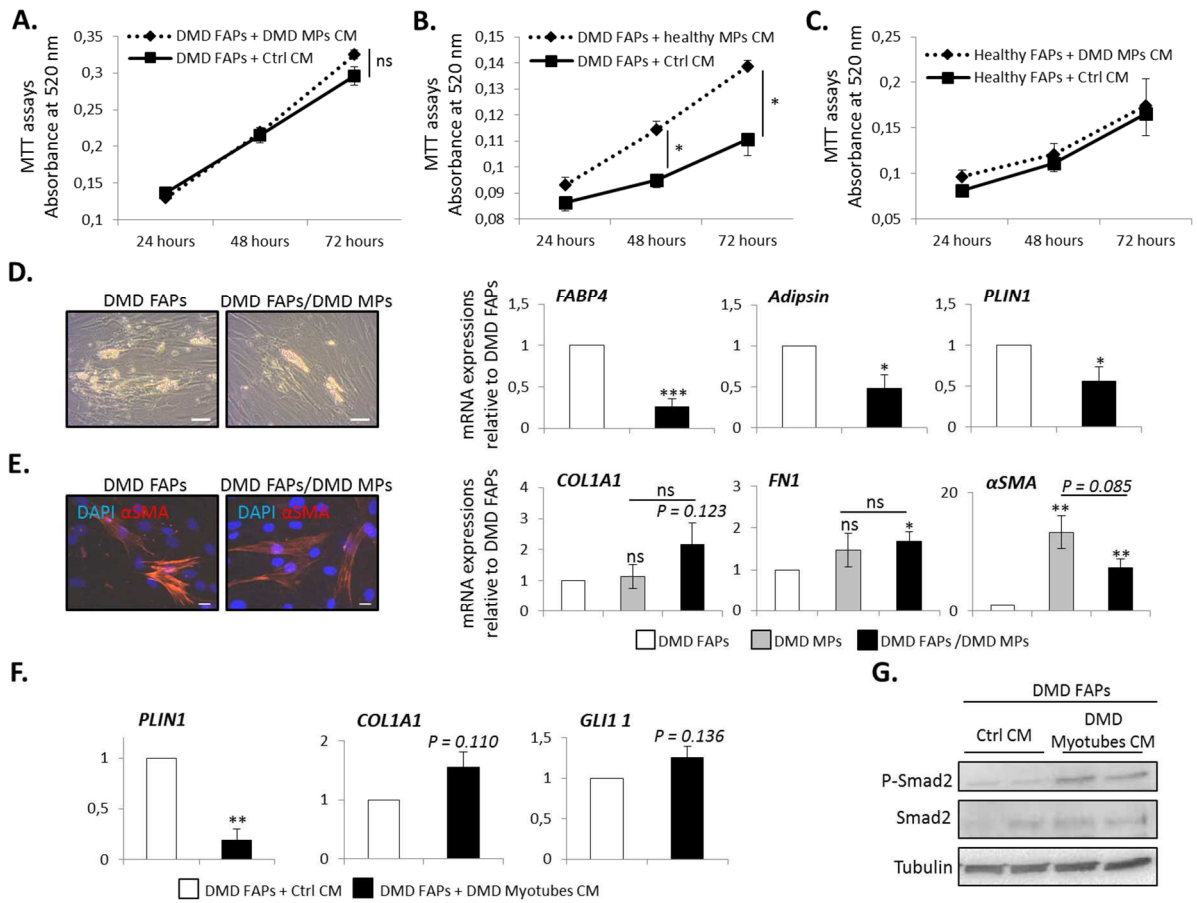
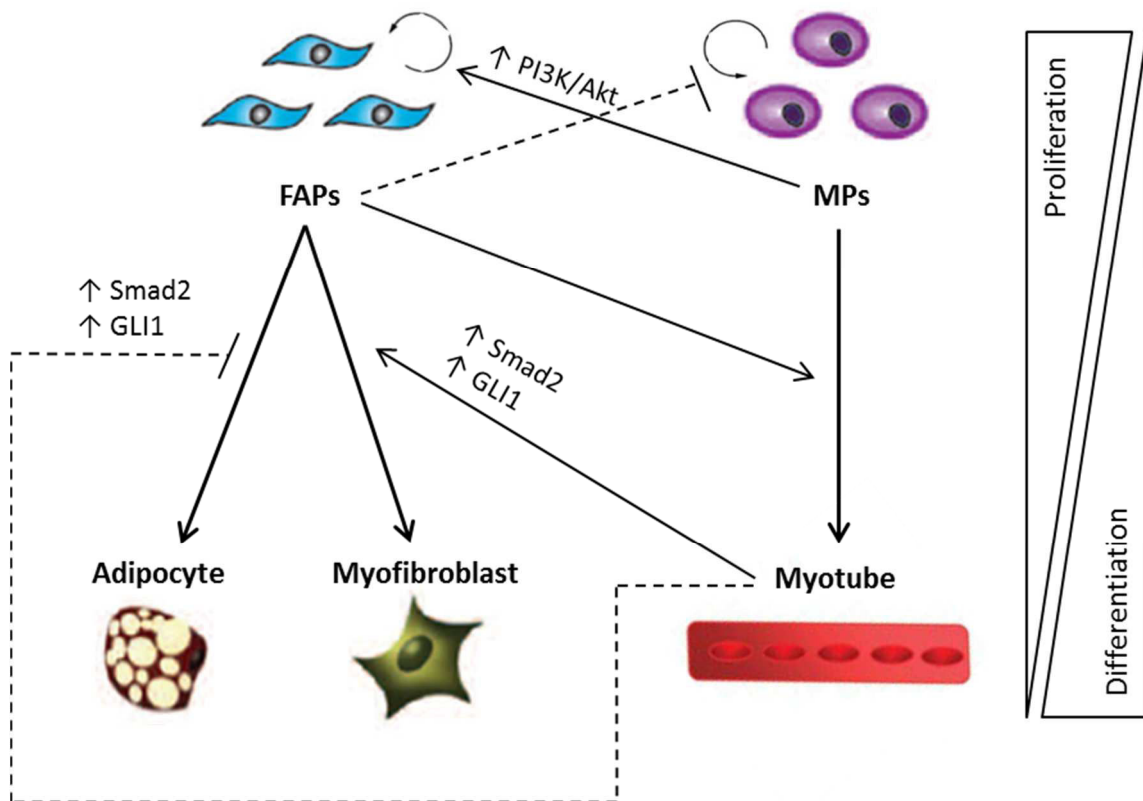
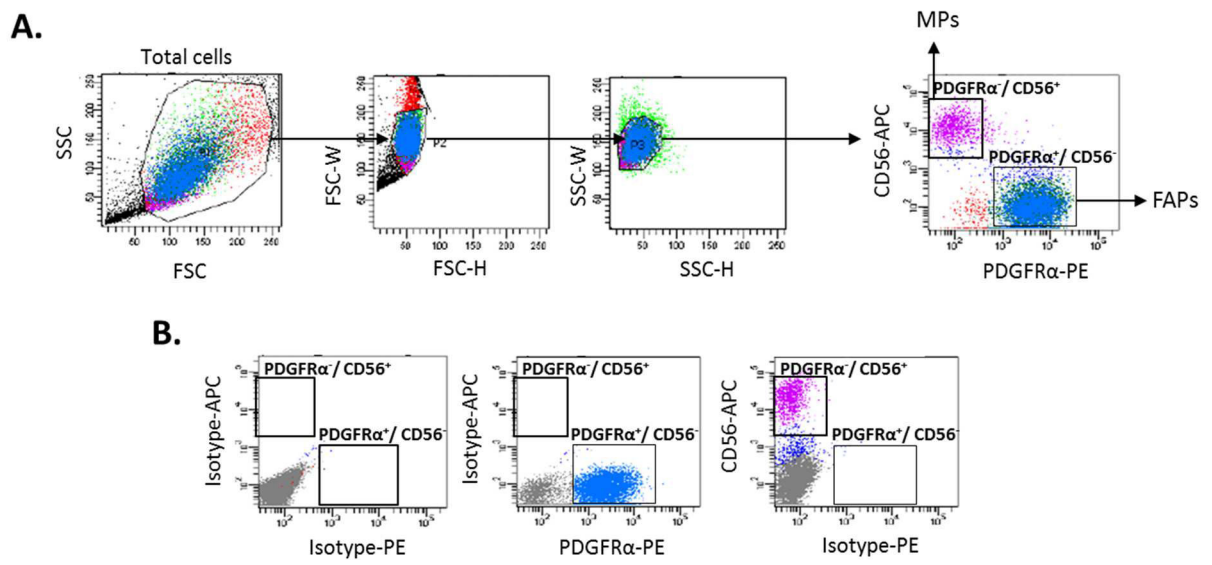


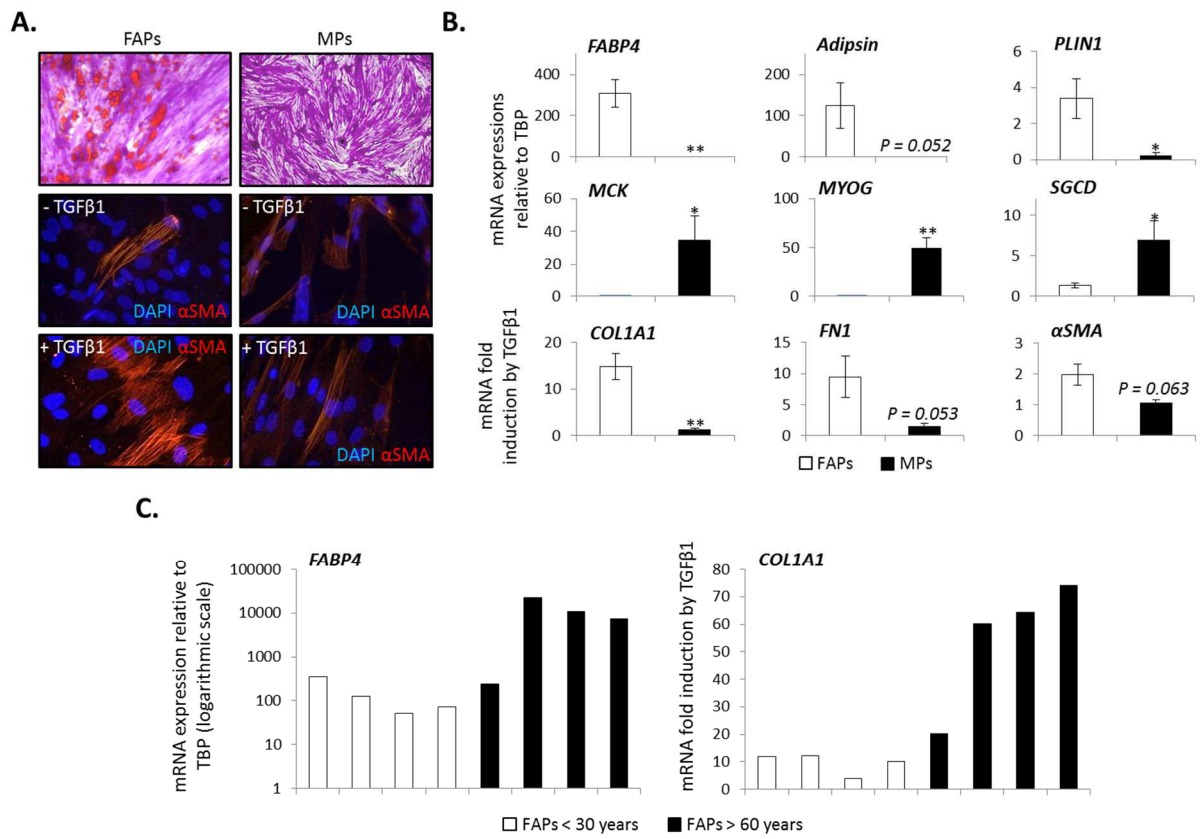
Figure 8



Supplemental figure 1

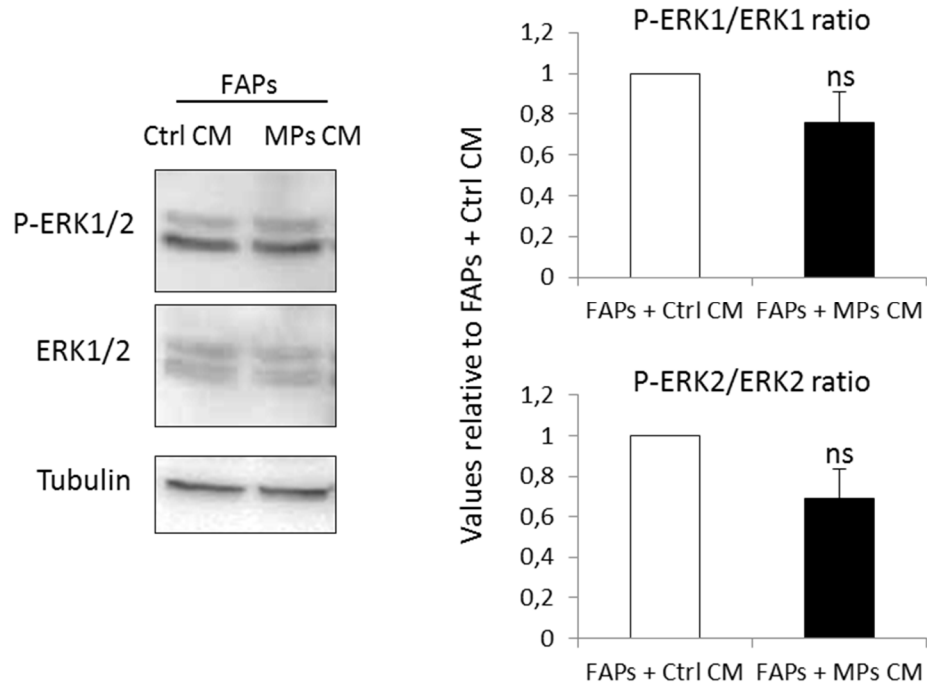


Supplemental figure 2

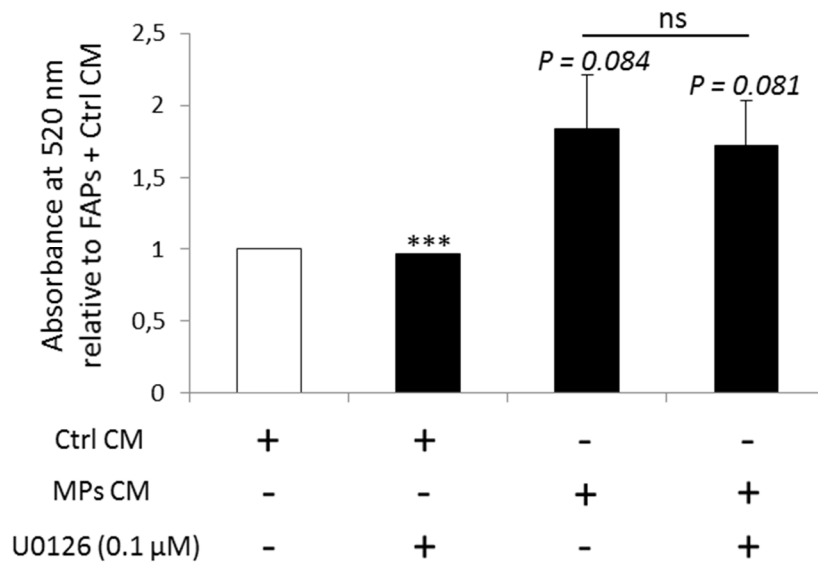


Supplemental figure 3

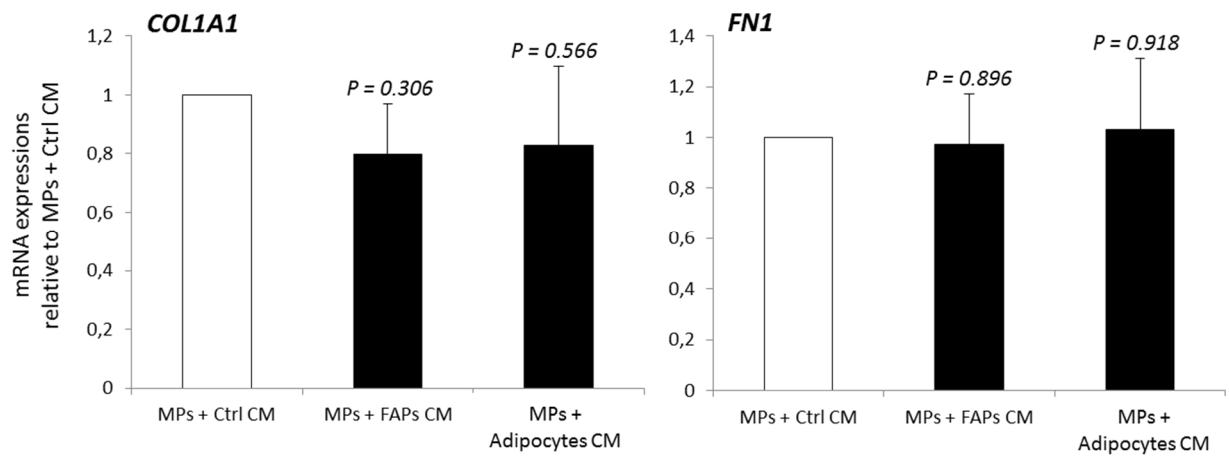
A.



B.

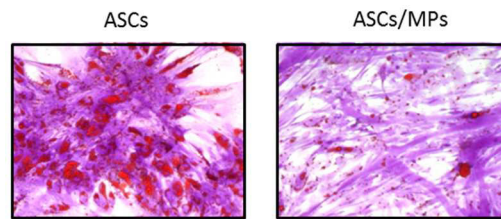


Supplemental figure 4

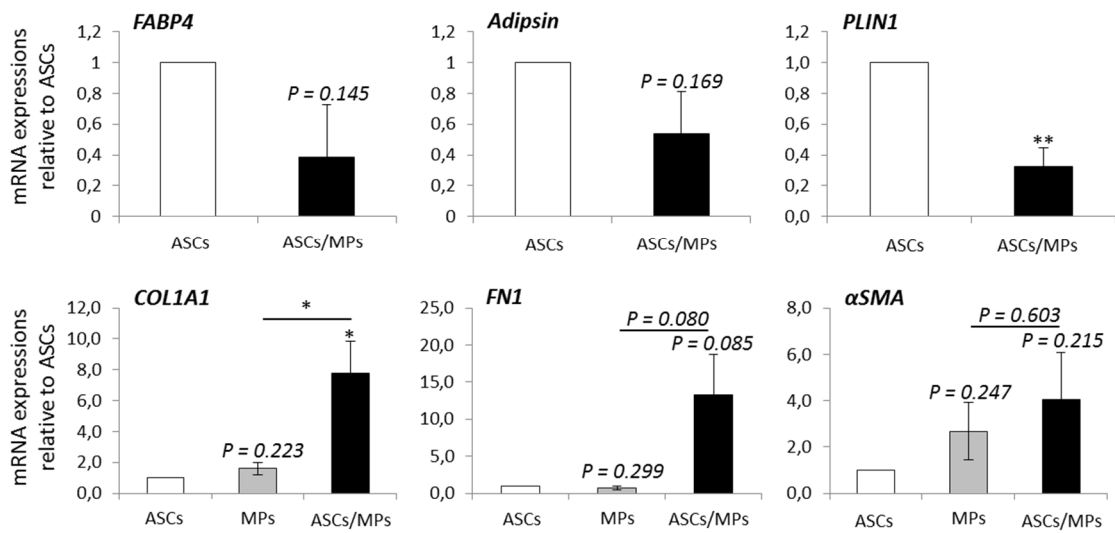


Supplemental figure 5

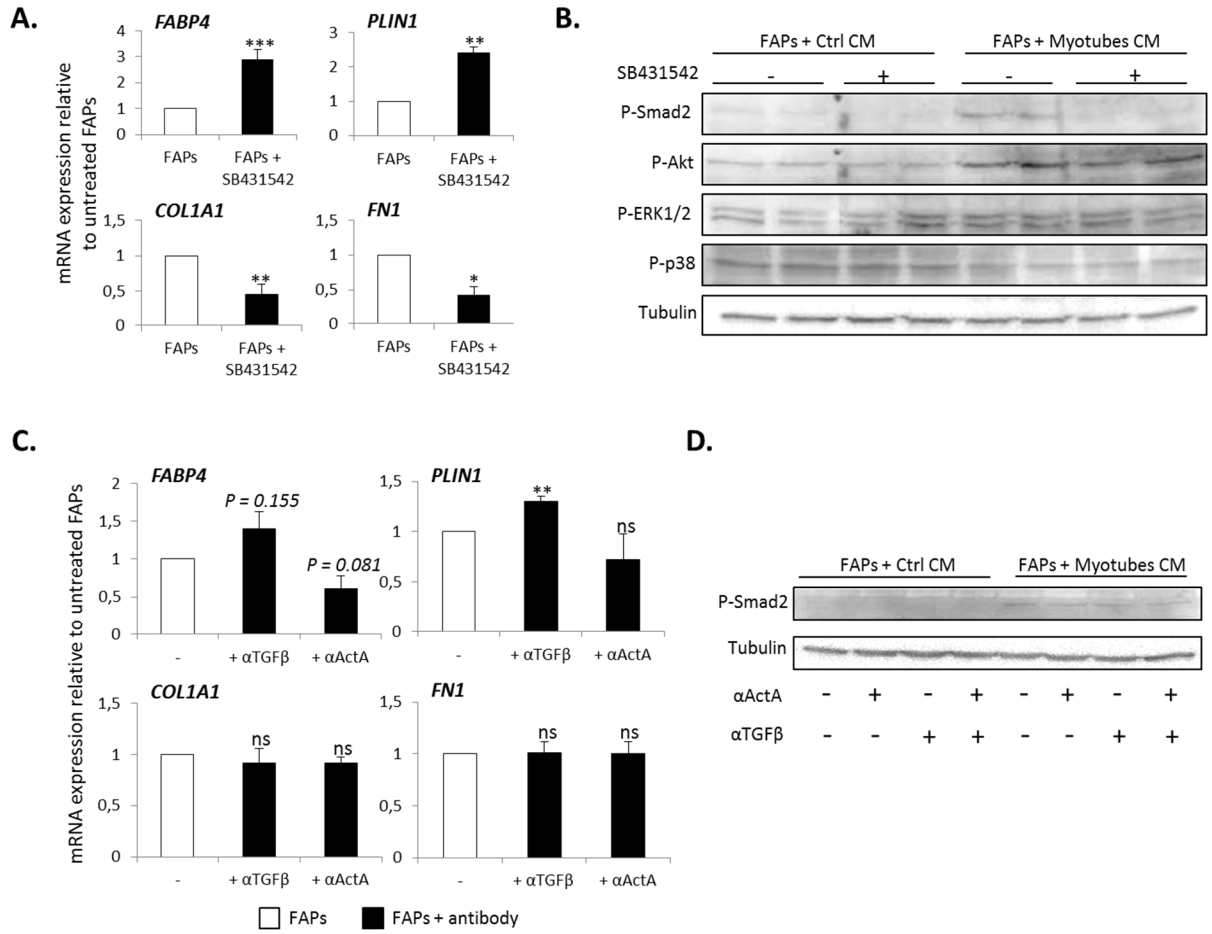
A.



B.

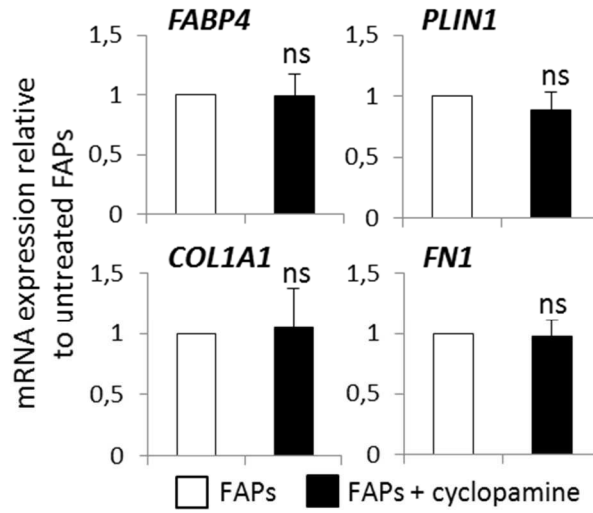


Supplemental figure 6

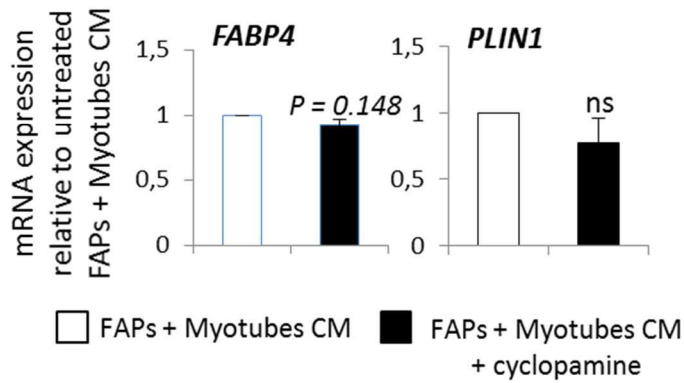


Supplemental figure 7

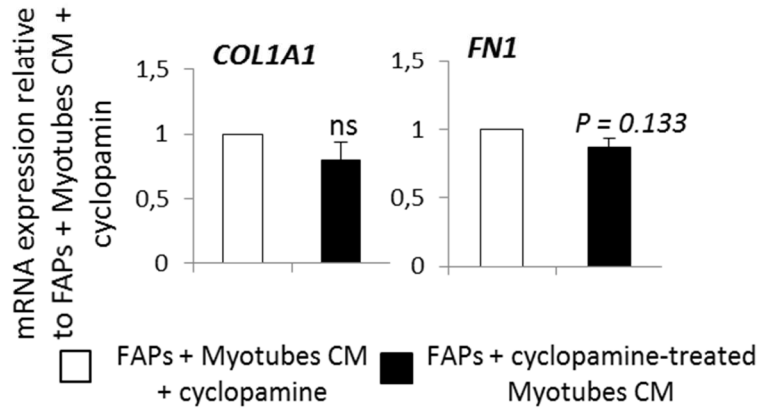
A.



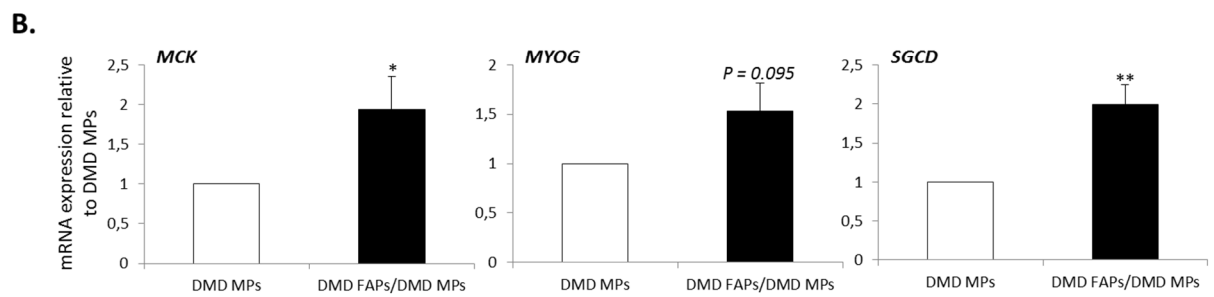
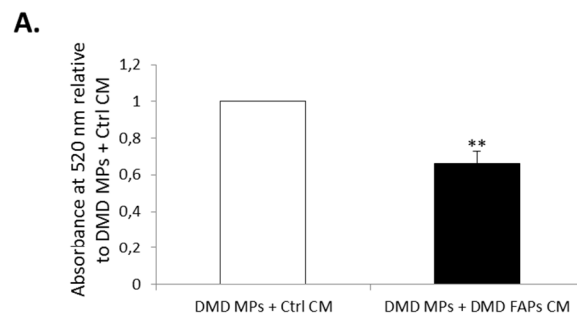
B.



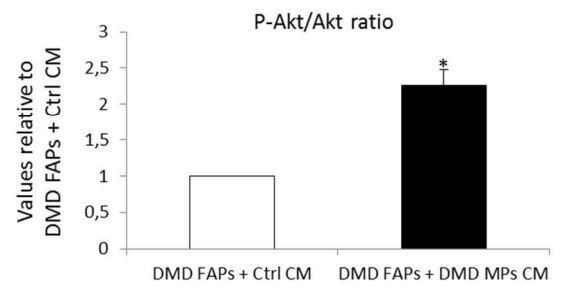
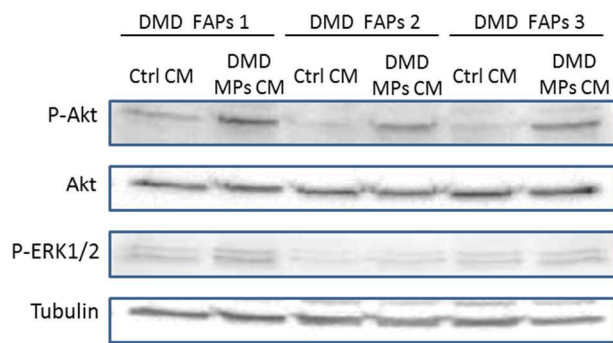
C.



Supplemental figure 8

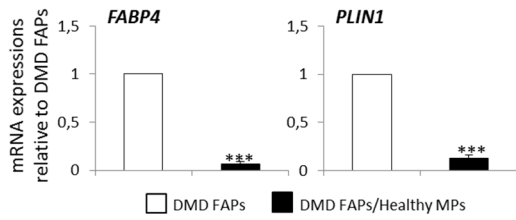


Supplemental figure 9

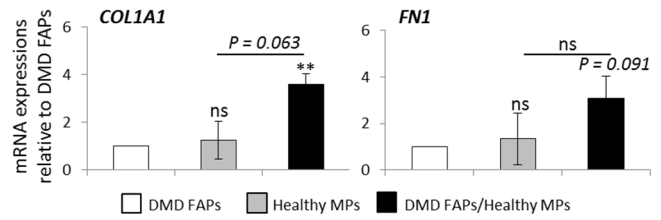


Supplemental figure 10

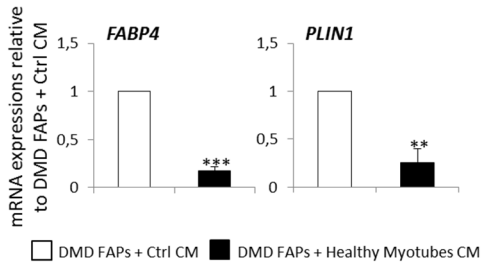
A.



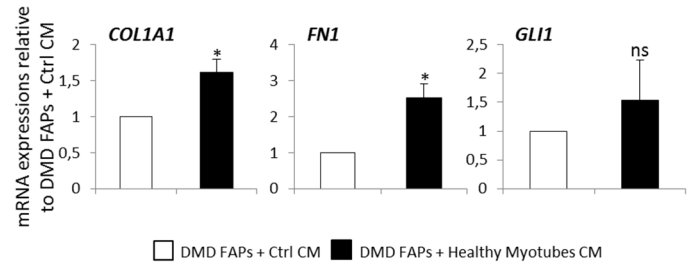
B.



C.



D.



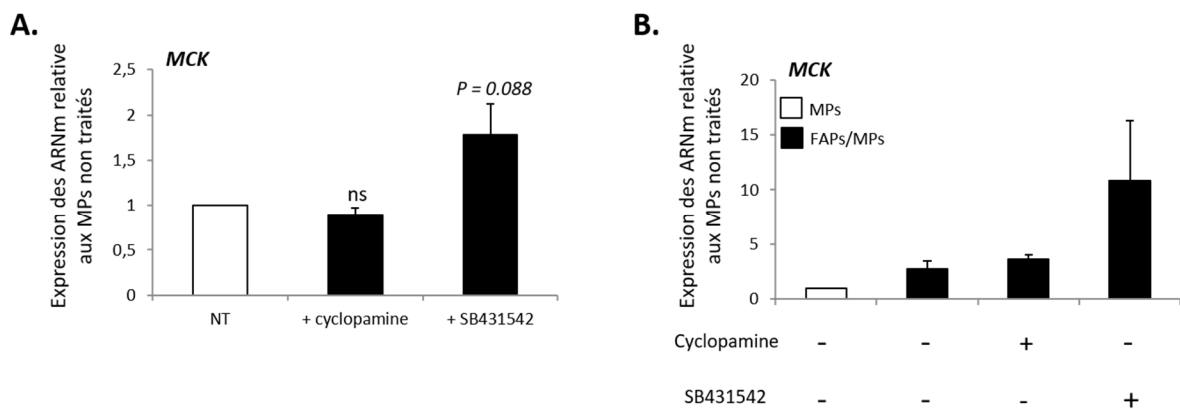


Figure 28. Effets de la cycloamine et du SB431542 sur la myogenèse des MPs. Le potentiel myogénique a été mesuré par l'expression des transcrits *MCK* en PCR quantitative. **(A).** Les MPs ont été différenciés en présence (colonnes noires) ou en absence (colonne blanche) de la cycloamine ou du SB431542 pendant 7 jours. Les résultats représentent la moyenne de trois biopsies musculaires différentes. ns : non significatif; NT : non traités. **(B).** Les MPs ont été différenciés seuls (colonne blanche) ou avec des FAPs (colonnes noires) en présence ou en absence de la cycloamine ou du SB431542 pendant 10 jours. Les résultats représentent la moyenne des résultats obtenus avec deux biopsies musculaires différentes.

3. Conclusion

Cet article a permis de mettre en évidence des interactions cellulaires entre les FAPs et les MPs provenant de donneurs sains et jeunes (âgés de moins de 30 ans). Nous avons montré que les FAPs et les adipocytes qui dérivent de leur différenciation libèrent des facteurs qui stimulent la myogenèse des MPs. A l'inverse, la prolifération des MPs est inhibée par les molécules solubles sécrétées par les FAPs. Les myotubes produisent des facteurs qui inhibent l'adipogenèse et augmentent la fibrogenèse des FAPs en stimulant la phosphorylation de Smad2 et l'expression de GLI1. Les MPs libèrent des molécules qui stimulent l'activation de la voie PI3Kinase/Akt dans les FAPs et, par conséquent, augmentent la prolifération des FAPs. D'une manière intéressante, la prolifération des FAPs n'est plus stimulée par les MPs issus de patients âgés et DMD. De même, la régulation de la différenciation des FAPs par les myotubes est perturbée pour les progéniteurs âgés ou dystrophiques. Cependant, le contrôle de la prolifération et de la différenciation des FAPs âgés ou DMD peut être restauré en remplaçant les MPs âgés ou DMD par des MPs sains. Ensemble, ces données montrent l'importance des interactions cellulaires entre les FAPs et les MPs. Leur dérégulation pourrait contribuer à la régénération musculaire anormale observée chez les patients dystrophiques ou sarcopéniques. Les connaissances des mécanismes moléculaires de ces interactions ouvrent des perspectives quant à la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques pour rendre efficace les thérapies cellulaires des patients dystrophiques.

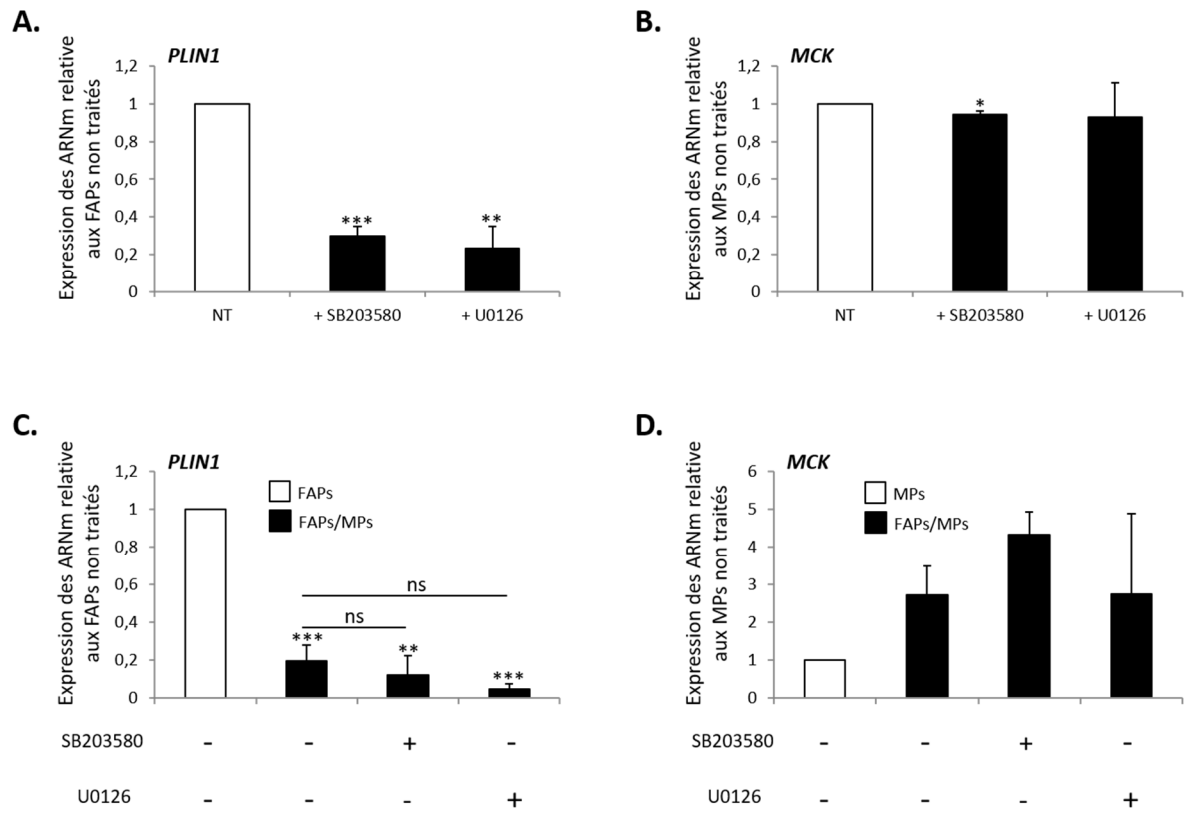


Figure 29. Effets du SB203580 et du U0126 sur la fibro-adipogenèse et la myogenèse des FAPs et des MPs respectivement. Les expressions des transcrits *MCK* ou *PLIN1* ont été mesurées par PCR quantitative pour quantifier la myogenèse des MPs ou la fibro-adipogenèse des FAPs respectivement. **(A)**. Les FAPs ont été différenciés en présence (colonnes noires) ou en absence (colonne blanche) du SB203580 ou du U0126 pendant 10 jours. NT : non traités. **(B)**. Les MPs ont été différenciés en présence (colonnes noires) ou en absence (colonne blanche) du SB203580 ou du U0126 pendant 7 jours. NT : non traités. **(C)**. Les FAPs ont été différenciés seuls (colonne blanche) ou avec des MPs (colonnes noires) en présence ou en absence du SB203580 ou du U0126 pendant 10 jours. **(A), (B) et (C)**. Les résultats représentent la moyenne des résultats obtenus avec trois biopsies musculaires différentes. *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; ns : non significatif. **(D)**. Les MPs ont été différenciés seuls (colonne blanche) ou avec des FAPs (colonnes noires) en présence ou en absence du SB203580 ou du U0126 pendant 10 jours. Les résultats représentent la moyenne des résultats obtenus avec deux biopsies musculaires différentes.

4. A la recherche des facteurs régulant les interactions cellulaires entre les lignages fibro-adipogénique et myogénique

De façon complémentaire aux résultats présentés dans l'article du chapitre 3, mes expériences se sont focalisées sur les mécanismes moléculaires du contrôle de la myogenèse des MPs par le lignage fibro-adipogénique.

Une des stratégies est la même que celle utilisée dans l'article : des inhibiteurs spécifiques de certaines voies de signalisation ont été ajoutés un par un dans le milieu de culture tout au long de la différenciation des co-cultures FAPs/MPs ou des mono-cultures. Après 7 ou 10 jours de différenciation, les cellules ont été récoltées pour quantifier l'adipogenèse des FAPs et la myogenèse des MPs par PCR (polymerase chain reaction) quantitative. Les inhibiteurs utilisés ciblent : MEK1/2 (U0126), p38 (SB203580), ALK5 qui est un récepteur de la voie TGF β (SB431542), et Smoothened qui est récepteur de la voie Hedgehog (cyclopamine).

L'autre stratégie employée pour identifier les facteurs solubles intervenant dans les interactions entre les FAPs et les MPs a été d'examiner l'expression par PCR quantitative dans les co-cultures des facteurs connus pour réguler l'adipogenèse et la myogenèse. L'hypothèse est que les facteurs dont l'expression est modulée dans les co-cultures comparées aux mono-cultures pourraient être impliqués dans la stimulation de la myogenèse et l'inhibition de l'adipogenèse.

- Stratégie 1 :

Comme pour l'adipogenèse et la fibrogenèse des FAPs (article), les effets du SB431542 et de la cyclopamine ont été testés sur la myogenèse des MPs dans les mono-cultures et les co-cultures.

La cyclopamine n'a eu aucun impact sur l'expression du marqueur myogénique *MCK* (muscle creatine kinase) dans les mono-cultures de MPs indiquant que l'activation de la voie Hedgehog n'est pas essentielle à la myogenèse des MPs (**Fig. 28A**). En revanche, le SB431542 a stimulé l'expression de *MCK* suggérant que l'inhibition de la signalisation TGF β est importante pour la myogenèse des MPs. Le traitement par la cyclopamine ou le SB431542 n'a pas diminué l'expression de *MCK* dans la co-culture (**Fig. 28B**). A l'inverse, le SB431542 a stimulé l'augmentation de la myogenèse des MPs induite par la co-culture (**Fig. 28B**). Les

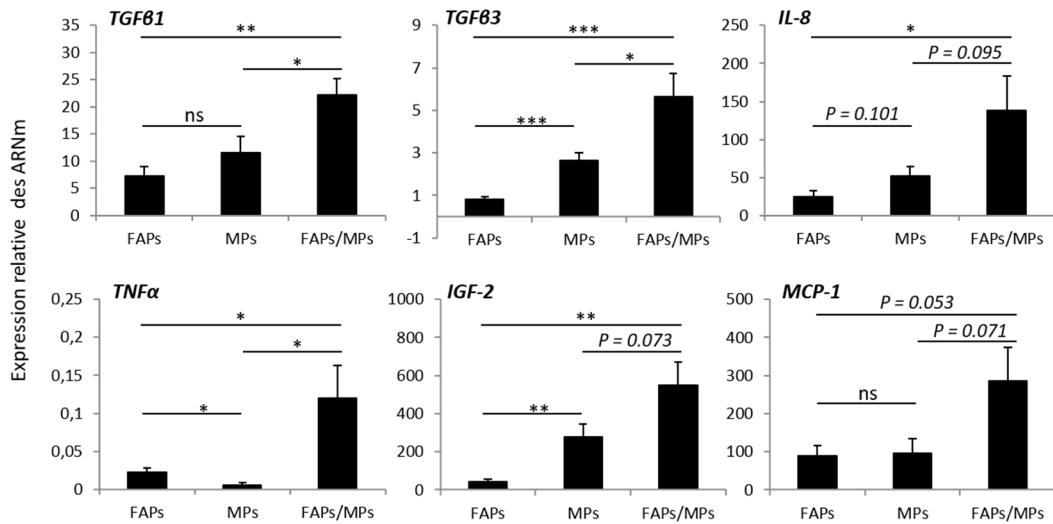


Figure 30. Expressions de *TGFβ1*, *TGFβ3*, *IL-8*, *TNFα*, *IGF-2* et *MCP-1* dans les co-cultures et les mono-cultures. Les transcrits de ces facteurs ont été quantifiés par PCR quantitative après 10 jours de différenciation. Les résultats représentent la moyenne des résultats obtenus avec sept biopsies musculaires différentes. *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$; ns : non significatif.

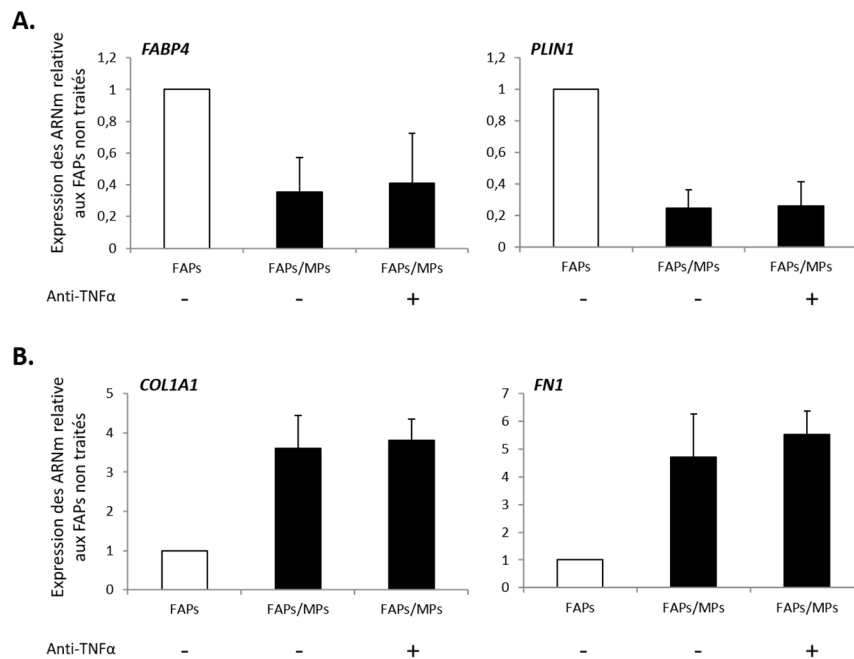


Figure 31. Effets de la neutralisation du $TNF\alpha$ sur l'adipogenèse et la fibrogenèse des FAPs dans les co-cultures. Les FAPs ont été différenciés seuls (colonne blanche) ou avec les MPs (colonnes noires) en présence ou non de l'anticorps neutralisant anti- $TNF\alpha$ pendant 10 jours. Les transcrits des marqueurs adipogéniques (A) et fibrogéniques (B) ont été quantifiés par PCR quantitative. Les résultats représentent la moyenne des résultats obtenus avec deux biopsies musculaires différentes. *FN1* : fibronectin 1.

activations des voies du TGF β et Hedgehog ne sont donc pas impliquées dans la stimulation de la myogenèse des MPs induite par le lignage fibro-adipogénique.

Par la suite, les effets des inhibiteurs SB203580 et U0126 ont été testés à la fois sur la myogenèse des MPs et la fibro-adipogenèse des FAPs. Les inhibitions des voies p38 ou MEK1/2 ont diminué l'expression de *PLIN1* (perilipin 1) par les FAPs (**Fig. 29A**) mais n'ont pas altéré l'expression de *MCK* par les MPs en mono-cultures (**Fig. 29B**). Ces résultats montrent que les activations de ces signalisations sont importantes pour le processus de différenciation des FAPs mais pas pour celui des MPs. SB203580 et U0126 n'ont pas modulé l'inhibition de l'adipogenèse des FAPs (**Fig. 29C**) et la stimulation de la myogenèse des MPs (**Fig. 29D**) induites par la co-culture. Ces résultats suggèrent que les activations des voies MAPKinases MEK1/2 et p38 dans les co-cultures ne sont pas essentielles aux interactions cellulaires entre les lignages fibro-adipogénique et myogénique.

- Stratégie 2 :

Parmi les 17 facteurs testés, 6 sont surexprimés dans les co-cultures : TGF β 1, TGF β 3, IL-8, TNF α , IGF-2 et MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) (**Fig. 30**).

D'une manière intéressante, l'expression de TNF α est stimulée dans les co-cultures (**Fig. 30**). TNF α est connu pour inhiber l'adipogenèse des progéniteurs adipogéniques du tissu adipeux (Cawthorn and Sethi 2008) ainsi que celle des FAPs intramusculaires humains (Arrighi et al. 2015). Nous avons testé les effets de la neutralisation du TNF α à l'aide d'un anticorps spécifique sur l'adipogenèse et la fibrogenèse des FAPs dans les expériences de co-culture et de milieux conditionnés de myotubes. Les résultats montrent que le blocage de TNF α n'a pas levé l'inhibition de l'adipogenèse et n'a pas inhibé la stimulation de la fibrogenèse des FAPs induites par les co-cultures (**Fig. 31**) ou le milieu conditionné (**Fig. 32**). Le facteur TNF α ne joue donc pas un rôle essentiel dans la régulation de la différenciation fibro-adipogénique des FAPs par les myotubes.

Conclusion

Bien que les facteurs solubles sécrétés par les myotubes activent les voies de signalisation TGF β et Hedgehog dans les FAPs pour réguler leur différenciation, l'augmentation de la myogenèse des MPs ne requiert pas une activation de ces voies par les molécules produites par le lignage fibro-adipogénique. Les signalisations des MAPKinases p38 et MEK1/2 ne sont pas

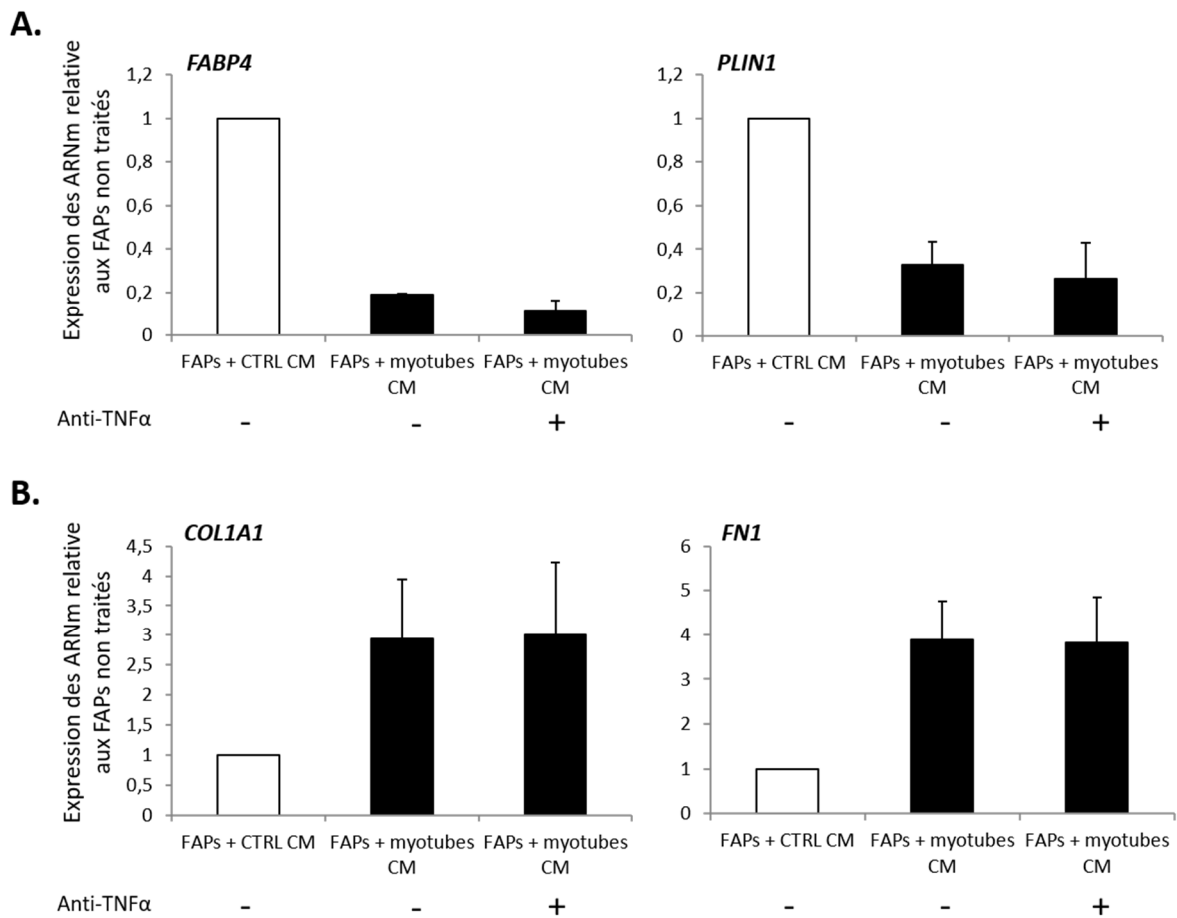


Figure 32. Effets de la neutralisation du TNF α sur l'adipogènèse et la fibrogènèse des FAPs cultivés en présence du milieu conditionné de myotubes. Les FAPs ont été différenciés dans le milieu conditionné contrôle (CTRL CM) ou dans le milieu conditionné de myotubes (myotubes CM) en présence ou non de l'anticorps neutralisant anti-TNF α pendant 10 jours. Les transcrits des marqueurs adipogéniques (**A**) et fibrogéniques (**B**) ont été quantifiés par PCR quantitative. Les résultats représentent la moyenne des résultats obtenus avec deux biopsies musculaires différentes.

impliquées dans les interactions cellulaires entre les FAPs et les MPs. Les expressions de six facteurs et cytokines (TGF β 1, TGF β 2, TNF α , IL-8, IGF-2 et MCP-1) sont stimulées dans les co-cultures suggérant un rôle potentiel de ces molécules dans la régulation des interactions FAPs/MPs. Cependant, nous avons exclu l'importance du TNF α dans la régulation de la différenciation des FAPs par les myotubes. Ces résultats apportent de nouvelles pistes quant au mécanisme moléculaire impliqué dans les interactions cellulaires entre les FAPs et les MPs issus de biopsies musculaires de patients sains.

Chapitre 4. Etude *in vitro* de la régulation des FAPs sains par les macrophages sanguins chez l'homme

1. Objectifs de l'étude

En plus des cellules satellites et des FAPs, le processus de régénération musculaire est aussi contrôlé par la réponse immunitaire innée. Les éosinophiles et les neutrophiles sont recrutés rapidement dans les zones endommagées et favorisent la dégénérescence des fibres musculaires nécrosées. Les muscles lésés sont aussi envahis par les lymphocytes mais la population leucocytaire majeure est celle des macrophages (Chazaud 2014).

Les macrophages constituent une population cellulaire hétérogène qui adapte son phénotype en réponse à des signaux spécifiques provenant du microenvironnement (Geissmann, Jung, and Littman 2003, Mosser 2003). Plusieurs classes de macrophages ont été décrites et cette description est basée sur l'expression de marqueurs, sur la production de facteurs et sur les fonctions biologiques spécifiques de chaque classe. La polarisation des macrophages pro-inflammatoires M1 est induite par les cytokines des lymphocytes T auxiliaires TH1 comme $IFN\gamma$ et $TNF\alpha$, ou par la reconnaissance des molécules de lipopolysaccharide (LPS). Le rôle des macrophages M1 est de phagocyter les micro-organismes et de produire des cytokines pro-inflammatoires telles que $TNF\alpha$, IL-6, IL-1 et IL-12 (Verreck et al. 2004). L'activation chronique des macrophages M1 libère des ROS qui induisent des dommages et qui altèrent la réparation tissulaire. Pour se protéger contre de tels dommages tissulaires, la réponse inflammatoire est contrebalancée par des mécanismes de régulation impliquant des macrophages activés de manière alternative (M2) (Gordon 2003). En effet, la plasticité cellulaire des macrophages leur confère la propriété de changer de phénotype en réponse à des signaux spécifiques (Porcheray et al. 2005). Trois sous-classes différentes de macrophages M2 ont été identifiées. Les macrophages M2a sont induits par les cytokines des lymphocytes T auxiliaires TH2, IL-4 et IL13. Le phénotype M2b est induit par les complexes immuns en combinaison avec l'IL-1 β et le LPS. Le phénotype M2c est induit par l'IL-10 et le TGF β , ou les glucocorticoïdes (Mantovani et al. 2004). Tous les macrophages M2 ont un profil anti-inflammatoire caractérisé par une faible production d'IL-12 et une forte sécrétion d'IL-10 et de

TGF β (Mantovani et al. 2004). Les macrophages anti-inflammatoires M2 phagocytent les débris cellulaires et favorisent l'angiogenèse, la fibrose, la réparation et le remodelage tissulaire.

Les premiers macrophages infiltrant les zones musculaires endommagées sont les macrophages M1 qui sécrètent des cytokines pro-inflammatoires. De plus, les macrophages M1 stimulent la prolifération des cellules satellites et inhibent leur fusion en myofibres. Ils sont ensuite convertis en macrophages anti-inflammatoires M2 dont le rôle est de stimuler la différenciation des cellules satellites. La régulation des cellules satellites par les différents types de macrophages au cours de la régénération musculaire est maintenant bien documentée (Arnold et al. 2007, Chazaud 2014, Tidball 2011).

La régénération musculaire est un processus complexe qui implique une collaboration étroite entre différentes populations cellulaires du muscle notamment entre les cellules satellites, les cellules immunitaires et les FAPs. A notre connaissance, la majorité des interactions cellulaires a été menée chez la souris mais pas chez l'homme. De plus, la plupart des interactions a porté sur les échanges entre les cellules satellites et les FAPs. Celles concernant les FAPs et les macrophages sont peu nombreuses. Cependant, une étude récente chez la souris montre que les macrophages induisent l'apoptose des FAPs qui est requise pour réduire le nombre de FAPs dans les muscles et pour le succès de la régénération musculaire (Lemos et al. 2015). Cette découverte renforce l'hypothèse que les macrophages réguleraient certaines fonctions des FAPs.

Nous avons obtenu des résultats préliminaires concernant la régulation des FAPs humains sains par des macrophages polarisés en type M1 ou M2 issus de la différenciation de monocytes sanguins de donneurs sains. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec le Pr. Giulia Chinetti de l'Institut de recherche sur le Cancer et le Vieillessement (IRCAN).

2. Matériels et méthodes

Culture des macrophages primaires humains

L'équipe du Pr. Giulia Chinetti est habilitée à recevoir des poches de sang humain de donateurs volontaires sains en provenance de l'Etablissement Français du Sang (EFS). La purification et la différenciation en macrophages des monocytes primaires humains ont été réalisées dans le laboratoire du Pr. Giulia Chinetti.

Brièvement, 20 mL de la suspension de sang diluée sont déposés délicatement sur 15 mL de Ficoll puis cette suspension est centrifugée à 2200 tours/min pendant 25 minutes à température ambiante. L'anneau de leucocytes est lavé 4 fois dans du PBS-EDTA par une succession de plusieurs centrifugations à vitesse décroissante. Le culot cellulaire est resuspendu dans un milieu RPMI de base (RPMI 1640, 2mM de L-glutamine et 100µg/mL de gentamycine). La concentration cellulaire est ajustée à 15 millions de cellules/mL puis les cellules sontensemencées dans une boîte de diamètre 100 mm. Après 1 heure et 30 minutes d'incubation dans l'étuve à 37°C, les monocytes adhérents sont lavés 3 fois avec du PBS sans EDTA puis resuspendus dans 20 mL de milieu RPMI complet (RPMI de base supplémenté avec 10% de sérum humain). Pour induire la polarisation des macrophages M1, 15 ng/mL d'IL-1β est ajouté au milieu complet. La polarisation des macrophages M2 est induite en ajoutant 15 ng/mL d'IL-4 au milieu complet. En parallèle, des monocytes sont incubés avec le milieu complet sans cytokine. A la fin de la différenciation, les cellules sont lavées avec du PBS puis 10 mL de milieu de base (sans sérum humain et sans cytokine) sont ajoutés sur les cellules. Après 24 heures d'incubation, les milieux conditionnés de macrophages non polarisés (RM, resting macrophages), des macrophages M1 (M1) ou des macrophages M2 (M2) sont centrifugés à 2000 tours/min pendant 10 minutes puis stockés à -80°C. Du milieu de base incubé dans l'étuve en absence de cellules a aussi été préparé (Ctrl).

Culture des FAPs primaires humains

Les FAPs sont extraits à partir de biopsies musculaires humaines de 3 donneurs sains âgés de 1 an, 8 ans ou 17 ans. Les biopsies musculaires sont émincées en petits fragments de 1mm³ et digérées à 37°C avec de la libérase pendant 1 heure puis avec de la trypsine-EDTA 0.25% pendant 20 minutes. La suspension cellulaire estensemencée dans un milieu de croissance (Ham's F10, 20% de sérum de veau fœtal, 10 mM d'Hepes, 10⁻⁶ M de dexaméthasone, 2.5 ng/mL de FGF2, 100 U/mL de pénicilline et 100 mg/mL de streptomycine) dans une boîte de Pétri de 60 mm de diamètre.

La différenciation adipogénique est induite 2 jours après la confluence dans un milieu constitué de 50% du milieu conditionné de macrophages et 50% d'un milieu Ham's F10/F12/DMEM à faible teneur en glucose (2v/1v/1v). A chaque milieu conditionné Ctrl, RM, M1 et M2, est ajouté 1% de sérum de cheval, 500 nM de dexaméthasone, 50 µM de 1-méthyl-3-isobutylmethyl-xanthine (MIX), 7.5 µg/ml d'insuline, 7.5 µg/ml de transferrine, 0.1 nM de triiodothyronine (T3) et 50 nM de rosiglitazone. Trois jours plus tard, T3 et MIX sont enlevés

du milieu de différenciation. Le milieu est changé tous les 3 jours et les cellules sont collectées 10 jours après le début de la différenciation pour les analyses.

Extraction des ARNs et RT-qPCR

Les ARNs totaux sont extraits avec le kit TRI-reagent. Les protocoles de l'extraction des ARNs et de la RT-qPCR sont décrits dans les articles précédents. Le gène de ménage *TBP* (TATA box-binding protein) est utilisé comme gène de référence. Les séquences 5'-3' des amorces forward et reverse sont respectivement : ACGCCAGCTTCGGAGAGTTC et CAAACCGCTTGGGATTATATTCG pour *TBP*, ACCATCTCCACCCGCCTC et GATGGGAACGCTGATGCTGT pour *PLIN1*, ACCTGCGTGTACCCCACTCA et CCGCCATACTCGAACTGGAA pour *COL1A1* (*collagen type I alpha 1*).

Immunofluorescence

Les cellules ensemencées sur des lamelles en verre sont fixées au paraformaldéhyde 4% pendant 10 minutes, puis perméabilisées avec du Triton 100X 0.1 %. Les sites non spécifiques sont saturés avec une solution de BSA 3% pendant 30 minutes à température ambiante. Les cellules sont incubées avec l'anticorps primaire anti- α SMA dilué au 1/8000^{ème} toute la nuit à +4°C, puis avec l'anticorps secondaire anti-souris IgG couplé au fluorochrome Alexa Fluor 594 pendant 45 minutes à température ambiante. Entre chaque étape, trois lavages au PBS sont réalisés. La lamelle de cellules est finalement déposée sur une lame avec une goutte de Mowiol contenant du DAPI. Les cellules sont visualisées au microscope Axiovert sous immersion d'huile. Les photos sont capturées et traitées avec le logiciel Axiovision.

Analyses statistiques

Les différences entre les groupes de données ont été évaluées pour leur significativité en utilisant le test-t student non apparié. Une valeur < 0.05 est considérée comme significative. Les données sont représentées avec la SEM (standard error of the mean).

3. Résultats

Nos résultats préliminaires indiquent que les FAPs sont différentiellement régulés par les diverses sortes de milieux conditionnés de macrophages. Les macrophages non polarisés et les

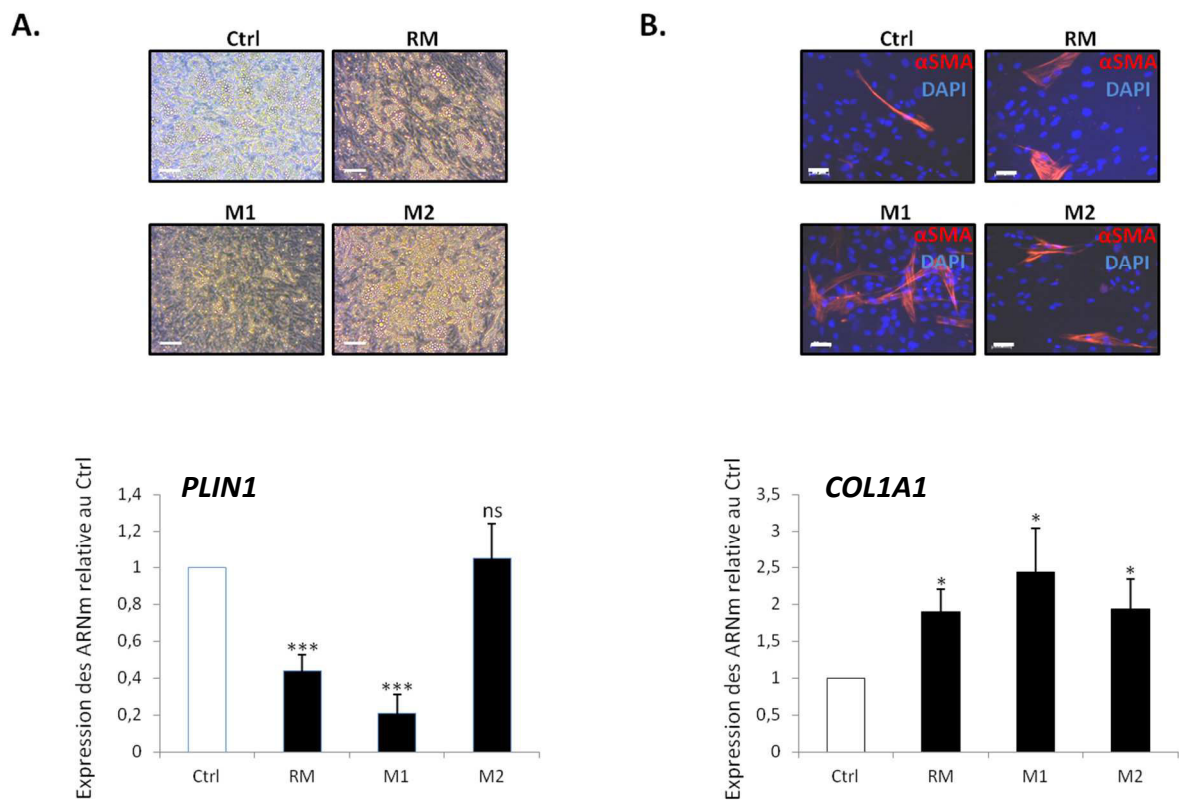


Figure 33. Régulation du potentiel fibro-adipogénique des FAPs par les macrophages. Les FAPs ont été cultivés 10 jours sous des conditions adipogéniques en présence du milieu conditionné Ctrl, RM, M1 ou M2 dilué au demi. **(A).** En haut, images en contraste de phase de FAPs différenciés en adipocytes contenant des gouttelettes lipidiques (échelle : 5 μ m). En bas, expression de *PLIN1* mesurée par RT-qPCR. **(B).** En haut, images d'immunofluorescence de myofibroblastes exprimant α SMA (rouge) issus de la différenciation de FAPs (échelle : 50 μ m). En bas, expressions de *COL1A1* mesurée par RT-qPCR. Trois biopsies musculaires différentes et trois donneurs de sang différents ont été utilisés dans cette étude (n = 9). *** P < 0.001; ** P < 0.01; * P < 0.05; ns = non-significatif

macrophages pro-inflammatoires M1 inhibent l'adipogenèse (**Fig. 33A**). Cette inhibition est plus forte en présence du milieu conditionné M1 (**Fig. 33A**). En revanche, le milieu conditionné de macrophages anti-inflammatoires M2 n'influence pas la différenciation en adipocytes des FAPs (**Fig. 33A**). La fibrogenèse des FAPs est stimulée par les 3 types de macrophages mais la stimulation est plus forte avec le milieu conditionné M1 (**Fig. 33B**). En effet, un nombre plus important de myofibroblastes αSMA^+ sont visibles dans les cultures de FAPs avec le milieu conditionné M1 (**Fig. 33B**).

4. Conclusion

Les macrophages pro-inflammatoires et anti-inflammatoires humains régulent différemment les FAPs humains de donneurs sains. Les facteurs sécrétés par les macrophages M1 stimulent la fibrogenèse tout en étant anti-adipogéniques, tandis que ceux produits par les macrophages M2 n'influencent pas ou très peu la différenciation fibro-adipogénique des FAPs. Pour la première fois chez l'homme, ces données ont permis d'identifier des interactions cellulaires entre les FAPs et les macrophages polarisés.

DISCUSSION

1. Les FAPs des muscles squelettiques humains

Le potentiel régénératif endogène des muscles squelettiques est une réponse à la perte de la masse musculaire qui peut survenir suite à un exercice pour faciliter la croissance et le remodelage musculaire ou après un traumatisme pour réparer les muscles endommagés. La régénération musculaire est supportée par les cellules satellites qui ont été caractérisées depuis des décennies et qui sont positionnées le long de la myofibre sous la lamina basale (MAURO 1961). Des travaux récents ont identifié chez l'homme des progéniteurs mésenchymateux musculaires appelés progéniteurs fibro-adipogéniques (FAPs) qui supportent la régénération musculaire et qui sont aussi une source des dépôts d'adipocytes et de fibrose dans les muscles squelettiques (Vauchez et al. 2009, Lecourt et al. 2010, Pisani, Clement, et al. 2010, Pisani, Dechesne, et al. 2010). Néanmoins, leur caractérisation, leurs rôles et leurs régulations dans les muscles humains sains et dystrophiques sont encore très incomplets.

1. 1. Expression du marqueur de surface PDGFR α par les FAPs

Initialement, ces cellules ont été identifiées chez l'homme, par deux équipes dont la nôtre, comme étant des progéniteurs adipogéniques non myogéniques (Vauchez et al. 2009, Lecourt et al. 2010, Pisani, Clement, et al. 2010, Pisani, Dechesne, et al. 2010). Au laboratoire, ces progéniteurs étaient purifiés après amplification des cellules souches totales extraites à partir de biopsies musculaires humaines. Les progéniteurs adipogéniques étaient ensuite isolés grâce à leur expression de CD15 et à l'absence du marqueur CD56 à leur surface. Cependant, la molécule CD15 n'est pas détectable *in situ* et n'apparaît que sur les cellules en culture (Lecourt et al. 2010). Nous avons démontré que le marqueur mésenchymateux PDGFR α , identifié sur des progéniteurs adipogéniques musculaires humains par l'équipe d'Uezumi, est exprimé à la surface des cellules CD15⁺/CD56⁻ indiquant que les progéniteurs CD15⁺/CD56⁻ et PDGFR α ⁺/CD56⁻ constituent la même population cellulaire. Cette découverte a rendu possible l'isolement des progéniteurs adipogéniques à partir de biopsies de muscles humains sans passer par l'étape d'amplification *in vitro* qui peut biaiser le comportement et le destin des cellules musculaires. PDGFR α est aussi utilisé pour isoler des cellules souches mésenchymateuses à partir de la moelle osseuse de souris adultes (Morikawa et al. 2009). Comme les cellules souches mésenchymateuses sont présentes dans la plupart des organes chez l'homme et chez la souris (da Silva Meirelles, Chagastelles, and Nardi 2006, Crisan et al. 2008), PDGFR α pourrait servir comme marqueur universel pour identifier les cellules souches mésenchymateuses dans

divers organes d'espèces différentes. Par exemple, des progéniteurs fibro-adipogéniques exprimant PDGFR α ont été récemment retrouvés dans les muscles cardiaques humains et murins (Lombardi et al. 2016).

L'expression de PDGFR α a été récemment détectée dans une sous-population des cellules interstitielles PICs (Pannérec et al. 2013) et dans des fibroblastes TCF4⁺ (Murphy et al. 2011) de muscles murins. Comme les FAPs de souris, les PICs sont Sca-1⁺/CD34⁺/CD45⁻ et expriment en plus le facteur de transcription PW1 (Mitchell et al. 2010). La sous-population de PICs PDGFR α ⁺ est capable de se différencier en adipocytes mais pas en myotubes, alors que la sous-population de PICs PDGFR α ⁻ génère des myotubes mais pas des adipocytes (Pannérec et al. 2013). Bien que leur potentiel adipogénique soit à investiguer, les fibroblastes TCF4⁺ prolifèrent aussi rapidement que les FAPs en réponse à une blessure et supportent la régénération musculaire en interagissant avec les cellules satellites (Murphy et al. 2011). D'après ces résultats, les FAPs, les fibroblastes TCF4⁺ et la sous-population de PICs PDGFR α ⁺ pourraient représenter la même population cellulaire interstitielle dans les muscles squelettiques. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en mesurant l'expression de PW1 et de TCF4 dans les FAPs murins et humains.

1. 2. Les adipocytes formés à partir des FAPs

Le tissu adipeux est dispersé dans l'organisme et notamment dans le compartiment musculaire puisque des infiltrations d'adipocytes sont observées entre les myofibres. Cependant, à ma connaissance, la spécificité de ces adipocytes intramusculaires n'a jamais été étudiée chez l'homme. Nous avons trouvé que les adipocytes issus de la différenciation des FAPs partagent les propriétés cellulaires et fonctionnelles des adipocytes dérivés du tissu adipeux sous-cutané (ASCs) bien qu'ayant leurs propres spécificités. Premièrement, l'adipogenèse des FAPs musculaires et des progéniteurs adipogéniques du tissu adipeux est induite et régulée par les mêmes molécules et voies de signalisation. Deuxièmement, les phénotypes des adipocytes générés par ces deux types de progéniteurs adipogéniques sont ressemblants bien que les FAPs soient plus petits à cause de la faible taille de leurs gouttelettes lipidiques. Ce résultat est en accord avec des données *in vivo* qui montrent que les adipocytes intramusculaires sont plus petits que les adipocytes du tissu adipeux chez le porc et le bœuf (Smith and Crouse 1984, Zhou et al. 2010, Kouba and Sellier 2011). Troisièmement, les FAPs se différencient exclusivement en adipocytes blancs du fait de l'absence d'expression du marqueur spécifique des adipocytes bruns UCP1. Ce résultat a été confirmé l'année suivante

pour des adipocytes issus de la différenciation de progéniteurs adipogéniques CD56⁻, correspondant aux FAPs PDGFR α ⁺/CD15⁺, isolés à partir de muscles de patients obèses (Laurens et al. 2016). Cependant, un potentiel adipogénique brun de progéniteurs musculaires Sca1⁺ a été identifié chez la souris (Schulz et al. 2011). De plus, des dépôts ectopiques d'adipocytes bruns ont été récemment détectés dans les muscles squelettiques de souris (Almind et al. 2007). Ces études indiquent que des différences dans la composition des adipocytes intramusculaires existent entre les muscles humains et murins.

Un troisième type d'adipocyte a été récemment décrit et nommé adipocyte beige. Ces adipocytes sont contenus dans des dépôts de tissus adipeux blancs mais présentent des caractéristiques des adipocytes bruns. Les adipocytes beiges sont similaires aux adipocytes blancs d'un point de vue morphologique mais peuvent se différencier en cellules exprimant UCP1 et acquérir les caractéristiques des adipocytes bruns après stimulation chronique de la voie β -adrénergique (Granneman et al. 2005). Les adipocytes beiges et blancs proviennent de progéniteurs qui sont différents de ceux qui génèrent les adipocytes bruns (Seale et al. 2007). De manière intéressante, les adipocytes beiges du tissu adipeux blanc de souris auraient pour origine un progéniteur adipogénique exprimant PDGFR α (Lee, Petkova, et al. 2012). Une étude récente a montré que le traitement des adipocytes issus de la différenciation de progéniteurs adipogéniques musculaires CD56⁻/CD15⁺ par la forskoline, stimulus induisant le « brunissage » des adipocytes blancs, n'a pas induit l'expression d'UCP1 et celles des marqueurs spécifiques des adipocytes beiges (Laurens et al. 2016). Nous pouvons donc conclure que les FAPs PDGFR⁺/CD56⁻/CD15⁺ se différencient exclusivement en adipocytes blancs.

Enfin, contrairement aux adipocytes classiques, les adipocytes des FAPs sont résistants à l'insuline et présentent une altération des premières étapes de la signalisation de l'insuline. Peu de données existent pour expliquer la relation entre l'accumulation d'adipocytes intramusculaires (IMAT) et la résistance à l'insuline mais toutes concluent que l'IMAT est lié au développement de la pathogenèse des maladies impliquant une insulino-résistance (Lee, Kim, et al. 2012, Goss and Gower 2012, Zoico et al. 2010, Boettcher et al. 2009). A ma connaissance, aucune publication n'a relaté l'état de sensibilité à l'insuline de l'IMAT dans les sujets sains. Nos résultats suggèrent que l'IMAT est un compartiment graisseux particulier qui est insensible à l'insuline. A noter que l'IMAT est physiquement très proche des fibres musculaires. Récemment, une étude a montré que les adipocytes issus de la différenciation des progéniteurs adipogéniques musculaires CD15⁺/CD56⁻ sécrètent des facteurs solubles pouvant altérer l'action de l'insuline sur les progéniteurs myogéniques CD15⁻/CD56⁺ (Laurens et al.

2016). Ces données ouvrent de nouvelles perspectives quant aux mécanismes cellulaires et moléculaires des interactions entre le tissu adipeux et le tissu musculaire.

1. 3. Le potentiel fibrogénique des FAPs et des MPs

Dans des conditions de dommages chroniques et aigus tels que la DMD, des myofibroblastes sécrètent en grande quantité des protéines de l'ECM qui remplacent les fibres musculaires et impactent la fonction du muscle (Zhou and Lu 2010). L'origine cellulaire des myofibroblastes est encore débattue et la plupart des études a été réalisée chez la souris.

Nous avons montré que les FAPs humains sains génèrent *in vitro* des myofibroblastes et participent à la production de protéines de l'ECM une fois injectées dans des muscles de souris endommagés. Les facteurs capables de réguler le choix du devenir des FAPs sont TGF β 1 et la myostatine, autre membre de la famille TGF β , puisqu'ils inhibent l'adipogenèse des FAPs et stimulent leur différenciation fibrogénique (Dong et al. 2016, Uezumi et al. 2014). Le mécanisme moléculaire par lequel des FAPs contribuent à la fibrose musculaire est en cours d'investigation. Notamment, une étude montre l'importance de l'expression de la protéine ADAM12 (metallopeptidase domain 12) dans le développement du tissu fibrotique intramusculaire (Dulauroy et al. 2012). Une accumulation de progéniteurs PDGFR α ⁺ exprimant ADAM12 a été identifiée dans les muscles de souris en régénération puis ces progéniteurs sont progressivement éliminés lors de la cicatrisation des muscles. Les auteurs de cette étude ont démontré *in vivo* que ces progéniteurs ADAM12⁺ représentent la principale source de cellules produisant du collagène au cours de la régénération. La suppression des cellules ADAM12⁺ est suffisante pour limiter la génération de cellules pro-fibrotiques et l'accumulation de collagène dans l'espace interstitiel des muscles de souris. Un lien entre la fibrogenèse et la signalisation PDGFR α est décrit dans la littérature. Les souris mutantes, pour lesquelles la signalisation PDGFR α est suractivée, présentent une fibrose progressive dans de multiples organes dont le muscle squelettique (Olson and Soriano 2009). La stimulation de la signalisation PDGFR α est observée dans les muscles de souris en régénération (Ieronimakakis et al. 2016) et favorise l'expression des gènes fibrotiques dans les FAPs de souris *in vitro* (Uezumi et al. 2011).

In vivo, les FAPs DMD possèdent le même potentiel fibrogénique que les FAPs sains. Les mécanismes moléculaires responsables de l'induction incontrôlée de la fibrogenèse des FAPs restent à identifier. La forte sécrétion des facteurs TGF β dans les muscles dystrophiques pourrait très vraisemblablement être impliquée dans ce phénomène (Pessina et al. 2015). En effet, l'équipe de Rossi a récemment identifié le mécanisme de clairance des FAPs dans les

muscles sains de souris (Lemos et al. 2015). Celui-ci implique l'action apoptotique du TNF α , libéré par les macrophages inflammatoires, sur les FAPs. Dans les muscles dystrophiques de souris, les macrophages expriment fortement TGF β 1 dont l'action est d'empêcher l'apoptose des FAPs induite par TNF α et d'induire leur différenciation en myofibroblastes. Ce mécanisme de régulation des FAPs par le TGF β expliquerait également la corrélation entre la sévérité de la fibrose dans les muscles DMD et l'augmentation importante du nombre de FAPs PDGFR $^+$ dans l'espace interstitiel des muscles squelettiques dystrophiques humains (Uezumi et al. 2014). L'imatinib, un inhibiteur des tyrosines kinases telles que celles des voies de signalisation TGF β et PDGFR α , améliore les symptômes dystrophiques des souris *mdx* notamment en inhibant la prolifération et l'expression des gènes fibrogéniques des progéniteurs musculaires PDGFR α^+ (Bizario et al. 2009, Huang et al. 2009, Ito et al. 2013). Très récemment, une étude a prouvé que la signalisation PDGFR α est suractivée dans les muscles DMD et que l'inhibition spécifique de cette voie réduit la fibrose musculaire des muscles de souris *mdx* (Ieronimakakis et al. 2016). Ces données suggèrent fortement une implication des facteurs PDGFs dans l'induction de la fibrogenèse des FAPs dans les muscles dystrophiques. Enfin, une plasticité du devenir de FAPs murins induite par l'environnement dystrophique a récemment été découverte chez la souris dystrophique *mdx* (Faralli and Dilworth 2014). La dégénérescence musculaire des souris *mdx* jeunes crée un environnement qui modifie l'état épigénétique des FAPs qui peuvent alors acquérir un potentiel myogénique en réponse aux HDACi (HDAC inhibitor) au détriment de leur devenir fibro-adipogénique. Au cours de la progression de la maladie, les FAPs perdent leur sensibilité aux HDACi et par conséquent leur plasticité myogénique. Ainsi, les FAPs peuvent se différencier en myofibroblastes et en adipocytes aux stades avancés de la dystrophie. Les patients DMD ont une activité élevée des HDACs dans leurs muscles (Colussi et al. 2008). Ce modèle de plasticité du destin des FAPs murins pourrait également être retranscrit dans les muscles de patients DMD.

Alors que les MPs sains ne génèrent pas de myofibroblastes et constituent une population de progéniteurs exclusivement myogéniques, les MPs DMD acquièrent un potentiel fibrogénique *in vitro* et *in vivo* identique à celui des FAPs DMD. En revanche, les MPs DMD forment très peu de myofibres humaines lorsqu'ils sont injectés dans les muscles de souris. Ces données montrent qu'une partie des MPs DMD participent au développement de la fibrose au lieu de contribuer à la génération de nouvelles myofibres chez le DMD. Il a été récemment identifié chez le DMD une plasticité des cellules satellites vers un potentiel mésenchymateux qui est associée à un devenir fibrogénique et à une perte du potentiel myogénique (Pessina et al. 2015). Cependant, cette transition mésenchymateuse est limitée puisque nous avons trouvé

peu de cellules satellites exprimant le marqueur mésenchymateux PDGFR α dans les muscles DMD. Les facteurs induisant le potentiel fibrogénique des MPs DMD sont à découvrir. Pour l'instant, nous envisageons trois pistes. La première concerne l'influence des nombreux cycles de divisions cellulaires que les MPs DMD subissent dans le muscle dystrophique. L'hypothèse est que le devenir fibrogénique des cellules serait une conséquence du vieillissement programmé. La deuxième piste qui pourrait expliquer l'acquisition du potentiel fibrogénique des MPs DMD serait liée à l'absence de dystrophine récemment découverte dans les MPs en prolifération (Dumont et al. 2015). Nous pouvons spéculer que le manque d'expression de la dystrophine modifierait le phénotype des MPs dans un environnement régénératif. Enfin, l'environnement inflammatoire chronique des muscles squelettiques dystrophiques pourrait également avoir un rôle dans la plasticité fibrogénique des MPs DMD. La contribution des MPs DMD dans la fibrose des muscles dystrophiques pourrait être faible puisque seulement 2% des cellules musculaires de souris *mdx* exprimant le collagène expriment aussi le marqueur myogénique α 7-integrin (Pessina et al. 2015). Néanmoins, ce résultat n'exclut pas que les cellules exprimant le collagène puissent provenir d'un lignage myogénique qui aurait perdu l'expression de ses marqueurs myogéniques. De plus, cette observation doit être vérifiée dans les muscles dystrophiques chez l'homme.

Dans l'hypothèse que les MPs DMD participent faiblement à la fibrose des muscles dystrophiques, les FAPs restent la principale source des dépôts fibrotiques observés dans les muscles DMD.

2. Participation du lignage fibro-adipogénique humain dans la régénération musculaire

L'activité des FAPs murins est régulée par le lignage myogénique aussi bien que par les cytokines sécrétées par les cellules de l'immunité innée. En retour, les FAPs contrôlent la prolifération et la différenciation des cellules satellites pour supporter le processus régénératif. Dans les muscles de souris dystrophiques, les interactions cellulaires entre les FAPs et les MPs sont perturbées. Un tel réseau de régulation n'a pas encore été identifié chez l'homme.

		Effets sur :								
		FAPs			MPs		macrophages			
Interactions cellulaires		prolifération	adipogenèse	fibrogenèse	prolifération	myogenèse	prolifération	phagocytose	inflammation	
Effets de :	FAPs	FAPs en prolifération				-	+	?	?	?
		adipocytes FAPs				?	+	?	?	?
		myofibroblastes FAPs				?	?	?	?	?
	MPs	MPs en prolifération	+	0	0			?	?	?
		myotubes MPs	?	-	+			?	?	?
	macrophages	macrophages M1	?	-	+	+	-			
macrophages M2		?	0	+	0	+				

Tableau 6. Interactions cellulaires entre FAPs, MPs et macrophages humains chez les donneurs jeunes et sains. Les actions peuvent être une stimulation (+), une inhibition (-), ou une absence d'effet (0). Les interactions inconnues sont représentées par un point d'interrogation (?). Les effets des macrophages sur les MPs (en rouge) ont été démontrés *in vitro* et *in vivo* par une autre équipe (Bencze et al. 2012). Tous les autres effets ont été démontrés par mes travaux de thèse.

2. 1. Importance du « ménage à trois » FAPs/MPs/macrophages : particularités de l'espèce humaine

Nous avons découvert que les MPs et les macrophages peuvent interagir avec les FAPs issus de muscles de patients sains âgés de moins de trente ans (patients jeunes). Ces interactions cellulaires sont détaillées dans le **tableau 6**. Notamment, nous avons démontré que les facteurs sécrétés par les FAPs en prolifération inhibent l'expansion des MPs et que l'adipogenèse des FAPs est diminuée par des molécules solubles produites par les myotubes. Ces résultats contredisent ceux obtenus avec les cellules murines : les FAPs de souris activent l'expansion des cellules satellites quiescentes (Fiore et al. 2016) puis favorisent la différenciation des MPs sans affecter leur prolifération (Joe et al. 2010), et les myotubes de souris inhibent la différenciation des FAPs en adipocytes en interagissant physiquement avec eux (Uezumi et al. 2010). Chez la souris, une étude montre que les macrophages pro-inflammatoires sécrètent des molécules TNF α pour induire la clairance des FAPs de souris en déclenchant le processus apoptotique (Lemos et al. 2015). Or, nous avons trouvé que le milieu conditionné de macrophages M1 humains diminue l'adipogenèse des FAPs humains sans affecter la survie des cellules. La confrontation de nos données sur les interactions cellulaires FAPs/MPs/macrophages avec celles obtenues chez la souris suggère des disparités entre les espèces.

Nous pourrions compléter ces travaux en étudiant les effets des myofibroblastes et des adipocytes FAPs sur la prolifération et la différenciation des MPs, ainsi que le contrôle de la prolifération des FAPs par les myotubes. L'étude de la régulation de la prolifération et des fonctions des macrophages M1 et M2 par les FAPs et les MPs serait également intéressante. D'ailleurs, des interactions cellulaires entre macrophages et progéniteurs adipogéniques du tissu adipeux ont été détectées (Sorisky, Molgat, and Gagnon 2013). Ces résultats *in vitro* pourraient être vérifiés dans un contexte plus physiologique où les FAPs et les MPs humains seraient injectés seuls ou co-injectés dans des muscles de souris immunodéficientes pour éviter le rejet des transplantations. Les FAPs humains seraient préalablement modifiés *in vitro* pour exprimer la GFP afin de détecter et d'identifier *in situ* les cellules générées à partir du lignage fibro-adipogénique humain. Trois types de modèle de blessure des muscles de souris pourraient être employés. Le premier modèle implique la cryoblessure des muscles TA qui induit un processus de régénération musculaire similaire à un dommage physiologique et est donc favorable à la myogenèse. Le modèle de blessure par injection intramusculaire de glycérol,

décrit par notre équipe (Pisani, Bottema, et al. 2010), permet de générer un environnement régénératif favorisant la formation d'adipocytes intramusculaires sur le long terme. Le dernier modèle est celui de la scarification des muscles TA qui favorise le développement des dépôts fibrotiques intramusculaires sur le long terme. Le premier modèle serait utilisé pour mesurer la myogénèse des MPs humains, le second permettrait d'évaluer l'adipogénèse des FAPs humains, et le troisième servirait à analyser la fibrogenèse des FAPs humains.

Le modèle de régulation des FAPs par les MPs humains et sains est perturbé pour les progéniteurs extraits à partir de muscles de donneurs âgés. Pour les progéniteurs âgés, les MPs ne contrôlent ni la prolifération ni la différenciation fibro-adipogénique des FAPs. Le vieillissement des MPs mais pas des FAPs est la cause de cette absence de régulation puisque les FAPs âgés répondent aux stimuli des MPs sains. Ce résultat coïncide avec le déclin fonctionnel des cellules satellites décrit dans les muscles sarcopéniques (Sousa-Victor and Muñoz-Cánoves 2016, Sousa-Victor et al. 2015). Par conséquent, l'absence d'interaction liée à l'âge entre les FAPs et les MPs serait à l'origine des dépôts fibro-adipogéniques observés dans les muscles âgés.

Le modèle d'interaction entre les FAPs et les MPs de muscles sains est partiellement modifié pour les progéniteurs DMD. En effet, les MPs DMD ont perdu leur capacité pro-mitotique et pro-fibrogénique sur les FAPs DMD. Les mutations sur le gène *DMD*, concernant uniquement le lignage myogénique, pourraient induire des changements dans les facteurs sécrétés par les MPs en prolifération et les myotubes. Les effets indirects de l'absence de la dystrophine, comme l'induction chronique de la réponse inflammatoire, pourraient également altérer les propriétés intrinsèques des MPs DMD. Les MPs sains restaurent une forte stimulation de la fibrogenèse des FAPs DMD mais en agissant sur d'autres voies de signalisation que celles activées dans les FAPs sains. Comme la dystrophine n'est pas exprimée dans les FAPs, nous pouvons spéculer que l'environnement dystrophique modifie les propriétés fonctionnelles des FAPs DMD. Cependant, l'action pro-myogénique des FAPs sur les MPs et l'action anti-adipogénique des myotubes sur les FAPs sont préservées pour les progéniteurs DMD. Ces résultats suggèrent que ces modifications particulières des interactions FAPs/MPs de patients DMD peuvent être comprises comme une adaptation aux caractéristiques pathologiques des muscles DMD. Les FAPs sont très abondants dans les muscles DMD (Uezumi et al. 2014). La stimulation de la prolifération des FAPs DMD pourrait comprendre d'autres signaux que ceux provenant des MPs DMD. De même, l'excès de fibrose dans les muscles DMD impliquerait la stimulation de la fibrogenèse des FAPs DMD induite par le microenvironnement dystrophique

mais pas par des facteurs produits par le lignage myogénique. Par exemple, l'augmentation de l'activation de la signalisation TGF β dans les muscles DMD pourrait favoriser la fibrogenèse des FAPs (Pessina et al. 2015). L'action anti-adipogénique des MPs sur les FAPs n'est pas altérée avec les cellules DMD. Nous pouvons supposer que c'est pour limiter l'accumulation d'adipocytes dans les muscles DMD. La formation de ces adipocytes serait induite par d'autres signaux que ceux des myotubes. Enfin, nous avons montré que la régulation des MPs par les FAPs est identique pour les progéniteurs DMD et sains.

2. 2. Les facteurs impliqués dans ce « ménage à trois » : cibles thérapeutiques potentielles

Les interactions cellulaires entre les FAPs et les MPs nécessitent l'action de molécules solubles sécrétées. La première stratégie employée pour identifier ces facteurs a été d'étudier les effets de l'inhibition des voies de signalisation décrites pour être impliquées dans le processus de régénération musculaire. La seconde stratégie a été de mesurer, dans les co-cultures FAPs/MPs, les expressions des transcrits de nombreux facteurs connus pour contrôler la myogenèse, l'adipogenèse et/ou la fibrogenèse. Cependant, cette dernière méthode possède ses limites. Nous pouvons passer à côté de facteurs, dont les expressions ne sont pas modifiées dans les co-cultures, qui pourraient être impliqués dans les interactions FAPs/MPs. De plus, l'expression des ARNm (ARN messenger) ne reflète pas forcément l'expression de la protéine synthétisée par la cellule et la protéine sécrétée dans le milieu de culture.

Les facteurs produits par les MPs en prolifération sur-activent la signalisation PI3K/Akt (phosphatidylinositol-3 kinase/Akt) dans les FAPs humains pour stimuler leur prolifération. PDGF-AA est capable de stimuler la prolifération des FAPs souris en induisant la voie PI3K/Akt (Uezumi et al. 2014). PDGF-AA pourrait être un des facteurs sécrétés par les myotubes qui aurait un rôle pro-mitotique sur les FAPs humains.

Les facteurs sécrétés par les myotubes sains inhibent l'adipogenèse et stimulent la fibrogenèse des FAPs sains en activant la voie de signalisation TGF β /Smad2 dans les FAPs. Les ligands de la superfamille de TGF β se lient aux récepteurs de type I et II à domaines sérine/thréonine kinases présents sur la surface des cellules pour former un complexe hétérodimérique (Tsuchida et al. 2008). Plusieurs récepteurs de type I, ALKs, existent dont : ALK5 sur lequel se lient les TGF β s et la myostatine, ALK4 sur lequel se lient les activines et

GDF11. ALK4 et ALK5 ont des structures et des fonctions proches, et peuvent activer les Smad2 et Smad3. Les protéines Smads se fixent au co-médiateur Smad4 et ce complexe Smad migre dans le noyau pour activer la transcription des gènes cibles. Nous avons exclu l'importance de TGF β et de l'activine dans l'inhibition de l'adipogenèse et la stimulation de la fibrogenèse des FAPs par les myotubes. Par contre, nous n'avons pas encore investigué les rôles de la myostatine et de GDF11 dans la régulation des FAPs par les myotubes. La myostatine est un inhibiteur endogène de la croissance musculaire et de la différenciation des myoblastes (Carnac, Vernus, and Bonniou 2007). Elle est exprimée à la fois dans les cellules satellites (McKay et al. 2012) et dans les myofibres en régénération (Zhu et al. 2007). De manière intéressante, comme TGF β 1, la myostatine peut induire la différenciation des FAPs souris en myofibroblastes et inhiber leur adipogenèse (Dong et al. 2016) La myostatine et GDF11 présentent 89% d'homologie dans leur séquence protéique. Comme ces deux facteurs activent la même cascade de signalisation, GDF11 et la myostatine partagent essentiellement les mêmes gènes cibles (Egerman et al. 2015). Il n'est donc pas surprenant que GDF11 inhibe également la myogenèse des myoblastes et la croissance musculaire. Des travaux publiés récemment relatent une régulation de l'adipogenèse et de la fibrogenèse par GDF11. GDF11 inhibe l'adipogenèse des cellules souches mésenchymateuses humaines (Zhang, Shao, et al. 2015). L'injection intrapéritonéale de GDF11 dans des souris *mdx* stimule la formation de dépôts fibrotiques intramusculaires (Rinaldi et al. 2016). Ensemble, ces études supportent l'hypothèse d'une possible régulation de la différenciation des FAPs humains sains par la myostatine et/ou GDF11 produits par les myotubes.

Nous avons démontré que l'expression de *GLI1* est stimulée par la voie TGF β en même temps que la fibrogenèse des FAPs humains sains par les myotubes. De plus, l'expression de *GLI1* contrôle la sécrétion par les myotubes des facteurs anti-adipogéniques. *GLI1* est un facteur de transcription impliqué dans l'induction de la voie Hedgehog (Robbins, Fei, and Riobo 2012) et a aussi été démontré comme étant un effecteur de signalisation Smad (Dennler et al. 2007). Nos données sont en accord avec la littérature montrant que la signalisation Hedgehog est stimulée dans les muscles de souris endommagés (Piccioni et al. 2014, Straface et al. 2009) et que son inhibition altère la régénération musculaire (Piccioni et al. 2014). Nous pourrions alors suspecter un rôle des facteurs de la voie Hedgehog, tels que *Shh*, dans la régulation de la différenciation des FAPs par les myotubes. Malheureusement, cette hypothèse est très peu probable puisque la surexpression de *Shh* dans les muscles de souris dystrophiques a diminué la fibrose intramusculaire (Piccioni et al. 2014).

Les expressions de TNF α et TGF β sont augmentées dans les co-cultures suggérant qu'une quantité élevée de ces facteurs pourrait être libérée dans le milieu des co-cultures et réguler les interactions cellulaires FAPs/MPs. Néanmoins, nous avons montré que TNF α et TGF β ne sont pas impliqués dans le contrôle de la différenciation des FAPs humains sains par les myotubes. TNF α , comme TGF β 1, sont connus pour inhiber la différenciation myogénique au cours de la régénération musculaire excluant aussi la participation de ces facteurs dans la régulation de la différenciation myogénique des MPs par les FAPs (Zhao et al. 2015, Langen et al. 2001, Massagué et al. 1986).

L'IL-8 est surexprimée dans les co-cultures. Ce facteur est fortement exprimé dans les muscles squelettiques humains après un exercice physique (Akerstrom et al. 2005). Une étude récente montre que l'IL-8 est sécrétée dans le milieu de culture de cellules musculaires squelettiques humaines (Trayhurn, Drevon, and Eckel 2011). Cependant, l'IL-8 ne module pas l'adipogenèse des pré-adipocytes des tissus adipeux sous-cutanés (Couturier et al. 2012). Avant d'examiner le rôle potentiel de l'IL-8 dans la régulation de la différenciation des FAPs, il serait important d'étudier l'effet de l'IL-8 sur l'adipogenèse et la fibrogenèse des FAPs. Le traitement de myoblastes humains par l'IL-8 augmente le nombre de myotubes formés *in vitro* (Polesskaya et al. 2016). Ce facteur pourrait être sécrété par les FAPs pour stimuler la myogenèse des MPs humains sains, d'autant plus que l'IL-8 est connue pour être produite par les pré-adipocytes isolés à partir du tissu adipeux sous-cutané humain (Gao, Trayhurn, and Bing 2013).

L'expression d'IGF-2 est aussi augmentée dans les co-cultures mais son rôle dans l'inhibition de la différenciation adipogénique des FAPs n'a pas été étudié car les facteurs IGFs sont connus pour être pro-adipogéniques (Ali et al. 2013). Par contre, IGF-1 joue un rôle très important dans la régénération des muscles squelettiques puisqu'il stimule à la fois la prolifération et la différenciation des cellules musculaires (Engert, Berglund, and Rosenthal 1996). Il induit notamment l'hypertrophie musculaire en augmentant la taille des myotubes (Adams and McCue 1998), phénomène aussi observé dans les co-cultures FAPs/MPs. L'expression d'IGF-2 suit celle d'IGF-1 au cours de la réparation musculaire et est corrélée avec la formation des myotubes (Hayashi et al. 2004, Levinovitz et al. 1992). Comme IGF-1 et IGF-2 sont sécrétés par les pré-adipocytes et les adipocytes du tissu adipeux sous-cutané (Gude et al. 2012, Wabitsch et al. 2000), ces facteurs pourraient aussi être produits par les cellules du lignage fibro-adipogénique musculaire pour stimuler la myogenèse des MPs en augmentant la taille des myotubes.

Enfin, l'expression de MCP-1 est stimulée dans les co-cultures FAPs/MPs. MCP-1 est une chémokine et son rôle est de recruter les monocytes et les lymphocytes T dans les tissus

(Qin et al. 1996, Baggiolini, Dewald, and Moser 1994). L'expression des transcrits de ce facteur est augmentée dans les muscles d'hommes jeunes après un exercice excentrique répété (Hubal et al. 2008). Il a été montré que MCP-1 n'a aucun effet sur l'adipogenèse de la lignée cellulaire 3T3-L1 (Hammarstedt et al. 2007). Par contre, les pré-adipocytes et les adipocytes du tissu adipeux sous-cutané humain sécrètent la protéine MCP-1 (Gao, Trayhurn, and Bing 2013, Ignacio et al. 2016). A ma connaissance, aucune donnée n'a reporté un rôle de cette chémokine sur la myogenèse des myoblastes. MCP-1 pourrait être un candidat sécrété par le lignage fibro-adipogénique pour stimuler la différenciation myogénique des MPs humains.

Pour continuer l'identification des molécules solubles qui contrôlent les interactions cellulaires FAPs/MPs/macrophages, nous pouvons envisager un criblage global. Les sécrétomes des milieux conditionnés des différentes populations cellulaires seraient analysés à l'aide de puces commerciales contenant des anticorps dirigés contre des cytokines, des facteurs de croissance et des médiateurs de l'inflammation. Pour diminuer le nombre de candidats, des analyses comparatives pourraient ensuite être réalisées. Comme les myotubes mais pas les MPs indifférenciés régulent la différenciation des FAPs, nous pourrions confronter le sécrétome des MPs à celui des myotubes. De la même manière, puisque les myotubes âgés ou DMD régulent différemment la fibro-adipogenèse des FAPs, leurs sécrétomes pourraient être comparés à celui des myotubes sains. Et comme les macrophages M1 et les macrophages M2 ont des effets différents sur l'adipogenèse des FAPs, leurs sécrétomes pourraient également être confrontés. Les candidats issus de ces analyses globales et comparatives seraient ensuite validés *in vitro* en les neutralisant à l'aide d'anticorps spécifiques dans les milieux conditionnés. Pour les facteurs dont aucun anticorps neutralisant n'est disponible, leurs expressions pourraient être réprimées par des siARN (small interfering ARN) dans les cellules sécrétrices.

Pour conclure, cette étude montre que la régénération musculaire, sous des conditions physiologiques ou pathologiques, ne doit pas être étudiée uniquement pour son côté myogénèse. En effet, nous avons montré que les progéniteurs myogéniques interagissent avec des partenaires cellulaires dont les FAPs et les macrophages. L'altération de ces interactions pourrait affecter l'homéostasie tissulaire notamment en induisant le développement de tissus non myogéniques dans les muscles squelettiques en régénération.

L'établissement du mécanisme moléculaire des interactions cellulaires FAPs/MPs/macrophages pourrait fournir des cibles pour diminuer les infiltrations graisseuses

et fibrotiques dans les muscles des patients DMD ou d'individus âgés. L'efficacité des thérapies cellulaires impliquant la transplantation de myoblastes fonctionnels ou d'autres cellules souches musculaires à potentiel myogénique est limitée par la formation de ces dépôts fibro-adipogéniques. Nos résultats permettent d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques dont le but serait de restaurer des interactions normales entre les FAPs, les MPs et les macrophages dans les muscles pathologiques.

REFERENCES

- Abmayr, S. M., and G. K. Pavlath. 2012. "Myoblast fusion: lessons from flies and mice." *Development* 139 (4):641-56. doi: 10.1242/dev.068353.
- Abou-Khalil, R., R. Mounier, and B. Chazaud. 2010. "Regulation of myogenic stem cell behavior by vessel cells: the "ménage à trois" of satellite cells, periendothelial cells and endothelial cells." *Cell Cycle* 9 (5):892-6. doi: 10.4161/cc.9.5.10851.
- Adams, G. R., and S. A. McCue. 1998. "Localized infusion of IGF-I results in skeletal muscle hypertrophy in rats." *J Appl Physiol (1985)* 84 (5):1716-22.
- Akerstrom, T., A. Steensberg, P. Keller, C. Keller, M. Penkowa, and B. K. Pedersen. 2005. "Exercise induces interleukin-8 expression in human skeletal muscle." *J Physiol* 563 (Pt 2):507-16. doi: 10.1113/jphysiol.2004.077610.
- Alderton, J. M., and R. A. Steinhardt. 2000. "Calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes." *J Biol Chem* 275 (13):9452-60.
- Alfaro, L. A., S. A. Dick, A. L. Siegel, A. S. Anonuevo, K. M. McNagny, L. A. Megeney, D. D. Cornelison, and F. M. Rossi. 2011. "CD34 promotes satellite cell motility and entry into proliferation to facilitate efficient skeletal muscle regeneration." *Stem Cells* 29 (12):2030-41. doi: 10.1002/stem.759.
- Ali, A. T., W. E. Hochfeld, R. Myburgh, and M. S. Pepper. 2013. "Adipocyte and adipogenesis." *Eur J Cell Biol* 92 (6-7):229-36. doi: 10.1016/j.ejcb.2013.06.001.
- Allen, R. E., M. V. Dodson, L. S. Luiten, and L. K. Boxhorn. 1985. "A serum-free medium that supports the growth of cultured skeletal muscle satellite cells." *In Vitro Cell Dev Biol* 21 (11):636-40.
- Almind, K., M. Manieri, W. I. Sivitz, S. Cinti, and C. R. Kahn. 2007. "Ectopic brown adipose tissue in muscle provides a mechanism for differences in risk of metabolic syndrome in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (7):2366-71. doi: 10.1073/pnas.0610416104.
- Amthor, H., B. Christ, and K. Patel. 1999. "A molecular mechanism enabling continuous embryonic muscle growth - a balance between proliferation and differentiation." *Development* 126 (5):1041-53.
- Amthor, H., B. Christ, F. Rashid-Doubell, C. F. Kemp, E. Lang, and K. Patel. 2002. "Follistatin regulates bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) activity to stimulate embryonic muscle growth." *Dev Biol* 243 (1):115-27. doi: 10.1006/dbio.2001.0555.

- Andrés, V., and K. Walsh. 1996. "Myogenin expression, cell cycle withdrawal, and phenotypic differentiation are temporally separable events that precede cell fusion upon myogenesis." *J Cell Biol* 132 (4):657-66.
- Angelini, C., S. Di Mauro, and A. Margreth. 1968. "Relationship of serum enzyme changes to muscle damage in vitamin E deficiency of the rabbit." *Sperimentale* 118 (5):349-69.
- Armstrong, R. B. 1986. "Muscle damage and endurance events." *Sports Med* 3 (5):370-81.
- Armstrong, R. B., R. W. Ogilvie, and J. A. Schwane. 1983. "Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle." *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 54 (1):80-93.
- Arnold, L., A. Henry, F. Poron, Y. Baba-Amer, N. van Rooijen, A. Plonquet, R. K. Gherardi, and B. Chazaud. 2007. "Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis." *J Exp Med* 204 (5):1057-69. doi: 10.1084/jem.20070075.
- Arrighi, N., C. Moratal, N. Clément, S. Giorgetti-Peraldi, P. Peraldi, A. Loubat, J. Y. Kurzenne, C. Dani, A. Chopard, and C. A. Dechesne. 2015. "Characterization of adipocytes derived from fibro/adipogenic progenitors resident in human skeletal muscle." *Cell Death Dis* 6:e1733. doi: 10.1038/cddis.2015.79.
- Asakura, A., M. Komaki, and M. Rudnicki. 2001. "Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation." *Differentiation* 68 (4-5):245-53.
- Asakura, A., P. Seale, A. Girgis-Gabardo, and M. A. Rudnicki. 2002. "Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle." *J Cell Biol* 159 (1):123-34. doi: 10.1083/jcb.200202092.
- Auffray, C., D. Fogg, M. Garfa, G. Elain, O. Join-Lambert, S. Kayal, S. Sarnacki, A. Cumano, G. Lauvau, and F. Geissmann. 2007. "Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior." *Science* 317 (5838):666-70. doi: 10.1126/science.1142883.
- Bachrach, E., S. Li, A. L. Perez, J. Schienda, K. Liadaki, J. Volinski, A. Flint, J. Chamberlain, and L. M. Kunkel. 2004. "Systemic delivery of human microdystrophin to regenerating mouse dystrophic muscle by muscle progenitor cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (10):3581-6. doi: 10.1073/pnas.0400373101.
- Baggiolini, M., B. Dewald, and B. Moser. 1994. "Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-

- CXC and CC chemokines." *Adv Immunol* 55:97-179.
- Baj, A., A. A. Bettaccini, R. Casalone, A. Sala, P. Cherubino, and A. Q. Toniolo. 2005. "Culture of skeletal myoblasts from human donors aged over 40 years: dynamics of cell growth and expression of differentiation markers." *J Transl Med* 3 (1):21. doi: 10.1186/1479-5876-3-21.
- Bajard, L., F. Relaix, M. Lagha, D. Rocancourt, P. Daubas, and M. E. Buckingham. 2006. "A novel genetic hierarchy functions during hypaxial myogenesis: Pax3 directly activates Myf5 in muscle progenitor cells in the limb." *Genes Dev* 20 (17):2450-64. doi: 10.1101/gad.382806.
- Baker, D. J., T. Wijshake, T. Tchkonja, N. K. LeBrasseur, B. G. Childs, B. van de Sluis, J. L. Kirkland, and J. M. van Deursen. 2011. "Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders." *Nature* 479 (7372):232-6. doi: 10.1038/nature10600.
- Bankolé, L. C., L. Feasson, E. Ponsot, and F. Kadi. 2013. "Fibre type-specific satellite cell content in two models of muscle disease." *Histopathology* 63 (6):826-32. doi: 10.1111/his.12231.
- Bansal, D., K. Miyake, S. S. Vogel, S. Groh, C. C. Chen, R. Williamson, P. L. McNeil, and K. P. Campbell. 2003. "Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy." *Nature* 423 (6936):168-72. doi: 10.1038/nature01573.
- Barba, M., C. Cicione, C. Bernardini, F. Michetti, and W. Lattanzi. 2013. "Adipose-derived mesenchymal cells for bone regeneration: state of the art." *Biomed Res Int* 2013:416391. doi: 10.1155/2013/416391.
- Barberi, T., M. Bradbury, Z. Dincer, G. Panagiotakos, N. D. Socci, and L. Studer. 2007. "Derivation of engraftable skeletal myoblasts from human embryonic stem cells." *Nat Med* 13 (5):642-8. doi: 10.1038/nm1533.
- Barberi, T., L. M. Willis, N. D. Socci, and L. Studer. 2005. "Derivation of multipotent mesenchymal precursors from human embryonic stem cells." *PLoS Med* 2 (6):e161. doi: 10.1371/journal.pmed.0020161.
- Barns, M., C. Gondro, R. L. Tellam, H. G. Radley-Crabb, M. D. Grounds, and T. Shavlakadze. 2014. "Molecular analyses provide insight into mechanisms underlying sarcopenia and myofibre denervation in old skeletal muscles of mice." *Int J Biochem Cell Biol* 53:174-85. doi: 10.1016/j.biocel.2014.04.025.

- Beauchamp, J. R., L. Heslop, D. S. Yu, S. Tajbakhsh, R. G. Kelly, A. Wernig, M. E. Buckingham, T. A. Partridge, and P. S. Zammit. 2000. "Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells." *J Cell Biol* 151 (6):1221-34.
- Benabdallah, B. F., M. Bouchentouf, J. Rousseau, and J. P. Tremblay. 2009. "Overexpression of follistatin in human myoblasts increases their proliferation and differentiation, and improves the graft success in SCID mice." *Cell Transplant* 18 (7):709-18. doi: 10.3727/096368909X470865.
- Benchaouir, R., M. Meregalli, A. Farini, G. D'Antona, M. Belicchi, A. Goyenvalle, M. Battistelli, N. Bresolin, R. Bottinelli, L. Garcia, and Y. Torrente. 2007. "Restoration of human dystrophin following transplantation of exon-skipping-engineered DMD patient stem cells into dystrophic mice." *Cell Stem Cell* 1 (6):646-57. doi: 10.1016/j.stem.2007.09.016.
- Bencze, M., E. Negroni, D. Vallese, H. Yacoub-Youssef, S. Chaouch, A. Wolff, A. Aamiri, J. P. Di Santo, B. Chazaud, G. Butler-Browne, W. Savino, V. Mouly, and I. Riederer. 2012. "Proinflammatory macrophages enhance the regenerative capacity of human myoblasts by modifying their kinetics of proliferation and differentiation." *Mol Ther* 20 (11):2168-79. doi: 10.1038/mt.2012.189.
- Bentzinger, C. F., Y. X. Wang, N. A. Dumont, and M. A. Rudnicki. 2013. "Cellular dynamics in the muscle satellite cell niche." *EMBO Rep* 14 (12):1062-72. doi: 10.1038/embor.2013.182.
- Bergen, H. R., J. N. Farr, P. M. Vanderboom, E. J. Atkinson, T. A. White, R. J. Singh, S. Khosla, and N. K. LeBrasseur. 2015. "Myostatin as a mediator of sarcopenia versus homeostatic regulator of muscle mass: insights using a new mass spectrometry-based assay." *Skelet Muscle* 5:21. doi: 10.1186/s13395-015-0047-5.
- Bergstrom, D. A., B. H. Penn, A. Strand, R. L. Perry, M. A. Rudnicki, and S. J. Tapscott. 2002. "Promoter-specific regulation of MyoD binding and signal transduction cooperate to pattern gene expression." *Mol Cell* 9 (3):587-600.
- Bernet, J. D., J. D. Doles, J. K. Hall, K. Kelly Tanaka, T. A. Carter, and B. B. Olwin. 2014. "p38 MAPK signaling underlies a cell-autonomous loss of stem cell self-renewal in skeletal muscle of aged mice." *Nat Med* 20 (3):265-71. doi: 10.1038/nm.3465.
- Besson, V., P. Smeriglio, A. Wegener, F. Relaix, B. Nait Oumesmar, D. A. Sassoon, and G. Marazzi. 2011. "PW1 gene/paternally expressed gene 3 (PW1/Peg3) identifies multiple

- adult stem and progenitor cell populations." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (28):11470-5. doi: 10.1073/pnas.1103873108.
- Bhagavati, S., and W. Xu. 2005. "Generation of skeletal muscle from transplanted embryonic stem cells in dystrophic mice." *Biochem Biophys Res Commun* 333 (2):644-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.05.135.
- Bigot, A., W. J. Duddy, Z. G. Ouandaogo, E. Negroni, V. Mariot, S. Ghimbovschi, B. Harmon, A. Wielgosik, C. Loiseau, J. Devaney, J. Dumonceaux, G. Butler-Browne, V. Mouly, and S. Duguez. 2015. "Age-Associated Methylation Suppresses SPRY1, Leading to a Failure of Re-quiescence and Loss of the Reserve Stem Cell Pool in Elderly Muscle." *Cell Rep* 13 (6):1172-82. doi: 10.1016/j.celrep.2015.09.067.
- Birbrair, A., T. Zhang, Z. M. Wang, M. L. Messi, G. N. Enikolopov, A. Mintz, and O. Delbono. 2013a. "Role of pericytes in skeletal muscle regeneration and fat accumulation." *Stem Cells Dev* 22 (16):2298-314. doi: 10.1089/scd.2012.0647.
- Birbrair, A., T. Zhang, Z. M. Wang, M. L. Messi, G. N. Enikolopov, A. Mintz, and O. Delbono. 2013b. "Skeletal muscle pericyte subtypes differ in their differentiation potential." *Stem Cell Res* 10 (1):67-84. doi: 10.1016/j.scr.2012.09.003.
- Birbrair, A., T. Zhang, Z. M. Wang, M. L. Messi, A. Mintz, and O. Delbono. 2013. "Type-1 pericytes participate in fibrous tissue deposition in aged skeletal muscle." *Am J Physiol Cell Physiol* 305 (11):C1098-113. doi: 10.1152/ajpcell.00171.2013.
- Birbrair, A., T. Zhang, Z. M. Wang, M. L. Messi, A. Mintz, and O. Delbono. 2014. "Pericytes: multitasking cells in the regeneration of injured, diseased, and aged skeletal muscle." *Front Aging Neurosci* 6:245. doi: 10.3389/fnagi.2014.00245.
- Biressi, S., E. H. Miyabara, S. D. Gopinath, P. M. Carlig, and T. A. Rando. 2014. "A Wnt-TGFβ2 axis induces a fibrogenic program in muscle stem cells from dystrophic mice." *Sci Transl Med* 6 (267):267ra176. doi: 10.1126/scitranslmed.3008411.
- Biressi, S., M. Molinaro, and G. Cossu. 2007. "Cellular heterogeneity during vertebrate skeletal muscle development." *Dev Biol* 308 (2):281-93. doi: 10.1016/j.ydbio.2007.06.006.
- Biressi, S., E. Tagliafico, G. Lamorte, S. Monteverde, E. Tenedini, E. Roncaglia, S. Ferrari, M. G. Cusella-De Angelis, S. Tajbakhsh, and G. Cossu. 2007. "Intrinsic phenotypic diversity of embryonic and fetal myoblasts is revealed by genome-wide gene expression analysis on purified cells." *Dev Biol* 304 (2):633-51. doi: 10.1016/j.ydbio.2007.01.016.

- Bischoff, R. 1986. "Proliferation of muscle satellite cells on intact myofibers in culture." *Dev Biol* 115 (1):129-39.
- Biswas, A. A., and D. J. Goldhamer. 2016. "FACS Fractionation and Differentiation of Skeletal-Muscle Resident Multipotent Tie2+ Progenitors." *Methods Mol Biol* 1460:255-67. doi: 10.1007/978-1-4939-3810-0_18.
- Biswas, S. K., and A. Mantovani. 2010. "Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm." *Nat Immunol* 11 (10):889-96. doi: 10.1038/ni.1937.
- Bizario, J. C., D. G. Cerri, L. C. Rodrigues, G. L. Oliveira, A. Nomizo, D. D. de Araujo, P. S. Fukuhara, J. C. Ribeiro, F. A. de Castro, and M. C. Costa. 2009. "Imatinib mesylate ameliorates the dystrophic phenotype in exercised mdx mice." *J Neuroimmunol* 212 (1-2):93-101. doi: 10.1016/j.jneuroim.2009.05.006.
- Bladt, F., D. Riethmacher, S. Isenmann, A. Aguzzi, and C. Birchmeier. 1995. "Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud." *Nature* 376 (6543):768-71. doi: 10.1038/376768a0.
- Blain, M., Y. Zeng, M. Bendjelloul, P. L. Hallauer, A. Kumar, K. E. Hastings, G. Karpati, B. Massie, and R. Gilbert. 2010. "Strong muscle-specific regulatory cassettes based on multiple copies of the human slow troponin I gene upstream enhancer." *Hum Gene Ther* 21 (1):127-34. doi: 10.1089/hum.2008.208.
- Blais, A., M. Tsikitis, D. Acosta-Alvear, R. Sharan, Y. Kluger, and B. D. Dynlacht. 2005. "An initial blueprint for myogenic differentiation." *Genes Dev* 19 (5):553-69. doi: 10.1101/gad.1281105.
- Blau, H. M., C. Webster, and G. K. Pavlath. 1983. "Defective myoblasts identified in Duchenne muscular dystrophy." *Proc Natl Acad Sci U S A* 80 (15):4856-60.
- Boettcher, M., J. Machann, N. Stefan, C. Thamer, H. U. Häring, C. D. Claussen, A. Fritsche, and F. Schick. 2009. "Intermuscular adipose tissue (IMAT): association with other adipose tissue compartments and insulin sensitivity." *J Magn Reson Imaging* 29 (6):1340-5. doi: 10.1002/jmri.21754.
- Bokhoven, M., S. L. Stephen, S. Knight, E. F. Gevers, I. C. Robinson, Y. Takeuchi, and M. K. Collins. 2009. "Insertional gene activation by lentiviral and gammaretroviral vectors." *J Virol* 83 (1):283-94. doi: 10.1128/JVI.01865-08.
- Boldrin, L., P. S. Zammit, and J. E. Morgan. 2015. "Satellite cells from dystrophic muscle retain

- regenerative capacity." *Stem Cell Res* 14 (1):20-9. doi: 10.1016/j.scr.2014.10.007.
- Bonfanti, C., G. Rossi, F. S. Tedesco, M. Giannotta, S. Benedetti, R. Tonlorenzi, S. Antonini, G. Marazzi, E. Dejana, D. Sassoon, G. Cossu, and G. Messina. 2015. "PW1/Peg3 expression regulates key properties that determine mesoangioblast stem cell competence." *Nat Commun* 6:6364. doi: 10.1038/ncomms7364.
- Bonner, J. C. 2004. "Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases." *Cytokine Growth Factor Rev* 15 (4):255-73. doi: 10.1016/j.cytogfr.2004.03.006.
- Bonnaud, P., P. J. Margetts, K. Ask, K. Flanders, J. Gaultie, and M. Kolb. 2005. "TGF-beta and Smad3 signaling link inflammation to chronic fibrogenesis." *J Immunol* 175 (8):5390-5.
- Bortoli, S., V. Renault, E. Eveno, C. Auffray, G. Butler-Browne, and G. Piétu. 2003. "Gene expression profiling of human satellite cells during muscular aging using cDNA arrays." *Gene* 321:145-54.
- Borycki, A. G., B. Brunk, S. Tajbakhsh, M. Buckingham, C. Chiang, and C. P. Emerson. 1999. "Sonic hedgehog controls epaxial muscle determination through Myf5 activation." *Development* 126 (18):4053-63.
- Bosurgi, L., G. Corna, M. Vezzoli, T. Touvier, G. Cossu, A. A. Manfredi, S. Brunelli, and P. Rovere-Querini. 2012. "Transplanted mesoangioblasts require macrophage IL-10 for survival in a mouse model of muscle injury." *J Immunol* 188 (12):6267-77. doi: 10.4049/jimmunol.1102680.
- Bouchentouf, M., B. F. Benabdallah, and J. P. Tremblay. 2004. "Myoblast survival enhancement and transplantation success improvement by heat-shock treatment in mdx mice." *Transplantation* 77 (9):1349-56.
- Brack, A. S., H. Bildsoe, and S. M. Hughes. 2005. "Evidence that satellite cell decrement contributes to preferential decline in nuclear number from large fibres during murine age-related muscle atrophy." *J Cell Sci* 118 (Pt 20):4813-21. doi: 10.1242/jcs.02602.
- Brack, A. S., I. M. Conboy, M. J. Conboy, J. Shen, and T. A. Rando. 2008. "A temporal switch from notch to Wnt signaling in muscle stem cells is necessary for normal adult myogenesis." *Cell Stem Cell* 2 (1):50-9. doi: 10.1016/j.stem.2007.10.006.
- Brack, A. S., M. J. Conboy, S. Roy, M. Lee, C. J. Kuo, C. Keller, and T. A. Rando. 2007. "Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis." *Science* 317 (5839):807-10. doi: 10.1126/science.1144090.

- Brack, A. S., and T. A. Rando. 2007. "Intrinsic changes and extrinsic influences of myogenic stem cell function during aging." *Stem Cell Rev* 3 (3):226-37.
- Braun, T., G. Buschhausen-Denker, E. Bober, E. Tannich, and H. H. Arnold. 1989. "A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts." *EMBO J* 8 (3):701-9.
- Brooks, S. V. 2003. "Current topics for teaching skeletal muscle physiology." *Adv Physiol Educ* 27 (1-4):171-82.
- Buckingham, M., L. Bajard, T. Chang, P. Daubas, J. Hadchouel, S. Meilhac, D. Montarras, D. Rocancourt, and F. Relaix. 2003. "The formation of skeletal muscle: from somite to limb." *J Anat* 202 (1):59-68.
- Bulfield, G., W. G. Siller, P. A. Wight, and K. J. Moore. 1984. "X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse." *Proc Natl Acad Sci U S A* 81 (4):1189-92.
- Camargo, F. D., R. Green, Y. Capetanaki, K. A. Jackson, M. A. Goodell, and Y. Capetanaki. 2003. "Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates." *Nat Med* 9 (12):1520-7. doi: 10.1038/nm963.
- Campbell, K. P., and S. D. Kahl. 1989. "Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein." *Nature* 338 (6212):259-62. doi: 10.1038/338259a0.
- Cantini, M., E. Giurisato, C. Radu, S. Tiozzo, F. Pampinella, D. Senigaglia, G. Zaniolo, F. Mazzoleni, and L. Vitiello. 2002. "Macrophage-secreted myogenic factors: a promising tool for greatly enhancing the proliferative capacity of myoblasts in vitro and in vivo." *Neurol Sci* 23 (4):189-94. doi: 10.1007/s100720200060.
- Cantini, M., M. L. Massimino, A. Bruson, C. Catani, L. Dalla Libera, and U. Carraro. 1994. "Macrophages regulate proliferation and differentiation of satellite cells." *Biochem Biophys Res Commun* 202 (3):1688-96.
- Cantini, M., M. L. Massimino, E. Rapizzi, K. Rossini, C. Catani, L. Dalla Libera, and U. Carraro. 1995. "Human satellite cell proliferation in vitro is regulated by autocrine secretion of IL-6 stimulated by a soluble factor(s) released by activated monocytes." *Biochem Biophys Res Commun* 216 (1):49-53.
- Cao, B., B. Zheng, R. J. Jankowski, S. Kimura, M. Ikezawa, B. Deasy, J. Cummins, M. Epperly, Z. Qu-Petersen, and J. Huard. 2003. "Muscle stem cells differentiate into haematopoietic lineages but retain myogenic potential." *Nat Cell Biol* 5 (7):640-6. doi: 10.1038/ncb1008.

- Cao, Y., R. M. Kumar, B. H. Penn, C. A. Berkes, C. Kooperberg, L. A. Boyer, R. A. Young, and S. J. Tapscott. 2006. "Global and gene-specific analyses show distinct roles for Myod and Myog at a common set of promoters." *EMBO J* 25 (3):502-11. doi: 10.1038/sj.emboj.7600958.
- Caplan, A. I. 2008. "All MSCs are pericytes?" *Cell Stem Cell* 3 (3):229-30. doi: 10.1016/j.stem.2008.08.008.
- Carlson, B. M., and J. A. Faulkner. 1989. "Muscle transplantation between young and old rats: age of host determines recovery." *Am J Physiol* 256 (6 Pt 1):C1262-6.
- Carlson, M. E., M. Hsu, and I. M. Conboy. 2008. "Imbalance between pSmad3 and Notch induces CDK inhibitors in old muscle stem cells." *Nature* 454 (7203):528-32. doi: 10.1038/nature07034.
- Carnac, G., B. Vernus, and A. Bonniou. 2007. "Myostatin in the pathophysiology of skeletal muscle." *Curr Genomics* 8 (7):415-22. doi: 10.2174/138920207783591672.
- Cawthorn, W. P., and J. K. Sethi. 2008. "TNF-alpha and adipocyte biology." *FEBS Lett* 582 (1):117-31. doi: 10.1016/j.febslet.2007.11.051.
- Ceafalan, L. C., B. O. Popescu, and M. E. Hinescu. 2014. "Cellular players in skeletal muscle regeneration." *Biomed Res Int* 2014:957014. doi: 10.1155/2014/957014.
- Cerletti, M., Y. C. Jang, L. W. Finley, M. C. Haigis, and A. J. Wagers. 2012. "Short-term calorie restriction enhances skeletal muscle stem cell function." *Cell Stem Cell* 10 (5):515-9. doi: 10.1016/j.stem.2012.04.002.
- Chakkalakal, J. V., K. M. Jones, M. A. Basson, and A. S. Brack. 2012. "The aged niche disrupts muscle stem cell quiescence." *Nature* 490 (7420):355-60. doi: 10.1038/nature11438.
- Chakkalakal, J. V., J. Thompson, R. J. Parks, and B. J. Jasmin. 2005. "Molecular, cellular, and pharmacological therapies for Duchenne/Becker muscular dystrophies." *FASEB J* 19 (8):880-91. doi: 10.1096/fj.04-1956rev.
- Chan, J., S. N. Waddington, K. O'Donoghue, H. Kurata, P. V. Guillot, C. Gotherstrom, M. Themis, J. E. Morgan, and N. M. Fisk. 2007. "Widespread distribution and muscle differentiation of human fetal mesenchymal stem cells after intrauterine transplantation in dystrophic mdx mouse." *Stem Cells* 25 (4):875-84. doi: 10.1634/stemcells.2006-0694.
- Chang, N. C., F. P. Chevalier, and M. A. Rudnicki. 2016. "Satellite Cells in Muscular Dystrophy - Lost in Polarity." *Trends Mol Med* 22 (6):479-96. doi: 10.1016/j.molmed.2016.04.002.

- Chang, N. C., and M. A. Rudnicki. 2014. "Satellite cells: the architects of skeletal muscle." *Curr Top Dev Biol* 107:161-81. doi: 10.1016/B978-0-12-416022-4.00006-8.
- Chargé, S. B., A. S. Brack, and S. M. Hughes. 2002. "Aging-related satellite cell differentiation defect occurs prematurely after Ski-induced muscle hypertrophy." *Am J Physiol Cell Physiol* 283 (4):C1228-41. doi: 10.1152/ajpcell.00206.2002.
- Chazaud, B., M. Brigitte, H. Yacoub-Youssef, L. Arnold, R. Gherardi, C. Sonnet, P. Lafuste, and F. Chretien. 2009. "Dual and beneficial roles of macrophages during skeletal muscle regeneration." *Exerc Sport Sci Rev* 37 (1):18-22. doi: 10.1097/JES.0b013e318190ebdb.
- Chazaud, B., C. Sonnet, P. Lafuste, G. Bassez, A. C. Rimaniol, F. Poron, F. J. Authier, P. A. Dreyfus, and R. K. Gherardi. 2003. "Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth." *J Cell Biol* 163 (5):1133-43. doi: 10.1083/jcb.200212046.
- Chazaud, B. 2014. "Macrophages: supportive cells for tissue repair and regeneration." *Immunobiology* 219 (3):172-8. doi: 10.1016/j.imbio.2013.09.001.
- Chen, J. F., Y. Tao, J. Li, Z. Deng, Z. Yan, X. Xiao, and D. Z. Wang. 2010. "microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7." *J Cell Biol* 190 (5):867-79. doi: 10.1083/jcb.200911036.
- Chen, X., and Y. Li. 2009. "Role of matrix metalloproteinases in skeletal muscle: migration, differentiation, regeneration and fibrosis." *Cell Adh Migr* 3 (4):337-41.
- Chen, Y., G. Lin, and J. M. Slack. 2006. "Control of muscle regeneration in the *Xenopus* tadpole tail by Pax7." *Development* 133 (12):2303-13. doi: 10.1242/dev.02397.
- Cheng, M., M. H. Nguyen, G. Fantuzzi, and T. J. Koh. 2008. "Endogenous interferon-gamma is required for efficient skeletal muscle regeneration." *Am J Physiol Cell Physiol* 294 (5):C1183-91. doi: 10.1152/ajpcell.00568.2007.
- Christ, B., and C. P. Ordahl. 1995. "Early stages of chick somite development." *Anat Embryol (Berl)* 191 (5):381-96.
- Christov, C., F. Chrétien, R. Abou-Khalil, G. Bassez, G. Vallet, F. J. Authier, Y. Bassaglia, V. Shinin, S. Tajbakhsh, B. Chazaud, and R. K. Gherardi. 2007. "Muscle satellite cells and endothelial cells: close neighbors and privileged partners." *Mol Biol Cell* 18 (4):1397-409. doi: 10.1091/mbc.E06-08-0693.
- Claeys Bouuaert, C., and R. M. Chalmers. 2010. "Gene therapy vectors: the prospects and

- potentials of the cut-and-paste transposons." *Genetica* 138 (5):473-84. doi: 10.1007/s10709-009-9391-x.
- Collins, C. A., I. Olsen, P. S. Zammit, L. Heslop, A. Petrie, T. A. Partridge, and J. E. Morgan. 2005. "Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche." *Cell* 122 (2):289-301. doi: 10.1016/j.cell.2005.05.010.
- Collins, C. A., P. S. Zammit, A. P. Ruiz, J. E. Morgan, and T. A. Partridge. 2007. "A population of myogenic stem cells that survives skeletal muscle aging." *Stem Cells* 25 (4):885-94. doi: 10.1634/stemcells.2006-0372.
- Colussi, C., C. Mozzetta, A. Gurtner, B. Illi, J. Rosati, S. Straino, G. Ragone, M. Pescatori, G. Zaccagnini, A. Antonini, G. Minetti, F. Martelli, G. Piaggio, P. Gallinari, C. Steinkuhler, C. Steinkulher, E. Clementi, C. Dell'Aversana, L. Altucci, A. Mai, M. C. Capogrossi, P. L. Puri, and C. Gaetano. 2008. "HDAC2 blockade by nitric oxide and histone deacetylase inhibitors reveals a common target in Duchenne muscular dystrophy treatment." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (49):19183-7. doi: 10.1073/pnas.0805514105.
- Conboy, I. M., M. J. Conboy, G. M. Smythe, and T. A. Rando. 2003. "Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle." *Science* 302 (5650):1575-7. doi: 10.1126/science.1087573.
- Conboy, I. M., M. J. Conboy, A. J. Wagers, E. R. Girma, I. L. Weissman, and T. A. Rando. 2005. "Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment." *Nature* 433 (7027):760-4. doi: 10.1038/nature03260.
- Conboy, M. J., A. O. Karasov, and T. A. Rando. 2007. "High incidence of non-random template strand segregation and asymmetric fate determination in dividing stem cells and their progeny." *PLoS Biol* 5 (5):e102. doi: 10.1371/journal.pbio.0050102.
- Contreras, O., D. L. Rebolledo, J. E. Oyarzún, H. C. Olgún, and E. Brandan. 2016. "Connective tissue cells expressing fibro/adipogenic progenitor markers increase under chronic damage: relevance in fibroblast-myofibroblast differentiation and skeletal muscle fibrosis." *Cell Tissue Res* 364 (3):647-60. doi: 10.1007/s00441-015-2343-0.
- Cooper, R. N., S. Tajbakhsh, V. Mouly, G. Cossu, M. Buckingham, and G. S. Butler-Browne. 1999. "In vivo satellite cell activation via Myf5 and MyoD in regenerating mouse skeletal muscle." *J Cell Sci* 112 (Pt 17):2895-901.
- Corbel, S. Y., A. Lee, L. Yi, J. Duenas, T. R. Brazelton, H. M. Blau, and F. M. Rossi. 2003.

- "Contribution of hematopoietic stem cells to skeletal muscle." *Nat Med* 9 (12):1528-32. doi: 10.1038/nm959.
- Cordani, N., V. Pisa, L. Pozzi, C. Sciorati, and E. Clementi. 2014. "Nitric oxide controls fat deposition in dystrophic skeletal muscle by regulating fibro-adipogenic precursor differentiation." *Stem Cells* 32 (4):874-85. doi: 10.1002/stem.1587.
- Cornelison, D. D., B. B. Olwin, M. A. Rudnicki, and B. J. Wold. 2000. "MyoD(-/-) satellite cells in single-fiber culture are differentiation defective and MRF4 deficient." *Dev Biol* 224 (2):122-37. doi: 10.1006/dbio.2000.9682.
- Cornelison, D. D., and B. J. Wold. 1997. "Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells." *Dev Biol* 191 (2):270-83. doi: 10.1006/dbio.1997.8721.
- Cosgrove, B. D., P. M. Gilbert, E. Porpiglia, F. Mourkioti, S. P. Lee, S. Y. Corbel, M. E. Llewellyn, S. L. Delp, and H. M. Blau. 2014. "Rejuvenation of the muscle stem cell population restores strength to injured aged muscles." *Nat Med* 20 (3):255-64. doi: 10.1038/nm.3464.
- Cossu, G., and S. Biressi. 2005. "Satellite cells, myoblasts and other occasional myogenic progenitors: possible origin, phenotypic features and role in muscle regeneration." *Semin Cell Dev Biol* 16 (4-5):623-31. doi: 10.1016/j.semcdb.2005.07.003.
- Cossu, G., and F. Mavilio. 2000. "Myogenic stem cells for the therapy of primary myopathies: wishful thinking or therapeutic perspective?" *J Clin Invest* 105 (12):1669-74. doi: 10.1172/JCI10376.
- Cossu, G., S. C. Previtali, S. Napolitano, M. P. Cicalese, F. S. Tedesco, F. Nicastro, M. Noviello, U. Roostalu, M. G. Natali Sora, M. Scarlato, M. De Pellegrin, C. Godi, S. Giuliani, F. Ciotti, R. Tonlorenzi, I. Lorenzetti, C. Rivellini, S. Benedetti, R. Gatti, S. Markt, B. Mazzi, A. Tettamanti, M. Ragazzi, M. A. Imro, G. Marano, A. Ambrosi, R. Fiori, M. P. Sormani, C. Bonini, M. Venturini, L. S. Politi, Y. Torrente, and F. Ciceri. 2015. "Intra-arterial transplantation of HLA-matched donor mesoangioblasts in Duchenne muscular dystrophy." *EMBO Mol Med* 7 (12):1513-28. doi: 10.15252/emmm.201505636.
- Cossu, G., and M. Sampaolesi. 2007. "New therapies for Duchenne muscular dystrophy: challenges, prospects and clinical trials." *Trends Mol Med* 13 (12):520-6. doi: 10.1016/j.molmed.2007.10.003.
- Costamagna, D., H. Mommaerts, M. Sampaolesi, and P. Tylzanowski. 2016. "Noggin inactivation

- affects the number and differentiation potential of muscle progenitor cells in vivo." *Sci Rep* 6:31949. doi: 10.1038/srep31949.
- Couturier, J., S. G. Patel, D. Iyer, A. Balasubramanyam, and D. E. Lewis. 2012. "Human monocytes accelerate proliferation and blunt differentiation of preadipocytes in association with suppression of C/EBPA mRNA." *Obesity (Silver Spring)* 20 (2):253-62. doi: 10.1038/oby.2011.275.
- Crisan, M., S. Yap, L. Casteilla, C. W. Chen, M. Corselli, T. S. Park, G. Andriolo, B. Sun, B. Zheng, L. Zhang, C. Norotte, P. N. Teng, J. Traas, R. Schugar, B. M. Deasy, S. Badylak, H. J. Buhring, J. P. Giacobino, L. Lazzari, J. Huard, and B. Péault. 2008. "A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs." *Cell Stem Cell* 3 (3):301-13. doi: 10.1016/j.stem.2008.07.003.
- Crist, C. G., D. Montarras, G. Pallafacchina, D. Rocancourt, A. Cumano, S. J. Conway, and M. Buckingham. 2009. "Muscle stem cell behavior is modified by microRNA-27 regulation of Pax3 expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (32):13383-7. doi: 10.1073/pnas.0900210106.
- Cruz-Jentoft, A. J., J. P. Baeyens, J. M. Bauer, Y. Boirie, T. Cederholm, F. Landi, F. C. Martin, J. P. Michel, Y. Rolland, S. M. Schneider, E. Topinková, M. Vandewoude, M. Zamboni, and European Working Group on Sarcopenia in Older People. 2010. "Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People." *Age Ageing* 39 (4):412-23. doi: 10.1093/ageing/afq034.
- Csete, M., J. Walikonis, N. Slawny, Y. Wei, S. Korsnes, J. C. Doyle, and B. Wold. 2001. "Oxygen-mediated regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and adipogenesis in culture." *J Cell Physiol* 189 (2):189-96. doi: 10.1002/jcp.10016.
- da Silva Meirelles, L., P. C. Chagastelles, and N. B. Nardi. 2006. "Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues." *J Cell Sci* 119 (Pt 11):2204-13. doi: 10.1242/jcs.02932.
- Darabi, R., J. Baik, M. Clee, M. Kyba, R. Tupler, and R. C. Perlingeiro. 2009. "Engraftment of embryonic stem cell-derived myogenic progenitors in a dominant model of muscular dystrophy." *Exp Neurol* 220 (1):212-6. doi: 10.1016/j.expneurol.2009.08.002.
- Darabi, R., K. Gehlbach, R. M. Bachoo, S. Kamath, M. Osawa, K. E. Kamm, M. Kyba, and R. C. Perlingeiro. 2008. "Functional skeletal muscle regeneration from differentiating embryonic

- stem cells." *Nat Med* 14 (2):134-43. doi: 10.1038/nm1705.
- Day, K., G. Shefer, A. Shearer, and Z. Yablonka-Reuveni. 2010. "The depletion of skeletal muscle satellite cells with age is concomitant with reduced capacity of single progenitors to produce reserve progeny." *Dev Biol* 340 (2):330-43. doi: 10.1016/j.ydbio.2010.01.006.
- De Angelis, L., L. Berghella, M. Coletta, L. Lattanzi, M. Zanchi, M. G. Cusella-De Angelis, C. Ponzetto, and G. Cossu. 1999. "Skeletal myogenic progenitors originating from embryonic dorsal aorta coexpress endothelial and myogenic markers and contribute to postnatal muscle growth and regeneration." *J Cell Biol* 147 (4):869-78.
- De Paepe, B., J. M. Schröder, J. J. Martin, G. Z. Racz, and J. L. De Bleecker. 2004. "Localization of the alpha-chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in idiopathic inflammatory myopathies." *Neuromuscul Disord* 14 (4):265-73. doi: 10.1016/j.nmd.2004.01.001.
- De Palma, C., F. Morisi, S. Cheli, S. Pambianco, V. Cappello, M. Vezzoli, P. Rovere-Querini, M. Moggio, M. Ripolone, M. Francolini, M. Sandri, and E. Clementi. 2012. "Autophagy as a new therapeutic target in Duchenne muscular dystrophy." *Cell Death Dis* 3:e418. doi: 10.1038/cddis.2012.159.
- De Palma, M., M. A. Venneri, R. Galli, L. Sergi Sergi, L. S. Politi, M. Sampaolesi, and L. Naldini. 2005. "Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors." *Cancer Cell* 8 (3):211-26. doi: 10.1016/j.ccr.2005.08.002.
- Deasy, B. M., R. J. Jankowski, and J. Huard. 2001. "Muscle-derived stem cells: characterization and potential for cell-mediated therapy." *Blood Cells Mol Dis* 27 (5):924-33. doi: 10.1006/bcmd.2001.0463.
- Delfini, M. C., M. De La Celle, J. Gros, O. Serralbo, I. Marics, M. Seux, M. Scaal, and C. Marcelle. 2009. "The timing of emergence of muscle progenitors is controlled by an FGF/ERK/SNAIL1 pathway." *Dev Biol* 333 (2):229-37. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.05.544.
- Delfini, M. C., E. Hirsinger, O. Pourquié, and D. Duprez. 2000. "Delta 1-activated notch inhibits muscle differentiation without affecting Myf5 and Pax3 expression in chick limb myogenesis." *Development* 127 (23):5213-24.
- Dell'Agnola, C., Z. Wang, R. Storb, S. J. Tapscott, C. S. Kuhr, S. D. Hauschka, R. S. Lee, G. E. Sale, E. Zellmer, S. Gisburne, J. Bogan, J. N. Kornegay, B. J. Cooper, T. A. Gooley, and

- M. T. Little. 2004. "Hematopoietic stem cell transplantation does not restore dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy dogs." *Blood* 104 (13):4311-8. doi: 10.1182/blood-2004-06-2247.
- Dellavalle, A., G. Maroli, D. Covarello, E. Azzoni, A. Innocenzi, L. Perani, S. Antonini, R. Sambasivan, S. Brunelli, S. Tajbakhsh, and G. Cossu. 2011. "Pericytes resident in postnatal skeletal muscle differentiate into muscle fibres and generate satellite cells." *Nat Commun* 2:499. doi: 10.1038/ncomms1508.
- Dellavalle, A., M. Sampaolesi, R. Tonlorenzi, E. Tagliafico, B. Sacchetti, L. Perani, A. Innocenzi, B. G. Galvez, G. Messina, R. Morosetti, S. Li, M. Belicchi, G. Peretti, J. S. Chamberlain, W. E. Wright, Y. Torrente, S. Ferrari, P. Bianco, and G. Cossu. 2007. "Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells." *Nat Cell Biol* 9 (3):255-67. doi: 10.1038/ncb1542.
- Delmonico, M. J., T. B. Harris, J. S. Lee, M. Visser, M. Nevitt, S. B. Kritchevsky, F. A. Tylavsky, A. B. Newman, and A.ing and Body Composition Study Health. 2007. "Alternative definitions of sarcopenia, lower extremity performance, and functional impairment with aging in older men and women." *J Am Geriatr Soc* 55 (5):769-74. doi: 10.1111/j.1532-5415.2007.01140.x.
- Dennler, S., J. André, I. Alexaki, A. Li, T. Magnaldo, P. ten Dijke, X. J. Wang, F. Verrecchia, and A. Mauviel. 2007. "Induction of sonic hedgehog mediators by transforming growth factor-beta: Smad3-dependent activation of Gli2 and Gli1 expression in vitro and in vivo." *Cancer Res* 67 (14):6981-6. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0491.
- Desguerre, I., M. Mayer, F. Leturcq, J. P. Barbet, R. K. Gherardi, and C. Christov. 2009. "Endomysial fibrosis in Duchenne muscular dystrophy: a marker of poor outcome associated with macrophage alternative activation." *J Neuropathol Exp Neurol* 68 (7):762-73. doi: 10.1097/NEN.0b013e3181aa31c2.
- Desmoulière, A., A. Geinoz, F. Gabbiani, and G. Gabbiani. 1993. "Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts." *J Cell Biol* 122 (1):103-11.
- Dey, B. K., J. Gagan, and A. Dutta. 2011. "miR-206 and -486 induce myoblast differentiation by downregulating Pax7." *Mol Cell Biol* 31 (1):203-14. doi: 10.1128/MCB.01009-10.
- Dezawa, M., H. Ishikawa, Y. Itokazu, T. Yoshihara, M. Hoshino, S. Takeda, C. Ide, and Y.

- Nabeshima. 2005. "Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration." *Science* 309 (5732):314-7. doi: 10.1126/science.1110364.
- Dissen, G. A., A. Lomniczi, T. L. Neff, T. R. Hobbs, S. G. Kohama, C. D. Kroenke, F. Galimi, and S. R. Ojeda. 2009. "In vivo manipulation of gene expression in non-human primates using lentiviral vectors as delivery vehicles." *Methods* 49 (1):70-7. doi: 10.1016/j.ymeth.2009.06.004.
- Doherty, M. J., B. A. Ashton, S. Walsh, J. N. Beresford, M. E. Grant, and A. E. Canfield. 1998. "Vascular pericytes express osteogenic potential in vitro and in vivo." *J Bone Miner Res* 13 (5):828-38. doi: 10.1359/jbmr.1998.13.5.828.
- Doherty, T. J. 2003. "Invited review: Aging and sarcopenia." *J Appl Physiol (1985)* 95 (4):1717-27. doi: 10.1152/jappphysiol.00347.2003.
- Dong, J., Y. Dong, Z. Chen, W. E. Mitch, and L. Zhang. 2016. "The pathway to muscle fibrosis depends on myostatin stimulating the differentiation of fibro/adipogenic progenitor cells in chronic kidney disease." *Kidney Int.* doi: 10.1016/j.kint.2016.07.029.
- Dong, Y., K. A. Silva, and L. Zhang. 2014. "Glucocorticoids increase adipocytes in muscle by affecting IL-4 regulated FAP activity." *FASEB J* 28 (9):4123-32. doi: 10.1096/fj.14-254011.
- Doyle, M. J., S. Zhou, K. K. Tanaka, A. Pisconti, N. H. Farina, B. P. Sorrentino, and B. B. Olwin. 2011. "Abcg2 labels multiple cell types in skeletal muscle and participates in muscle regeneration." *J Cell Biol* 195 (1):147-63. doi: 10.1083/jcb.201103159.
- Duffield, J. S., M. Lupher, V. J. Thannickal, and T. A. Wynn. 2013. "Host responses in tissue repair and fibrosis." *Annu Rev Pathol* 8:241-76. doi: 10.1146/annurev-pathol-020712-163930.
- Dulauroy, S., S. E. Di Carlo, F. Langa, G. Eberl, and L. Peduto. 2012. "Lineage tracing and genetic ablation of ADAM12(+) perivascular cells identify a major source of profibrotic cells during acute tissue injury." *Nat Med* 18 (8):1262-70. doi: 10.1038/nm.2848.
- Dumont, N. A., Y. X. Wang, J. von Maltzahn, A. Pasut, C. F. Bentzinger, C. E. Brun, and M. A. Rudnicki. 2015. "Dystrophin expression in muscle stem cells regulates their polarity and asymmetric division." *Nat Med* 21 (12):1455-63. doi: 10.1038/nm.3990.
- Dumont, N., and J. Frenette. 2010. "Macrophages protect against muscle atrophy and promote muscle recovery in vivo and in vitro: a mechanism partly dependent on the insulin-like

- growth factor-1 signaling molecule." *Am J Pathol* 176 (5):2228-35. doi: 10.2353/ajpath.2010.090884.
- Dunant, P., N. Larochelle, C. Thirion, R. Stucka, D. Ursu, B. J. Petrof, E. Wolf, and H. Lochmüller. 2003. "Expression of dystrophin driven by the 1.35-kb MCK promoter ameliorates muscular dystrophy in fast, but not in slow muscles of transgenic mdx mice." *Mol Ther* 8 (1):80-9.
- Edom-Vovard, F., M. A. Bonnin, and D. Duprez. 2001. "Misexpression of Fgf-4 in the chick limb inhibits myogenesis by down-regulating Fkrl expression." *Dev Biol* 233 (1):56-71. doi: 10.1006/dbio.2001.0221.
- Egerman, M. A., S. M. Cadena, J. A. Gilbert, A. Meyer, H. N. Nelson, S. E. Swalley, C. Mallozzi, C. Jacobi, L. L. Jennings, I. Clay, G. Laurent, S. Ma, S. Brachat, E. Lach-Trifilieff, T. Shavlakadze, A. U. Trendelenburg, A. S. Brack, and D. J. Glass. 2015. "GDF11 Increases with Age and Inhibits Skeletal Muscle Regeneration." *Cell Metab* 22 (1):164-74. doi: 10.1016/j.cmet.2015.05.010.
- Elabd, C., W. Cousin, P. Upadhyayula, R. Y. Chen, M. S. Chooljian, J. Li, S. Kung, K. P. Jiang, and I. M. Conboy. 2014. "Oxytocin is an age-specific circulating hormone that is necessary for muscle maintenance and regeneration." *Nat Commun* 5:4082. doi: 10.1038/ncomms5082.
- Emery, A. E. 2002. "The muscular dystrophies." *Lancet* 359 (9307):687-95. doi: 10.1016/S0140-6736(02)07815-7.
- Enerbäck, S. 2010a. "Brown adipose tissue in humans." *Int J Obes (Lond)* 34 Suppl 1:S43-6. doi: 10.1038/ijo.2010.183.
- Enerbäck, S. 2010b. "Human brown adipose tissue." *Cell Metab* 11 (4):248-52. doi: 10.1016/j.cmet.2010.03.008.
- Engert, J. C., E. B. Berglund, and N. Rosenthal. 1996. "Proliferation precedes differentiation in IGF-I-stimulated myogenesis." *J Cell Biol* 135 (2):431-40.
- Epstein, J. A., D. N. Shapiro, J. Cheng, P. Y. Lam, and R. L. Maas. 1996. "Pax3 modulates expression of the c-Met receptor during limb muscle development." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (9):4213-8.
- Ervasti, J. M., K. Ohlendieck, S. D. Kahl, M. G. Gaver, and K. P. Campbell. 1990. "Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle." *Nature* 345

- (6273):315-9. doi: 10.1038/345315a0.
- Escors, D., and K. Breckpot. 2010. "Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential." *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 58 (2):107-19. doi: 10.1007/s00005-010-0063-4.
- Exeter, D., and D. A. Connell. 2010. "Skeletal muscle: functional anatomy and pathophysiology." *Semin Musculoskelet Radiol* 14 (2):97-105. doi: 10.1055/s-0030-1253154.
- Fan, C. M., C. S. Lee, and M. Tessier-Lavigne. 1997. "A role for WNT proteins in induction of dermomyotome." *Dev Biol* 191 (1):160-5. doi: 10.1006/dbio.1997.8713.
- Faralli, H., and F. J. Dilworth. 2014. "Dystrophic muscle environment induces changes in cell plasticity." *Genes Dev* 28 (8):809-11. doi: 10.1101/gad.241182.114.
- Farrington-Rock, C., N. J. Crofts, M. J. Doherty, B. A. Ashton, C. Griffin-Jones, and A. E. Canfield. 2004. "Chondrogenic and adipogenic potential of microvascular pericytes." *Circulation* 110 (15):2226-32. doi: 10.1161/01.CIR.0000144457.55518.E5.
- Farup, J., L. Madaro, P. L. Puri, and U. R. Mikkelsen. 2015. "Interactions between muscle stem cells, mesenchymal-derived cells and immune cells in muscle homeostasis, regeneration and disease." *Cell Death Dis* 6:e1830. doi: 10.1038/cddis.2015.198.
- Feng, J., A. Mantesso, C. De Bari, A. Nishiyama, and P. T. Sharpe. 2011. "Dual origin of mesenchymal stem cells contributing to organ growth and repair." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (16):6503-8. doi: 10.1073/pnas.1015449108.
- Ferrari, G., G. Cusella-De Angelis, M. Coletta, E. Paolucci, A. Stornaiuolo, G. Cossu, and F. Mavilio. 1998. "Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors." *Science* 279 (5356):1528-30.
- Fielding, R. A., T. J. Manfredi, W. Ding, M. A. Fiatarone, W. J. Evans, and J. G. Cannon. 1993. "Acute phase response in exercise. III. Neutrophil and IL-1 beta accumulation in skeletal muscle." *Am J Physiol* 265 (1 Pt 2):R166-72.
- Filippin, L. I., A. J. Moreira, N. P. Marroni, and R. M. Xavier. 2009. "Nitric oxide and repair of skeletal muscle injury." *Nitric Oxide* 21 (3-4):157-63. doi: 10.1016/j.niox.2009.08.002.
- Fiore, D., R. N. Judson, M. Low, S. Lee, E. Zhang, C. Hopkins, P. Xu, A. Lenzi, F. M. Rossi, and D. R. Lemos. 2016. "Pharmacological blockage of fibro/adipogenic progenitor expansion and suppression of regenerative fibrogenesis is associated with impaired skeletal muscle regeneration." *Stem Cell Res* 17 (1):161-9. doi: 10.1016/j.scr.2016.06.007.

- Forcales, S. V., S. Albin, L. Giordani, B. Malecova, L. Cignolo, A. Chernov, P. Coutinho, V. Saccone, S. Consalvi, R. Williams, K. Wang, Z. Wu, S. Baranovskaya, A. Miller, F. J. Dilworth, and P. L. Puri. 2012. "Signal-dependent incorporation of MyoD-BAF60c into Brg1-based SWI/SNF chromatin-remodelling complex." *EMBO J* 31 (2):301-16. doi: 10.1038/emboj.2011.391.
- Fry, C. S., J. D. Lee, J. Mula, T. J. Kirby, J. R. Jackson, F. Liu, L. Yang, C. L. Mendias, E. E. Dupont-Versteegden, J. J. McCarthy, and C. A. Peterson. 2015. "Inducible depletion of satellite cells in adult, sedentary mice impairs muscle regenerative capacity without affecting sarcopenia." *Nat Med* 21 (1):76-80. doi: 10.1038/nm.3710.
- Fujita, R., K. Tamai, E. Aikawa, K. Nimura, S. Ishino, Y. Kikuchi, and Y. Kaneda. 2015. "Endogenous mesenchymal stromal cells in bone marrow are required to preserve muscle function in mdx mice." *Stem Cells* 33 (3):962-75. doi: 10.1002/stem.1900.
- Fukada, S., S. Higuchi, M. Segawa, K. Koda, Y. Yamamoto, K. Tsujikawa, Y. Kohama, A. Uezumi, M. Imamura, Y. Miyagoe-Suzuki, S. Takeda, and H. Yamamoto. 2004. "Purification and cell-surface marker characterization of quiescent satellite cells from murine skeletal muscle by a novel monoclonal antibody." *Exp Cell Res* 296 (2):245-55. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.02.018.
- Fulle, S., S. Di Donna, C. Puglielli, T. Pietrangelo, S. Beccafico, R. Bellomo, F. Protasi, and G. Fanò. 2005. "Age-dependent imbalance of the antioxidative system in human satellite cells." *Exp Gerontol* 40 (3):189-97. doi: 10.1016/j.exger.2004.11.006.
- Füchtbauer, E. M., and H. Westphal. 1992. "MyoD and myogenin are coexpressed in regenerating skeletal muscle of the mouse." *Dev Dyn* 193 (1):34-9. doi: 10.1002/aja.1001930106.
- Gaeta, M., S. Messina, A. Mileto, G. L. Vita, G. Ascenti, S. Vinci, A. Bottari, G. Vita, N. Settineri, D. Bruschetta, S. Racchiusa, and F. Minutoli. 2012. "Muscle fat-fraction and mapping in Duchenne muscular dystrophy: evaluation of disease distribution and correlation with clinical assessments. Preliminary experience." *Skeletal Radiol* 41 (8):955-61. doi: 10.1007/s00256-011-1301-5.
- Galbiati, F., D. Volonte, J. A. Engelman, P. E. Scherer, and M. P. Lisanti. 1999. "Targeted down-regulation of caveolin-3 is sufficient to inhibit myotube formation in differentiating C2C12 myoblasts. Transient activation of p38 mitogen-activated protein kinase is required for induction of caveolin-3 expression and subsequent myotube formation." *J Biol Chem* 274

(42):30315-21.

- Galbiati, F., D. Volonte, C. Minetti, J. B. Chu, and M. P. Lisanti. 1999. "Phenotypic behavior of caveolin-3 mutations that cause autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy (LGMD-1C). Retention of LGMD-1C caveolin-3 mutants within the golgi complex." *J Biol Chem* 274 (36):25632-41.
- Galvez, B. G., M. Sampaolesi, S. Brunelli, D. Covarello, M. Gavina, B. Rossi, G. Constantin, G. Costantin, Y. Torrente, and G. Cossu. 2006. "Complete repair of dystrophic skeletal muscle by mesoangioblasts with enhanced migration ability." *J Cell Biol* 174 (2):231-43. doi: 10.1083/jcb.200512085.
- Gang, E. J., J. A. Jeong, S. H. Hong, S. H. Hwang, S. W. Kim, I. H. Yang, C. Ahn, H. Han, and H. Kim. 2004. "Skeletal myogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from human umbilical cord blood." *Stem Cells* 22 (4):617-24. doi: 10.1634/stemcells.22-4-617.
- Gao, D., P. Trayhurn, and C. Bing. 2013. "1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits the cytokine-induced secretion of MCP-1 and reduces monocyte recruitment by human preadipocytes." *Int J Obes (Lond)* 37 (3):357-65. doi: 10.1038/ijo.2012.53.
- García-Prat, L., M. Martínez-Vicente, E. Perdiguero, L. Ortet, J. Rodríguez-Ubreva, E. Rebollo, V. Ruiz-Bonilla, S. Gutarra, E. Ballestar, A. L. Serrano, M. Sandri, and P. Muñoz-Cánoves. 2016. "Autophagy maintains stemness by preventing senescence." *Nature* 529 (7584):37-42. doi: 10.1038/nature16187.
- García-Prat, L., P. Sousa-Victor, and P. Muñoz-Cánoves. 2013. "Functional dysregulation of stem cells during aging: a focus on skeletal muscle stem cells." *FEBS J* 280 (17):4051-62. doi: 10.1111/febs.12221.
- Gayraud-Morel, B., F. Chrétien, P. Flamant, D. Gomès, P. S. Zammit, and S. Tajbakhsh. 2007. "A role for the myogenic determination gene Myf5 in adult regenerative myogenesis." *Dev Biol* 312 (1):13-28. doi: 10.1016/j.ydbio.2007.08.059.
- Geissmann, F., S. Jung, and D. R. Littman. 2003. "Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties." *Immunity* 19 (1):71-82.
- Glasser, S. W., J. S. Hagood, S. Wong, C. A. Taype, S. K. Madala, and W. D. Hardie. 2016. "Mechanisms of Lung Fibrosis Resolution." *Am J Pathol* 186 (5):1066-77. doi: 10.1016/j.ajpath.2016.01.018.

- Goljanek-Whysall, K., D. Sweetman, M. Abu-Elmagd, E. Chapnik, T. Dalmay, E. Hornstein, and A. Münsterberg. 2011. "MicroRNA regulation of the paired-box transcription factor Pax3 confers robustness to developmental timing of myogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (29):11936-41. doi: 10.1073/pnas.1105362108.
- Gordon, S. 2003. "Alternative activation of macrophages." *Nat Rev Immunol* 3 (1):23-35. doi: 10.1038/nri978.
- Goss, A. M., and B. A. Gower. 2012. "Insulin sensitivity is associated with thigh adipose tissue distribution in healthy postmenopausal women." *Metabolism* 61 (12):1817-23. doi: 10.1016/j.metabol.2012.05.016.
- Goudenege, S., C. Lebel, N. B. Huot, C. Dufour, I. Fujii, J. Gekas, J. Rousseau, and J. P. Tremblay. 2012. "Myoblasts derived from normal hESCs and dystrophic hiPSCs efficiently fuse with existing muscle fibers following transplantation." *Mol Ther* 20 (11):2153-67. doi: 10.1038/mt.2012.188.
- Goyenvalle, A., A. Babbs, G. J. van Ommen, L. Garcia, and K. E. Davies. 2009. "Enhanced exon-skipping induced by U7 snRNA carrying a splicing silencer sequence: Promising tool for DMD therapy." *Mol Ther* 17 (7):1234-40. doi: 10.1038/mt.2009.113.
- Granneman, J. G., P. Li, Z. Zhu, and Y. Lu. 2005. "Metabolic and cellular plasticity in white adipose tissue I: effects of beta3-adrenergic receptor activation." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289 (4):E608-16. doi: 10.1152/ajpendo.00009.2005.
- Greco, A. V., G. Mingrone, A. Giancaterini, M. Manco, M. Morroni, S. Cinti, M. Granzotto, R. Vettor, S. Camastra, and E. Ferrannini. 2002. "Insulin resistance in morbid obesity: reversal with intramyocellular fat depletion." *Diabetes* 51 (1):144-51.
- Gressner, O. A. 2011. "Intracrine signaling mechanisms of activin A and TGF- β ." *Vitam Horm* 85:59-77. doi: 10.1016/B978-0-12-385961-7.00004-4.
- Griffin, C. A., L. H. Apponi, K. K. Long, and G. K. Pavlath. 2010. "Chemokine expression and control of muscle cell migration during myogenesis." *J Cell Sci* 123 (Pt 18):3052-60. doi: 10.1242/jcs.066241.
- Gros, J., M. Manceau, V. Thomé, and C. Marcelle. 2005. "A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells." *Nature* 435 (7044):954-8. doi: 10.1038/nature03572.
- Grosso, S., S. Perrone, M. Longini, C. Bruno, C. Minetti, D. Gazzolo, P. Balestri, and G.

- Buonocore. 2008. "Isoprostanes in dystrophinopathy: Evidence of increased oxidative stress." *Brain Dev* 30 (6):391-5. doi: 10.1016/j.braindev.2007.11.005.
- Grounds, M. D. 2014. "Therapies for sarcopenia and regeneration of old skeletal muscles: more a case of old tissue architecture than old stem cells." *Bioarchitecture* 4 (3):81-7. doi: 10.4161/bioa.29668.
- Grounds, M. D., K. L. Garrett, M. C. Lai, W. E. Wright, and M. W. Beilharz. 1992. "Identification of skeletal muscle precursor cells in vivo by use of MyoD1 and myogenin probes." *Cell Tissue Res* 267 (1):99-104.
- Gu, W., J. W. Schneider, G. Condorelli, S. Kaushal, V. Mahdavi, and B. Nadal-Ginard. 1993. "Interaction of myogenic factors and the retinoblastoma protein mediates muscle cell commitment and differentiation." *Cell* 72 (3):309-24.
- Gude, M. F., J. Frystyk, A. Flyvbjerg, J. M. Bruun, B. Richelsen, and S. B. Pedersen. 2012. "The production and regulation of IGF and IGFbps in human adipose tissue cultures." *Growth Horm IGF Res* 22 (6):200-5. doi: 10.1016/j.ghir.2012.09.004.
- Gussoni, E., H. M. Blau, and L. M. Kunkel. 1997. "The fate of individual myoblasts after transplantation into muscles of DMD patients." *Nat Med* 3 (9):970-7.
- Gussoni, E., Y. Soneoka, C. D. Strickland, E. A. Buzney, M. K. Khan, A. F. Flint, L. M. Kunkel, and R. C. Mulligan. 1999. "Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation." *Nature* 401 (6751):390-4. doi: 10.1038/43919.
- Gustafsson, M. K., H. Pan, D. F. Pinney, Y. Liu, A. Lewandowski, D. J. Epstein, and C. P. Emerson. 2002. "Myf5 is a direct target of long-range Shh signaling and Gli regulation for muscle specification." *Genes Dev* 16 (1):114-26. doi: 10.1101/gad.940702.
- Guttinger, M., E. Tafi, M. Battaglia, M. Coletta, and G. Cossu. 2006. "Allogeneic mesoangioblasts give rise to alpha-sarcoglycan expressing fibers when transplanted into dystrophic mice." *Exp Cell Res* 312 (19):3872-9. doi: 10.1016/j.yexcr.2006.08.012.
- Hacein-Bey-Abina, S., C. von Kalle, M. Schmidt, F. Le Deist, N. Wulffraat, E. McIntyre, I. Radford, J. L. Villeval, C. C. Fraser, M. Cavazzana-Calvo, and A. Fischer. 2003a. "A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency." *N Engl J Med* 348 (3):255-6. doi: 10.1056/NEJM200301163480314.
- Hacein-Bey-Abina, S., C. Von Kalle, M. Schmidt, M. P. McCormack, N. Wulffraat, P. Leboulch,

- A. Lim, C. S. Osborne, R. Pawliuk, E. Morillon, R. Sorensen, A. Forster, P. Fraser, J. I. Cohen, G. de Saint Basile, I. Alexander, U. Wintergerst, T. Frebourg, A. Aurias, D. Stoppa-Lyonnet, S. Romana, I. Radford-Weiss, F. Gross, F. Valensi, E. Delabesse, E. Macintyre, F. Sigaux, J. Soulier, L. E. Leiva, M. Wissler, C. Prinz, T. H. Rabbitts, F. Le Deist, A. Fischer, and M. Cavazzana-Calvo. 2003b. "LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1." *Science* 302 (5644):415-9. doi: 10.1126/science.1088547.
- Halevy, O., B. G. Novitch, D. B. Spicer, S. X. Skapek, J. Rhee, G. J. Hannon, D. Beach, and A. B. Lassar. 1995. "Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD." *Science* 267 (5200):1018-21.
- Halevy, O., Y. Piestun, M. Z. Allouh, B. W. Rosser, Y. Rinkevich, R. Reshef, I. Rozenboim, M. Wleklinski-Lee, and Z. Yablonka-Reuveni. 2004. "Pattern of Pax7 expression during myogenesis in the posthatch chicken establishes a model for satellite cell differentiation and renewal." *Dev Dyn* 231 (3):489-502. doi: 10.1002/dvdy.20151.
- Hall-Craggs, E. C., and H. S. Seyan. 1975. "Histochemical changes in innervated and denervated skeletal muscle fibers following treatment with bupivacaine (marcain)." *Exp Neurol* 46 (2):345-54.
- Hamilton, T. A., Y. Ohmori, and J. Tebo. 2002. "Regulation of chemokine expression by antiinflammatory cytokines." *Immunol Res* 25 (3):229-45. doi: 10.1385/IR:25:3:229.
- Hammarstedt, A., P. Isakson, B. Gustafson, and U. Smith. 2007. "Wnt-signaling is maintained and adipogenesis inhibited by TNFalpha but not MCP-1 and resistin." *Biochem Biophys Res Commun* 357 (3):700-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.03.202.
- Hammond, C. L., Y. Hinitz, D. P. Osborn, J. E. Minchin, G. Tettamanti, and S. M. Hughes. 2007. "Signals and myogenic regulatory factors restrict pax3 and pax7 expression to dermomyotome-like tissue in zebrafish." *Dev Biol* 302 (2):504-21. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.10.009.
- Hara, M., S. Yuasa, K. Shimoji, T. Onizuka, N. Hayashiji, Y. Ohno, T. Arai, F. Hattori, R. Kaneda, K. Kimura, S. Makino, M. Sano, and K. Fukuda. 2011. "G-CSF influences mouse skeletal muscle development and regeneration by stimulating myoblast proliferation." *J Exp Med* 208 (4):715-27. doi: 10.1084/jem.20101059.
- Harel, I., E. Nathan, L. Tirosh-Finkel, H. Zigdon, N. Guimarães-Camboa, S. M. Evans, and E.

- Tzahor. 2009. "Distinct origins and genetic programs of head muscle satellite cells." *Dev Cell* 16 (6):822-32. doi: 10.1016/j.devcel.2009.05.007.
- Hasty, P., A. Bradley, J. H. Morris, D. G. Edmondson, J. M. Venuti, E. N. Olson, and W. H. Klein. 1993. "Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene." *Nature* 364 (6437):501-6. doi: 10.1038/364501a0.
- Hawke, T. J., and D. J. Garry. 2001. "Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology." *J Appl Physiol (1985)* 91 (2):534-51.
- Hayashi, S., H. Aso, K. Watanabe, H. Nara, M. T. Rose, S. Ohwada, and T. Yamaguchi. 2004. "Sequence of IGF-I, IGF-II, and HGF expression in regenerating skeletal muscle." *Histochem Cell Biol* 122 (5):427-34. doi: 10.1007/s00418-004-0704-y.
- Haycock, J. W., S. MacNeil, P. Jones, J. B. Harris, and D. Mantle. 1996. "Oxidative damage to muscle protein in Duchenne muscular dystrophy." *Neuroreport* 8 (1):357-61.
- Heaton, J. M. 1972. "The distribution of brown adipose tissue in the human." *J Anat* 112 (Pt 1):35-9.
- Heredia, J. E., L. Mukundan, F. M. Chen, A. A. Mueller, R. C. Deo, R. M. Locksley, T. A. Rando, and A. Chawla. 2013. "Type 2 innate signals stimulate fibro/adipogenic progenitors to facilitate muscle regeneration." *Cell* 153 (2):376-88. doi: 10.1016/j.cell.2013.02.053.
- Hess, P. G. 2009. "Risk of tumorigenesis in first-in-human trials of embryonic stem cell neural derivatives: Ethics in the face of long-term uncertainty." *Account Res* 16 (4):175-98. doi: 10.1080/08989620903065145.
- Hilton, T. N., L. J. Tuttle, K. L. Bohnert, M. J. Mueller, and D. R. Sinacore. 2008. "Excessive adipose tissue infiltration in skeletal muscle in individuals with obesity, diabetes mellitus, and peripheral neuropathy: association with performance and function." *Phys Ther* 88 (11):1336-44. doi: 10.2522/ptj.20080079.
- Hindi, S. M., M. M. Tajrishi, and A. Kumar. 2013. "Signaling mechanisms in mammalian myoblast fusion." *Sci Signal* 6 (272):re2. doi: 10.1126/scisignal.2003832.
- Hirai, H., M. Verma, S. Watanabe, C. Tastad, Y. Asakura, and A. Asakura. 2010. "MyoD regulates apoptosis of myoblasts through microRNA-mediated down-regulation of Pax3." *J Cell Biol* 191 (2):347-65. doi: 10.1083/jcb.201006025.
- Holleman, D., H. Budka, W. N. Löscher, G. Yanagida, M. B. Fischer, and J. V. Wanschitz. 2008. "Endothelial and myogenic differentiation of hematopoietic progenitor cells in

- inflammatory myopathies." *J Neuropathol Exp Neurol* 67 (7):711-9. doi: 10.1097/NEN.0b013e31817d8064.
- Honda, H., H. Kimura, and A. Rostami. 1990. "Demonstration and phenotypic characterization of resident macrophages in rat skeletal muscle." *Immunology* 70 (2):272-7.
- Horsley, V., and G. K. Pavlath. 2004. "Forming a multinucleated cell: molecules that regulate myoblast fusion." *Cells Tissues Organs* 176 (1-3):67-78. doi: 10.1159/000075028.
- Hoshiya, H., Y. Kazuki, S. Abe, M. Takiguchi, N. Kajitani, Y. Watanabe, T. Yoshino, Y. Shirayoshi, K. Higaki, G. Messina, G. Cossu, and M. Oshimura. 2009. "A highly stable and nonintegrated human artificial chromosome (HAC) containing the 2.4 Mb entire human dystrophin gene." *Mol Ther* 17 (2):309-17. doi: 10.1038/mt.2008.253.
- Huang, P., T. J. Schulz, A. Beauvais, Y. H. Tseng, and E. Gussoni. 2014. "Intramuscular adipogenesis is inhibited by myo-endothelial progenitors with functioning Bmpr1a signalling." *Nat Commun* 5:4063. doi: 10.1038/ncomms5063.
- Huang, P., X. S. Zhao, M. Fields, R. M. Ransohoff, and L. Zhou. 2009. "Imatinib attenuates skeletal muscle dystrophy in mdx mice." *FASEB J* 23 (8):2539-48. doi: 10.1096/fj.09-129833.
- Huard, J., B. Cao, and Z. Qu-Petersen. 2003. "Muscle-derived stem cells: potential for muscle regeneration." *Birth Defects Res C Embryo Today* 69 (3):230-7. doi: 10.1002/bdrc.10020.
- Huard, J., C. Labrecque, G. Dansereau, L. Robitaille, and J. P. Tremblay. 1991. "Dystrophin expression in myotubes formed by the fusion of normal and dystrophic myoblasts." *Muscle Nerve* 14 (2):178-82. doi: 10.1002/mus.880140213.
- Huard, J., Y. Li, and F. H. Fu. 2002. "Muscle injuries and repair: current trends in research." *J Bone Joint Surg Am* 84-A (5):822-32.
- Huard, J., R. Roy, B. Guérette, S. Verreault, G. Tremblay, and J. P. Tremblay. 1994. "Human myoblast transplantation in immunodeficient and immunosuppressed mice: evidence of rejection." *Muscle Nerve* 17 (2):224-34. doi: 10.1002/mus.880170214.
- Hubal, M. J., T. C. Chen, P. D. Thompson, and P. M. Clarkson. 2008. "Inflammatory gene changes associated with the repeated-bout effect." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294 (5):R1628-37. doi: 10.1152/ajpregu.00853.2007.
- Hughes, S. M., and H. M. Blau. 1990. "Migration of myoblasts across basal lamina during skeletal muscle development." *Nature* 345 (6273):350-3. doi: 10.1038/345350a0.

- Hutcheson, D. A., J. Zhao, A. Merrell, M. Haldar, and G. Kardon. 2009. "Embryonic and fetal limb myogenic cells are derived from developmentally distinct progenitors and have different requirements for beta-catenin." *Genes Dev* 23 (8):997-1013. doi: 10.1101/gad.1769009.
- Huttunen, P., J. Hirvonen, and V. Kinnula. 1981. "The occurrence of brown adipose tissue in outdoor workers." *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 46 (4):339-45.
- Ibebunjo, C., J. M. Chick, T. Kendall, J. K. Eash, C. Li, Y. Zhang, C. Vickers, Z. Wu, B. A. Clarke, J. Shi, J. Cruz, B. Fournier, S. Brachat, S. Gutzwiller, Q. Ma, J. Markovits, M. Broome, M. Steinkrauss, E. Skuba, J. R. Galarneau, S. P. Gygi, and D. J. Glass. 2013. "Genomic and proteomic profiling reveals reduced mitochondrial function and disruption of the neuromuscular junction driving rat sarcopenia." *Mol Cell Biol* 33 (2):194-212. doi: 10.1128/MCB.01036-12.
- Ieronimakis, N., A. Hays, A. Prasad, K. Janebodin, J. S. Duffield, and M. Reyes. 2016. "PDGFR α signalling promotes fibrogenic responses in collagen producing cells in Duchenne Muscular Dystrophy." *J Pathol*. doi: 10.1002/path.4801.
- Iezzi, S., M. Di Padova, C. Serra, G. Caretti, C. Simone, E. Maklan, G. Minetti, P. Zhao, E. P. Hoffman, P. L. Puri, and V. Sartorelli. 2004. "Deacetylase inhibitors increase muscle cell size by promoting myoblast recruitment and fusion through induction of follistatin." *Dev Cell* 6 (5):673-84.
- Ignacio, R. M., C. R. Gibbs, E. S. Lee, and D. S. Son. 2016. "Differential Chemokine Signature between Human Preadipocytes and Adipocytes." *Immune Netw* 16 (3):189-94. doi: 10.4110/in.2016.16.3.189.
- Ikezawa, M., B. Cao, Z. Qu, H. Peng, X. Xiao, R. Pruchnic, S. Kimura, T. Miike, and J. Huard. 2003. "Dystrophin delivery in dystrophin-deficient DMDmdx skeletal muscle by isogenic muscle-derived stem cell transplantation." *Hum Gene Ther* 14 (16):1535-46. doi: 10.1089/104303403322495043.
- Ito, T., R. Ogawa, A. Uezumi, T. Ohtani, Y. Watanabe, K. Tsujikawa, Y. Miyagoe-Suzuki, S. Takeda, H. Yamamoto, and S. Fukada. 2013. "Imatinib attenuates severe mouse dystrophy and inhibits proliferation and fibrosis-marker expression in muscle mesenchymal progenitors." *Neuromuscul Disord* 23 (4):349-56. doi: 10.1016/j.nmd.2012.10.025.
- Itoigawa, Y., K. N. Kishimoto, H. Sano, K. Kaneko, and E. Itoi. 2011. "Molecular mechanism of

- fatty degeneration in rotator cuff muscle with tendon rupture." *J Orthop Res* 29 (6):861-6. doi: 10.1002/jor.21317.
- Ivics, Z., and Z. Izsvák. 2006. "Transposons for gene therapy!" *Curr Gene Ther* 6 (5):593-607.
- Izsvák, Z., M. K. Chuah, T. Vandendriessche, and Z. Ivics. 2009. "Efficient stable gene transfer into human cells by the Sleeping Beauty transposon vectors." *Methods* 49 (3):287-97. doi: 10.1016/j.ymeth.2009.07.001.
- Jackson, K. A., T. Mi, and M. A. Goodell. 1999. "Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (25):14482-6.
- Jenkins, G. 2002. "Molecular mechanisms of skin ageing." *Mech Ageing Dev* 123 (7):801-10.
- Jiang, C., Y. Wen, K. Kuroda, K. Hannon, M. A. Rudnicki, and S. Kuang. 2014. "Notch signaling deficiency underlies age-dependent depletion of satellite cells in muscular dystrophy." *Dis Model Mech* 7 (8):997-1004. doi: 10.1242/dmm.015917.
- Jockusch, H., and S. Voigt. 2003. "Migration of adult myogenic precursor cells as revealed by GFP/nLacZ labelling of mouse transplantation chimeras." *J Cell Sci* 116 (Pt 8):1611-6.
- Joe, A. W., L. Yi, Y. Even, A. W. Vogl, and F. M. Rossi. 2009. "Depot-specific differences in adipogenic progenitor abundance and proliferative response to high-fat diet." *Stem Cells* 27 (10):2563-70. doi: 10.1002/stem.190.
- Joe, A. W., L. Yi, A. Natarajan, F. Le Grand, L. So, J. Wang, M. A. Rudnicki, and F. M. Rossi. 2010. "Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis." *Nat Cell Biol* 12 (2):153-63. doi: 10.1038/ncb2015.
- Johnson, R. L., E. Laufer, R. D. Riddle, and C. Tabin. 1994. "Ectopic expression of Sonic hedgehog alters dorsal-ventral patterning of somites." *Cell* 79 (7):1165-73.
- Jung, Y., and A. S. Brack. 2014. "Cellular mechanisms of somatic stem cell aging." *Curr Top Dev Biol* 107:405-38. doi: 10.1016/B978-0-12-416022-4.00014-7.
- Karalaki, M., S. Fili, A. Philippou, and M. Koutsilieris. 2009. "Muscle regeneration: cellular and molecular events." *In Vivo* 23 (5):779-96.
- Kastenberg, Z. J., and J. S. Odorico. 2008. "Alternative sources of pluripotency: science, ethics, and stem cells." *Transplant Rev (Orlando)* 22 (3):215-22. doi: 10.1016/j.trre.2008.04.002.
- Kennedy, B. K., S. L. Berger, A. Brunet, J. Campisi, A. M. Cuervo, E. S. Epel, C. Franceschi, G. J. Lithgow, R. I. Morimoto, J. E. Pessin, T. A. Rando, A. Richardson, E. E. Schadt, T.

- Wyss-Coray, and F. Sierra. 2014. "Geroscience: linking aging to chronic disease." *Cell* 159 (4):709-13. doi: 10.1016/j.cell.2014.10.039.
- Kharraz, Y., J. Guerra, C. J. Mann, A. L. Serrano, and P. Muñoz-Cánoves. 2013. "Macrophage plasticity and the role of inflammation in skeletal muscle repair." *Mediators Inflamm* 2013:491497. doi: 10.1155/2013/491497.
- Kharraz, Y., J. Guerra, P. Pessina, A. L. Serrano, and P. Muñoz-Cánoves. 2014. "Understanding the process of fibrosis in Duchenne muscular dystrophy." *Biomed Res Int* 2014:965631. doi: 10.1155/2014/965631.
- Kim, H. K., A. C. Merrow, S. Shiraj, B. L. Wong, P. S. Horn, and T. Laor. 2013. "Analysis of fatty infiltration and inflammation of the pelvic and thigh muscles in boys with Duchenne muscular dystrophy (DMD): grading of disease involvement on MR imaging and correlation with clinical assessments." *Pediatr Radiol* 43 (10):1327-35. doi: 10.1007/s00247-013-2696-z.
- Kimura, E., S. Li, P. Gregorevic, B. M. Fall, and J. S. Chamberlain. 2010. "Dystrophin delivery to muscles of mdx mice using lentiviral vectors leads to myogenic progenitor targeting and stable gene expression." *Mol Ther* 18 (1):206-13. doi: 10.1038/mt.2009.253.
- Klingler, W., K. Jurkat-Rott, F. Lehmann-Horn, and R. Schleip. 2012. "The role of fibrosis in Duchenne muscular dystrophy." *Acta Myol* 31 (3):184-95.
- Knudsen, K. A., and A. F. Horwitz. 1977. "Tandem events in myoblast fusion." *Dev Biol* 58 (2):328-38.
- Koenig, M., E. P. Hoffman, C. J. Bertelson, A. P. Monaco, C. Feener, and L. M. Kunkel. 1987. "Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals." *Cell* 50 (3):509-17.
- Koenig, M., A. P. Monaco, and L. M. Kunkel. 1988. "The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein." *Cell* 53 (2):219-28.
- Kohno, S., T. Ueji, T. Abe, R. Nakao, K. Hirasaka, M. Oarada, A. Harada-Sukeno, A. Ohno, A. Higashibata, R. Mukai, J. Terao, Y. Okumura, and T. Nikawa. 2011. "Rantes secreted from macrophages disturbs skeletal muscle regeneration after cardiotoxin injection in Cbl-b-deficient mice." *Muscle Nerve* 43 (2):223-9. doi: 10.1002/mus.21829.
- Kollu, S., R. Abou-Khalil, C. Shen, and A. S. Brack. 2015. "The Spindle Assembly Checkpoint

- Safeguards Genomic Integrity of Skeletal Muscle Satellite Cells." *Stem Cell Reports* 4 (6):1061-74. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.04.006.
- Kopan, R., J. S. Nye, and H. Weintraub. 1994. "The intracellular domain of mouse Notch: a constitutively activated repressor of myogenesis directed at the basic helix-loop-helix region of MyoD." *Development* 120 (9):2385-96.
- Kornegay, J. N., J. R. Bogan, D. J. Bogan, M. K. Childers, J. Li, P. Nghiem, D. A. Detwiler, C. A. Larsen, R. W. Grange, R. K. Bhavaraju-Sanka, S. Tou, B. P. Keene, J. F. Howard, J. Wang, Z. Fan, S. J. Schatzberg, M. A. Styner, K. M. Flanigan, X. Xiao, and E. P. Hoffman. 2012. "Canine models of Duchenne muscular dystrophy and their use in therapeutic strategies." *Mamm Genome* 23 (1-2):85-108. doi: 10.1007/s00335-011-9382-y.
- Kottlors, M., and J. Kirschner. 2010. "Elevated satellite cell number in Duchenne muscular dystrophy." *Cell Tissue Res* 340 (3):541-8. doi: 10.1007/s00441-010-0976-6.
- Kouba, M., and P. Sellier. 2011. "A review of the factors influencing the development of intermuscular adipose tissue in the growing pig." *Meat Sci* 88 (2):213-20. doi: 10.1016/j.meatsci.2011.01.003.
- Kramann, R., D. P. DiRocco, and B. D. Humphreys. 2013. "Understanding the origin, activation and regulation of matrix-producing myofibroblasts for treatment of fibrotic disease." *J Pathol* 231 (3):273-89. doi: 10.1002/path.4253.
- Kuang, S., S. B. Chargé, P. Seale, M. Huh, and M. A. Rudnicki. 2006. "Distinct roles for Pax7 and Pax3 in adult regenerative myogenesis." *J Cell Biol* 172 (1):103-13. doi: 10.1083/jcb.200508001.
- Kuang, S., K. Kuroda, F. Le Grand, and M. A. Rudnicki. 2007. "Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle." *Cell* 129 (5):999-1010. doi: 10.1016/j.cell.2007.03.044.
- Kumar, A., and A. M. Boriek. 2003. "Mechanical stress activates the nuclear factor-kappaB pathway in skeletal muscle fibers: a possible role in Duchenne muscular dystrophy." *FASEB J* 17 (3):386-96. doi: 10.1096/fj.02-0542com.
- Kuswanto, W., D. Burzyn, M. Panduro, K. K. Wang, Y. C. Jang, A. J. Wagers, C. Benoist, and D. Mathis. 2016. "Poor Repair of Skeletal Muscle in Aging Mice Reflects a Defect in Local, Interleukin-33-Dependent Accumulation of Regulatory T Cells." *Immunity* 44 (2):355-67. doi: 10.1016/j.immuni.2016.01.009.

- Kutcher, M. E., and I. M. Herman. 2009. "The pericyte: cellular regulator of microvascular blood flow." *Microvasc Res* 77 (3):235-46. doi: 10.1016/j.mvr.2009.01.007.
- LaBarge, M. A., and H. M. Blau. 2002. "Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury." *Cell* 111 (4):589-601.
- Lafreniere, J. F., M. C. Caron, D. Skuk, M. Goulet, A. R. Cheikh, and J. P. Tremblay. 2009. "Growth factor coinjection improves the migration potential of monkey myogenic precursors without affecting cell transplantation success." *Cell Transplant* 18 (7):719-30. doi: 10.3727/096368909X470900.
- Langen, R. C., A. M. Schols, M. C. Kelders, E. F. Wouters, and Y. M. Janssen-Heininger. 2001. "Inflammatory cytokines inhibit myogenic differentiation through activation of nuclear factor-kappaB." *FASEB J* 15 (7):1169-80.
- Lapidos, K. A., Y. E. Chen, J. U. Earley, A. Heydemann, J. M. Huber, M. Chien, A. Ma, and E. M. McNally. 2004. "Transplanted hematopoietic stem cells demonstrate impaired sarcoglycan expression after engraftment into cardiac and skeletal muscle." *J Clin Invest* 114 (11):1577-85. doi: 10.1172/JCI23071.
- Larochelle, N., W. Oualikene, P. Dunant, B. Massie, G. Karpati, J. Nalbantoglu, and H. Lochmuller. 2002. "The short MCK1350 promoter/enhancer allows for sufficient dystrophin expression in skeletal muscles of mdx mice." *Biochem Biophys Res Commun* 292 (3):626-31. doi: 10.1006/bbrc.2002.6715.
- Laterza, O. F., L. Lim, P. W. Garrett-Engele, K. Vlasakova, N. Muniappa, W. K. Tanaka, J. M. Johnson, J. F. Sina, T. L. Fare, F. D. Sistare, and W. E. Glaab. 2009. "Plasma MicroRNAs as sensitive and specific biomarkers of tissue injury." *Clin Chem* 55 (11):1977-83. doi: 10.1373/clinchem.2009.131797.
- Laurens, C., K. Louche, C. Sengenès, M. Coué, D. Langin, C. Moro, and V. Bourlier. 2016. "Adipogenic progenitors from obese human skeletal muscle give rise to functional white adipocytes that contribute to insulin resistance." *Int J Obes (Lond)* 40 (3):497-506. doi: 10.1038/ijo.2015.193.
- Law, P. K., T. G. Goodwin, Q. Fang, M. B. Deering, V. Duggirala, C. Larkin, J. A. Florendo, D. S. Kirby, H. J. Li, and M. Chen. 1993. "Cell transplantation as an experimental treatment for Duchenne muscular dystrophy." *Cell Transplant* 2 (6):485-505.

- Law, P. K., T. G. Goodwin, Q. Fang, V. Duggirala, C. Larkin, J. A. Florendo, D. S. Kirby, M. B. Deering, H. J. Li, and M. Chen. 1992. "Feasibility, safety, and efficacy of myoblast transfer therapy on Duchenne muscular dystrophy boys." *Cell Transplant* 1 (2-3):235-44.
- Law, P. K., T. G. Goodwin, Q. W. Fang, M. Chen, H. J. Li, J. A. Florendo, and D. S. Kirby. 1991. "Myoblast transfer therapy for Duchenne muscular dystrophy." *Acta Paediatr Jpn* 33 (2):206-15.
- Le Grand, F., A. E. Jones, V. Seale, A. Scimè, and M. A. Rudnicki. 2009. "Wnt7a activates the planar cell polarity pathway to drive the symmetric expansion of satellite stem cells." *Cell Stem Cell* 4 (6):535-47. doi: 10.1016/j.stem.2009.03.013.
- Lecourt, S., J. P. Marolleau, O. Fromigué, K. Vauchez, R. Andriamanalijaona, B. Ternaux, M. N. Lacassagne, I. Robert, K. Boumédiène, F. Chéreau, P. Marie, J. Larghéro, M. Fiszman, and J. T. Vilquin. 2010. "Characterization of distinct mesenchymal-like cell populations from human skeletal muscle in situ and in vitro." *Exp Cell Res* 316 (15):2513-26. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.04.020.
- Lee, J. Y., Z. Qu-Petersen, B. Cao, S. Kimura, R. Jankowski, J. Cummins, A. Usas, C. Gates, P. Robbins, A. Wernig, and J. Huard. 2000. "Clonal isolation of muscle-derived cells capable of enhancing muscle regeneration and bone healing." *J Cell Biol* 150 (5):1085-100.
- Lee, S. J., and A. C. McPherron. 2001. "Regulation of myostatin activity and muscle growth." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (16):9306-11. doi: 10.1073/pnas.151270098.
- Lee, S., Y. Kim, D. A. White, J. L. Kuk, and S. Arslanian. 2012. "Relationships between insulin sensitivity, skeletal muscle mass and muscle quality in obese adolescent boys." *Eur J Clin Nutr* 66 (12):1366-8. doi: 10.1038/ejcn.2012.142.
- Lee, Y. H., A. P. Petkova, E. P. Mottillo, and J. G. Granneman. 2012. "In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by β 3-adrenoceptor activation and high-fat feeding." *Cell Metab* 15 (4):480-91. doi: 10.1016/j.cmet.2012.03.009.
- Lemos, D. R., F. Babaeijandaghi, M. Low, C. K. Chang, S. T. Lee, D. Fiore, R. H. Zhang, A. Natarajan, S. A. Nedospasov, and F. M. Rossi. 2015. "Nilotinib reduces muscle fibrosis in chronic muscle injury by promoting TNF-mediated apoptosis of fibro/adipogenic progenitors." *Nat Med* 21 (7):786-94. doi: 10.1038/nm.3869.
- Lepper, C., and C. M. Fan. 2010. "Inducible lineage tracing of Pax7-descendant cells reveals embryonic origin of adult satellite cells." *Genesis* 48 (7):424-36. doi: 10.1002/dvg.20630.

- Lepper, C., T. A. Partridge, and C. M. Fan. 2011. "An absolute requirement for Pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration." *Development* 138 (17):3639-46. doi: 10.1242/dev.067595.
- Lescaudron, L., E. Peltékian, J. Fontaine-Pérus, D. Paulin, M. Zampieri, L. Garcia, and E. Parrish. 1999. "Blood borne macrophages are essential for the triggering of muscle regeneration following muscle transplant." *Neuromuscul Disord* 9 (2):72-80.
- Levinovitz, A., E. Jennische, A. Oldfors, D. Edwall, and G. Norstedt. 1992. "Activation of insulin-like growth factor II expression during skeletal muscle regeneration in the rat: correlation with myotube formation." *Mol Endocrinol* 6 (8):1227-34. doi: 10.1210/mend.6.8.1406701.
- Lewis, F. C., B. J. Henning, G. Marazzi, D. Sassoon, G. M. Ellison, and B. Nadal-Ginard. 2014. "Porcine skeletal muscle-derived multipotent PW1pos/Pax7neg interstitial cells: isolation, characterization, and long-term culture." *Stem Cells Transl Med* 3 (6):702-12. doi: 10.5966/sctm.2013-0174.
- Li, S., E. Kimura, B. M. Fall, M. Reyes, J. C. Angello, R. Welikson, S. D. Hauschka, and J. S. Chamberlain. 2005. "Stable transduction of myogenic cells with lentiviral vectors expressing a minidystrophin." *Gene Ther* 12 (14):1099-108. doi: 10.1038/sj.gt.3302505.
- Li, Y. P. 2003. "TNF-alpha is a mitogen in skeletal muscle." *Am J Physiol Cell Physiol* 285 (2):C370-6. doi: 10.1152/ajpcell.00453.2002.
- Li, Z. B., H. D. Kollias, and K. R. Wagner. 2008. "Myostatin directly regulates skeletal muscle fibrosis." *J Biol Chem* 283 (28):19371-8. doi: 10.1074/jbc.M802585200.
- Lindström, M., F. Pedrosa-Domellöf, and L. E. Thornell. 2010. "Satellite cell heterogeneity with respect to expression of MyoD, myogenin, Dlk1 and c-Met in human skeletal muscle: application to a cohort of power lifters and sedentary men." *Histochem Cell Biol* 134 (4):371-85. doi: 10.1007/s00418-010-0743-5.
- Lipton, B. H., and I. R. Konigsberg. 1972. "A fine-structural analysis of the fusion of myogenic cells." *J Cell Biol* 53 (2):348-64.
- Liu, J., M. Aoki, I. Illa, C. Wu, M. Fardeau, C. Angelini, C. Serrano, J. A. Urtizberea, F. Hentati, M. B. Hamida, S. Bohlega, E. J. Culper, A. A. Amato, K. Bossie, J. Oeltjen, K. Bejaoui, D. McKenna-Yasek, B. A. Hosler, E. Schurr, K. Arahata, P. J. de Jong, and R. H. Brown. 1998. "Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb

- girdle muscular dystrophy." *Nat Genet* 20 (1):31-6. doi: 10.1038/1682.
- Liu, L., T. H. Cheung, G. W. Charville, B. M. Hurgo, T. Leavitt, J. Shih, A. Brunet, and T. A. Rando. 2013. "Chromatin modifications as determinants of muscle stem cell quiescence and chronological aging." *Cell Rep* 4 (1):189-204. doi: 10.1016/j.celrep.2013.05.043.
- Liu, W., Y. Liu, X. Lai, and S. Kuang. 2012. "Intramuscular adipose is derived from a non-Pax3 lineage and required for efficient regeneration of skeletal muscles." *Dev Biol* 361 (1):27-38. doi: 10.1016/j.ydbio.2011.10.011.
- Lolmede, K., L. Campana, M. Vezzoli, L. Bosurgi, R. Tonlorenzi, E. Clementi, M. E. Bianchi, G. Cossu, A. A. Manfredi, S. Brunelli, and P. Rovere-Querini. 2009. "Inflammatory and alternatively activated human macrophages attract vessel-associated stem cells, relying on separate HMGB1- and MMP-9-dependent pathways." *J Leukoc Biol* 85 (5):779-87. doi: 10.1189/jlb.0908579.
- Lombardi, R., S. N. Chen, A. Ruggiero, P. Gurha, G. Z. Czernuszewicz, J. T. Willerson, and A. J. Marian. 2016. "Cardiac Fibro-Adipocyte Progenitors Express Desmosome Proteins and Preferentially Differentiate to Adipocytes Upon Deletion of the Desmoplakin Gene." *Circ Res* 119 (1):41-54. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.308136.
- Loperfido, M., S. Jarmin, S. Dastidar, M. Di Matteo, I. Perini, M. Moore, N. Nair, E. Samarakuko, T. Athanasopoulos, F. S. Tedesco, G. Dickson, M. Sampaolesi, T. VandenDriessche, and M. K. Chuah. 2016. "piggyBac transposons expressing full-length human dystrophin enable genetic correction of dystrophic mesoangioblasts." *Nucleic Acids Res* 44 (2):744-60. doi: 10.1093/nar/gkv1464.
- Lu, A., J. H. Cummins, J. B. Pollett, B. Cao, B. Sun, M. A. Rudnicki, and J. Huard. 2008. "Isolation of myogenic progenitor populations from Pax7-deficient skeletal muscle based on adhesion characteristics." *Gene Ther* 15 (15):1116-25. doi: 10.1038/gt.2008.86.
- Lu, H., D. Huang, N. Saederup, I. F. Charo, R. M. Ransohoff, and L. Zhou. 2011. "Macrophages recruited via CCR2 produce insulin-like growth factor-1 to repair acute skeletal muscle injury." *FASEB J* 25 (1):358-69. doi: 10.1096/fj.10-171579.
- Lukjanenko, L., S. Brachat, E. Pierrel, E. Lach-Trifilieff, and J. N. Feige. 2013. "Genomic profiling reveals that transient adipogenic activation is a hallmark of mouse models of skeletal muscle regeneration." *PLoS One* 8 (8):e71084. doi: 10.1371/journal.pone.0071084.
- Malerba, A., L. Vitiello, D. Segat, E. Dazzo, M. Frigo, I. Scambi, P. De Coppi, L. Boldrin, L.

- Martelli, A. Pasut, C. Romualdi, R. G. Bellomo, J. Vecchiet, and M. D. Baroni. 2009. "Selection of multipotent cells and enhanced muscle reconstruction by myogenic macrophage-secreted factors." *Exp Cell Res* 315 (6):915-27. doi: 10.1016/j.yexcr.2009.01.005.
- Mann, C. J., E. Perdiguero, Y. Kharraz, S. Aguilar, P. Pessina, A. L. Serrano, and P. Muñoz-Cánoves. 2011. "Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle." *Skelet Muscle* 1 (1):21. doi: 10.1186/2044-5040-1-21.
- Mantovani, A., S. Sozzani, M. Locati, T. Schioppa, A. Saccani, P. Allavena, and A. Sica. 2004. "Infiltration of tumours by macrophages and dendritic cells: tumour-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes." *Novartis Found Symp* 256:137-45; discussion 146-8, 259-69.
- Marcelle, C., M. R. Stark, and M. Bronner-Fraser. 1997. "Coordinate actions of BMPs, Wnts, Shh and noggin mediate patterning of the dorsal somite." *Development* 124 (20):3955-63.
- Marcelle, C., J. Wolf, and M. Bronner-Fraser. 1995. "The in vivo expression of the FGF receptor FREK mRNA in avian myoblasts suggests a role in muscle growth and differentiation." *Dev Biol* 172 (1):100-14. doi: 10.1006/dbio.1995.0008.
- Maroto, M., R. Reshef, A. E. Münsterberg, S. Koester, M. Goulding, and A. B. Lassar. 1997. "Ectopic Pax-3 activates MyoD and Myf-5 expression in embryonic mesoderm and neural tissue." *Cell* 89 (1):139-48.
- Marshall, E. 1999. "Gene therapy death prompts review of adenovirus vector." *Science* 286 (5448):2244-5.
- Martinez, C. O., M. J. McHale, J. T. Wells, O. Ochoa, J. E. Michalek, L. M. McManus, and P. K. Shireman. 2010. "Regulation of skeletal muscle regeneration by CCR2-activating chemokines is directly related to macrophage recruitment." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299 (3):R832-42. doi: 10.1152/ajpregu.00797.2009.
- Martinez, F. O., A. Sica, A. Mantovani, and M. Locati. 2008. "Macrophage activation and polarization." *Front Biosci* 13:453-61.
- Massagué, J., S. Cheifetz, T. Endo, and B. Nadal-Ginard. 1986. "Type beta transforming growth factor is an inhibitor of myogenic differentiation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 (21):8206-10.
- Mathew, S. J., J. M. Hansen, A. J. Merrell, M. M. Murphy, J. A. Lawson, D. A. Hutcheson, M. S.

- Hansen, M. Angus-Hill, and G. Kardon. 2011. "Connective tissue fibroblasts and Tcf4 regulate myogenesis." *Development* 138 (2):371-84. doi: 10.1242/dev.057463.
- Matsumura, K., K. Ohlendieck, V. V. Ionasescu, F. M. Tomé, I. Nonaka, A. H. Burghes, M. Mora, J. C. Kaplan, M. Fardeau, and K. P. Campbell. 1993. "The role of the dystrophin-glycoprotein complex in the molecular pathogenesis of muscular dystrophies." *Neuromuscul Disord* 3 (5-6):533-5.
- Mauro, A. 1961. "Satellite cell of skeletal muscle fibers." *J Biophys Biochem Cytol* 9:493-5.
- McArdle, A., R. H. Edwards, and M. J. Jackson. 1995. "How does dystrophin deficiency lead to muscle degeneration?--evidence from the mdx mouse." *Neuromuscul Disord* 5 (6):445-56.
- McCroskery, S., M. Thomas, L. Platt, A. Hennebry, T. Nishimura, L. McLeay, M. Sharma, and R. Kambadur. 2005. "Improved muscle healing through enhanced regeneration and reduced fibrosis in myostatin-null mice." *J Cell Sci* 118 (Pt 15):3531-41. doi: 10.1242/jcs.02482.
- McKay, B. R., D. I. Ogborn, L. M. Bellamy, M. A. Tarnopolsky, and G. Parise. 2012. "Myostatin is associated with age-related human muscle stem cell dysfunction." *FASEB J* 26 (6):2509-21. doi: 10.1096/fj.11-198663.
- McLennan, I. S. 1993. "Resident macrophages (ED2- and ED3-positive) do not phagocytose degenerating rat skeletal muscle fibres." *Cell Tissue Res* 272 (1):193-6.
- McLennan, I. S. 1996. "Degenerating and regenerating skeletal muscles contain several subpopulations of macrophages with distinct spatial and temporal distributions." *J Anat* 188 (Pt 1):17-28.
- McLoon, L. K., and J. Wirtschafter. 2003. "Activated satellite cells in extraocular muscles of normal adult monkeys and humans." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 (5):1927-32.
- McPherron, A. C., A. M. Lawler, and S. J. Lee. 1997. "Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member." *Nature* 387 (6628):83-90. doi: 10.1038/387083a0.
- McPherron, A. C., and S. J. Lee. 2002. "Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice." *J Clin Invest* 109 (5):595-601. doi: 10.1172/JCI13562.
- Meeson, A. P., T. J. Hawke, S. Graham, N. Jiang, J. Elterman, K. Hutcheson, J. M. Dimaio, T. D. Gallardo, and D. J. Garry. 2004. "Cellular and molecular regulation of skeletal muscle side population cells." *Stem Cells* 22 (7):1305-20. doi: 10.1634/stemcells.2004-0077.

- Megeney, L. A., B. Kablar, K. Garrett, J. E. Anderson, and M. A. Rudnicki. 1996. "MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle." *Genes Dev* 10 (10):1173-83.
- Mendell, J. R., and K. R. Clark. 2006. "Challenges for gene therapy for muscular dystrophy." *Curr Neurol Neurosci Rep* 6 (1):47-56.
- Mendell, J. R., J. T. Kissel, A. A. Amato, W. King, L. Signore, T. W. Prior, Z. Sahenk, S. Benson, P. E. McAndrew, and R. Rice. 1995. "Myoblast transfer in the treatment of Duchenne's muscular dystrophy." *N Engl J Med* 333 (13):832-8. doi: 10.1056/NEJM199509283331303.
- Meng, J., S. Chun, R. Asfahani, H. Lochmüller, F. Muntoni, and J. Morgan. 2014. "Human skeletal muscle-derived CD133(+) cells form functional satellite cells after intramuscular transplantation in immunodeficient host mice." *Mol Ther* 22 (5):1008-17. doi: 10.1038/mt.2014.26.
- Meng, J., F. Muntoni, and J. E. Morgan. 2011. "Stem cells to treat muscular dystrophies - where are we?" *Neuromuscul Disord* 21 (1):4-12. doi: 10.1016/j.nmd.2010.10.004.
- Menzies, F. M., A. Fleming, and D. C. Rubinsztein. 2015. "Compromised autophagy and neurodegenerative diseases." *Nat Rev Neurosci* 16 (6):345-57. doi: 10.1038/nrn3961.
- Meregalli, M., A. Farini, C. Sitzia, C. Beley, P. Razini, L. Cassinelli, F. Colleoni, P. Frattini, N. Santo, E. Galbiati, D. Prosperi, A. Tavelli, M. Belicchi, L. Garcia, and Y. Torrente. 2015. "Stem Cell-Mediated Exon Skipping of the Dystrophin Gene by the Bystander Effect." *Curr Gene Ther* 15 (6):563-71.
- Merly, F., L. Lescaudron, T. Rouaud, F. Crossin, and M. F. Gardahaut. 1999. "Macrophages enhance muscle satellite cell proliferation and delay their differentiation." *Muscle Nerve* 22 (6):724-32.
- Messina, G., and G. Cossu. 2009. "The origin of embryonic and fetal myoblasts: a role of Pax3 and Pax7." *Genes Dev* 23 (8):902-5. doi: 10.1101/gad.1797009.
- Miller, R. G., K. R. Sharma, G. K. Pavlath, E. Gussoni, M. Mynhier, A. M. Lanctot, C. M. Greco, L. Steinman, and H. M. Blau. 1997. "Myoblast implantation in Duchenne muscular dystrophy: the San Francisco study." *Muscle Nerve* 20 (4):469-78.
- Minasi, M. G., M. Riminucci, L. De Angelis, U. Borello, B. Berarducci, A. Innocenzi, A. Caprioli, D. Sirabella, M. Baiocchi, R. De Maria, R. Boratto, T. Jaffredo, V. Broccoli, P. Bianco,

- and G. Cossu. 2002. "The meso-angioblast: a multipotent, self-renewing cell that originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues." *Development* 129 (11):2773-83.
- Minetti, C., F. Sotgia, C. Bruno, P. Scartezzini, P. Broda, M. Bado, E. Masetti, M. Mazzocco, A. Egeo, M. A. Donati, D. Volonte, F. Galbiati, G. Cordone, F. D. Bricarelli, M. P. Lisanti, and F. Zara. 1998. "Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy." *Nat Genet* 18 (4):365-8. doi: 10.1038/ng0498-365.
- Minetti, G. C., C. Colussi, R. Adami, C. Serra, C. Mozzetta, V. Parente, S. Fortuni, S. Straino, M. Sampaolesi, M. Di Padova, B. Illi, P. Gallinari, C. Steinkühler, M. C. Capogrossi, V. Sartorelli, R. Bottinelli, C. Gaetano, and P. L. Puri. 2006. "Functional and morphological recovery of dystrophic muscles in mice treated with deacetylase inhibitors." *Nat Med* 12 (10):1147-50. doi: 10.1038/nm1479.
- Mitchell, K. J., A. Pannérec, B. Cadot, A. Parlakian, V. Besson, E. R. Gomes, G. Marazzi, and D. A. Sassoon. 2010. "Identification and characterization of a non-satellite cell muscle resident progenitor during postnatal development." *Nat Cell Biol* 12 (3):257-66. doi: 10.1038/ncb2025.
- Mitchell, P. J., S. E. Johnson, and K. Hannon. 2002. "Insulin-like growth factor I stimulates myoblast expansion and myofiber development in the limb." *Dev Dyn* 223 (1):12-23. doi: 10.1002/dvdy.1227.
- Mizuno, Y., H. Chang, K. Umeda, A. Niwa, T. Iwasa, T. Awaya, S. Fukada, H. Yamamoto, S. Yamanaka, T. Nakahata, and T. Heike. 2010. "Generation of skeletal muscle stem/progenitor cells from murine induced pluripotent stem cells." *FASEB J* 24 (7):2245-53. doi: 10.1096/fj.09-137174.
- Moens, P. D., M. C. Van-Schoor, and G. Maréchal. 1996. "Lack of myoblasts migration between transplanted and host muscles of mdx and normal mice." *J Muscle Res Cell Motil* 17 (1):37-43.
- Montarras, D., J. Morgan, C. Collins, F. Relaix, S. Zaffran, A. Cumano, T. Partridge, and M. Buckingham. 2005. "Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration." *Science* 309 (5743):2064-7. doi: 10.1126/science.1114758.
- Moresi, V., A. Pristerà, B. M. Scicchitano, M. Molinaro, L. Teodori, D. Sassoon, S. Adamo, and D. Coletti. 2008. "Tumor necrosis factor-alpha inhibition of skeletal muscle regeneration

- is mediated by a caspase-dependent stem cell response." *Stem Cells* 26 (4):997-1008. doi: 10.1634/stemcells.2007-0493.
- Morikawa, S., Y. Mabuchi, Y. Kubota, Y. Nagai, K. Niibe, E. Hiratsu, S. Suzuki, C. Miyauchi-Hara, N. Nagoshi, T. Sunabori, S. Shimmura, A. Miyawaki, T. Nakagawa, T. Suda, H. Okano, and Y. Matsuzaki. 2009. "Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow." *J Exp Med* 206 (11):2483-96. doi: 10.1084/jem.20091046.
- Morosetti, R., M. Mirabella, C. Gliubizzi, A. Broccolini, L. De Angelis, E. Tagliafico, M. Sampaolesi, T. Gidaro, M. Papacci, E. Roncaglia, S. Rutella, S. Ferrari, P. A. Tonali, E. Ricci, and G. Cossu. 2006. "MyoD expression restores defective myogenic differentiation of human mesoangioblasts from inclusion-body myositis muscle." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (45):16995-7000. doi: 10.1073/pnas.0603386103.
- Morrison, J. I., S. Lööf, P. He, and A. Simon. 2006. "Salamander limb regeneration involves the activation of a multipotent skeletal muscle satellite cell population." *J Cell Biol* 172 (3):433-40. doi: 10.1083/jcb.200509011.
- Mosser, D. M. 2003. "The many faces of macrophage activation." *J Leukoc Biol* 73 (2):209-12.
- Mosser, D. M., and J. P. Edwards. 2008. "Exploring the full spectrum of macrophage activation." *Nat Rev Immunol* 8 (12):958-69. doi: 10.1038/nri2448.
- Mounier, R., F. Chrétien, and B. Chazaud. 2011. "Blood vessels and the satellite cell niche." *Curr Top Dev Biol* 96:121-38. doi: 10.1016/B978-0-12-385940-2.00005-X.
- Mounier, R., M. Théret, L. Arnold, S. Cuvellier, L. Bultot, O. Göransson, N. Sanz, A. Ferry, K. Sakamoto, M. Foretz, B. Viollet, and B. Chazaud. 2013. "AMPK α 1 regulates macrophage skewing at the time of resolution of inflammation during skeletal muscle regeneration." *Cell Metab* 18 (2):251-64. doi: 10.1016/j.cmet.2013.06.017.
- Mozzetta, C., S. Consalvi, V. Saccone, M. Tierney, A. Diamantini, K. J. Mitchell, G. Marazzi, G. Borsellino, L. Battistini, D. Sassoon, A. Sacco, and P. L. Puri. 2013. "Fibroadipogenic progenitors mediate the ability of HDAC inhibitors to promote regeneration in dystrophic muscles of young, but not old Mdx mice." *EMBO Mol Med* 5 (4):626-39. doi: 10.1002/emmm.201202096.
- Mu, X., G. Xiang, C. R. Rathbone, H. Pan, I. H. Bellayr, T. J. Walters, and Y. Li. 2011. "Slow-adhering stem cells derived from injured skeletal muscle have improved regenerative

- capacity." *Am J Pathol* 179 (2):931-41. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.05.004.
- Murphy, M. M., J. A. Lawson, S. J. Mathew, D. A. Hutcheson, and G. Kardon. 2011. "Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration." *Development* 138 (17):3625-37. doi: 10.1242/dev.064162.
- Murphy, M. M., A. C. Keefe, J. A. Lawson, S. D. Flygare, M. Yandell, and G. Kardon. 2014. "Transiently active Wnt/ β -catenin signaling is not required but must be silenced for stem cell function during muscle regeneration." *Stem Cell Reports* 3 (3):475-88. doi: 10.1016/j.stemcr.2014.06.019.
- Musarò, A. 2005. "Growth factor enhancement of muscle regeneration: a central role of IGF-1." *Arch Ital Biol* 143 (3-4):243-8.
- Muñoz-Cánoves, P., and A. L. Serrano. 2015. "Macrophages decide between regeneration and fibrosis in muscle." *Trends Endocrinol Metab* 26 (9):449-50. doi: 10.1016/j.tem.2015.07.005.
- Nahrendorf, M., F. K. Swirski, E. Aikawa, L. Stangenberg, T. Wurdinger, J. L. Figueiredo, P. Libby, R. Weissleder, and M. J. Pittet. 2007. "The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions." *J Exp Med* 204 (12):3037-47. doi: 10.1084/jem.20070885.
- Naito, A. T., T. Sumida, S. Nomura, M. L. Liu, T. Higo, A. Nakagawa, K. Okada, T. Sakai, A. Hashimoto, Y. Hara, I. Shimizu, W. Zhu, H. Toko, A. Katada, H. Akazawa, T. Oka, J. K. Lee, T. Minamino, T. Nagai, K. Walsh, A. Kikuchi, M. Matsumoto, M. Botto, I. Shiojima, and I. Komuro. 2012. "Complement C1q activates canonical Wnt signaling and promotes aging-related phenotypes." *Cell* 149 (6):1298-313. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.047.
- Natarajan, A., D. R. Lemos, and F. M. Rossi. 2010. "Fibro/adipogenic progenitors: a double-edged sword in skeletal muscle regeneration." *Cell Cycle* 9 (11):2045-6. doi: 10.4161/cc.9.11.11854.
- Negróni, E., I. Riederer, S. Chaouch, M. Belicchi, P. Razini, J. Di Santo, Y. Torrente, G. S. Butler-Browne, and V. Mouly. 2009. "In vivo myogenic potential of human CD133+ muscle-derived stem cells: a quantitative study." *Mol Ther* 17 (10):1771-8. doi: 10.1038/mt.2009.167.
- Nguyen, H. T., and M. Frasch. 2006. "MicroRNAs in muscle differentiation: lessons from *Drosophila* and beyond." *Curr Opin Genet Dev* 16 (5):533-9. doi:

10.1016/j.gde.2006.08.010.

- Nicolas, N., G. Marazzi, K. Kelley, and D. Sassoon. 2005. "Embryonic deregulation of muscle stress signaling pathways leads to altered postnatal stem cell behavior and a failure in postnatal muscle growth." *Dev Biol* 281 (2):171-83. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.02.022.
- Novitch, B. G., G. J. Mulligan, T. Jacks, and A. B. Lassar. 1996. "Skeletal muscle cells lacking the retinoblastoma protein display defects in muscle gene expression and accumulate in S and G2 phases of the cell cycle." *J Cell Biol* 135 (2):441-56.
- Olguin, H. C., and B. B. Olwin. 2004. "Pax-7 up-regulation inhibits myogenesis and cell cycle progression in satellite cells: a potential mechanism for self-renewal." *Dev Biol* 275 (2):375-88. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.08.015.
- Olguin, H. C., Z. Yang, S. J. Tapscott, and B. B. Olwin. 2007. "Reciprocal inhibition between Pax7 and muscle regulatory factors modulates myogenic cell fate determination." *J Cell Biol* 177 (5):769-79. doi: 10.1083/jcb.200608122.
- Olson, L. E., and P. Soriano. 2009. "Increased PDGFRalpha activation disrupts connective tissue development and drives systemic fibrosis." *Dev Cell* 16 (2):303-13. doi: 10.1016/j.devcel.2008.12.003.
- Ono, Y., L. Boldrin, P. Knopp, J. E. Morgan, and P. S. Zammit. 2010. "Muscle satellite cells are a functionally heterogeneous population in both somite-derived and branchiomic muscles." *Dev Biol* 337 (1):29-41. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.10.005.
- Ontell, M., M. P. Ontell, M. M. Sopper, R. Mallonga, G. Lyons, and M. Buckingham. 1993. "Contractile protein gene expression in primary myotubes of embryonic mouse hindlimb muscles." *Development* 117 (4):1435-44.
- Orimo, S., E. Hiyamuta, K. Arahata, and H. Sugita. 1991. "Analysis of inflammatory cells and complement C3 in bupivacaine-induced myonecrosis." *Muscle Nerve* 14 (6):515-20. doi: 10.1002/mus.880140605.
- Palumbo, R., M. Sampaolesi, F. De Marchis, R. Tonlrenzi, S. Colombetti, A. Mondino, G. Cossu, and M. E. Bianchi. 2004. "Extracellular HMGB1, a signal of tissue damage, induces mesoangioblast migration and proliferation." *J Cell Biol* 164 (3):441-9. doi: 10.1083/jcb.200304135.
- Pannérec, A., L. Formicola, V. Besson, G. Marazzi, and D. A. Sassoon. 2013. "Defining skeletal muscle resident progenitors and their cell fate potentials." *Development* 140 (14):2879-

91. doi: 10.1242/dev.089326.
- Pannérec, A., G. Marazzi, and D. Sassoon. 2012. "Stem cells in the hood: the skeletal muscle niche." *Trends Mol Med* 18 (10):599-606. doi: 10.1016/j.molmed.2012.07.004.
- Pannérec, A., and D. Sassoon. 2010. "[PICs (PW1+ interstitial cells), a new muscle stem cell population]." *Med Sci (Paris)* 26 (10):797-800. doi: 10.1051/medsci/20102610797.
- Partridge, T. A. 2004. "Stem cell therapies for neuromuscular diseases." *Acta Neurol Belg* 104 (4):141-7.
- Partridge, T. A., J. E. Morgan, G. R. Coulton, E. P. Hoffman, and L. M. Kunkel. 1989. "Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts." *Nature* 337 (6203):176-9. doi: 10.1038/337176a0.
- Patruno, M., F. Caliaro, T. Martinello, and F. Mascarello. 2008. "Expression of the paired box domain Pax7 protein in myogenic cells isolated from the porcine semitendinosus muscle after birth." *Tissue Cell* 40 (1):1-6. doi: 10.1016/j.tice.2007.08.006.
- Pattanaik, D., M. Brown, B. C. Postlethwaite, and A. E. Postlethwaite. 2015. "Pathogenesis of Systemic Sclerosis." *Front Immunol* 6:272. doi: 10.3389/fimmu.2015.00272.
- Pauwels, K., R. Gijssbers, J. Toelen, A. Schambach, K. Willard-Gallo, C. Verheust, Z. Debyser, and P. Herman. 2009. "State-of-the-art lentiviral vectors for research use: risk assessment and biosafety recommendations." *Curr Gene Ther* 9 (6):459-74.
- Pelosi, L., C. Giacinti, C. Nardis, G. Borsellino, E. Rizzuto, C. Nicoletti, F. Wannenes, L. Battistini, N. Rosenthal, M. Molinaro, and A. Musarò. 2007. "Local expression of IGF-1 accelerates muscle regeneration by rapidly modulating inflammatory cytokines and chemokines." *FASEB J* 21 (7):1393-402. doi: 10.1096/fj.06-7690com.
- Perdiguero, E., P. Sousa-Victor, V. Ruiz-Bonilla, M. Jardí, C. Caelles, A. L. Serrano, and P. Muñoz-Cánoves. 2011. "p38/MKP-1-regulated AKT coordinates macrophage transitions and resolution of inflammation during tissue repair." *J Cell Biol* 195 (2):307-22. doi: 10.1083/jcb.201104053.
- Pessina, P., Y. Kharraz, M. Jardí, S. Fukada, A. L. Serrano, E. Perdiguero, and P. Muñoz-Cánoves. 2015. "Fibrogenic Cell Plasticity Blunts Tissue Regeneration and Aggravates Muscular Dystrophy." *Stem Cell Reports* 4 (6):1046-60. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.04.007.
- Peterson, J. M., and D. C. Guttridge. 2008. "Skeletal muscle diseases, inflammation, and NF-kappaB signaling: insights and opportunities for therapeutic intervention." *Int Rev*

- Immunol* 27 (5):375-87. doi: 10.1080/08830180802302389.
- Piccioni, A., E. Gaetani, V. Neri, I. Gatto, M. Palladino, M. Silver, R. C. Smith, I. Giarretta, E. Pola, L. Hlatky, and R. Pola. 2014. "Sonic hedgehog therapy in a mouse model of age-associated impairment of skeletal muscle regeneration." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 69 (3):245-52. doi: 10.1093/gerona/glt076.
- Pietrangelo, T., C. Puglielli, R. Mancinelli, S. Beccafico, G. Fanò, and S. Fulle. 2009. "Molecular basis of the myogenic profile of aged human skeletal muscle satellite cells during differentiation." *Exp Gerontol* 44 (8):523-31. doi: 10.1016/j.exger.2009.05.002.
- Pietsch, P., and S. B. McCollister. 1965. "Replication and the activation of muscle differentiation." *Nature* 208 (5016):1170-3.
- Pimorady-Esfahani, A., M. D. Grounds, and P. G. McMenamin. 1997. "Macrophages and dendritic cells in normal and regenerating murine skeletal muscle." *Muscle Nerve* 20 (2):158-66.
- Pisani, D. F., C. D. Bottema, C. Butori, C. Dani, and C. A. Dechesne. 2010. "Mouse model of skeletal muscle adiposity: a glycerol treatment approach." *Biochem Biophys Res Commun* 396 (3):767-73. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.05.021.
- Pisani, D. F., N. Clement, A. Loubat, M. Plaisant, S. Sacconi, J. Y. Kurzenne, C. Desnuelle, C. Dani, and C. A. Dechesne. 2010. "Hierarchization of myogenic and adipogenic progenitors within human skeletal muscle." *Stem Cells* 28 (12):2182-94. doi: 10.1002/stem.537.
- Pisani, D. F., C. A. Dechesne, S. Sacconi, S. Delplace, N. Belmonte, O. Cochet, N. Clement, B. Wdziekonski, A. P. Villageois, C. Butori, C. Bagnis, J. P. Di Santo, J. Y. Kurzenne, C. Desnuelle, and C. Dani. 2010. "Isolation of a highly myogenic CD34-negative subset of human skeletal muscle cells free of adipogenic potential." *Stem Cells* 28 (4):753-64. doi: 10.1002/stem.317.
- Poggioli, T., A. Vujic, P. Yang, C. Macias-Trevino, A. Uygur, F. S. Loffredo, J. R. Pancoast, M. Cho, J. Goldstein, R. M. Tandias, E. Gonzalez, R. G. Walker, T. B. Thompson, A. J. Wagers, Y. W. Fong, and R. T. Lee. 2016. "Circulating Growth Differentiation Factor 11/8 Levels Decline With Age." *Circ Res* 118 (1):29-37. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.307521.
- Polesskaya, A., G. Pinna, Y. Sassi, M. Vandamme, A. Bigot, V. Mouly, N. Morozova, A. Harel-Bellan, and C. Degerny. 2016. "Post-transcriptional modulation of interleukin 8 by CNOT6L regulates skeletal muscle differentiation." *Biochim Biophys Acta* 1863 (2):263-

70. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.11.018.
- Porcheray, F., S. Viaud, A. C. Rimaniol, C. Léone, B. Samah, N. Dereuddre-Bosquet, D. Dormont, and G. Gras. 2005. "Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation." *Clin Exp Immunol* 142 (3):481-9. doi: 10.1111/j.1365-2249.2005.02934.x.
- Pouget, C., K. Pottin, and T. Jaffredo. 2008. "Sclerotomal origin of vascular smooth muscle cells and pericytes in the embryo." *Dev Biol* 315 (2):437-47. doi: 10.1016/j.ydbio.2007.12.045.
- Price, F. D., J. von Maltzahn, C. F. Bentzinger, N. A. Dumont, H. Yin, N. C. Chang, D. H. Wilson, J. Frenette, and M. A. Rudnicki. 2014. "Inhibition of JAK-STAT signaling stimulates adult satellite cell function." *Nat Med* 20 (10):1174-81. doi: 10.1038/nm.3655.
- Puri, P. L., and V. Sartorelli. 2000. "Regulation of muscle regulatory factors by DNA-binding, interacting proteins, and post-transcriptional modifications." *J Cell Physiol* 185 (2):155-73. doi: 10.1002/1097-4652(200011)185:2<155::AID-JCP1>3.0.CO;2-Z.
- Qin, S., G. LaRosa, J. J. Campbell, H. Smith-Heath, N. Kassam, X. Shi, L. Zeng, E. C. Buthcher, and C. R. Mackay. 1996. "Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 receptors on subsets of T cells: correlation with transendothelial chemotactic potential." *Eur J Immunol* 26 (3):640-7. doi: 10.1002/eji.1830260320.
- Qu-Petersen, Z., B. Deasy, R. Jankowski, M. Ikezawa, J. Cummins, R. Pruchnic, J. Mytinger, B. Cao, C. Gates, A. Wernig, and J. Huard. 2002. "Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration." *J Cell Biol* 157 (5):851-64. doi: 10.1083/jcb.200108150.
- Quattrocelli, M., D. Costamagna, G. Giacomazzi, J. Camps, and M. Sampaolesi. 2014. "Notch signaling regulates myogenic regenerative capacity of murine and human mesoangioblasts." *Cell Death Dis* 5:e1448. doi: 10.1038/cddis.2014.401.
- Radley, H. G., M. J. Davies, and M. D. Grounds. 2008. "Reduced muscle necrosis and long-term benefits in dystrophic mdx mice after cV1q (blockade of TNF) treatment." *Neuromuscul Disord* 18 (3):227-38. doi: 10.1016/j.nmd.2007.11.002.
- Rahimov, F., and L. M. Kunkel. 2013. "The cell biology of disease: cellular and molecular mechanisms underlying muscular dystrophy." *J Cell Biol* 201 (4):499-510. doi: 10.1083/jcb.201212142.
- Rando, T. A., M. H. Disatnik, Y. Yu, and A. Franco. 1998. "Muscle cells from mdx mice have an

- increased susceptibility to oxidative stress." *Neuromuscul Disord* 8 (1):14-21.
- Rantanen, J., T. Hurme, R. Lukka, J. Heino, and H. Kalimo. 1995. "Satellite cell proliferation and the expression of myogenin and desmin in regenerating skeletal muscle: evidence for two different populations of satellite cells." *Lab Invest* 72 (3):341-7.
- Rash, J. E., and D. Fambrough. 1973. "Ultrastructural and electrophysiological correlates of cell coupling and cytoplasmic fusion during myogenesis in vitro." *Dev Biol* 30 (1):166-86.
- Reimers, C. D., and M. Finkenstaedt. 1997. "Muscle imaging in inflammatory myopathies." *Curr Opin Rheumatol* 9 (6):475-85.
- Relaix, F., D. Montarras, S. Zaffran, B. Gayraud-Morel, D. Rocancourt, S. Tajbakhsh, A. Mansouri, A. Cumano, and M. Buckingham. 2006. "Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells." *J Cell Biol* 172 (1):91-102. doi: 10.1083/jcb.200508044.
- Relaix, F., D. Rocancourt, A. Mansouri, and M. Buckingham. 2005. "A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells." *Nature* 435 (7044):948-53. doi: 10.1038/nature03594.
- Relaix, F., X. Weng, G. Marazzi, E. Yang, N. Copeland, N. Jenkins, S. E. Spence, and D. Sassoon. 1996. "Pw1, a novel zinc finger gene implicated in the myogenic and neuronal lineages." *Dev Biol* 177 (2):383-96. doi: 10.1006/dbio.1996.0172.
- Relaix, F., and P. S. Zammit. 2012. "Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage." *Development* 139 (16):2845-56. doi: 10.1242/dev.069088.
- Reshef, R., M. Maroto, and A. B. Lassar. 1998. "Regulation of dorsal somitic cell fates: BMPs and Noggin control the timing and pattern of myogenic regulator expression." *Genes Dev* 12 (3):290-303.
- Rezza, A., R. Sennett, and M. Rendl. 2014. "Adult stem cell niches: cellular and molecular components." *Curr Top Dev Biol* 107:333-72. doi: 10.1016/B978-0-12-416022-4.00012-3.
- Rhodes, S. J., and S. F. Konieczny. 1989. "Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family." *Genes Dev* 3 (12B):2050-61.
- Rigamonti, E., T. Touvier, E. Clementi, A. A. Manfredi, S. Brunelli, and P. Rovere-Querini. 2013. "Requirement of inducible nitric oxide synthase for skeletal muscle regeneration after acute

- damage." *J Immunol* 190 (4):1767-77. doi: 10.4049/jimmunol.1202903.
- Rinaldi, F., Y. Zhang, R. Mondragon-Gonzalez, J. Harvey, and R. C. Perlingeiro. 2016. "Treatment with rGDF11 does not improve the dystrophic muscle pathology of mdx mice." *Skelet Muscle* 6:21. doi: 10.1186/s13395-016-0092-8.
- Rivier, F., O. Alkan, A. F. Flint, K. Muskiewicz, P. D. Allen, P. Leboulch, and E. Gussoni. 2004. "Role of bone marrow cell trafficking in replenishing skeletal muscle SP and MP cell populations." *J Cell Sci* 117 (Pt 10):1979-88. doi: 10.1242/jcs.01051.
- Robbins, D. J., D. L. Fei, and N. A. Riobo. 2012. "The Hedgehog signal transduction network." *Sci Signal* 5 (246):re6. doi: 10.1126/scisignal.2002906.
- Robertson, T. A., M. A. Maley, M. D. Grounds, and J. M. Papadimitriou. 1993. "The role of macrophages in skeletal muscle regeneration with particular reference to chemotaxis." *Exp Cell Res* 207 (2):321-31. doi: 10.1006/excr.1993.1199.
- Rodeheffer, M. S. 2010. "Tipping the scale: muscle versus fat." *Nat Cell Biol* 12 (2):102-4. doi: 10.1038/ncb0210-102.
- Rodeheffer, M. S., K. Birsoy, and J. M. Friedman. 2008. "Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo." *Cell* 135 (2):240-9. doi: 10.1016/j.cell.2008.09.036.
- Rodriguez, A. M., D. Pisani, C. A. Dechesne, C. Turc-Carel, J. Y. Kurzenne, B. Wdziekonski, A. Villageois, C. Bagnis, J. P. Breittmayer, H. Groux, G. Ailhaud, and C. Dani. 2005. "Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse." *J Exp Med* 201 (9):1397-405. doi: 10.1084/jem.20042224.
- Rosen, G. D., J. R. Sanes, R. LaChance, J. M. Cunningham, J. Roman, and D. C. Dean. 1992. "Roles for the integrin VLA-4 and its counter receptor VCAM-1 in myogenesis." *Cell* 69 (7):1107-19.
- Rosenberg, I. H. 1997. "Sarcopenia: origins and clinical relevance." *J Nutr* 127 (5 Suppl):990S-991S.
- Roth, D., and U. Oron. 1985. "Repair mechanisms involved in muscle regeneration following partial excision of the rat gastrocnemius muscle." *Exp Cell Biol* 53 (2):107-14.
- Roth, S. M., G. F. Martel, F. M. Ivey, J. T. Lemmer, E. J. Metter, B. F. Hurley, and M. A. Rogers. 2000. "Skeletal muscle satellite cell populations in healthy young and older men and women." *Anat Rec* 260 (4):351-8.

- Rudnicki, M. A., T. Braun, S. Hinuma, and R. Jaenisch. 1992. "Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development." *Cell* 71 (3):383-90.
- Rudnicki, M. A., F. Le Grand, I. McKinnell, and S. Kuang. 2008. "The molecular regulation of muscle stem cell function." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 73:323-31. doi: 10.1101/sqb.2008.73.064.
- Rudnicki, M. A., P. N. Schnegelsberg, R. H. Stead, T. Braun, H. H. Arnold, and R. Jaenisch. 1993. "MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle." *Cell* 75 (7):1351-9.
- Rudolf, R., M. M. Khan, S. Labeit, and M. R. Deschenes. 2014. "Degeneration of neuromuscular junction in age and dystrophy." *Front Aging Neurosci* 6:99. doi: 10.3389/fnagi.2014.00099.
- Ruffell, D., F. Mourkioti, A. Gambardella, P. Kirstetter, R. G. Lopez, N. Rosenthal, and C. Nerlov. 2009. "A CREB-C/EBPbeta cascade induces M2 macrophage-specific gene expression and promotes muscle injury repair." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (41):17475-80. doi: 10.1073/pnas.0908641106.
- Sacco, A., R. Doyonnas, P. Kraft, S. Vitorovic, and H. M. Blau. 2008. "Self-renewal and expansion of single transplanted muscle stem cells." *Nature* 456 (7221):502-6. doi: 10.1038/nature07384.
- Sacco, A., F. Mourkioti, R. Tran, J. Choi, M. Llewellyn, P. Kraft, M. Shkreli, S. Delp, J. H. Pomerantz, S. E. Artandi, and H. M. Blau. 2010. "Short telomeres and stem cell exhaustion model Duchenne muscular dystrophy in mdx/mTR mice." *Cell* 143 (7):1059-71. doi: 10.1016/j.cell.2010.11.039.
- Saccone, V., S. Consalvi, L. Giordani, C. Mozzetta, I. Barozzi, M. Sandoná, T. Ryan, A. Rojas-Muñoz, L. Madaro, P. Fasanaro, G. Borsellino, M. De Bardi, G. Frigè, A. Termanini, X. Sun, J. Rossant, B. G. Bruneau, M. Mercola, S. Minucci, and P. L. Puri. 2014. "HDAC-regulated myomiRs control BAF60 variant exchange and direct the functional phenotype of fibro-adipogenic progenitors in dystrophic muscles." *Genes Dev* 28 (8):841-57. doi: 10.1101/gad.234468.113.
- Saclier, M., S. Cuvellier, M. Magnan, R. Mounier, and B. Chazaud. 2013. "Monocyte/macrophage interactions with myogenic precursor cells during skeletal muscle regeneration." *FEBS J* 280 (17):4118-30. doi: 10.1111/febs.12166.

- Saclier, M., H. Yacoub-Youssef, A. L. Mackey, L. Arnold, H. Ardjoune, M. Magnan, F. Sailhan, J. Chelly, G. K. Pavlath, R. Mounier, M. Kjaer, and B. Chazaud. 2013. "Differentially activated macrophages orchestrate myogenic precursor cell fate during human skeletal muscle regeneration." *Stem Cells* 31 (2):384-96. doi: 10.1002/stem.1288.
- Sambasivan, R., B. Gayraud-Morel, G. Dumas, C. Cimper, S. Paisant, R. G. Kelly, R. Kelly, and S. Tajbakhsh. 2009. "Distinct regulatory cascades govern extraocular and pharyngeal arch muscle progenitor cell fates." *Dev Cell* 16 (6):810-21. doi: 10.1016/j.devcel.2009.05.008.
- Sambasivan, R., and S. Tajbakhsh. 2007. "Skeletal muscle stem cell birth and properties." *Semin Cell Dev Biol* 18 (6):870-82. doi: 10.1016/j.semcdb.2007.09.013.
- Sambasivan, R., R. Yao, A. Kissenpfennig, L. Van Wittenberghe, A. Paldi, B. Gayraud-Morel, H. Guenou, B. Malissen, S. Tajbakhsh, and A. Galy. 2011. "Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration." *Development* 138 (17):3647-56. doi: 10.1242/dev.067587.
- Sampaolesi, M., S. Blot, G. D'Antona, N. Granger, R. Tonlorenzi, A. Innocenzi, P. Mognol, J. L. Thibaud, B. G. Galvez, I. Barthélémy, L. Perani, S. Mantero, M. Guttinger, O. Pansarasa, C. Rinaldi, M. G. Cusella De Angelis, Y. Torrente, C. Bordignon, R. Bottinelli, and G. Cossu. 2006. "Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs." *Nature* 444 (7119):574-9. doi: 10.1038/nature05282.
- Sampaolesi, M., Y. Torrente, A. Innocenzi, R. Tonlorenzi, G. D'Antona, M. A. Pellegrino, R. Barresi, N. Bresolin, M. G. De Angelis, K. P. Campbell, R. Bottinelli, and G. Cossu. 2003. "Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts." *Science* 301 (5632):487-92. doi: 10.1126/science.1082254.
- Scaal, M., A. Bonafede, V. Dathe, M. Sachs, G. Cann, B. Christ, and B. Brand-Saberi. 1999. "SF/HGF is a mediator between limb patterning and muscle development." *Development* 126 (21):4885-93.
- Scharner, J., and P. S. Zammit. 2011. "The muscle satellite cell at 50: the formative years." *Skelet Muscle* 1 (1):28. doi: 10.1186/2044-5040-1-28.
- Schienda, J., K. A. Engleka, S. Jun, M. S. Hansen, J. A. Epstein, C. J. Tabin, L. M. Kunkel, and G. Kardon. 2006. "Somitic origin of limb muscle satellite and side population cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (4):945-50. doi: 10.1073/pnas.0510164103.
- Schultz, E. 1978. "Changes in the satellite cells of growing muscle following denervation." *Anat*

- Rec* 190 (2):299-311. doi: 10.1002/ar.1091900212.
- Schultz, E. 1996. "Satellite cell proliferative compartments in growing skeletal muscles." *Dev Biol* 175 (1):84-94. doi: 10.1006/dbio.1996.0097.
- Schultz, E., D. L. Jaryszak, and C. R. Valliere. 1985. "Response of satellite cells to focal skeletal muscle injury." *Muscle Nerve* 8 (3):217-22. doi: 10.1002/mus.880080307.
- Schulz, T. J., T. L. Huang, T. T. Tran, H. Zhang, K. L. Townsend, J. L. Shadrach, M. Cerletti, L. E. McDougall, N. Giorgadze, T. Tchkonina, D. Schrier, D. Falb, J. L. Kirkland, A. J. Wagers, and Y. H. Tseng. 2011a. "Identification of inducible brown adipocyte progenitors residing in skeletal muscle and white fat." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (1):143-8. doi: 10.1073/pnas.1010929108.
- Schulz, T. J., T. L. Huang, T. T. Tran, H. Zhang, K. L. Townsend, J. L. Shadrach, M. Cerletti, L. E. McDougall, N. Giorgadze, T. Tchkonina, D. Schrier, D. Falb, J. L. Kirkland, A. J. Wagers, and Y. H. Tseng. 2011. "Identification of inducible brown adipocyte progenitors residing in skeletal muscle and white fat." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (1):143-8. doi: 10.1073/pnas.1010929108.
- Schwander, M., M. Leu, M. Stumm, O. M. Dorchies, U. T. Ruegg, J. Schittny, and U. Müller. 2003. "Beta1 integrins regulate myoblast fusion and sarcomere assembly." *Dev Cell* 4 (5):673-85.
- Sciorati, C., E. Clementi, A. A. Manfredi, and P. Rovere-Querini. 2015. "Fat deposition and accumulation in the damaged and inflamed skeletal muscle: cellular and molecular players." *Cell Mol Life Sci* 72 (11):2135-56. doi: 10.1007/s00018-015-1857-7.
- Sciorati, C., B. G. Galvez, S. Brunelli, E. Tagliafico, S. Ferrari, G. Cossu, and E. Clementi. 2006. "Ex vivo treatment with nitric oxide increases mesoangioblast therapeutic efficacy in muscular dystrophy." *J Cell Sci* 119 (Pt 24):5114-23. doi: 10.1242/jcs.03300.
- Seale, P., J. Ishibashi, C. Holterman, and M. A. Rudnicki. 2004. "Muscle satellite cell-specific genes identified by genetic profiling of MyoD-deficient myogenic cell." *Dev Biol* 275 (2):287-300. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.07.034.
- Seale, P., J. Ishibashi, A. Scimè, and M. A. Rudnicki. 2004. "Pax7 is necessary and sufficient for the myogenic specification of CD45⁺:Sca1⁺ stem cells from injured muscle." *PLoS Biol* 2 (5):E130. doi: 10.1371/journal.pbio.0020130.
- Seale, P., S. Kajimura, W. Yang, S. Chin, L. M. Rohas, M. Uldry, G. Tavernier, D. Langin, and

- B. M. Spiegelman. 2007. "Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16." *Cell Metab* 6 (1):38-54. doi: 10.1016/j.cmet.2007.06.001.
- Seale, P., L. A. Sabourin, A. Girgis-Gabardo, A. Mansouri, P. Gruss, and M. A. Rudnicki. 2000. "Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells." *Cell* 102 (6):777-86.
- Segawa, M., S. Fukada, Y. Yamamoto, H. Yahagi, M. Kanematsu, M. Sato, T. Ito, A. Uezumi, S. Hayashi, Y. Miyagoe-Suzuki, S. Takeda, K. Tsujikawa, and H. Yamamoto. 2008. "Suppression of macrophage functions impairs skeletal muscle regeneration with severe fibrosis." *Exp Cell Res* 314 (17):3232-44. doi: 10.1016/j.yexcr.2008.08.008.
- Seibel, H. R., M. F. Dolwick, F. M. Bush, and S. S. Craig. 1978. "Electron-microscopic study of the rat masseter muscle following injection of lidocaine." *Acta Anat (Basel)* 100 (3):354-64.
- Serrano, A. L., B. Baeza-Raja, E. Perdiguero, M. Jardí, and P. Muñoz-Cánoves. 2008. "Interleukin-6 is an essential regulator of satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy." *Cell Metab* 7 (1):33-44. doi: 10.1016/j.cmet.2007.11.011.
- Serrano, A. L., C. J. Mann, B. Vidal, E. Ardite, E. Perdiguero, and P. Muñoz-Cánoves. 2011. "Cellular and molecular mechanisms regulating fibrosis in skeletal muscle repair and disease." *Curr Top Dev Biol* 96:167-201. doi: 10.1016/B978-0-12-385940-2.00007-3.
- Shadrach, J. L., and A. J. Wagers. 2011. "Stem cells for skeletal muscle repair." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366 (1575):2297-306. doi: 10.1098/rstb.2011.0027.
- Shea, K. L., W. Xiang, V. S. LaPorta, J. D. Licht, C. Keller, M. A. Basson, and A. S. Brack. 2010. "Sprouty1 regulates reversible quiescence of a self-renewing adult muscle stem cell pool during regeneration." *Cell Stem Cell* 6 (2):117-29. doi: 10.1016/j.stem.2009.12.015.
- Shefer, G., G. Rauner, Z. Yablonka-Reuveni, and D. Benayahu. 2010. "Reduced satellite cell numbers and myogenic capacity in aging can be alleviated by endurance exercise." *PLoS One* 5 (10):e13307. doi: 10.1371/journal.pone.0013307.
- Shefer, G., D. P. Van de Mark, J. B. Richardson, and Z. Yablonka-Reuveni. 2006. "Satellite-cell pool size does matter: defining the myogenic potency of aging skeletal muscle." *Dev Biol* 294 (1):50-66. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.02.022.
- Shefer, G., M. Wleklinski-Lee, and Z. Yablonka-Reuveni. 2004. "Skeletal muscle satellite cells can spontaneously enter an alternative mesenchymal pathway." *J Cell Sci* 117 (Pt 22):5393-404. doi: 10.1242/jcs.01419.

- Sherwood, R. I., J. L. Christensen, I. M. Conboy, M. J. Conboy, T. A. Rando, I. L. Weissman, and A. J. Wagers. 2004. "Isolation of adult mouse myogenic progenitors: functional heterogeneity of cells within and engrafting skeletal muscle." *Cell* 119 (4):543-54. doi: 10.1016/j.cell.2004.10.021.
- Shi, D., H. Reinecke, C. E. Murry, and B. Torok-Storb. 2004. "Myogenic fusion of human bone marrow stromal cells, but not hematopoietic cells." *Blood* 104 (1):290-4. doi: 10.1182/blood-2003-03-0688.
- Shi, X., and D. J. Garry. 2006. "Muscle stem cells in development, regeneration, and disease." *Genes Dev* 20 (13):1692-708. doi: 10.1101/gad.1419406.
- Shin, J., M. M. Tajrishi, Y. Ogura, and A. Kumar. 2013. "Wasting mechanisms in muscular dystrophy." *Int J Biochem Cell Biol* 45 (10):2266-79. doi: 10.1016/j.biocel.2013.05.001.
- Shinin, V., B. Gayraud-Morel, D. Gomès, and S. Tajbakhsh. 2006. "Asymmetric division and cosegregation of template DNA strands in adult muscle satellite cells." *Nat Cell Biol* 8 (7):677-87. doi: 10.1038/ncb1425.
- Silva-Barbosa, S. D., G. S. Butler-Browne, W. de Mello, I. Riederer, J. P. Di Santo, W. Savino, and V. Mouly. 2008. "Human myoblast engraftment is improved in laminin-enriched microenvironment." *Transplantation* 85 (4):566-75. doi: 10.1097/TP.0b013e31815fee50.
- Sinha, M., Y. C. Jang, J. Oh, D. Khong, E. Y. Wu, R. Manohar, C. Miller, S. G. Regalado, F. S. Loffredo, J. R. Pancoast, M. F. Hirshman, J. Lebowitz, J. L. Shadrach, M. Cerletti, M. J. Kim, T. Serwold, L. J. Goodyear, B. Rosner, R. T. Lee, and A. J. Wagers. 2014. "Restoring systemic GDF11 levels reverses age-related dysfunction in mouse skeletal muscle." *Science* 344 (6184):649-52. doi: 10.1126/science.1251152.
- Skuk, D. 2004. "Myoblast transplantation for inherited myopathies: a clinical approach." *Expert Opin Biol Ther* 4 (12):1871-85. doi: 10.1517/14712598.4.12.1871.
- Skuk, D., M. Goulet, B. Roy, P. Chapdelaine, J. P. Bouchard, R. Roy, F. J. Dugré, M. Sylvain, J. G. Lachance, L. Deschênes, H. Senay, and J. P. Tremblay. 2006. "Dystrophin expression in muscles of duchenne muscular dystrophy patients after high-density injections of normal myogenic cells." *J Neuropathol Exp Neurol* 65 (4):371-86. doi: 10.1097/01.jnen.0000218443.45782.81.
- Skuk, D., M. Goulet, B. Roy, V. Piette, C. H. Côté, P. Chapdelaine, J. Y. Hogrel, M. Paradis, J. P. Bouchard, M. Sylvain, J. G. Lachance, and J. P. Tremblay. 2007. "First test of a "high-

- density injection" protocol for myogenic cell transplantation throughout large volumes of muscles in a Duchenne muscular dystrophy patient: eighteen months follow-up." *Neuromuscul Disord* 17 (1):38-46. doi: 10.1016/j.nmd.2006.10.003.
- Smith, C. K., M. J. Janney, and R. E. Allen. 1994. "Temporal expression of myogenic regulatory genes during activation, proliferation, and differentiation of rat skeletal muscle satellite cells." *J Cell Physiol* 159 (2):379-85. doi: 10.1002/jcp.1041590222.
- Smith, C., M. J. Kruger, R. M. Smith, and K. H. Myburgh. 2008. "The inflammatory response to skeletal muscle injury: illuminating complexities." *Sports Med* 38 (11):947-69.
- Smith, S. B., and J. D. Crouse. 1984. "Relative contributions of acetate, lactate and glucose to lipogenesis in bovine intramuscular and subcutaneous adipose tissue." *J Nutr* 114 (4):792-800.
- Snow, M. H. 1977. "Myogenic cell formation in regenerating rat skeletal muscle injured by mincing. II. An autoradiographic study." *Anat Rec* 188 (2):201-17. doi: 10.1002/ar.1091880206.
- Snow, M. H. 1978. "An autoradiographic study of satellite cell differentiation into regenerating myotubes following transplantation of muscles in young rats." *Cell Tissue Res* 186 (3):535-40.
- Sonnet, C., P. Lafuste, L. Arnold, M. Brigitte, F. Poron, F. J. Authier, F. Chrétien, R. K. Gherardi, and B. Chazaud. 2006. "Human macrophages rescue myoblasts and myotubes from apoptosis through a set of adhesion molecular systems." *J Cell Sci* 119 (Pt 12):2497-507. doi: 10.1242/jcs.02988.
- Sorisky, A., A. S. Molgat, and A. Gagnon. 2013. "Macrophage-induced adipose tissue dysfunction and the preadipocyte: should I stay (and differentiate) or should I go?" *Adv Nutr* 4 (1):67-75. doi: 10.3945/an.112.003020.
- Sousa-Victor, P., L. García-Prat, A. L. Serrano, E. Perdiguero, and P. Muñoz-Cánoves. 2015. "Muscle stem cell aging: regulation and rejuvenation." *Trends Endocrinol Metab* 26 (6):287-96. doi: 10.1016/j.tem.2015.03.006.
- Sousa-Victor, P., S. Gutarra, L. García-Prat, J. Rodriguez-Ubreva, L. Ortet, V. Ruiz-Bonilla, M. Jardí, E. Ballestar, S. González, A. L. Serrano, E. Perdiguero, and P. Muñoz-Cánoves. 2014. "Geriatric muscle stem cells switch reversible quiescence into senescence." *Nature* 506 (7488):316-21. doi: 10.1038/nature13013.

- Sousa-Victor, P., and P. Muñoz-Cánoves. 2016. "Regenerative decline of stem cells in sarcopenia." *Mol Aspects Med*. doi: 10.1016/j.mam.2016.02.002.
- Sousa-Victor, P., E. Perdiguero, and P. Muñoz-Cánoves. 2014. "Geroconversion of aged muscle stem cells under regenerative pressure." *Cell Cycle* 13 (20):3183-90. doi: 10.4161/15384101.2014.965072.
- Spicer, D. B., J. Rhee, W. L. Cheung, and A. B. Lassar. 1996. "Inhibition of myogenic bHLH and MEF2 transcription factors by the bHLH protein Twist." *Science* 272 (5267):1476-80.
- Spitali, P., P. Grumati, M. Hiller, M. Chrisam, A. Aartsma-Rus, and P. Bonaldo. 2013. "Autophagy is Impaired in the Tibialis Anterior of Dystrophin Null Mice." *PLoS Curr* 5. doi: 10.1371/currents.md.e1226cefa851a2f079bbc406c0a21e80.
- Starkey, J. D., M. Yamamoto, S. Yamamoto, and D. J. Goldhamer. 2011. "Skeletal muscle satellite cells are committed to myogenesis and do not spontaneously adopt nonmyogenic fates." *J Histochem Cytochem* 59 (1):33-46. doi: 10.1369/jhc.2010.956995.
- Stockdale, F. E., and H. Holtzer. 1961. "DNA synthesis and myogenesis." *Exp Cell Res* 24:508-20.
- Straface, G., T. Aprahamian, A. Flex, E. Gaetani, F. Biscetti, R. C. Smith, G. Pecorini, E. Pola, F. Angelini, E. Stigliano, J. J. Castellet, D. W. Losordo, and R. Pola. 2009. "Sonic hedgehog regulates angiogenesis and myogenesis during post-natal skeletal muscle regeneration." *J Cell Mol Med* 13 (8B):2424-35. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00440.x.
- Suelves, M., B. Vidal, A. L. Serrano, M. Tjwa, J. Roma, R. López-Alemany, A. Luttun, M. M. de Lagrán, A. Díaz-Ramos, M. A. Díaz, M. Jardí, M. Roig, M. Dierssen, M. Dewerchin, P. Carmeliet, and P. Muñoz-Cánoves. 2007. "uPA deficiency exacerbates muscular dystrophy in MDX mice." *J Cell Biol* 178 (6):1039-51. doi: 10.1083/jcb.200705127.
- Szalay, K., Z. Rázga, and E. Duda. 1997. "TNF inhibits myogenesis and downregulates the expression of myogenic regulatory factors myoD and myogenin." *Eur J Cell Biol* 74 (4):391-8.
- Tacke, F., D. Alvarez, T. J. Kaplan, C. Jakubzick, R. Spanbroek, J. Llodra, A. Garin, J. Liu, M. Mack, N. van Rooijen, S. A. Lira, A. J. Habenicht, and G. J. Randolph. 2007. "Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques." *J Clin Invest* 117 (1):185-94. doi: 10.1172/JCI28549.
- Tajbakhsh, S., U. Borello, E. Vivarelli, R. Kelly, J. Papkoff, D. Duprez, M. Buckingham, and G.

- Cossu. 1998. "Differential activation of Myf5 and MyoD by different Wnts in explants of mouse paraxial mesoderm and the later activation of myogenesis in the absence of Myf5." *Development* 125 (21):4155-62.
- Takahashi, K., M. Narita, M. Yokura, T. Ichisaka, and S. Yamanaka. 2009. "Human induced pluripotent stem cells on autologous feeders." *PLoS One* 4 (12):e8067. doi: 10.1371/journal.pone.0008067.
- Takahashi, K., K. Okita, M. Nakagawa, and S. Yamanaka. 2007. "Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures." *Nat Protoc* 2 (12):3081-9. doi: 10.1038/nprot.2007.418.
- Takahashi, K., K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda, and S. Yamanaka. 2007. "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors." *Cell* 131 (5):861-72. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019.
- Takahashi, K., and S. Yamanaka. 2006. "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." *Cell* 126 (4):663-76. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
- Talbot, G. E., S. N. Waddington, O. Bales, R. C. Tchen, and M. N. Antoniou. 2010. "Desmin-regulated lentiviral vectors for skeletal muscle gene transfer." *Mol Ther* 18 (3):601-8. doi: 10.1038/mt.2009.267.
- Tamaki, T., A. Akatsuka, K. Ando, Y. Nakamura, H. Matsuzawa, T. Hotta, R. R. Roy, and V. R. Edgerton. 2002. "Identification of myogenic-endothelial progenitor cells in the interstitial spaces of skeletal muscle." *J Cell Biol* 157 (4):571-7. doi: 10.1083/jcb.200112106.
- Tamaki, T., Y. Okada, Y. Uchiyama, K. Tono, M. Masuda, M. Nitta, A. Hoshi, and A. Akatsuka. 2008. "Skeletal muscle-derived CD34+/45- and CD34-/45- stem cells are situated hierarchically upstream of Pax7+ cells." *Stem Cells Dev* 17 (4):653-67. doi: 10.1089/scd.2008.0070.
- Tanaka, K. K., J. K. Hall, A. A. Troy, D. D. Cornelison, S. M. Majka, and B. B. Olwin. 2009. "Syndecan-4-expressing muscle progenitor cells in the SP engraft as satellite cells during muscle regeneration." *Cell Stem Cell* 4 (3):217-25. doi: 10.1016/j.stem.2009.01.016.
- Tang, W., D. Zeve, J. M. Suh, D. Bosnakovski, M. Kyba, R. E. Hammer, M. D. Tallquist, and J. M. Graff. 2008. "White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature." *Science* 322 (5901):583-6. doi: 10.1126/science.1156232.
- Tapscott, S. J., R. L. Davis, M. J. Thayer, P. F. Cheng, H. Weintraub, and A. B. Lassar. 1988.

- "MyoD1: a nuclear phosphoprotein requiring a Myc homology region to convert fibroblasts to myoblasts." *Science* 242 (4877):405-11.
- Tedesco, F. S., H. Hoshiya, G. D'Antona, M. F. Gerli, G. Messina, S. Antonini, R. Tonlorenzi, S. Benedetti, L. Berghella, Y. Torrente, Y. Kazuki, R. Bottinelli, M. Oshimura, and G. Cossu. 2011. "Stem cell-mediated transfer of a human artificial chromosome ameliorates muscular dystrophy." *Sci Transl Med* 3 (96):96ra78. doi: 10.1126/scitranslmed.3002342.
- Thomas, C. E., A. Ehrhardt, and M. A. Kay. 2003. "Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy." *Nat Rev Genet* 4 (5):346-58. doi: 10.1038/nrg1066.
- Tidball, J. G. 2005. "Inflammatory processes in muscle injury and repair." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288 (2):R345-53. doi: 10.1152/ajpregu.00454.2004.
- Tidball, J. G., and S. A. Villalta. 2010. "Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298 (5):R1173-87. doi: 10.1152/ajpregu.00735.2009.
- Tidball, J. G. 2011. "Mechanisms of muscle injury, repair, and regeneration." *Compr Physiol* 1 (4):2029-62. doi: 10.1002/cphy.c100092.
- Tierney, M. T., T. Aydogdu, D. Sala, B. Malecova, S. Gatto, P. L. Puri, L. Latella, and A. Sacco. 2014. "STAT3 signaling controls satellite cell expansion and skeletal muscle repair." *Nat Med* 20 (10):1182-6. doi: 10.1038/nm.3656.
- Tonlorenzi, R., A. Dellavalle, E. Schnapp, G. Cossu, and M. Sampaolesi. 2007. "Isolation and characterization of mesoangioblasts from mouse, dog, and human tissues." *Curr Protoc Stem Cell Biol* Chapter 2:Unit 2B.1. doi: 10.1002/9780470151808.sc02b01s3.
- Torrente, Y., M. Belicchi, C. Marchesi, G. D'Antona, F. Cogiமானian, F. Pisati, M. Gavina, R. Giordano, R. Tonlorenzi, G. Fagiolari, C. Lamperti, L. Porretti, R. Lopa, M. Sampaolesi, L. Vicentini, N. Grimoldi, F. Tiberio, V. Songa, P. Baratta, A. Prella, L. Forzenigo, M. Guglieri, O. Pansarasa, C. Rinaldi, V. Mouly, G. S. Butler-Browne, G. P. Comi, P. Biondetti, M. Moggio, S. M. Gaini, N. Stocchetti, A. Priori, M. G. D'Angelo, A. Turconi, R. Bottinelli, G. Cossu, P. Rebull, and N. Bresolin. 2007. "Autologous transplantation of muscle-derived CD133+ stem cells in Duchenne muscle patients." *Cell Transplant* 16 (6):563-77.
- Torrente, Y., M. Belicchi, M. Sampaolesi, F. Pisati, M. Meregalli, G. D'Antona, R. Tonlorenzi, L. Porretti, M. Gavina, K. Mamchaoui, M. A. Pellegrino, D. Furling, V. Mouly, G. S. Butler-

- Browne, R. Bottinelli, G. Cossu, and N. Bresolin. 2004. "Human circulating AC133(+) stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle." *J Clin Invest* 114 (2):182-95. doi: 10.1172/JCI20325.
- Trayhurn, P., C. A. Drevon, and J. Eckel. 2011. "Secreted proteins from adipose tissue and skeletal muscle - adipokines, myokines and adipose/muscle cross-talk." *Arch Physiol Biochem* 117 (2):47-56. doi: 10.3109/13813455.2010.535835.
- Tremblay, J. P., F. Malouin, R. Roy, J. Huard, J. P. Bouchard, A. Satoh, and C. L. Richards. 1993. "Results of a triple blind clinical study of myoblast transplantations without immunosuppressive treatment in young boys with Duchenne muscular dystrophy." *Cell Transplant* 2 (2):99-112.
- Tsuchida, K., M. Nakatani, A. Uezumi, T. Murakami, and X. Cui. 2008. "Signal transduction pathway through activin receptors as a therapeutic target of musculoskeletal diseases and cancer." *Endocr J* 55 (1):11-21.
- Uezumi, A., S. Fukada, N. Yamamoto, M. Ikemoto-Uezumi, M. Nakatani, M. Morita, A. Yamaguchi, H. Yamada, I. Nishino, Y. Hamada, and K. Tsuchida. 2014. "Identification and characterization of PDGFR α + mesenchymal progenitors in human skeletal muscle." *Cell Death Dis* 5:e1186. doi: 10.1038/cddis.2014.161.
- Uezumi, A., S. Fukada, N. Yamamoto, S. Takeda, and K. Tsuchida. 2010. "Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle." *Nat Cell Biol* 12 (2):143-52. doi: 10.1038/ncb2014.
- Uezumi, A., M. Ikemoto-Uezumi, and K. Tsuchida. 2014. "Roles of nonmyogenic mesenchymal progenitors in pathogenesis and regeneration of skeletal muscle." *Front Physiol* 5:68. doi: 10.3389/fphys.2014.00068.
- Uezumi, A., T. Ito, D. Morikawa, N. Shimizu, T. Yoneda, M. Segawa, M. Yamaguchi, R. Ogawa, M. M. Matev, Y. Miyagoe-Suzuki, S. Takeda, K. Tsujikawa, K. Tsuchida, H. Yamamoto, and S. Fukada. 2011. "Fibrosis and adipogenesis originate from a common mesenchymal progenitor in skeletal muscle." *J Cell Sci* 124 (Pt 21):3654-64. doi: 10.1242/jcs.086629.
- Uezumi, A., M. Nakatani, M. Ikemoto-Uezumi, N. Yamamoto, M. Morita, A. Yamaguchi, H. Yamada, T. Kasai, S. Masuda, A. Narita, Y. Miyagoe-Suzuki, S. Takeda, S. Fukada, I. Nishino, and K. Tsuchida. 2016. "Cell-Surface Protein Profiling Identifies Distinctive Markers of Progenitor Cells in Human Skeletal Muscle." *Stem Cell Reports* 7 (2):263-78.

doi: 10.1016/j.stemcr.2016.07.004.

- Unger, C., S. Gao, M. Cohen, M. Jaconi, R. Bergstrom, F. Holm, A. Galan, E. Sanchez, O. Irion, J. B. Dubuisson, M. Giry-Laterriere, P. Salmon, C. Simon, O. Hovatta, and A. Feki. 2009. "Immortalized human skin fibroblast feeder cells support growth and maintenance of both human embryonic and induced pluripotent stem cells." *Hum Reprod* 24 (10):2567-81. doi: 10.1093/humrep/dep232.
- Usas, A., J. Mačiulaitis, R. Mačiulaitis, N. Jakubonienė, A. Milašius, and J. Huard. 2011. "Skeletal muscle-derived stem cells: implications for cell-mediated therapies." *Medicina (Kaunas)* 47 (9):469-79.
- Ustanina, S., J. Carvajal, P. Rigby, and T. Braun. 2007. "The myogenic factor Myf5 supports efficient skeletal muscle regeneration by enabling transient myoblast amplification." *Stem Cells* 25 (8):2006-16. doi: 10.1634/stemcells.2006-0736.
- Vahidi Ferdousi, L., P. Rocheteau, R. Chayot, B. Montagne, Z. Chaker, P. Flamant, S. Tajbakhsh, and M. Ricchetti. 2014. "More efficient repair of DNA double-strand breaks in skeletal muscle stem cells compared to their committed progeny." *Stem Cell Res* 13 (3 Pt A):492-507. doi: 10.1016/j.scr.2014.08.005.
- van Lochem, E. G., V. H. van der Velden, H. K. Wind, J. G. te Marvelde, N. A. Westerdaal, and J. J. van Dongen. 2004. "Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts." *Cytometry B Clin Cytom* 60 (1):1-13. doi: 10.1002/cyto.b.20008.
- Vauchez, K., J. P. Marolleau, M. Schmid, P. Khattar, A. Chapel, C. Catelain, S. Lecourt, J. Larghéro, M. Fiszman, and J. T. Vilquin. 2009. "Aldehyde dehydrogenase activity identifies a population of human skeletal muscle cells with high myogenic capacities." *Mol Ther* 17 (11):1948-58. doi: 10.1038/mt.2009.204.
- Verreck, F. A., T. de Boer, D. M. Langenberg, M. A. Hoeve, M. Kramer, E. Vaisberg, R. Kastelein, A. Kolk, R. de Waal-Malefyt, and T. H. Ottenhoff. 2004. "Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (13):4560-5. doi: 10.1073/pnas.0400983101.
- Vertino, A. M., J. M. Taylor-Jones, K. A. Longo, E. D. Bearden, T. F. Lane, R. E. McGehee, O. A. MacDougald, and C. A. Peterson. 2005. "Wnt10b deficiency promotes coexpression of

- myogenic and adipogenic programs in myoblasts." *Mol Biol Cell* 16 (4):2039-48. doi: 10.1091/mbc.E04-08-0720.
- Vettor, R., G. Milan, C. Franzin, M. Sanna, P. De Coppi, R. Rizzuto, and G. Federspil. 2009. "The origin of intermuscular adipose tissue and its pathophysiological implications." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297 (5):E987-98. doi: 10.1152/ajpendo.00229.2009.
- Vidal, B., A. L. Serrano, M. Tjwa, M. Suelves, E. Ardite, R. De Mori, B. Baeza-Raja, M. Martínez de Lagrán, P. Lafuste, V. Ruiz-Bonilla, M. Jardí, R. Gherardi, C. Christov, M. Dierssen, P. Carmeliet, J. L. Degen, M. Dewerchin, and P. Muñoz-Cánoves. 2008. "Fibrinogen drives dystrophic muscle fibrosis via a TGFbeta/alternative macrophage activation pathway." *Genes Dev* 22 (13):1747-52. doi: 10.1101/gad.465908.
- Vieira, N. M., V. Brandalise, E. Zucconi, T. Jazedje, M. Secco, V. A. Nunes, B. E. Strauss, M. Vainzof, and M. Zatz. 2008. "Human multipotent adipose-derived stem cells restore dystrophin expression of Duchenne skeletal-muscle cells in vitro." *Biol Cell* 100 (4):231-41. doi: 10.1042/BC20070102.
- Vieira, N. M., M. Valadares, E. Zucconi, M. Secco, C. R. Bueno, V. Brandalise, A. Assoni, J. Gomes, V. Landini, T. Andrade, H. V. Caetano, M. Vainzof, and M. Zatz. 2012. "Human adipose-derived mesenchymal stromal cells injected systemically into GRMD dogs without immunosuppression are able to reach the host muscle and express human dystrophin." *Cell Transplant* 21 (7):1407-17. doi: 10.3727/096368911X.
- Villalta, S. A., W. Rosenthal, L. Martinez, A. Kaur, T. Sparwasser, J. G. Tidball, M. Margeta, M. J. Spencer, and J. A. Bluestone. 2014. "Regulatory T cells suppress muscle inflammation and injury in muscular dystrophy." *Sci Transl Med* 6 (258):258ra142. doi: 10.1126/scitranslmed.3009925.
- Wabitsch, M., E. Heinze, K. M. Debatin, and W. F. Blum. 2000. "IGF-I- and IGFBP-3-expression in cultured human preadipocytes and adipocytes." *Horm Metab Res* 32 (11-12):555-9. doi: 10.1055/s-2007-978685.
- Wagatsuma, A. 2007. "Adipogenic potential can be activated during muscle regeneration." *Mol Cell Biochem* 304 (1-2):25-33. doi: 10.1007/s11010-007-9482-x.
- Wagers, A. J., and I. M. Conboy. 2005. "Cellular and molecular signatures of muscle regeneration: current concepts and controversies in adult myogenesis." *Cell* 122 (5):659-67. doi: 10.1016/j.cell.2005.08.021.

- Wagner, K. R., A. C. McPherron, N. Winik, and S. J. Lee. 2002. "Loss of myostatin attenuates severity of muscular dystrophy in mdx mice." *Ann Neurol* 52 (6):832-6. doi: 10.1002/ana.10385.
- Wakelam, M. J. 1985. "The fusion of myoblasts." *Biochem J* 228 (1):1-12.
- Wang, C. H., C. G. Bonnemann, A. Rutkowski, T. Sejersen, J. Bellini, V. Battista, J. M. Florence, U. Schara, P. M. Schuler, K. Wahbi, A. Aloysius, R. O. Bash, C. Bérout, E. Bertini, K. Bushby, R. D. Cohn, A. M. Connolly, N. Deconinck, I. Desguerre, M. Eagle, B. Estournet-Mathiaud, A. Ferreira, A. Fajak, N. Goemans, S. T. Iannaccone, P. Jouinot, M. Main, P. Melacini, W. Mueller-Felber, F. Muntoni, L. L. Nelson, J. Rahbek, S. Quijano-Roy, C. Sewry, K. Storhaug, A. Simonds, B. Tseng, J. Vajsar, A. Vianello, R. Zeller, and International Standard of Care Committee for Congenital Muscular Dystrophy. 2010. "Consensus statement on standard of care for congenital muscular dystrophies." *J Child Neurol* 25 (12):1559-81. doi: 10.1177/0883073810381924.
- Watkins, S. C., and M. J. Cullen. 1988. "A quantitative study of myonuclear and satellite cell nuclear size in Duchenne's muscular dystrophy, polymyositis and normal human skeletal muscle." *Anat Rec* 222 (1):6-11. doi: 10.1002/ar.1092220103.
- Watt, D. J., J. E. Morgan, M. A. Clifford, and T. A. Partridge. 1987. "The movement of muscle precursor cells between adjacent regenerating muscles in the mouse." *Anat Embryol (Berl)* 175 (4):527-36.
- Wehling, M., M. J. Spencer, and J. G. Tidball. 2001. "A nitric oxide synthase transgene ameliorates muscular dystrophy in mdx mice." *J Cell Biol* 155 (1):123-31. doi: 10.1083/jcb.200105110.
- Whalen, R. G., J. B. Harris, G. S. Butler-Browne, and S. Sesodia. 1990. "Expression of myosin isoforms during notexin-induced regeneration of rat soleus muscles." *Dev Biol* 141 (1):24-40.
- White, J. D., A. Scaffidi, M. Davies, J. McGeachie, M. A. Rudnicki, and M. D. Grounds. 2000. "Myotube formation is delayed but not prevented in MyoD-deficient skeletal muscle: studies in regenerating whole muscle grafts of adult mice." *J Histochem Cytochem* 48 (11):1531-44.
- Williams, A. H., N. Liu, E. van Rooij, and E. N. Olson. 2009. "MicroRNA control of muscle development and disease." *Curr Opin Cell Biol* 21 (3):461-9. doi:

- 10.1016/j.ceb.2009.01.029.
- Wren, T. A., S. Bluml, L. Tseng-Ong, and V. Gilsanz. 2008. "Three-point technique of fat quantification of muscle tissue as a marker of disease progression in Duchenne muscular dystrophy: preliminary study." *AJR Am J Roentgenol* 190 (1):W8-12. doi: 10.2214/AJR.07.2732.
- Wright, W. E., D. A. Sassoon, and V. K. Lin. 1989. "Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD." *Cell* 56 (4):607-17.
- Wynn, T. A. 2008. "Cellular and molecular mechanisms of fibrosis." *J Pathol* 214 (2):199-210. doi: 10.1002/path.2277.
- Xaymardan, M., M. Cimini, S. Fazel, R. D. Weisel, W. Y. Lu, U. Martin, R. P. Harvey, and R. K. Li. 2009. "c-Kit function is necessary for in vitro myogenic differentiation of bone marrow hematopoietic cells." *Stem Cells* 27 (8):1911-20. doi: 10.1002/stem.106.
- Yablonka-Reuveni, Z., and A. J. Rivera. 1994. "Temporal expression of regulatory and structural muscle proteins during myogenesis of satellite cells on isolated adult rat fibers." *Dev Biol* 164 (2):588-603. doi: 10.1006/dbio.1994.1226.
- Yablonka-Reuveni, Z., M. A. Rudnicki, A. J. Rivera, M. Primig, J. E. Anderson, and P. Natanson. 1999. "The transition from proliferation to differentiation is delayed in satellite cells from mice lacking MyoD." *Dev Biol* 210 (2):440-55. doi: 10.1006/dbio.1999.9284.
- Yang, S., T. Laumonier, and J. Menetrey. 2007. "Heat shock pretreatment enhances porcine myoblasts survival after autotransplantation in intact skeletal muscle." *Sci China C Life Sci* 50 (4):438-46. doi: 10.1007/s11427-007-0065-6.
- Yin, H., F. Price, and M. A. Rudnicki. 2013. "Satellite cells and the muscle stem cell niche." *Physiol Rev* 93 (1):23-67. doi: 10.1152/physrev.00043.2011.
- Yogo, Y., S. Fujishima, T. Inoue, F. Saito, T. Shiomi, K. Yamaguchi, and A. Ishizaka. 2009. "Macrophage derived chemokine (CCL22), thymus and activation-regulated chemokine (CCL17), and CCR4 in idiopathic pulmonary fibrosis." *Respir Res* 10:80. doi: 10.1186/1465-9921-10-80.
- Yona, S., and S. Jung. 2010. "Monocytes: subsets, origins, fates and functions." *Curr Opin Hematol* 17 (1):53-9. doi: 10.1097/MOH.0b013e3283324f80.
- Yusuf, F., and B. Brand-Saberi. 2012. "Myogenesis and muscle regeneration." *Histochem Cell Biol* 138 (2):187-99. doi: 10.1007/s00418-012-0972-x.

- Zammit, P. S. 2008. "All muscle satellite cells are equal, but are some more equal than others?" *J Cell Sci* 121 (Pt 18):2975-82. doi: 10.1242/jcs.019661.
- Zammit, P. S., J. P. Golding, Y. Nagata, V. Hudon, T. A. Partridge, and J. R. Beauchamp. 2004. "Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal?" *J Cell Biol* 166 (3):347-57. doi: 10.1083/jcb.200312007.
- Zammit, P. S., L. Heslop, V. Hudon, J. D. Rosenblatt, S. Tajbakhsh, M. E. Buckingham, J. R. Beauchamp, and T. A. Partridge. 2002. "Kinetics of myoblast proliferation show that resident satellite cells are competent to fully regenerate skeletal muscle fibers." *Exp Cell Res* 281 (1):39-49.
- Zhang, Y., J. Shao, Z. Wang, T. Yang, S. Liu, Y. Liu, X. Fan, and W. Ye. 2015. "Growth differentiation factor 11 is a protective factor for osteoblastogenesis by targeting PPARgamma." *Gene* 557 (2):209-14. doi: 10.1016/j.gene.2014.12.039.
- Zhang, Y., Y. Zhu, Y. Li, J. Cao, H. Zhang, M. Chen, L. Wang, and C. Zhang. 2015. "Long-term engraftment of myogenic progenitors from adipose-derived stem cells and muscle regeneration in dystrophic mice." *Hum Mol Genet* 24 (21):6029-40. doi: 10.1093/hmg/ddv316.
- Zhao, Q., S. T. Yang, J. J. Wang, J. Zhou, S. S. Xing, C. C. Shen, X. X. Wang, Y. X. Yue, J. Song, M. Chen, Y. Y. Wei, Q. P. Zhou, T. Dai, and Y. H. Song. 2015. "TNF alpha inhibits myogenic differentiation of C2C12 cells through NF- κ B activation and impairment of IGF-1 signaling pathway." *Biochem Biophys Res Commun* 458 (4):790-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.02.026.
- Zheng, B., B. Cao, M. Crisan, B. Sun, G. Li, A. Logar, S. Yap, J. B. Pollett, L. Drowley, T. Cassino, B. Gharaibeh, B. M. Deasy, J. Huard, and B. Péault. 2007. "Prospective identification of myogenic endothelial cells in human skeletal muscle." *Nat Biotechnol* 25 (9):1025-34. doi: 10.1038/nbt1334.
- Zheng, B., G. Li, W. C. Chen, B. M. Deasy, J. B. Pollett, B. Sun, L. Drowley, B. Gharaibeh, A. Usas, B. Péault, and J. Huard. 2013. "Human myogenic endothelial cells exhibit chondrogenic and osteogenic potentials at the clonal level." *J Orthop Res* 31 (7):1089-95. doi: 10.1002/jor.22335.
- Zhou, G., S. Wang, Z. Wang, X. Zhu, G. Shu, W. Liao, K. Yu, P. Gao, Q. Xi, X. Wang, Y. Zhang, L. Yuan, and Q. Jiang. 2010. "Global comparison of gene expression profiles between

- intramuscular and subcutaneous adipocytes of neonatal landrace pig using microarray." *Meat Sci* 86 (2):440-50. doi: 10.1016/j.meatsci.2010.05.031.
- Zhou, L., and H. Lu. 2010. "Targeting fibrosis in Duchenne muscular dystrophy." *J Neuropathol Exp Neurol* 69 (8):771-6. doi: 10.1097/NEN.0b013e3181e9a34b.
- Zhou, L., J. D. Porter, G. Cheng, B. Gong, D. A. Hatala, A. P. Merriam, X. Zhou, J. A. Rafael, and H. J. Kaminski. 2006. "Temporal and spatial mRNA expression patterns of TGF-beta1, 2, 3 and TbetaRI, II, III in skeletal muscles of mdx mice." *Neuromuscul Disord* 16 (1):32-8. doi: 10.1016/j.nmd.2005.09.009.
- Zhou, S., J. D. Schuetz, K. D. Bunting, A. M. Colapietro, J. Sampath, J. J. Morris, I. Lagutina, G. C. Grosveld, M. Osawa, H. Nakauchi, and B. P. Sorrentino. 2001. "The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype." *Nat Med* 7 (9):1028-34. doi: 10.1038/nm0901-1028.
- Zhu, J., Y. Li, W. Shen, C. Qiao, F. Ambrosio, M. Lavasani, M. Nozaki, M. F. Branca, and J. Huard. 2007. "Relationships between transforming growth factor-beta1, myostatin, and decorin: implications for skeletal muscle fibrosis." *J Biol Chem* 282 (35):25852-63. doi: 10.1074/jbc.M704146200.
- Zoico, E., A. Rossi, V. Di Francesco, A. Sepe, D. Oliosio, F. Pizzini, F. Fantin, O. Bosello, L. Cominacini, T. B. Harris, and M. Zamboni. 2010. "Adipose tissue infiltration in skeletal muscle of healthy elderly men: relationships with body composition, insulin resistance, and inflammation at the systemic and tissue level." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 65 (3):295-9. doi: 10.1093/gerona/qlp155.
- Zordan, P., C. Sciorati, L. Campana, L. Cottone, E. Clementi, P. R. Querini, and S. Brunelli. 2013. "The nitric oxide-donor molsidomine modulates the innate inflammatory response in a mouse model of muscular dystrophy." *Eur J Pharmacol* 715 (1-3):296-303. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.05.007.