



HAL
open science

Rôle du microenvironnement musculaire et des micro-ARN dans le développement des paraostéoarthropathies neurogènes

Jules Gueguen

► **To cite this version:**

Jules Gueguen. Rôle du microenvironnement musculaire et des micro-ARN dans le développement des paraostéoarthropathies neurogènes. Biologie moléculaire. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT : 2022UPASQ056 . tel-04114465

HAL Id: tel-04114465

<https://theses.hal.science/tel-04114465>

Submitted on 2 Jun 2023

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.

Rôle du microenvironnement musculaire et des micro-ARN dans le développement des paraostéoarthropathies neurogènes

Role of muscle microenvironment and microRNAs in the development of neurogenic heterotopic ossification

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°569, Innovation Thérapeutique : du Fondamental à l'Appliqué
Spécialité de doctorat : Physiologie, Physiopathologie
Graduate School : Santé et Médicaments. Référent : Faculté de Pharmacie

Thèse préparée à l'**Institut de Recherche Biomédicale des Armées**, unité de recherche interactions cellules souches-niches : physiologie, tumeurs et réparation tissulaire (Université Paris-Saclay, INSERM UMR-MD 1197), sous la direction de **Sébastien BANZET**, MD, PhD, HDR, et l'encadrement de **Dorothée GIRARD**, PhD

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 19 décembre 2022, par

Jules GUEGUEN

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Jérôme GUICHEUX

Pr, RMeS – UMRS 1229 – INSERM

Président du jury

Céline COLNOT

Pr, IMRB – U955 – INSERM

Rapporteur & Examinatrice

Frédéric CHARBONNIER

Pr, T3S – UMRS 1124 – INSERM

Rapporteur & Examineur

Marjorie SALGA

Dr, UMR 1179 – INSERM – AP-HP

Examinatrice

Titre : Rôle du microenvironnement musculaire et des micro-ARN dans le développement des paraostéopathies neurogènes

Mots clés : Lésion médullaire, miRNA, paraostéopathies neurogènes, muscle squelettique

Résumé : Les Paraostéopathies Neurogènes (POAN) sont des formations osseuses extra-squelettiques ectopiques survenant après une lésion du système nerveux central telle qu'une lésion de la moelle épinière, un traumatisme crânien ou lors d'un accident vasculaire cérébral. Les POAN se développent aux dépens du tissu musculaire, se localisent autour des articulations et peuvent considérablement altérer la mobilité des patients. Les POAN provoquent des compressions vasculaires et nerveuses induisant des douleurs aiguës ainsi qu'une perte de l'amplitude articulaire pouvant aller jusqu'à l'ankylose complète. La chirurgie d'exérèse, bien qu'exposant à de nombreuses complications, reste actuellement le seul traitement curatif efficace. Environ 30 % des patients souffrant d'une lésion médullaire et 20 % des patients souffrant d'un traumatisme crânien développent des POAN, entraînant ainsi de lourdes comorbidités et compromettant la réadaptation des patients. Le développement des POAN implique un processus d'ossification endochondrale et conduit à la formation d'un os mature caractérisé par une niche hématopoïétique fonctionnelle. Les progéniteurs fibro-adipogéniques (FAPs) sont des cellules stromales mésenchymateuses présentes dans l'interstitium musculaire. Les FAPs soutiennent physiologiquement les fonctions des progéniteurs myogéniques (MPs) et sont les acteurs cellulaires majeurs du développement des POAN. La pathogenèse implique aussi l'activation de l'inflammation par la lésion neurologique via les macrophages et la production de cytokines inflammatoires poussant les FAPs à s'engager dans des processus ostéogéniques. En dépit des recherches menées ces dernières années, certains aspects de la pathogenèse des POAN ne sont toujours pas définis, tel que l'impact et le rôle de la lésion neurologique sur la signalisation et le destin des progéniteurs du muscle.

Les miARN sont de petits ARN non codants simple brin qui régulent de manière post-transcriptionnelle l'expression des gènes en se liant à leur ARNm cible. De nombreux miARN sont physiologiquement impliqués dans les processus du développement ou de la régénération osseuse, régulant alors la prolifération et la différenciation des ostéoblastes ou la maturation hypertrophique des chondrocytes en ciblant les acteurs moléculaires clés de ces processus. Alors que les acteurs cellulaires et de nombreuses cytokines ont été décrits dans les POAN, l'implication potentielle des miARN n'a jamais été étudiée. Nous avons donc émis l'hypothèse que les miARN pourraient participer à la formation des POAN. Nous avons étudié leur expression dans notre modèle murin de POAN, combinant une lésion neurologique associée à une lésion musculaire aiguë, ainsi que dans les FAPs isolés de muscles de patients POAN. Pour comprendre pourquoi les muscles lésés ne parviennent pas à régénérer et s'engagent dans des processus ostéo-chondrogéniques, nous avons réalisé un criblage des miARN du tissu musculaire et des progéniteurs du muscle aux stades précoces. Les miARN dérégulés ont ensuite été étudiés in vitro, et des tests fonctionnels ont été réalisés afin de valider leur capacité à moduler la différenciation ostéogénique des FAPs et des MPs issus de patients POAN. Dans cette étude, nous avons identifié une dérégulation précoce des miARN ostéo-suppressifs des FAPs en parallèle d'une perte d'expression des miARN myogéniques des MPs dans le modèle murin de POAN. Nous avons également confirmé que la surexpression des miARN ostéo-suppressifs miR-146a-5p et miR-214-3p ainsi que l'inhibition du miARN ostéogénique miR-20a-5p pouvaient atténuer la minéralisation et l'expression des marqueurs ostéogéniques des FAPs humains, identifiant ainsi de nouveaux acteurs de la pathogenèse des POAN.

Title : Role of muscle microenvironment and microRNAs in the development of neurogenic heterotopic ossification

Keywords : Spinal cord injury, miRNA, neurogenic heterotopic ossifications, skeletal muscle

Abstract : Neurogenic Heterotopic Ossifications (NHOs) are ectopic extra-skeletal bone formations, that occur after central nervous system injury, primarily spinal cord injury, traumatic brain injury and stroke. NHOs develop at the expense of skeletal muscle tissue, are located around major joints and can significantly impair limb mobility. NHOs induce acute pain, nervous and vascular compressions and can cause severe joint ankylosis. Surgical resection, although complex and unsatisfying, is currently the most efficient and reliable treatment. Up to 30% of SCI and 20% of TBI patients develop NHOs, leading to comorbidities and compromising patient's rehabilitation. NHOs development involves a process of endochondral ossification and can lead to a mature bone containing a functional hematopoietic niche. Fibro-adipogenic progenitors (FAPs) are muscle interstitium resident mesenchymal stromal cells that physiologically support myogenic progenitors (MPs) function and are major cellular actors in ectopic ossification development and specifically in NHOs. Pro-inflammatory cytokines and macrophages are involved and mandatory to drive FAPs towards an osteogenic fate with neurological injury triggering local and systemic inflammatory response. Despite all previous studies, several aspects of NHOs pathogenesis remain unclear, specifically the impact of the CNS lesion on muscular progenitors signaling and fate. MiRNAs are small non-coding single stranded RNA that post-transcriptionally regulate gene expression by binding and silencing their mRNA target.

Numerous miRNAs are physiologically involved in bone development and repair processes, they regulate osteoblast proliferation/differentiation or hypertrophic maturation of chondrocytes by targeting key molecular actors. While cellular actors and numerous cytokines have been studied in NHOs, the potential involvement of miRNAs has never been investigated. We hypothesized that miRNAs could participate to NHOs formation and studied their expression in our NHOs mouse model combining spinal cord injury and acute cardiotoxin muscle injury and in patient's FAPs isolated from muscle surrounding NHOs. To understand why injured muscle fails to regenerate and engages into osteo-chondrogenic processes following neurological injury, we performed a large miRNAs profiling in skeletal muscle tissue and muscular progenitor cells at early stages. Dysregulated and most relevant miRNAs were further studied in vitro, and functional assays were performed on human FAPs and MPs.

In this study, we identified early osteo-suppressive miRNAs downregulation in FAPs concomitant to myogenic miRNAs downregulation in MPs in the NHOs mouse model. We also confirmed that overexpression of osteo-suppressive miR-146a-5p and miR-214-3p as well as miR-20a-5p inhibition could attenuate mineralization and osteogenic markers expression from human FAPs, uncovering new molecular actors in NHOs pathogenesis.

Remerciements

Je souhaite dans un premier temps remercier tous les membres du jury d'avoir accepté de participer au travail de relecture et de révision de ce manuscrit. Je remercie par avance Céline Colnot, Frédéric Charbonnier et Marjorie Salga pour leur temps, leur investissement et leur participation à l'évaluation de ces travaux. Je remercie tout particulièrement Jérôme Guicheux qui m'a aussi fait découvrir le monde de la recherche il y'a maintenant 12 ans lors d'un bref passage en stage de 3^{ème} puis à nouveau quelques années plus tard au début de mon parcours universitaire. Je souhaite aussi remercier tous mes responsables de stages et toutes les personnes que j'ai pu côtoyer au cours de ces derniers, qui m'ont accordé, avec toujours beaucoup de bienveillance, leur temps et une partie de leurs connaissances. Je remercie aussi Frédéric Blanchard et David Israeli pour leurs conseils avisés et leurs suggestions lors du comité de mi-thèse. Enfin, je tiens aussi à remercier l'Université Paris Saclay, l'école doctorale « Innovation Thérapeutique, du Fondamental à l'Appliquée » ainsi que le ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation pour m'avoir accordé le financement nécessaire à la réalisation de ces travaux.

Mes remerciements vont ensuite à Sébastien Banzet, mon directeur de thèse, qui m'a accueilli au sein de son unité et m'a accordé sa confiance au cours de ces trois dernières années. Merci de m'avoir transmis tes connaissances des miARN, pour la qualité de nos échanges, scientifiques ou non, et ta disponibilité malgré les responsabilités qui incombent à tes fonctions de roi du LightCyler, grand prédicateur de GeNorm et égérie incontestée de Paris-Match.

Je remercie également Dorothée Girard pour son investissement dans l'encadrement de cette thèse et pour son abnégation dans la relecture de ce manuscrit et ses sempiternelles tirades d'appositions, conjonctions de coordination et autres subtilités de la langue française. Merci aussi pour la constance de ta bonne humeur et ces moments de joie, depuis le transport des cellules sous la neige avec Walid jusqu'aux symphonies de collagènes, en passant par le costume banane et Eugène. Je souhaite aussi remercier l'équipe POAN pour leur assistance technique mais aussi pour leur bienveillance depuis mon arrivée en 2019, à commencer par Bastien Rival, gouteur officieltm des gâteaux nantais et sheriff du labo, pour ses chants poly/cacophoniques de groupie. Merci aussi à Marie-Emmanuelle Goriot, éminente membre du G³, pour ses ravitaillements inopinés d'houmous et sa joie de vivre. Je remercie également Juliette Fernandez et ses sublimes boulettes de chondrocytes et lui souhaite beaucoup de courage dans la

reprise du flambeau ainsi que pour s'intégrer dans l'équipe. Enfin, merci à Denis Clay pour les longues journées de tri et d'isolement qui ressemblaient finalement plus à des épreuves de 4*400 mètres mixte sur 3 étages qu'à des journées d'expérimentation animale.

Je remercie évidemment tous mes collègues et amis clamartois, résidents et résidentes du CTSA, Juliette, Marion, Guillaume, Claire, Elodie, Frédéric, Marina, Marine et (même !) Muriel, ainsi que toutes celles et ceux qui sont restés pour un passage plus ou moins long. Merci pour tous ces échanges, ces conseils, ces suggestions, ces recommandations et surtout ces bons moments partagés en salle café. Vous qui faites de ce laboratoire ce qu'il est et qui connaissez maintenant les scripts d'OSS117, Kaamelott et Au service de la France sur le bout des doigts. Enfin, merci aux codocs Marianne, Océane et Hugo ainsi qu'à nos aînées et ex-codocs Clotilde, Constance et Lisa pour ces moments festifs à la poupe entrecoupant les divers confinements et couvre-feux. Merci à toi MD, pharmacienne sous-cotée, voix française et doublure de Léa Seydoux, pour ces dialogues enrichissants autour des rats taupes nus, de la papeterie de Tarascon ou de Natura 2000 que je n'ai toujours pas oubliés malgré toute cette huile d'olive passée sous les ponts ... Merci aussi à Hugo, actionnaire dans le café d'Amazon, grand gestionnaire de la corne d'abondance des belvita et de la climatisation, pour avoir été le meilleur dos avec qui discuter de tout (mais surtout de rien) pendant ces trois dernières années.

Merci au Noirmoute Crew et à l'élite du Fourman Show : Nico, Guigui, Pierrot, Mayana, Paupau, Max, Léou, Clém, Flofy et Juju pour tous ces rendez-vous à Notre-Dame, Noirmoutier, Sainte-Marie, Etel, Biarritz, au Cormier, en Corse et jusqu'en Martinique, sans oublier Saint-Jar-la-Jaille-Sur-Mer, sous le signe du Bigorneau, du Bâton du Zweiss, des barbecues sans lendemain et des Marlow et Castels improvisés. Merci à tous ceux qui me supportent (contre toute attente) depuis beaucoup trop d'années à commencer par Antonin, Aymeric, Mehdi, Louis, Benjamin, Estelle, Camille, Adèle et tous les autres. Je remercie aussi mes camarades universitaires n'est-ce pas, les Rennais Alexis, Corentin, Aurélie, Diane, Lucie, Mélanie, Samy, Yoann et Solenn pour les soirées grenier chez Coco et Solenn et les soirées poker où Alexis à découvert que le mensonge ne faisait pas partie de son registre de compétence. Merci aussi aux Nantais Quentin, Thomas, Romain, Nicolas, Paul et David pour les soirées Berlin et autres présidents de café.

Enfin, un grand merci à ma famille, à commencer par mes supers parents, Guillaume et Cathy, comme je les appelle souvent pour les agacer, qui m'ont toujours apporté un soutien sans faille, des encouragements illimités et poussé à accomplir toujours plus. Merci de nous avoir fait tant voyager et inspiré. Merci aussi

à mes deux sœurs, Salomé et Méline, pour tous ces fous rires en vacances ou à la maison ainsi que pour votre joie si communicative et votre soutien moral indéfectible, parfois même de l'autre bout de la Terre. Je remercie aussi mes grands-parents pour toutes les valeurs qu'ils m'ont transmis et pour qui je sais que ces études sont ou étaient très chères à leurs yeux.

Merci à vous tous pour avoir forgé mon quotidien et sans qui tout cela m'aurait paru infranchissable.

Sommaire

Résumé - Abstract	4
Remerciements	6
Sommaire.....	10
Index des figures	14
Index des tableaux	17
Liste des abréviations	18
I - Introduction	20
1 Description des paraostéarthropathies	20
1.1 Histoire des paraostéarthropathies.....	20
1.2 Description et répercussion des paraostéarthropathies	22
1.2.1 Diagnostic	22
1.2.2 Conséquences sur la réhabilitation du patient.....	24
1.2.3 Caractérisation des POA	24
1.3 Les principales formes d'ossifications ectopiques	26
1.3.1 Origine génétique	26
1.3.2 Origine traumatisme tissulaire (POA).....	26
1.3.3 Origine neurogène (POAN)	27
1.4 Epidémiologie des paraostéarthropathies neurogènes	27
1.4.1 Fréquences et délais d'apparition	27
1.4.2 Facteurs de risques et prédispositions	28
2 Stratégies thérapeutiques et préventives	29
2.1 Prophylaxies et traitements.....	29
2.1.1 Approches pharmacologiques	29
2.1.2 Approches non pharmacologiques.....	30
2.1.3 Approches combinées	31
2.2 Résection chirurgicale	31
3 Mécanismes cellulaires et moléculaires de la pathogenèse des paraostéarthropathies.....	32
3.1 L'ossification endochondrale et intramembranaire	32
3.2 Etat de l'art sur les différents modèles murins de POA-POAN	34
3.2.1 Modèles exogènes	34
3.2.2 Modèles transgéniques	35
3.2.3 Modèles traumatiques	35
3.2.4 Modèles neurogènes	35
3.3 Les progéniteurs myogéniques	37
3.3.1 Rôle dans la régénération musculaire	37
3.3.2 Processus de régénération musculaire pathologiques.....	40
3.3.3 Rôle dans les POA	41
3.4 Les progéniteurs fibro-adipogéniques	42
3.4.1 Rôle dans la régénération musculaire	42

3.4.2	Rôle dans la régénération osseuse physiologique.....	44
3.4.3	Processus pathologiques	46
3.4.4	Rôle dans les POA	47
3.5	Les macrophages et l'inflammation.....	50
3.5.1	Rôle de l'inflammation dans la régénération musculaire.....	50
3.5.2	Rôle de l'inflammation dans la régénération osseuse.....	52
3.5.3	Rôle dans les POA	54
3.5.4	Cytokines impliquées dans le développement des POA.....	54
3.5.5	Polarisation pro-inflammatoire M1-like dans les POA	54
3.5.6	Polarisation anti-inflammatoire M2-like dans les POA.....	56
3.5.7	Cas des neutrophiles et lymphocytes	58
3.6	Les cellules endothéliales	58
3.6.1	Rôle physiologique	58
3.6.2	Rôle dans les POA	58
3.7	Autres populations du muscle et du tendon	59
3.7.1	Les cellules souches dérivées du tendon (CSDT)	59
3.7.2	Les péricytes	59
3.8	L'impact des lésions neurologiques.....	60
3.8.1	Effets systémiques d'une lésion médullaire	60
3.8.2	Effets systémiques d'un traumatisme crânien	61
3.9	Facteurs additionnels	62
3.9.1	Protéines de morphogénèse osseuse (BMPs)	62
3.9.2	Hypoxie et hypervascularisation	64
3.9.3	Mécanotransduction	64
4	Les micro-ARN.....	66
4.1	Biogenèse des micro-ARN.....	66
4.1.1	Voie canonique.....	66
4.1.2	Voies non-canoniques	67
4.1.3	Mécanisme d'action	67
4.2	MiARN : à la fois cibles et effecteurs thérapeutiques.....	69
4.3	MiARN dans l'environnement musculaire	71
4.3.1	Les miARN musculaires ou myomiR	71
4.3.2	Régénération musculaire.....	72
4.3.3	Processus pathologiques	74
4.4	MiARN dans les processus ostéogéniques	76
4.4.1	Ossification endochondrale.....	76
4.4.2	Réparation osseuse	77
4.4.3	Effecteurs d'une régulation longue distance.....	81
4.4.4	Processus pathologiques	83
4.5	MiARN et inflammation.....	83
4.5.1	Rôle des miARN dans le contrôle de la réponse inflammatoire	83
4.5.2	MiARN, acteurs de la polarisation des macrophages	85
4.5.3	Hypoxie et angiogenèse.....	86
4.5.4	Processus pathologiques	86
II -	Objectifs de la thèse	88
III -	Démarche expérimentale	89
IV -	Matériels et méthodes	91
1.1	Modèles expérimentaux.....	91

1.1.1	Progéniteurs musculaires issus des POAN humains	91
1.1.1.1	Isolement et culture	91
1.1.1.2	Tri cellulaire	92
1.1.2	Progéniteurs mésenchymateux issus des ostéomes humains	92
1.1.3	Modèle murin de POAN.....	93
1.1.3.1	Induction chirurgicale des POAN	93
1.1.3.2	Suivi de l'animal.....	94
1.1.3.3	Euthanasie et prélèvements biologiques	95
1.1.3.4	Isolement des populations d'intérêt	96
1.2	Modèles fonctionnels	98
1.2.1	Isolement de monocytes et macrophages CD14 ⁺ et production de milieux conditionnés	98
1.2.2	Transfection.....	98
1.2.3	Test de différenciation ostéogénique.....	99
1.2.4	Modèle de coculture FAPs et macrophages	100
1.2.5	Test de différenciation adipogénique.....	100
1.2.6	Test de différenciation chondrogénique	100
1.3	Caractérisations cellulaires et tissulaires	102
1.3.1	Cytométrie en flux et phénotypage.....	102
1.3.2	Extraction des ARNm et miARN	102
1.3.3	RT et RT-qPCR	103
1.3.4	Méthode de normalisation	104
1.3.5	ELISA	105
1.3.6	Extraction protéique.....	105
1.3.7	Western Blots	105
1.3.8	Dosage de l'activité de la phosphatase alcaline	107
1.3.9	Contrôle de la viabilité cellulaire	107
1.3.10	Histologie et immunohistochimie	107
1.4	Statistiques	109
V	Résultats	111
1	Chapitre 1 : Caractérisation du microenvironnement musculaire des POAN ...	111
1.1	Introduction.....	111
1.2	Résultats.....	112
1.2.1	Développement des POAN dans le muscle endommagé chez la souris neurolésée	112
1.2.2	Dérégulation des ARNm du muscle POAN.....	116
1.2.3	Criblage des miARN du muscle POAN.....	119
1.3	Synthèse et discussion.....	124
2	Chapitre 2 : Caractérisation et analyse fonctionnelle des progéniteurs du muscle POAN	128
2.1	Introduction.....	128
2.2	Résultats.....	130
2.2.1	Isolement des populations musculaires	130
2.2.2	Caractérisation des transcrits ostéo-chondrogéniques et du miRnome des FAPs du muscle POAN	133
2.2.3	Caractérisation des transcrits myogéniques et du miRnome des MPs du muscle POAN.....	136
2.2.4	Caractérisation des progéniteurs musculaires avoisinant les POAN chez l'Homme	139
2.2.4.1	Tri et évaluation de la multipotence des progéniteurs musculaires	139
2.2.4.2	Cinétique d'expression des transcrits et miARN des FAPs en condition ostéogénique et inflammatoire.....	142
2.2.5	Etude fonctionnelle des miARN dans la modulation du potentiel de différenciation des FAPs et MPs.....	146

2.2.5.1	Effet des miARN sur le potentiel ostéogénique des FAPs	146
2.2.5.2	Effet des miARN sur le potentiel ostéogénique des MPs	150
2.3	Synthèse et discussion.....	152
3	Chapitre 3 : Rôle de l'inflammation sur les propriétés ostéo-chondrogéniques des FAPs.....	156
3.1	Introduction.....	156
3.2	Résultats.....	157
3.2.1	Caractérisation des transcrits inflammatoires, ostéo-inducteurs et du miRnome des macrophages du muscle POAN	157
3.2.2	Caractérisation des propriétés ostéoinductrices et chondro-suppressives des milieux conditionnés de macrophages	160
3.2.3	Potentiel des miARN à moduler la réponse des FAPs et macrophages au stimulus inflammatoire.....	164
3.3	Synthèse et discussion.....	166
VI	- Discussion et perspectives	170
1.1	Discussion générale.....	170
1.1.1	Les progéniteurs myogéniques et myofibres, entre initiateurs et témoins du développement des POAN	170
1.1.2	Influence de la lésion neurologique sur la signalisation des miARN	171
1.1.3	Rôle des miARN sur le devenir cellulaire	171
1.1.4	Altération des processus inflammatoires lors des lésions neurologiques et propriétés de modulation de l'inflammation des miARN	173
1.1.5	Rôle de la mécanotransduction sur l'expression des miARN et le devenir cellulaire.....	175
1.1.6	Limitations inhérentes à l'utilisation du modèle murin de POAN	176
1.1.7	Vers un essor de l'utilisation des miARN dans les thérapies géniques ?	177
1.2	Perspectives.....	179
VII	- Conclusion	182
VIII	- Annexes	183
1.1	Communications scientifiques	183
1.2	Publications scientifiques	183
1.2.1	Article de thèse : Rôle des miARN dans le développement des POAN.....	185
1.2.2	Article de revue : Les paraostéopathies neurogènes sont caractérisées par le développement d'une niche hématopoïétique intramusculaire fonctionnelle	226
1.2.3	Article annexe 1 : Implication et évaluation des caractéristiques et propriétés ostéogéniques des FAPs et MPs dans le développement des POAN	238
1.2.4	Article annexe 2 : Rôle de l'IL-1 dans le développement des POAN.....	256
1.3	Références	274
1.4	Feuille de suivi de la procédure expérimentale POAN.....	310
1.5	Clustergramme du criblage miRnome sur muscle entier	312
1.6	Liste des amorces criblage miRnome.....	313
	Résumés de la thèse.....	320

Index des figures

Figure 1 : Calques de clichés radiographiques de POA.....	21
Figure 2 : Radiographies, scan 3D et aspect physique des POA.....	23
Figure 3 : Descriptif histologique des POA.....	25
Figure 4 : Approches préventives et thérapeutiques dans la prise en charges des POAN.....	30
Figure 5 : Etapes clés de l'ossification endochondrale.....	33
Figure 6 : Illustration des acteurs du processus d'ossification endochondral intramusculaire à l'origine des POAN.....	34
Figure 7 : Architecture et organisation du tissu musculaire.....	37
Figure 8 : Dynamique des cellules satellites, progéniteurs myogéniques et facteurs de transcription dans la régénération musculaire.....	38
Figure 9 : Signalisation paracrine entre les cellules satellites, progéniteurs myogéniques et acteurs de la régénération musculaire.....	39
Figure 10 : Evolution des FAPs au décours d'une lésion musculaire.....	43
Figure 11 : Localisation interstitielle des FAPs et potentiel ostéo-chondrogénique dans la régénération osseuse.....	45
Figure 12 : Communications intercellulaires et dérive des FAPs du muscle physiologique ou pathologique.....	46
Figure 13 : La déplétion des FAPs conduit à un défaut de la régénération musculaire et une atrophie musculaire.....	47
Figure 14 : Rôle de l'inflammation, des progéniteurs fibro-adipogéniques et des cellules satellites dans la régénération musculaire.....	51
Figure 15 : La perturbation de la réponse inflammatoire médiée par les macrophages induit l'échec de la régénération musculaire au travers des FAPs.....	52
Figure 16 : Rôle de l'inflammation et des macrophages dans la régénération osseuse.....	53
Figure 17 : Rôle des polarisations M1 et M2 des macrophages sur les progéniteurs mésenchymateux dans le développement des POA.....	56
Figure 18 : La lésion du système nerveux central perturbe la balance cytokinique et exacerbe la réponse inflammatoire.....	61
Figure 19 : Cascade d'activation du TGF- β et des BMPs et transduction du signal par les SMAD des progéniteurs ostéogéniques.....	63
Figure 20 : Biogenèse, activité et modulation des mécanismes d'action des micro-ARNs.....	68
Figure 21 : Stratégies de régulation des voies de signalisation par les miARN.....	70
Figure 22 : Rôle et cibles des miARN dans la myogenèse.....	71
Figure 23 : Impact de la rigidité du substrat et de la mécanotransduction dans la signalisation des miARN et le devenir cellulaire.....	74
Figure 24 : Régulation des différentes voies d'engagement en différenciation des CSM par les miARN.....	77
Figure 25 : Tableau récapitulatif du rôle des miARN dans les processus ostéogéniques.....	79

Figure 26 : Rôle des miARN dans la différenciation ostéogénique des CSM.....	81
Figure 27 : Le traumatisme crânien améliore la régénération osseuse par la sécrétion de miARN ostéogéniques.....	82
Figure 28 : Rôle de miR-146a dans le rétrocontrôle de l'inflammation et de la tolérance au stress inflammatoire.....	85
Figure 29 : Etapes clés de la démarche expérimentale développées autour du modèle murin et des cellules de patients POAN.....	90
Figure 30 : Modèle murin de POAN et démarche expérimentale associée.....	95
Figure 31 : Stratégie de tri et d'activation des CD14 ⁺ isolés à partir de PBMC de dons de sang.....	98
Figure 32 : Représentation schématique du modèle murin de POAN combinant lésion musculaire et neurologique pour l'étude du muscle entier.....	111
↓ Figure 33 : Histologie du muscle gastrocnémien dans le modèle de POAN.....	112
↓ Figure 34 : Immunomarquages du MG dans le modèle de POAN.....	114
Figure 35 : Expression des ARNm codant pour des facteurs de transcription ostéogéniques, chondrogéniques, inflammatoires et matriciels du muscle entier.....	117
Figure 36 : Expression des ARNm codant pour des facteurs de transcription myogéniques du muscle entier.....	118
Figure 37 : Criblage des miARN dans le muscle entier.....	120
Figure 38 : Expression des miARN ostéo-chondrosuppressifs et anti-inflammatoires du muscle entier.....	121
Figure 39 : Expression des miARN ostéogéniques du muscle entier.....	122
Figure 40 : Expression des myomiR du muscle entier.....	123
Figure 41 : Représentation schématique de la stratégie d'isolement cellulaire, d'identification in vivo puis d'évaluation in vitro des miARN sur les populations musculaires.....	129
Figure 42 : Stratégie d'isolement cellulaire du modèle murin de POAN et répartition des populations résidentes du muscle.....	131
Figure 43 : Evolution des populations de macrophages, FAPs, MPs et ECs isolées en fonction de la condition expérimentale.....	132
Figure 44 : Expression des transcrits ostéogéniques, chondrogéniques, matriciels et endothéliaux des FAPs.....	133
Figure 45 : Expression des miARN ostéo-chondrosuppressifs et anti-inflammatoires des FAPs.....	134
Figure 46 : Impact des lésions musculaire et neurologique sur les miARN ostéogéniques des FAPs.....	135
Figure 47 : Expression des transcrits ostéogéniques, chondrogéniques et myogéniques des MPs.....	137
Figure 48 : Expression des miARN ostéo-chondrosuppressifs et myogéniques des MPs.....	138
Figure 49 : Stratégie d'isolement cellulaire des muscles avoisinant l'ostéome des patients POAN.....	139
Figure 50 : Evaluation des capacités de différenciations des progéniteurs musculaires et comparaison du potentiel ostéogénique en fonction des sources de CSM.....	141

Figure 51 : Impact de la différenciation ostéogénique en milieu inflammatoire sur les transcrits ostéogéniques, chondrogéniques, matriciels et endothéliaux des FAPs	143
Figure 52 : Impact de la différenciation ostéogénique en milieu inflammatoire sur l'expression des miARN des FAPs	144
Figure 53 : Effet des miARN et du vecteur sur la viabilité, l'abondance des miARN intracellulaires et la modulation des transcrits cibles.	147
Figure 54 : Effet des miARN sur la différenciation ostéogénique des FAPs et la modulation des marqueurs ostéogéniques.....	149
Figure 55 : Validation de la spécificité de l'effet biologique à la séquence des miARN et de la compétition de deux miARN au rôle antagoniste	150
Figure 56 : Effet des miARN sur la différenciation ostéogénique des MPs	151
Figure 57 : Expression des marqueurs pro- et anti-inflammatoires des macrophages	158
Figure 58 : Expression des miARN impliqués dans les processus d'activation et de polarisation des macrophages	159
Figure 59 : Caractérisation des propriétés ostéogéniques et chondro-suppressives des CM ⁺	161
Figure 60 : Impact de l'activation aux LPS des macrophages sur les miARN intracellulaires et sécrétés	163
Figure 61 : Evaluation du potentiel des miARN à moduler la réponse des FAPs et macrophages au stimulus inflammatoire	165
Figure 62 : Cibles ostéogéniques et inflammatoires des principaux miARN identifiés dans la pathogenèse des POAN	173
Figure 63 : Recrutement et coordination des acteurs inflammatoires lors d'une lésion musculaire traumatique ou d'une lésion médullaire.....	175

Index des tableaux

Tableau 1 : Anticorps utilisés pour l'isolement et le tri des différents acteurs de la régénération musculaire	96
Tableau 2 : Récapitulatif de la stratégie d'isolement et tri des différents acteurs de la régénération musculaire	97
Tableau 3 : Anticorps utilisés pour le phénotypage des progéniteurs musculaires, FAPs et MPs, issus de muscle de patient POAN	102
Tableau 4 : Anticorps utilisés en Western Blot	107
Tableau 5 : Anticorps utilisés pour les analyses histologiques et immunohistochimiques.....	108

Liste des abréviations

AAV : Virus Adéno-Associés

ACVR1 : Récepteur de type I à l'activine

ADN/ARN : Acide Désoxyribonucléique/Ribonucléique

ARN/RNA : Acide Ribonucléique

ARNm : ARN messenger

AVC : Accident Vasculaire Cérébral

BMP : Protéine de morphogenèse osseuse

CCL2 : Chimiochine ligand 2

CDTX : Cardiotoxine

CSDT : Cellule Souche Dérivée du Tendon

CSH : Cellule Souche Hématopoïétique

CSM : Cellule Stromale Mésoenchymateuse

DAMP : Motif Moléculaire Associé au Dégât

EC : Cellule Endothéliale

FAP : Progéniteur Fibro-Adipogénique

FGF : Facteur de croissance fibroblastique

GFP : Protéine de fluorescence verte

HIF-1 α : Facteur inductible par l'hypoxie-1 α

INF- γ : Interféron- γ

LPS : Lipopolysaccharides

MCP-1 : Monocyte chemoattractant protein 1

MG : Muscle Gastrocnémien

miARN : micro-ARN

MMP : MétalloProtéase Matricielle

MO : CSM de moelle osseuse d'ostéome

MP : Progéniteur Myogénique

MyomiR : miARN myogénique

NMJ : Jonction NeuroMusculaire

OA : Ostéoarthrite

OCN : Ostéocalcine

OSM : Oncostatine M

PAL : Phosphatase Alcaline

PBMC : Cellules mononuclées du sang périphérique

PCI : Points de Contrôle Immunitaire

PDGFR α : Récepteur α au facteur de croissance dérivé des plaquettes

POA : Paraostéoarthropathies

POAN : Paraostéoarthropathies neurogènes

P/S : Pénicilline/Streptomycine

RAR : Récepteur à l'Acide Rétinoïque

SC : Cellule Satellite

SCI : Lésion médullaire

SIRS : Syndrome de Réponse Inflammatoire Systémique

SNC : Système Nerveux Central

SVF : Sérum de Veau Foetal

TC : Trauma Crânien

TGF- β : Facteur de croissance transformant β

TNF- α : Facteur de Nécrose Tumorale α

VEGF- α : Facteur de croissance vasculaire α

I - Introduction

1 Description des paraostéoarthropathies

1.1 Histoire des paraostéoarthropathies

En 1914, la Grande Guerre embrase l'Europe. La révolution industrielle du XIX^{ème} siècle bouleverse l'échelle du conflit, les champs de bataille ne sont plus limités à quelques mètres mais s'étendent parfois sur des centaines de kilomètres. Au niveau industriel, la massification du conflit marque un tournant sans précédent. À Verdun, un million d'obus seront tirés le premier jour, tout autant le second. Les changements de doctrines militaires et l'essor de l'emploi massif de l'artillerie accroissent exponentiellement le nombre de blessés de guerre ainsi que le nombre de lésions neurologiques.

Augusta Déjerine et André Ceillier, alors affectés Centre des Grands Infirmes du Système Nerveux à l'Institution Nationale des Invalides, décrivent en mars 1918 les premiers cas d'ossification ectopique chez des blessés médullaires, qu'ils nomment paraostéoarthropathies neurogènes (POAN) [1]. Grâce à des observations anatomiques, cliniques et radiographiques détaillées des « ostéomes » de soldats français paraplégiques (**Figure 1**), ils émettent l'hypothèse que « ces [aiguilles osseuses] se multipliant, se développant et fusionnant, le muscle s'ossifie en entier ». Ils définissent ces paraostéoarthropathies comme l'apparition spontanée, sans infection, sans hématome préalable et dissociée de tout traumatisme tissulaire local, de néoformations osseuses en croissance rapide, survenant dans les tissus mous 5 à 30 mois après la blessure initiale. Dans la série présentée dans la thèse de Ceillier en 1920, sur 160 blessés paraplégiques, 79 avaient développés des POAN, soit une incidence de l'ordre de 50%.

Historiquement, les premiers rapports d'observation d'ossifications extra-squelettiques nous proviennent de Patin, Copping, Freke et enfin Riedel respectivement en 1692, 1740, 1741 et 1883 [2]. Cependant, ceux-ci faisaient état soit d'arthropathies nerveuses soit de myosites et fibrodysplasies ossifiantes progressives, décorréées de toute lésion traumatique ou neurologique, et d'origine génétique.

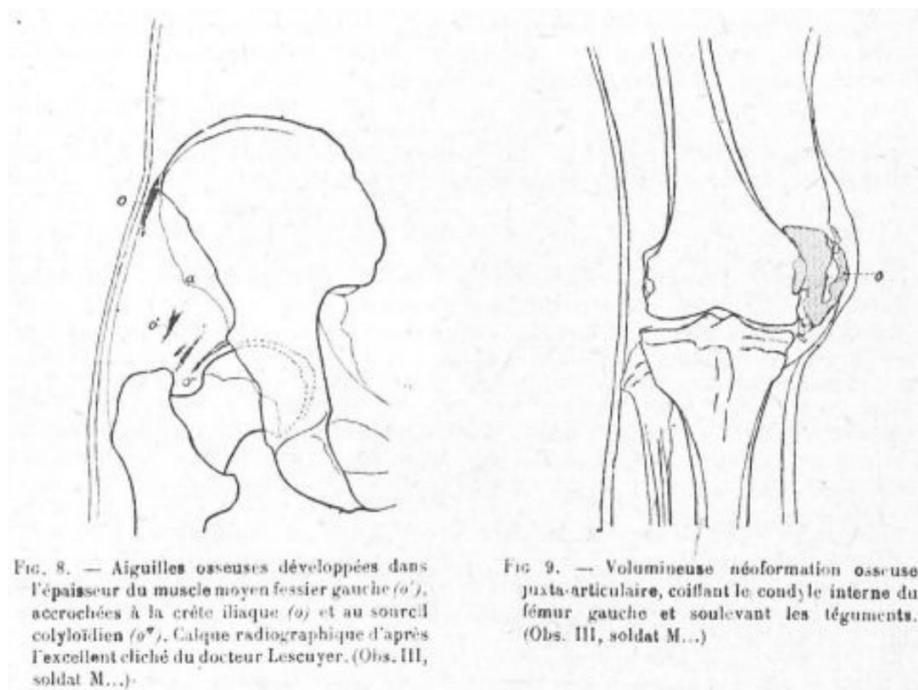


Figure 1 : Calques de clichés radiographiques de POA

A gauche : « Aiguilles osseuses développées dans l'épaisseur du muscle moyen fessier gauche accrochées à la crête iliaque et au sourcil cotyloïdien ». A droite : « Volumineuse néoformation osseuse juxta-articulaire, coiffant le condyle interne du fémur gauche et soulevant les téguments ».

Figure extraite de A. Déjerine et A. Ceillier, Société de Neurologie, 1918

Dans les conflits récents, dit asymétriques, de guérilla, il a été observé une recrudescence de blessés par explosifs liée à l'utilisation de mines et autres engins explosifs improvisés [3]. Les statistiques épidémiologiques des interventions occidentales en Irak et en Afghanistan montrent en effet une prévalence des atteintes à la tête et au cou. Ce type de lésion est à même de provoquer des dommages au système nerveux central (SNC), principalement des traumatismes crâniens (TC), et être à l'origine du développement des POAN, constituant un défi majeur aussi bien pour les populations militaires que les civils. Si les POAN ont été décrites comme une pathologie de guerre, elles soulèvent aujourd'hui des questions de santé publique et sociétales, avec une prévalence chez les accidentés graves de la route ou les victimes d'actes terroristes. Les mécanismes provoquant la pathologie restent pourtant méconnus, limitant à l'heure actuelle les approches thérapeutiques et le développement de prophylaxies efficaces.

1.2 Description et répercussion des paraostéarthropathies

1.2.1 Diagnostic

Les paraostéarthropathies (POA) sont des formations ectopiques pathologiques de tissu osseux qui se développent aux dépens du tissu musculaire. Ces ossifications hétérotopiques, sont spécifiquement localisées en périphérie des articulations : dans 61% des cas autour de la hanche, 21% du coude, 14% du genou et 4% de l'épaule (**Figure 2**) [4,5]. Elles ont, selon leurs localisations, des conséquences importantes sur les fonctions articulaires et musculaires [6]. Ces ossifications ectopiques regroupent un ensemble de complications ossifiantes des tissus mous dont les origines traumatiques ou génétiques sont multiples.

Leur découverte est souvent tardive, réalisée fortuitement lors d'observation de gonflement périarticulaire, de perte d'amplitude articulaire ou de douleurs ressenties par le patient (**Figure 2**) [7]. Leur détection peut aussi survenir au cours de radiographies, de scanners et scintigraphies osseuses, échographies, réalisées pour d'autres indications. Elles peuvent néanmoins être activement détectées par palpation ou avec des examens d'imagerie précoces par des cliniciens avisés du risque de survenue de la complication [8]. La raideur articulaire est aussi un évocateur de la mise en place de la pathologie [2]. Enfin, il est important de recontextualiser l'apparition des POA, en effet, ceux-ci survenant chez des patients polytraumatisés, neurolésés, voir brûlés ou amputés, la priorité absolue est apportée au traitement et à la survie du patient, complexifiant la détection précoce de cette pathologie.

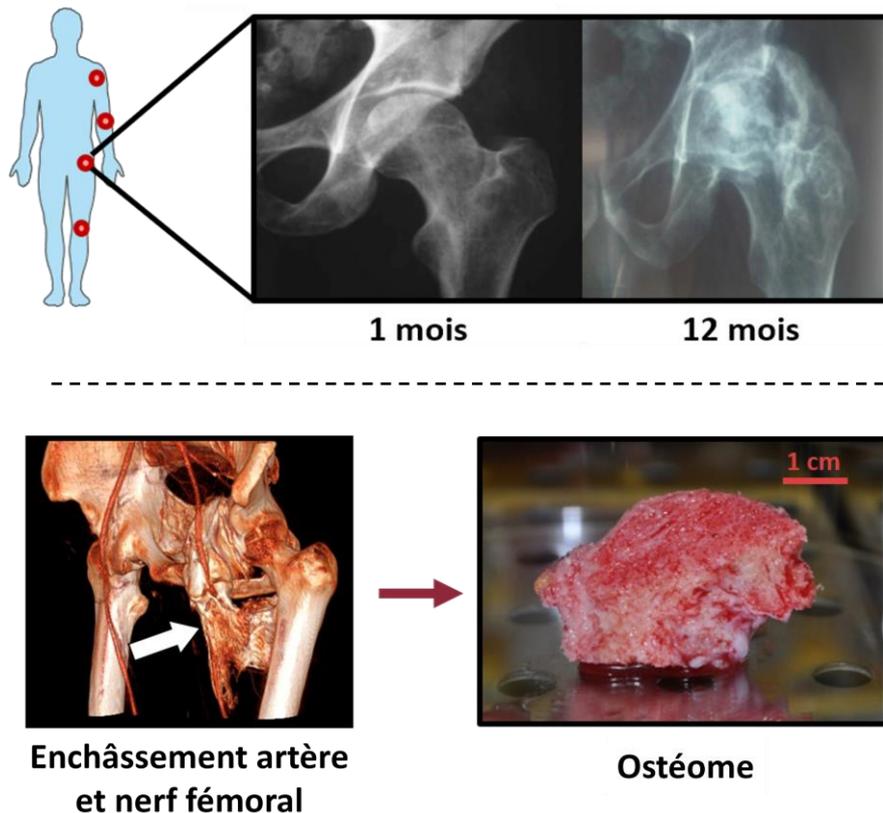


Figure 2 : Radiographies, scan 3D et aspect physique des POA

Evaluation par radiographie d'un ostéome de hanche à 1 et 12 mois (en haut), enchâssement artériel et nerveux dans un second ostéome de hanche (en bas). Radiographies et scanners issus du Service de Médecine Physique et de Réadaptation de l'hôpital Raymond-Poincaré, Garches

Des marqueurs moléculaires prédictifs ou confirmatoires ont été décrits dans des études rétrospectives mais restent très controversés [9,10]. Des concentrations sériques plus élevées en phosphatase alcaline, en parathormone ou du facteur de transcription RUNX2, ont été retrouvées chez des patients TC dès 6 heures après la lésion [11,12]. Cependant des études contradictoires n'ont pas permis de confirmer la fiabilité de ces biomarqueurs prédictifs [13]. Les variations de concentration sérique d'autres molécules telles que les métalloprotéases matricielles (MMPs), les facteurs de croissance fibroblastique (FGFs) ou les protéines de morphogénèse osseuse (BMPs) ont aussi révélé des corrélations avec l'intensité du TC ou la concomitance entre TC et lésion tissulaire, sans qu'aucun consensus puisse être dégagé quant à leur utilisation en diagnostic clinique [12,14]. Nous avons récemment observé des concentrations en cytokines pro-inflammatoires interleukine-1 β (IL-1 β) et oncostatine M (OSM) deux fois plus élevées chez les

patients ayant développés des POA d'origine neurogène, suggérant leur utilisation potentielle comme biomarqueurs de l'inflammation dans le cadre du développement de la pathologie [15,16].

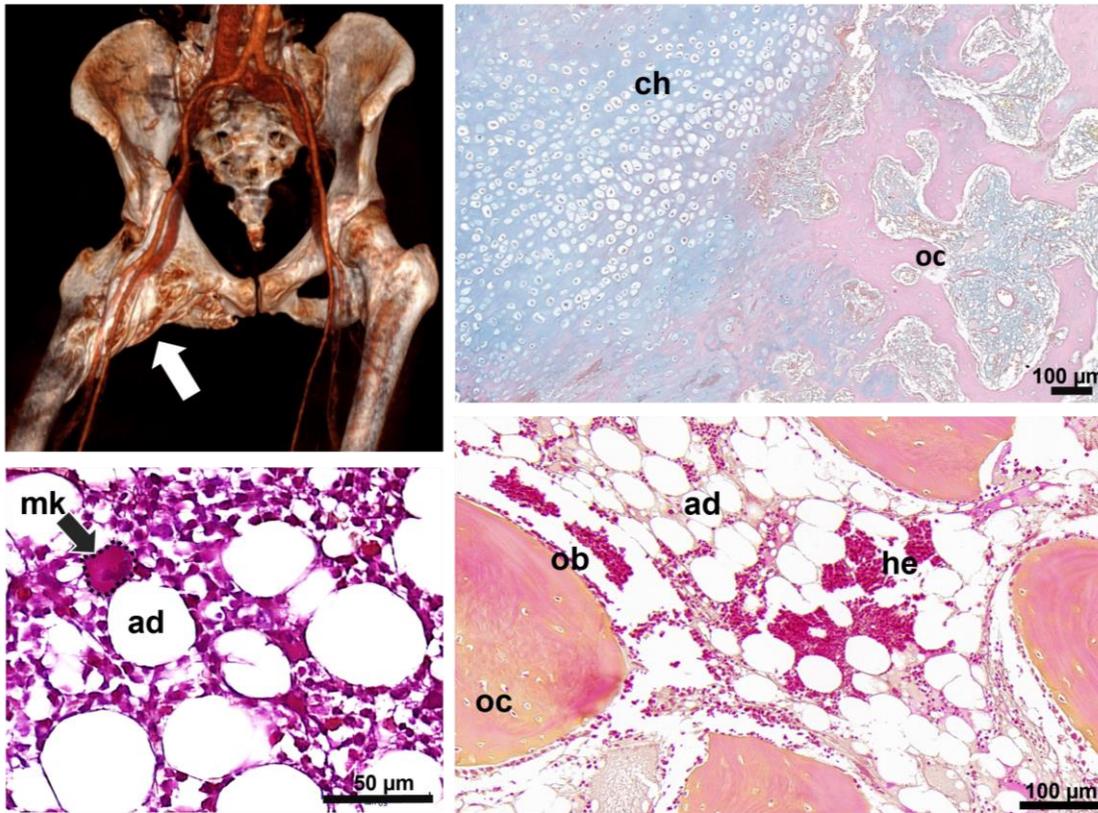
1.2.2 Conséquences sur la réhabilitation du patient

Les POA ont pour conséquence première une réduction de l'amplitude articulaire dans les phases précoces de la pathologie, pouvant aller jusqu'à l'ankylose complète. Leur développement peut générer des douleurs, des compressions nerveuses ou artérielles (**Figure 2**). Dans certains cas, elles sont aussi à même d'entraîner des contractures musculaires. En outre, les POA surviennent chez des patients déjà fragilisés et souvent lourdement médicalisés, impliquant de longs séjours en réanimation. Dans certains cas, les POA peuvent provoquer la formation d'escarres [17]. Elles vont par ailleurs entraîner une perte d'autonomie liée à la difficulté à réaliser des tâches du quotidien comme boire, manger et s'habiller. Les POA peuvent également perturber la prise en charge avec des difficultés de mise en fauteuil roulant ou d'appareillage suite à une amputation et plus directement entraîner une perte de mobilité croissante.

1.2.3 Caractérisation des POA

Les ostéomes se définissent par une formation pathologique de tissu osseux caractérisée à la phase mature par la présence d'une niche hématopoïétique fonctionnelle et hypervascularisée (**Figure 3**) [18,19]. L'ostéome est constitué d'os cortical rigide à sa périphérie et trabéculaire en son centre avec des cavités médullaires contenant les acteurs physiologiques de la moelle osseuse : cellules hématopoïétiques, ostéoblastes, adipocytes, macrophages, mégacaryocytes, tout particulièrement lorsque l'ostéome est volumineux. Cette moelle osseuse pleinement fonctionnelle est caractéristique des POA et la distingue d'autres pathologies de minéralisation ectopique telles que les calcifications dystrophiques, impliquant uniquement des dépôts de matrice calcique minéralisée dans des tissus en dégénération ou nécrosés [20]. L'origine endochondrale ou intramembranaire des POA a longtemps été débattue. Cependant, de nombreuses études ont montré la présence de matrice cartilagineuse colonisée de chondrocytes, parfois hypertrophiques, et côtoyant de l'os trabéculaire néoformé, suggérant le développement originel d'un tissu cartilagineux évoluant vers un tissu ossifié minéralisé dans les stades plus avancés de la pathologie (**Figure 3**) [6,21].

Alcian blue



ch: chondrocytes, ob: osteoblasts, oc: osteocytes,
ad: adipocytes, he: hematopoietic cells, mk: megakaryocytes

HPS

Figure 3 : Descriptif histologique des POA

Scanner 3D d'un ostéome de hanche, en haut, coloration bleu alcian/rouge nucléaire révélant la présence de chondrocytes hypertrophiques (bleu) et ostéocytes enchâssés dans la matrice calcique (rose). En bas, coloration Hématoxyline Eosine Safran révélant la présence de progéniteurs hématopoïétiques, mégacaryocytes et ostéoblastes (violet) présents sur 4 fronts de minéralisation, d'adipocytes (blanc négatif) et d'ostéocytes enchâssés dans le tissu osseux. Scanners issus du Service de Médecine Physique et de Réadaptation de l'hôpital Raymond-Poincaré, Garches, figure adaptée de Girard et al. [18].

1.3 Les principales formes d'ossifications ectopiques

Les différentes formes d'ossifications ectopiques sont directement reliées à leurs origines et peuvent être classées en deux grandes catégories, les POA d'origines génétiques et les POA acquises, ces dernières regroupant à la fois les ossifications ectopiques d'origine traumatique et neurogène.

1.3.1 Origine génétique

La Fibrodysplasie Ossifiante Progressive (FOP), aussi appelée maladie de l'homme de pierre, est une pathologie héréditaire orpheline extrêmement rare (1/2 000 000). Elle est causée par une mutation nucléotidique unique sur le gène du récepteur de type I à l'activine, *ACVR1^{R206H}*, impliqué dans la transduction du signal des protéines de morphogenèse osseuse (BMPs) [22]. Cette mutation entraîne une activation aberrante du récepteur [23]. La maladie se caractérise par des malformations congénitales des extrémités et des ossifications ectopiques [24] qui se développent dans de nombreux types de tissus mous associés aux muscles tels que les tendons, les ligaments, les fascias et les aponévroses. De manière intéressante, ces ossifications se développent de façon précipitée lors de lésions musculaires ou d'infections virales générant des poussées inflammatoires. La première cause de mortalité est liée aux complications associées à un syndrome d'insuffisance respiratoire lorsque la pathologie atteint les muscles intercostaux [24]. *A contrario* des formes acquises de POA, la chirurgie d'exérèse est une contre-indication car elle est associée à une recrudescence de l'inflammation, les seuls traitements actuellement disponibles sont donc palliatifs, visant à réduire l'impact des poussées inflammatoires.

1.3.2 Origine traumatisme tissulaire (POA)

Les origines traumatiques des POA sont nombreuses. Celles-ci peuvent être liées à un traumatisme orthopédique, une amputation, survenir chez les patients brûlés ou à la suite de la pose d'une prothèse totale de hanche [2,5,25]. Ces affections entraînent la survenue de POA dans 10 à 40% des cas pour les fractures, 60% des amputations, chez 5% des patients brûlés et peut aller jusqu'à 90% chez les patients ayant reçu une prothèse totale de hanche. La sévérité du traumatisme est par ailleurs corrélée avec la probabilité de développer des POA [26]. Dans tous les cas, ces conditions entraînent une réaction inflammatoire importante dont nous décrivons le rôle capital par la suite.

1.3.3 Origine neurogène (POAN)

Les lésions du système nerveux central (SNC) peuvent induire l'apparition de POA d'origine neurogène (POAN) indépendamment de toute lésion tissulaire périphérique. Les POAN sont attribuées dans 56% des cas aux traumatismes crâniens, 24% aux lésions médullaires, 12% aux AVC et 8% aux anoxies cérébrales [4]. De plus, leur incidence augmente lors de la concomitance avec une lésion tissulaire osseuse ou musculaire tandis que leur sévérité s'accroît avec la complétude de la lésion médullaire [7,10]. Dans le cadre de traumatismes de guerre, des travaux ont suggéré un lien entre le développement des POAN et les lésions engendrées lors d'un TC induit par une explosion, qui crée alors différentes atteintes lésionnelles telles que le blast, la brûlure et les projections [27]. En outre, Forsberg *et al.* ont observé que 86% des patients à la fois TC et blastés développaient secondairement des POAN [28]. Plus récemment, de nombreuses équipes ont documenté l'apparition de POA chez les patients alités en réanimation à la suite d'un COVID-19 [29]. Cependant, et bien que le développement de la pathologie soit imputé aux facteurs inflammatoires systémiques sévères, aucune étude n'a permis d'exclure l'impact du COVID-19 sur le système nerveux central ou périphérique, une ischémie tissulaire ou autre facteur de risque [30].

1.4 Epidémiologie des paraostéopathies neurogènes

1.4.1 Fréquences et délais d'apparition

Les POA traumatiques surviennent chez environ 10 à 30% des patients polytraumatisés. Dans certaines cohortes de blessés militaires, ces chiffres peuvent atteindre 60 à 67% des patients polytraumatisés [27,31]. Dans le cas des POAN, leur occurrence se situe entre 5 et 20% chez les traumatisés crâniens (TC) et entre 20 et 30% pour les blessés médullaires [4,32]. Chez les patients combinant un TC ou une lésion médullaire (SCI) ainsi qu'une atteinte tissulaire, la probabilité de développer des POAN est singulièrement augmentée [17].

Le développement des POAN peut être unique, multiple, symétrique ou non. Le nombre d'ostéomes est en moyenne de 2,12 pour les patients ayant subi un TC et de 2.84 pour les patients avec une lésion médullaire [33,34]. Paradoxalement, au cours des dernières décennies, la meilleure prise en charge des blessures primaires, notamment sur les théâtres d'opérations où l'accès aux soins est précaire, a significativement augmenté le taux de survie des blessés, engendrant ainsi une augmentation du nombre de complications dont font partie les POA [35]. Le

développement des POAN débute généralement entre 1 et 3 mois après la lésion du CNS [20,27]. Ces ossifications vont continuer de se développer jusqu'à un an après leur apparition avant d'enfin stabiliser leur volume.

1.4.2 Facteurs de risques et prédispositions

Différents facteurs de risques sont associés au développement des POAN. Garland *et al.* ont démontré qu'une spasticité musculaire des membres favorisait leur apparition tandis que Flin *et al.* mettaient en évidence un lien entre la présence d'une fracture osseuse et l'occurrence des POAN [33,34]. Les lésions axonales diffuses, qui peuvent survenir lors d'un TC où la boîte crânienne subit une accélération ou décélération violente, sont aussi un sous-type lésionnel favorable à l'émergence de la pathologie [36]. Dans ce même cadre, Hendricks *et al.* ont associé la sévérité du TC avec la probabilité d'apparition des POAN [37]. Plus récemment, un lien a été proposé entre l'apparition d'ulcères et des POA [38]. Finalement, l'immobilisation prolongée et la mise sous assistance respiratoire lors d'une hospitalisation de longue durée, augmentent significativement les risques de développer des POA [39]. Ces facteurs entraîneraient une perturbation de l'homéostasie calcique et une augmentation du pH liée à la respiration mécanique/artificielle, conduisant ainsi à une alcalose respiratoire et un risque accru de développer des POA [9].

Diverses études ont montré une plus forte prévalence des POAN chez les hommes, cependant ce point est débattu car les risques de TC sont aussi deux fois plus élevés chez cette population [40]. Les jeunes adultes de sexe masculin sont les plus représentés dans les forces armées et les graves accidents de la route. Enfin, le délai de prise en charge du patient, son âge ainsi que la localisation et la sévérité de la lésion médullaire sont des facteurs prédisposant à la survenue des POAN [41]. Aucune prédisposition génétique n'a à ce jour été rapportée.

Les POA peuvent être héréditaires ou acquises à la suite d'un traumatisme. Parmi les POA acquises, les paraostéoarthropathies neurogènes (POAN) sont caractérisées par le développement ectopique de tissu osseux d'origine endochondrale dans les muscles à la suite d'une lésion du système nerveux central (SNC). Les POAN se développent près ou autour des articulations, induisant une diminution de l'amplitude articulaire et d'importantes douleurs liées à des compressions nerveuses et vasculaires.

2 Stratégies thérapeutiques et préventives

2.1 Prophylaxies et traitements

Différentes prophylaxies pour prévenir la survenue des POAN sont proposées, partageant pour la plupart des efficacités relatives voire pour certaines des effets secondaires et contre-indications non négligeables (**Figure 4**) [9,27].

2.1.1 Approches pharmacologiques

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) ont longtemps été étudiés dans la prévention des POA car ils ont le potentiel d'inhiber la production de médiateurs pro-inflammatoires incriminés dans la mise en place des POA [42]. L'indométacine inhibe le développement des POAN lorsque administrée durant les 2 premiers mois suivant une SCI chez l'Homme, avec une incidence de 25% pour le groupe traité contre 65% pour le groupe placebo [43]. Cliniquement, l'utilisation des AINS est proposée pour une durée de 15 jours minimum afin de prévenir l'apparition de POAN à la suite d'une SCI [44]. Les effets indésirables des AINS (rénaux, cardiovasculaires ou gastrointestinaux) peuvent limiter leur prescription, ils peuvent aussi induire un retard de cicatrisation cutanée, rendant leur utilisation problématique chez des grands brûlés.

Les biphosphonates bloquent l'activité ostéoclastique. Paradoxalement, ils étaient initialement utilisés dans le traitement de pathologies telles que l'ostéoporose ou la maladie de Paget où l'on observe une perte de masse osseuse. La justification de leur emploi dans les POA repose sur le fait que l'inhibition de l'activité des ostéoclastes permettrait le ralentissement global des cycles de remodelage osseux, avec un effet indirect sur les processus de minéralisation. Plusieurs études ont montré qu'une injection dans la première semaine post TC, suivie d'une prise orale pendant six mois, permettait de réduire la fréquence d'apparition des POA de 70% à 20% [43]. Toutefois, un début de traitement tardif, après l'apparition des premiers symptômes cliniques, ne permettait ni de réduire ni de stopper la croissance des POA [45,46]. Étant donné leurs propriétés anti-ostéogéniques, l'utilisation de biphosphonates n'est pas souhaitable chez des patients présentant une ou plusieurs fractures au risque de compromettre les processus de consolidation osseuse [47].

Les agonistes des récepteurs de l'acide rétinoïque (RARs) sont des inhibiteurs de la chondrogenèse qui induisent l'expression de cadhérines par les

précurseurs mésenchymateux [48]. Leur utilisation a été proposée sur la base de résultats encourageants chez l'animal mais les études cliniques restent limitées et les effets secondaires limitent leur emploi [49]. La pertinence de l'utilisation d'agonistes aux RARs reste encore débattue [50].

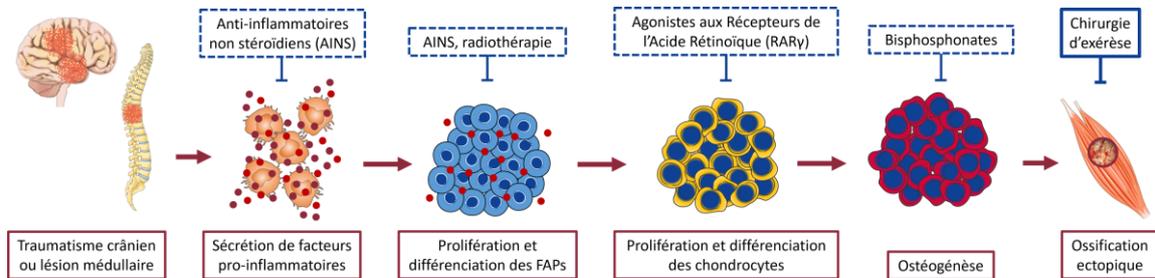


Figure 4 : Approches préventives et thérapeutiques dans la prise en charges des POAN

2.1.2 Approches non pharmacologiques

Sautter-Bihl *et al.* ont montré l'utilisation de la radiothérapie, visant à irradier les tissus mous pour interrompre la prolifération cellulaire lors de la phase inflammatoire était capable de prévenir l'apparition des POA dans $\approx 80\%$ des cas [51,52]. Cependant Cipriano *et al.*, dans une étude sur des patients neurolésés, ont observé un effet négatif de la radiothérapie, remettant en question son utilisation dans la prophylaxie des POA d'origine neurogène [53]. En outre, les effets indésirables de l'exposition aux rayonnements, liés à la fréquence et l'intensité des doses reçues, sont loin d'être négligeables.

La mobilisation des membres permet de lutter contre la spasticité musculaire. Les effets positifs de cette mobilisation dans la prévention des POA font consensus [5]. Cependant, il est important de noter qu'une mobilisation trop intensive des articulations à la suite d'une longue période d'immobilité peut favoriser l'apparition des POA, probablement par la création de microlésions tissulaires dans un environnement musculaire spastique [54].

En conclusion, la plupart des traitements prophylactiques manquent d'efficacité et sont parfois inemployables chez des patients polytraumatisés pour lesquels les risques de complications sont multiples.

2.1.3 Approches combinées

Ces dernières années, une approche holistique des différents paramètres de la pathologie a permis d'établir des stratégies thérapeutiques plus complexes. L'utilisation de biphosphonates, et plus particulièrement d'etidronate, pour lutter contre la récurrence post-exérèse a été démontrée avec succès [55]. Lors de la combinaison de l'intervention chirurgicale et de la radiothérapie, 82% des patients gagnaient en amplitude de mouvement comparé à la chirurgie seule [51,52]. L'utilisation de champs magnétiques de faible intensité couplée à des exercices de mobilisation physique a été suggérée par Garland *et al.* afin de lutter avec efficacité contre la progression de la pathologie [45].

2.2 Résection chirurgicale

A l'heure actuelle, la résection chirurgicale de l'ostéome mature reste le traitement de référence [5,20]. Il s'agit d'une chirurgie d'abord fonctionnelle, l'ostéome n'étant parfois pas retiré en entier à partir du moment où il n'affecte plus la mise en mouvement du membre [56]. Des POA asymptomatiques, souvent de petites tailles, ne sont pas opérés. L'indication chirurgicale varie en fonction de l'étiologie, Garland *et al.* suggèrent une intervention à 6 mois pour les POA traumatiques, à 12 mois pour les POAN liées à une lésion médullaire et à 18 mois pour les POAN liées à un traumatisme crânien [57,58]. Les complications de la chirurgie comprennent principalement la fracture d'un os avoisinant fragilisé et l'infection post chirurgicale, dix fois plus fréquentes que lors d'autres chirurgies de la hanche [56]. Il existe par ailleurs un risque important de récurrence, soit radiologique, soit clinique [59]. La récurrence radiologique est de l'ordre de 80 à 100% tandis que la récurrence clinique, symptomatique, est d'environ 6%.

En conclusion, l'ensemble de ces travaux souligne l'hétérogénéité d'efficacité des traitements et prophylaxies existants, et mettent en évidence l'utilisation de la mobilisation physique à la suite de l'intervention chirurgicale afin d'obtenir les meilleurs gains d'amplitude de mouvement tout en prévenant la récurrence des POA. Etant donnée la complexité, le coût et les risques associés à la chirurgie d'exérèse, qui reste pourtant le traitement de référence, la nécessité d'une meilleure compréhension des mécanismes à l'œuvre dans la pathogenèse des POA est cruciale dans l'optique d'identifier de nouveaux leviers prophylactiques et cibles thérapeutiques améliorant la prise en charge du patient.

3 Mécanismes cellulaires et moléculaires de la pathogenèse des paraostéopathies

3.1 L'ossification endochondrale et intramembranaire

La formation de l'os et son métabolisme impliquent de multiples niveaux de régulation médiés par de nombreux acteurs cellulaires et moléculaires. Ces mécanismes utilisent différents signaux pour le développement et le maintien de l'homéostasie osseuse, notamment les BMPs, la signalisation Wnt, des hormones ainsi que des facteurs de croissance et cytokines afin d'induire les processus ostéogéniques et de minéralisation.

L'ossification endochondrale est un type d'ossification primaire se développant à partir d'une trame cartilagineuse [60] (**Figure 5**). Les cellules stromales mésenchymateuses (CSM) du tissu embryonnaire mésodermique vont se condenser sous l'effet des BMPs et facteurs de transcription tels que SOX5-6-9 puis proliférer et engager une différenciation chondrogénique en présence de TGF- β et des SOX [61]. Ces chondrocytes vont générer une matrice extracellulaire (MEC) composée de collagènes II-IX-XI et de protéoglycanes [62]. Ces cellules vont ensuite mûrir en chondrocytes hypertrophiques et produire du collagène X, de la fibronectine et des métalloprotéinases matricielles (MMPs). Cette étape de remodelage permet l'infiltration vasculaire du tissu cartilagineux ainsi que son organisation en travées dotée d'une matrice riche en calcium et phosphatases alcalines (ALPL). Cette néovascularisation va permettre de recruter des progéniteurs ostéogéniques qui, au contact des BMPs, généreront un centre d'ossification primaire, en parallèle de la transdifférenciation des chondrocytes hypertrophiques en ostéoblastes. L'ensemble des processus ostéogéniques sont régulés par des facteurs de transcription dont OSX, RUNX2 et ATF4 sont les plus fondamentaux. Les ostéoblastes vont ensuite sécréter différents collagènes et concentrer le calcium et phosphate inorganique afin de convertir la trame chondrogénique en tissu ossifié. Leur enlèvement dans cette matrice permettra leur différenciation terminale en ostéocyte.

En parallèle, l'entrée en apoptose d'une partie des chondrocytes hypertrophiques permettra de générer la cavité médullaire ou s'établira la niche hématopoïétique. Ainsi, le développement de cette ossification s'opère de l'intérieur vers l'extérieur avec un gradient de chondrocytes et ostéoblastes à différents stades de maturité permettant la croissance régulière des os longs.

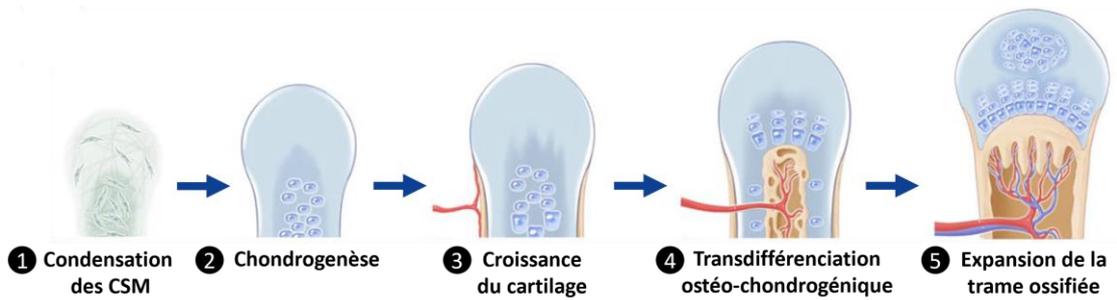


Figure 5 : Etapes clés de l'ossification endochondrale

Figure adaptée de Fu et al. [63]

A la différence de l'ossification endochondrale, l'ossification intramembranaire se caractérise par une absence de matrice cartilagineuse et de stade chondrogénique des CSM. Ce processus d'ossification intervient principalement dans le développement des os plats et du crâne. A l'instar de l'ossification endochondrale, les CSM du tissu conjonctif vont se condenser et directement se différencier en ostéoblastes sous la pression de BMP2-4-7 [64]. Ceux-ci vont sécréter une matrice composée de protéoglycanes et de collagènes capable de lier le calcium et ainsi former des ostéoïdes. Ce processus va se répéter, mener à la formation d'une matrice osseuse compacte dans laquelle les ostéoblastes pris au piège se différencieront en ostéocytes. La production d'ostéoïdes autour des vaisseaux sanguins du tissu conjonctif avoisinant permet la vascularisation de ce tissu.

3.2 Etat de l'art sur les différents modèles murins de POA-POAN

Afin de décrire au mieux les acteurs cellulaires et moléculaires impliqués dans la pathogenèse des POA (**Figure 6**), il est nécessaire de présenter les différents modèles d'étude. On distingue 4 grandes familles de modèles animaux développant des POA, listés dans l'ordre croissant de leur pertinence clinique : les modèles « exogènes », les modèles transgéniques, les modèles traumatiques et les modèles neurogènes.

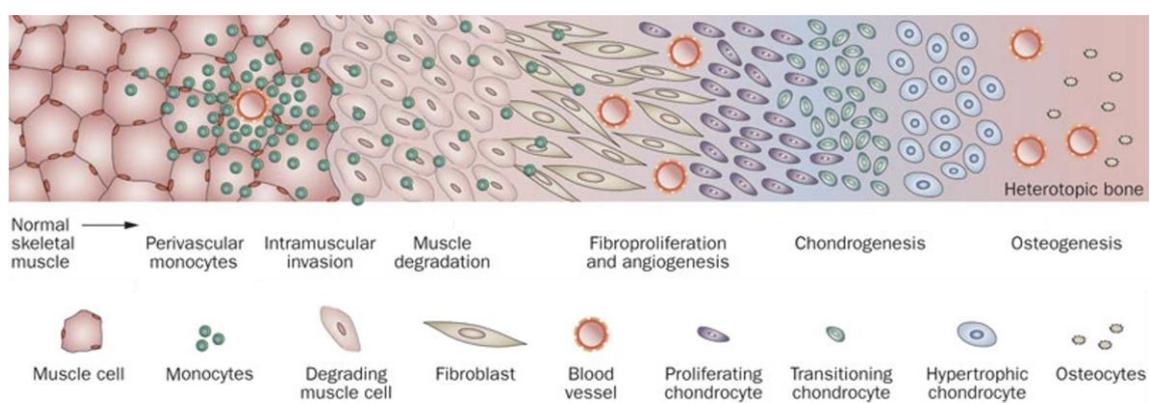


Figure 6 : Illustration des acteurs du processus d'ossification endochondrale intramusculaire à l'origine des POA

Figure adaptée de Shore et al. [65]

3.2.1 Modèles exogènes

Les modèles « exogènes », sont les premiers modèles d'ossifications ectopiques développés. Ceux-ci consistent à introduire un élément ostéo-inductif au sein du muscle ou des tissus mous de l'animal, pouvant prendre plusieurs formes telles qu'une greffe de fragments osseux, de moelle osseuse, de progéniteurs ostéogéniques ou l'injection de protéine de morphogénèse osseuse (BMPs), associée à un hydrogel ou sous vecteur transgénique transitoire [6]. Les avantages de ces modèles sont leur relative praticité d'utilisation et leur reproductibilité [66]. Toutefois, la pertinence d'introduire un élément ostéo-inductif exogène dans l'organisme pour reproduire la complexité de la pathogenèse reste discutable, bien que des augmentations d'expression des BMPs aient été observées lors de lésions musculaires [67].

3.2.2 Modèles transgéniques

Ces modèles permettent d'activer de façon constitutive le récepteur ACVR1, comme observé dans la FOP. L'expression peut être ubiquitaire ou spécifique d'un type de cellule, permettant l'étude des populations cellulaires impliquées dans le développement des ossifications ectopiques [68]. L'expression de ce récepteur muté (ACVR1^{R206H}) doit être contrôlée dans le temps par un système Cre-Lox car elle se trouve être létale pour le développement de l'animal. Ces modèles sont principalement utilisés dans l'étude de la FOP [23] et ne permettent pas d'explorer la physiopathologie des POA traumatiques.

3.2.3 Modèles traumatiques

Les modèles traumatiques combinent dans l'immense majorité des cas deux niveaux lésionnels couplant par exemple une lésion musculaire à une période d'exercice musculaire intense ou un fraisage de l'os avoisinant [69]. Un des modèles les plus utilisés à l'heure actuelle combine une ténotomie du tendon d'Achilles et une brûlure d'environ 25% de la surface corporelle afin de générer une POA [8,70]. De façon surprenante, la ténotomie seule sur un animal sauvage (WT) semble parfois capable d'induire la formation de POA [71]. Ces modèles sont de loin les plus pertinents pour l'étude des POA d'origine traumatique puisque générés par des facteurs semblables à la pathologie chez l'Homme.

3.2.4 Modèles neurogènes

Enfin, la dernière catégorie sont des modèles traumatiques intégrant une composante neurologique. Ce sont les modèles les plus pertinents du point de vue biologique et clinique pour les POAN.

Genêt *et al.* ont ainsi mis au point le premier modèle de POAN en combinant une lésion musculaire induite par la cardiotoxine (CDTX) à une section de la moelle épinière entre la vertèbre T7 et T8, modèle sur lequel se basera notre étude et qui sera détaillé IV - 1.1.3 [32]. Depuis, d'autres modèles de POAN ont été développés, Brady *et al.* ont montré que l'association d'un traumatisme crânien (TC), d'une fracture fémorale et d'une lésion musculaire permettait aussi d'induire l'apparition de POAN [72]. Ces modèles neurogènes soulignent l'importance de la concomitance de la lésion traumatique et neurologique dans le développement des POAN, et bien que la composante lésionnelle musculaire ne soit pas requise chez

l'Homme, ils constituent à l'heure actuelle la meilleure approche *in vivo* pour l'étude de cette pathologie.

Le développement de ces différents modèles d'étude a permis d'identifier de nombreux acteurs cellulaires et d'élucider les mécanismes moléculaires impliqués dans la pathogenèse des POA. Les descriptions des acteurs cellulaires et moléculaires suivantes étant dispersées dans ces différents modèles de POA et la pathogenèse étant sensiblement différente en fonction de l'origine, il sera précisé, lorsque pertinent, le modèle d'étude des travaux mentionnés.

3.3 Les progéniteurs myogéniques

Le muscle squelettique strié possède une matrice extracellulaire maintenant l'architecture du tissu. Chaque muscle est enveloppé dans une couche de tissu conjonctif : l'épimysium. Puis chaque faisceau musculaire est limité à sa périphérie par le péri-mysium et contient de multiples fibres musculaires ou myofibrilles, entourées chacune de l'endomysium (**Figure 7**). Les myofibrilles sont des cellules multinucléées contenant les myofibrilles elles-mêmes structurées par un enchaînement de sarcomères à l'origine du potentiel de contraction musculaire [73].

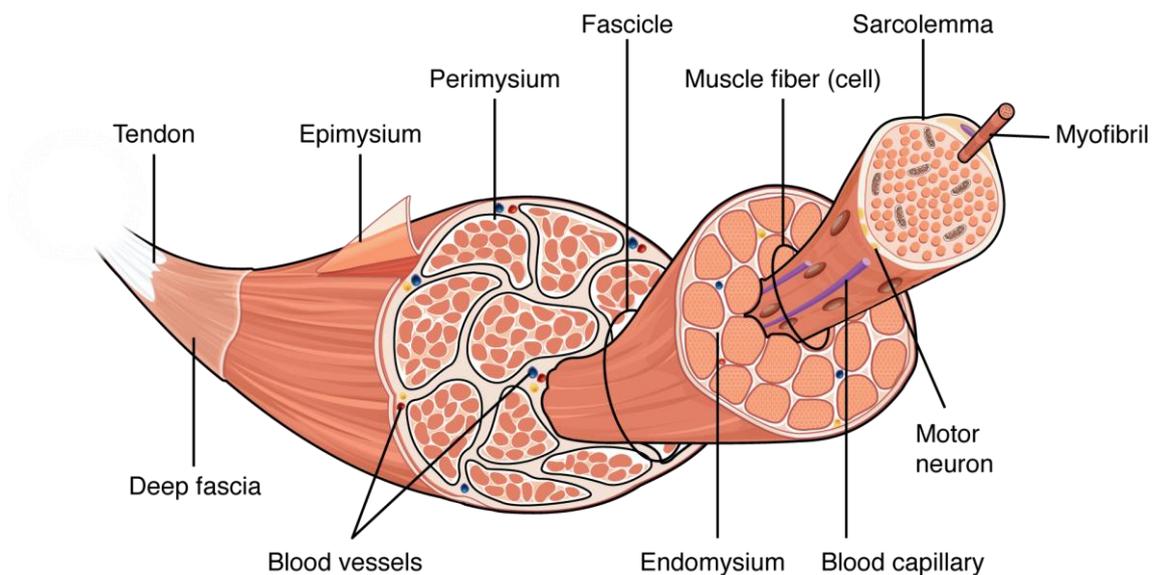


Figure 7 : Architecture et organisation du tissu musculaire

Les faisceaux de fibres musculaires, sont recouverts par le péri-mysium tandis que les fibres musculaires sont recouvertes par l'endomysium. Figure extraite de "Anatomy & Physiology" - Oregon State University [73].

3.3.1 Rôle dans la régénération musculaire

Le renouvellement des fibres musculaires est assuré par les cellules satellites (SCs), nommées en raison de leur position anatomique entre la lame basale et le sarcolemme des myofibrilles (**Figure 8**) [74]. Par ailleurs, de nombreux acteurs cellulaires participent au maintien de l'homéostasie musculaire tels que les progéniteurs fibro-adipogéniques (FAPs), les cellules endothéliales, ainsi que des cellules de l'immunité résidentes comme les macrophages sont aussi impliqués dans ce processus complexe (**Figure 9**) [75].

Lors d'une lésion musculaire, les myofibres endommagés vont nécroser et être éliminés à la suite de l'intervention de macrophages, éosinophiles et neutrophiles résidants ou suivant leurs infiltrations dans le tissu musculaire [76,77]. Les myofibres sont des cellules différenciées n'étant pas capable de mitose, leur renouvellement est donc assuré par les SCs, présentes physiologiquement dans un état de quiescence. Cet état dormant est notamment caractérisé par l'expression du facteur de transcription Pax7, régulé par la signalisation Notch et médié par les contacts cellulaires entre les myofibres et les SCs [78].

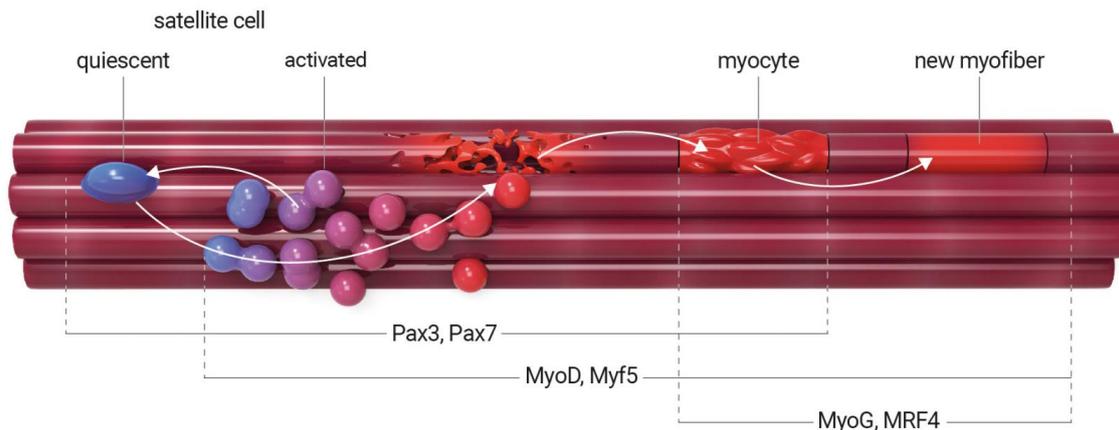


Figure 8 : Dynamique des cellules satellites, progéniteurs myogéniques et facteurs de transcription dans la régénération musculaire

Evolution des SCs et MPs du stade quiescent à la formation de nouvelles myofibres via leur activation, prolifération, différenciation et fusion. L'activation des cellules satellites entraîne la perte d'expression de Pax7 induisant l'expression de MyoD et permettant la prolifération des progéniteurs myogéniques, les MPs vont ensuite exprimer Myog et fusionner pour former de nouvelles myofibres. Certains MPs vont inverser leur expression de Pax7 et MyoD pour reformer les populations de cellules satellites quiescentes [79].

Figure extraite de Brzeszczyńska et al. [80].

A la suite de signaux moléculaires issus de la dégénération des myofibres, de leur phagocytose par des macrophages induisant la perte de la signalisation Notch, ainsi qu'à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine-1 β (IL-1 β), l'interleukine-6 (IL-6) ou le facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α), les SCs vont s'activer et ré-entrer dans leur cycle cellulaire (**Figure 9**) [76,77,81]. Elles quittent alors leur niche musculaire, se différencient en myoblastes exprimant la protéine de détermination myoblastique 1 (MyoD), prolifèrent, et fusionnent pour former de nouvelles myofibres caractérisées par l'expression de la myogénine

(Myog) [82]. Les myofibres néoformées produisent des chaînes de myosine permettant la contraction musculaire et vont finalement, en fonction de leur type, adopter un métabolisme oxydatif ou glycolytique, points d'orgue de la maturation terminale des fibres musculaires.

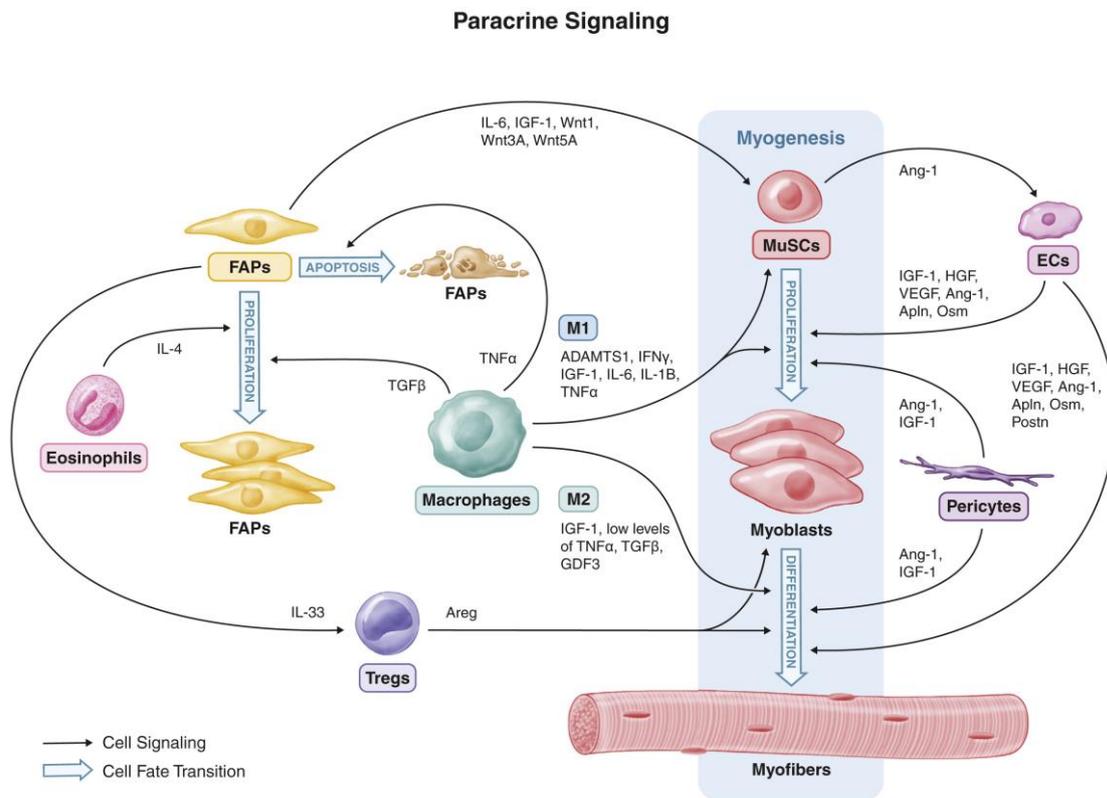


Figure 9 : Signalisation paracrine entre les cellules satellites, progéniteurs myogéniques et acteurs de la régénération musculaire

Lors d'une lésion musculaire, un environnement cellulaire et moléculaire dynamique permet l'activation, la prolifération, la différenciation myogénique et enfin la fusion des progéniteurs myogéniques nécessaire à la régénération des myofibres lésés. Les cellules impliquées fournissent une réponse coordonnée contrôlée par la sécrétion d'une multitude de facteurs.

Figure extraite de Wosczyzna et al. [76].

Ces 3 stades représentent les différents états de maturation des progéniteurs myogéniques : SCs quiescentes ($Pax7^+ MyoD^- Myog^-$), myoblastes en prolifération/différenciation ($Pax7^- MyoD^+ Myog^-$) et myofibres fusionnées ($Pax7^- MyoD^- Myog^+$) (**Figure 8**). Par ailleurs, la régulation des facteurs de transcription myogéniques Pax7 et Myog est exclusive mais nécessaire à l'un pour induire l'autre [79,83]. De façon synthétique, nous appellerons progéniteurs myogéniques (MPs)

toute population cellulaire qui se trouve dans un de ces stades d'activation et de différenciation. Les SCs bénéficient par ailleurs d'une capacité d'auto-renouvellement par division asymétrique permettant en permanence le maintien d'une population souche quiescente [84]. Il convient de noter que les SCs ne sont pas les seules cellules disposant d'un potentiel de myogenèse. Les cellules interstitielles exprimant PW1, mésoangioblastes, péricytes ou encore cellules circulantes CD133⁺ ont précédemment démontré cette capacité, bien qu'aucune d'entre elles ne soit capable de palier à une absence totale de SC dans leur modèle respectif [76].

Enfin, il est intéressant de noter que les cellules satellites sont aussi impliquées dans des processus régénératifs non-myogéniques et contribuent par exemple à la régénération osseuse [85]. En effet, lors d'une fracture, cette population est capable d'exercer une action paracrine sur les acteurs fibro-chondro-ostéogéniques du site lésionnel proximal, augmentant localement l'expression de facteurs de croissance prolifératifs et ostéogéniques tels que IGF-1, FGF2 et des protéines de morphogénèse osseuse (BMPs) [85].

3.3.2 Processus de régénération musculaire pathologiques

Un bouleversement dans la synchronicité et l'équilibre des acteurs impliqués dans ce processus complexe entraîne souvent une génération de fibrose, de tissu adipeux ou osseux pouvant compromettre une régénération musculaire [86,87]. L'âge est un facteur susceptible de perturber cet équilibre. Brack *et al.* ont en effet observé une augmentation de la signalisation Wnt dans les SCs menant à une accumulation de tissu fibreux dans les muscles de souris âgées [88]. Cette évolution vers un tissu fibreux est médiée par des facteurs systémiques liés à l'âge de l'animal, puisqu'il a été démontré à l'aide d'un modèle de parabiose qu'un animal jeune était capable de réduire la fibrose musculaire et de restaurer l'activité des SCs chez son partenaire plus âgé [89]. Les SCs peuvent aussi se différencier en myofibroblastes sous l'influence du facteur de croissance transformant β (TGF- β) exogène, notamment sécrété par les macrophages [90].

Les lésions musculaires dans des muscles dystrophiques induisent des accumulations de tissu fibreux et adipeux liés à la persistance de la réponse inflammatoire [86]. Uezumi *et al.* ont montré que les myofibres inhibaient physiologiquement la différenciation adipogénique FAPs et qu'un dérèglement pathologique de la myogenèse était susceptible d'induire la déstabilisation de cette boucle de contrôle négative entre néo-myofibres et FAPs menant ultimement à un échec de la régénération musculaire [91].

3.3.3 Rôle dans les POA

Les SCs et plus généralement les MPs ont initialement été incriminés dans le développement des POA du fait de leur capacité à se différencier en ostéoblastes en réponse à des stimuli ostéogéniques tels que les BMPs [92]. Wu *et al.* ont montré que du sérum de rat brûlé était capable d'induire la prolifération, la migration et le potentiel ostéogénique de SCs *ex vivo* [93]. Des études de traçage de lignée ont depuis montré l'absence de contribution de cette population dans la mise en place de la pathologie [94,95]. Par ailleurs, nous avons récemment confirmé que ces cellules ne contribuaient pas au développement des POAN [96]. En effet, les cellules satellites exprimant une protéine fluorescente verte (ZsGreen) sous contrôle du promoteur Pax7 étaient absentes du tissu osseux néoformé dans notre modèle murin de POAN, 2 et 4 semaines après son induction. D'autre part, le développement des ossifications était corrélé à une absence de myofibres en régénération, suggérant la nécessité d'une myogenèse compromise pour le développement des POAN. Enfin, l'isolement des cellules satellites à partir de résidus opératoires musculaires avoisinant l'ostéome chez l'Homme nous a permis de montrer leur faible capacité, mais néanmoins existante, à induire la formation d'un tissu osseux dans une niche ectopique *in vivo* [96].

3.4 Les progéniteurs fibro-adipogéniques

Le processus de régénération musculaire n'est cependant pas uniquement dépendant des SCs et demande une coordination entre de nombreux acteurs dont une des populations clés sont les progéniteurs fibro-adipogéniques (FAPs) [97,98]. Les FAPs sont des cellules souches multipotentes non myogéniques capables de se différencier en fibroblastes, adipocytes, chondrocytes ou ostéoblastes [91,95,99]. Elles se localisent dans l'interstitium des faisceaux musculaires, entre les myofibres, à proximité des vaisseaux sanguins [100].

Bien que cette définition englobe des sous-populations fonctionnellement différentes, les FAPs partagent de nombreuses caractéristiques avec les cellules stromales mésenchymateuses (CSM). Elles présentent les mêmes caractéristiques d'adhérence au plastique, de différenciation adipocytaire, chondrocytaire et ostéogénique ainsi que les marqueurs phénotypiques associés : CD105⁺ CD73⁺ CD90⁺ et CD45⁻ CD34⁻ CD14⁻ CD19⁻ HLA-DR⁻, et y sont donc assimilées [96,97,101]. Brièvement, les CSM sont issues du mésenchyme embryonnaire, multipotentes et capables d'auto-renouvellement, possèdent des propriétés immunosuppressives et pro-angiogéniques tout en étant présentes dans de nombreux tissus tels que la moelle osseuse, le tissu adipeux ou encore la pulpe dentaire [102,103].

Il est important de noter que l'hétérogénéité des FAPs complexifie leur étude, rendant la distinction entre populations interstitielles non-myogéniques et sous-populations de FAPs caractérisées par le marqueur PDGFR α ⁺ difficile sans faire intervenir des analyses single-cell. Leinroth *et al.* ont récemment décrit deux trajectoires de différenciation cellulaire des FAPs, l'une adipogénique et l'autre ostéogénique. Ces sous-populations possédant des capacités variables de différenciation en réponse à la lésion musculaire, elles illustrent l'hétérogénéité de cette population cellulaire [104].

3.4.1 Rôle dans la régénération musculaire

A la suite d'une lésion musculaire, les éosinophiles, premiers acteurs cellulaires, vont sécréter de l'IL-4 et IL-13 induisant la prolifération des FAPs et prévenant leur différenciation adipogénique [105]. Cette prolifération va s'effectuer en tandem avec les SCs pour atteindre un pic prolifératif 3 jours après la lésion (**Figure 10**). Elles entrent ensuite en apoptose pour retrouver leur niveau basal 7 à 9 jours après la lésion [106]. Lemos *et al.* ont démontré que la régulation post lésionnelle des FAPs était régie par deux cytokines sécrétées par les macrophages et monocytes : le TNF- α induisant l'apoptose et le TGF- β prévenant

cette dernière [107]. A la fin de leur cycle prolifératif, les FAPs vont se différencier en myofibroblastes et sécréter de la matrice extracellulaire (MEC) et des facteurs solubles tels que l'IGF-1 ou l'IL-6, favorisant ainsi la différenciation myogénique des SCs [99]. Cette MEC, produite de concert avec les fibroblastes résidants, a pour fonction d'assurer un support physique permettant la régénération anatomique du muscle lésé mais aussi de contenir une matrice riche en collagènes et autres facteurs de croissance pro-myogéniques [108]. Enfin, les FAPs participent à l'élimination des débris cellulaires nécrotiques dans un muscle en régénération, en étroite collaboration avec les macrophages [105].

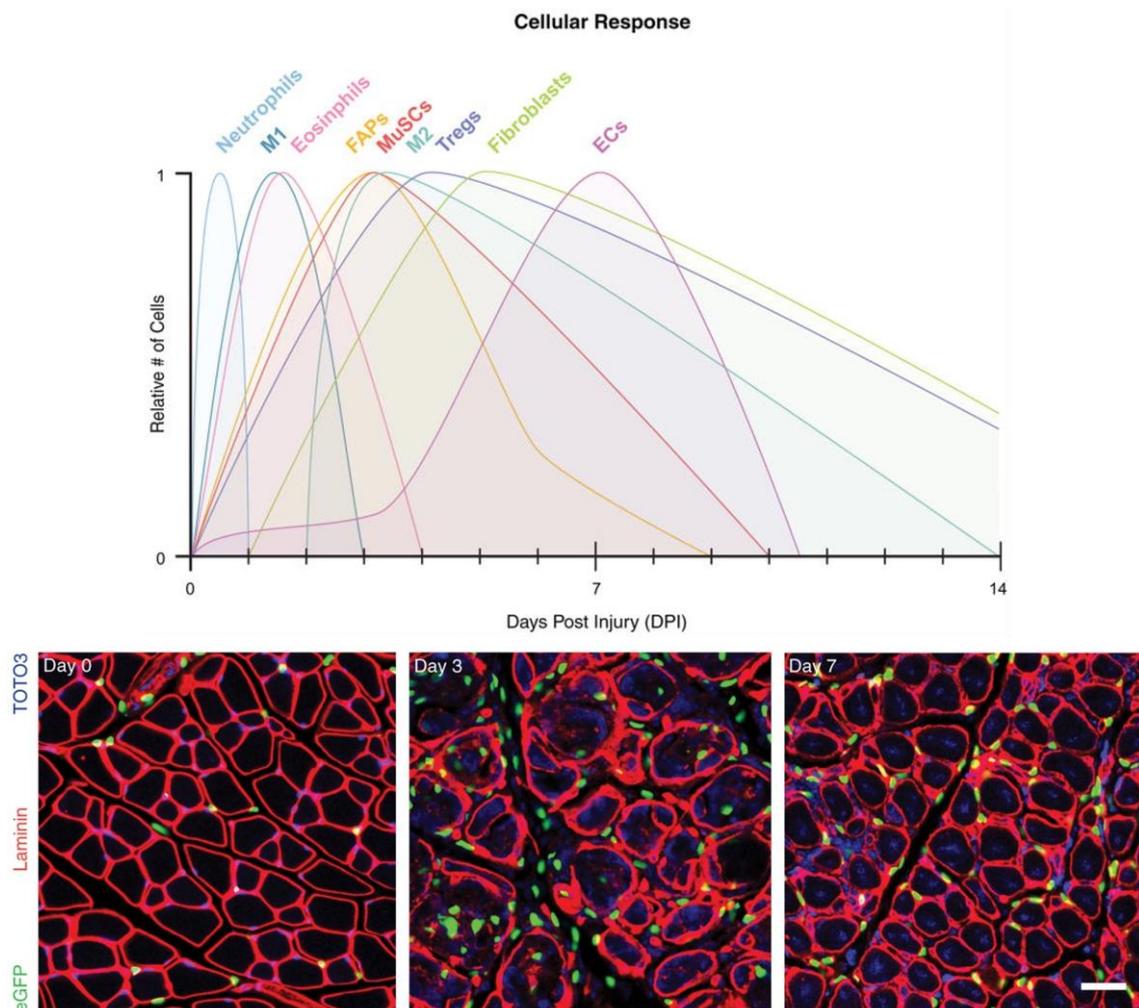


Figure 10 : Evolution des FAPs au décours d'une lésion musculaire

La laminine (rouge) marque la membrane basale et délimite la périphérie des myofibres, les FAPs (vert) résident dans l'interstitium musculaire (J0) et prolifèrent lors d'une lésion musculaire (J3) avant d'entrer en apoptose 7 jours après leur activation (J7).

Figure extraite de Wosczyzna et al. et Lemos et al. [76,107].

3.4.2 Rôle dans la régénération osseuse physiologique

La régénération osseuse est un processus complexe orchestré par de nombreux acteurs cellulaires et moléculaires. Celle-ci peut se décomposer en quatre étapes comprenant la formation d'un hématome primaire à la suite de la lésion, la formation d'un cal fibrocartilagineux, son évolution et maturation en cal osseux ainsi qu'un remodelage terminal permettant de recouvrer les fonctions et propriétés anatomiques et physiologiques de l'os [109]. L'inflammation est un acteur majeur de l'initiation de la régénération osseuse et sera détaillée plus précisément dans cette introduction. Sous l'influence de BMPs issues de la formation d'un tissu de granulation et de la réaction inflammatoire, des progéniteurs mésenchymateux vont être recrutés afin de contribuer à la formation du cal fibro-cartilagineux via une différenciation fibroblastique et le dépôt de protéines matricielles [109].

Certains de ces progéniteurs vont parallèlement s'engager dans une différenciation chondrocytaire puis sécréter des collagènes permettant l'établissement d'un tissu cartilagineux. Cette matrice néoformée va servir de support trophique à la différenciation ostéogénique des progéniteurs mésenchymateux impliqués dans le dépôt de matrice calcique, favorisant la transition vers un cal ossifiant. Ce remplacement du cartilage par le tissu osseux est une étape cruciale au processus d'ossification endochondrale. Les différents stades de l'ossification endochondrale sont régulés par des facteurs de transcription, parmi lesquels RUNX2 et SOX9 dont la cinétique d'expression est indispensable à l'initiation et à la maturation de ces processus [110,111]. La périphérie du cal est quant à elle caractérisée par un processus d'ossification intramembranaire où les progéniteurs mésenchymateux se différencient directement en ostéoblastes, sans transition chondrogénique [112].

Jusqu'à la découverte du potentiel ostéogénique du tissu musculaire, il a longtemps été suggéré que seuls les progéniteurs mésenchymateux de la moelle osseuse ou du périoste disposaient nativement de propriétés ostéogéniques [113]. Ce sont par ailleurs les principales sources de progéniteurs mésenchymateux contribuant aux processus de régénération osseuse [114,115]. Toutefois, Julien *et al.* ont récemment démontré la participation des progéniteurs mésenchymateux résidents du muscle dans ce processus régénératif (**Figure 11**) [116]. Un modèle de greffe musculaire ou de périoste allogénique a permis de révéler la capacité des FAPs issus du muscle à envahir le site fracturaire et suivre une différenciation ostéo-chondrogénique, démontrant ainsi le potentiel ostéogénique physiologique des FAPs résidents du muscle [116].

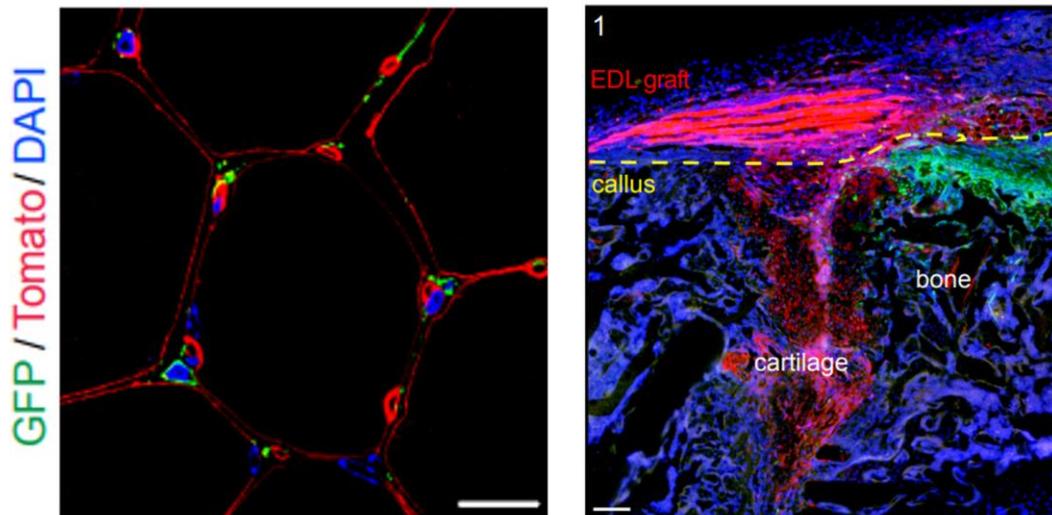


Figure 11: Localisation interstitielle des FAPs et potentiel ostéo-chondrogénique dans la régénération osseuse

A gauche, section transversale de muscle indiquant la position dans l'interstitium musculaire des FAPs (PRRX1⁺, vert), de cellules d'origine non mésenchymateuses (rouge) et de leurs noyaux (bleu). A droite, les populations cellulaires (rouge) provenant d'une greffe de tissu musculaire à proximité du site de fracture, témoigne de leur capacité à envahir le cal néoformé et de participer au développement du tissu cartilagineux.

Figure extraite de Julien et al. [116].

Par ailleurs, une étude comparative entre les progéniteurs mésenchymateux issus de la moelle osseuse et ceux du muscle attribue un plus grand potentiel ostéo-chondrogénique *in vivo* à ces derniers, ainsi qu'une trajectoire fibro-chondrogénique commune avec les progéniteurs issus du périoste, acteurs majeurs de la régénération osseuse [117]. En outre, la lésion du tissu musculaire avoisinant le site de fracture, telle que lors de polytraumatismes, induit la disruption de la régénération osseuse, retardant la formation du cal, du cartilage, du tissu osseux ainsi que son remodelage, et entraîne l'accumulation de tissu fibreux menant ultimement à un échec de la régénération. Ces observations soulignent le rôle du muscle et de ces composantes cellulaires dans les processus ostéogéniques physiologiques [116].

3.4.3 Processus pathologiques

Un échec de la régulation de la prolifération post lésionnelle des FAPs lors de lésions musculaires chroniques dystrophiques, ou défaut d'induction apoptotique, va entraîner l'accumulation de cette population ainsi que des dépôts fibreux et adipeux menant ultimement à une perturbation de l'environnement musculaire l'empêchant de parfaire sa régénération (**Figure 12**) [91,107,118].

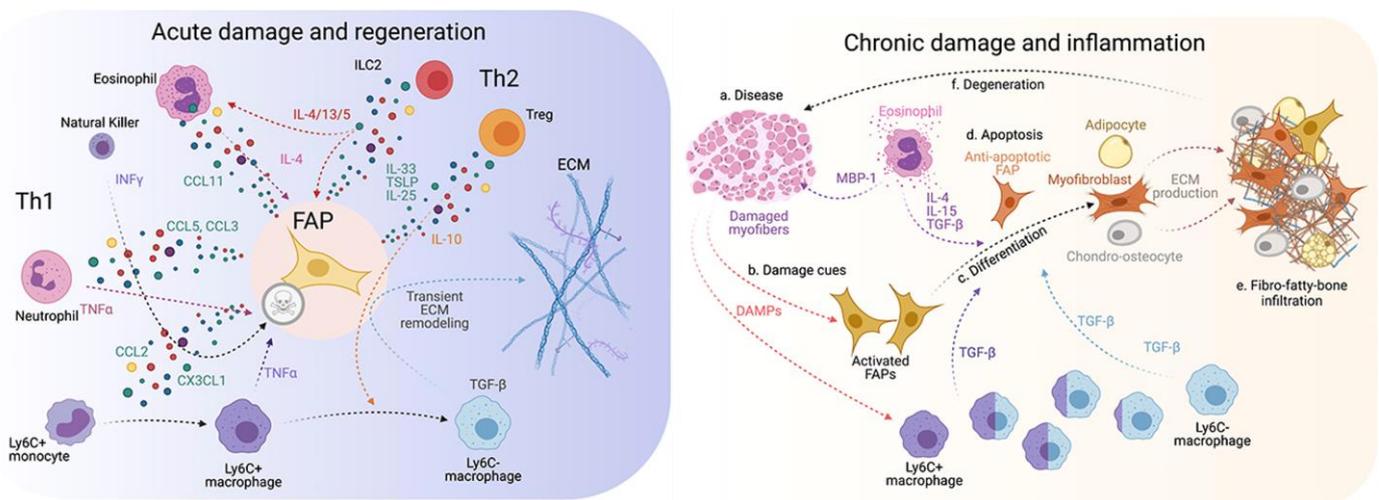


Figure 12 : Communications intercellulaires et dérive des FAPs du muscle physiologique ou pathologique

A gauche, processus physiologiques de l'activation, de la différenciation en myofibroblastes, de la production de MEC et de l'apoptose des FAPs au travers des différents acteurs de l'immunité. A droite, différenciation pathologique des FAPs et accumulation de tissu fibreux, adipeux ou osseux intramusculaire sous la pression de facteurs inflammatoires.

Figure adaptée de Theret et al. [119].

Uezumi et al. ont montré que les myofibres exercent un effet inhibiteur sur la différenciation adipogénique des FAPs dans un muscle en régénération, suggérant un cycle vicieux entre un échec initial de la régénération musculaire et l'accumulation de tissu adipeux au sein du tissu musculaire, comme retrouvé dans la myopathie de Duchenne [91]. Par ailleurs, dans un modèle de cette même dystrophie musculaire, il a été décrit que les FAPs, sous l'influence de TGF-β sécrété par les macrophages, étaient responsables d'une accumulation anormale de MEC provoquant une fibrose [107]. L'inhibition de cette cytokine et la suractivation de la

signalisation du TNF- α permet d'induire l'apoptose des FAPs et de prévenir ce processus pathologique. Ces résultats ont montré que les FAPs sont directement impliqués dans les processus d'accumulation de tissu adipeux et de fibrose menant à l'échec de la régénération musculaire.

A l'opposé, un défaut dans l'activation des FAPs est délétère pour la régénération musculaire. Une déplétion des FAPs provoque une dérégulation de l'homéostasie musculaire passant par une réduction du nombre de cellules satellites, une perturbation de la jonction neuromusculaire (JNM) et une perte de volume des myofibres menant ainsi à une atrophie du muscle (**Figure 13**) [97]. La régénération musculaire d'un muscle dépourvu de FAPs s'en retrouve aussi compromise au travers d'un moindre recrutement des macrophages, soulignant leur implication dans le maintien de l'homéostasie musculaire et des processus régénératifs [119].

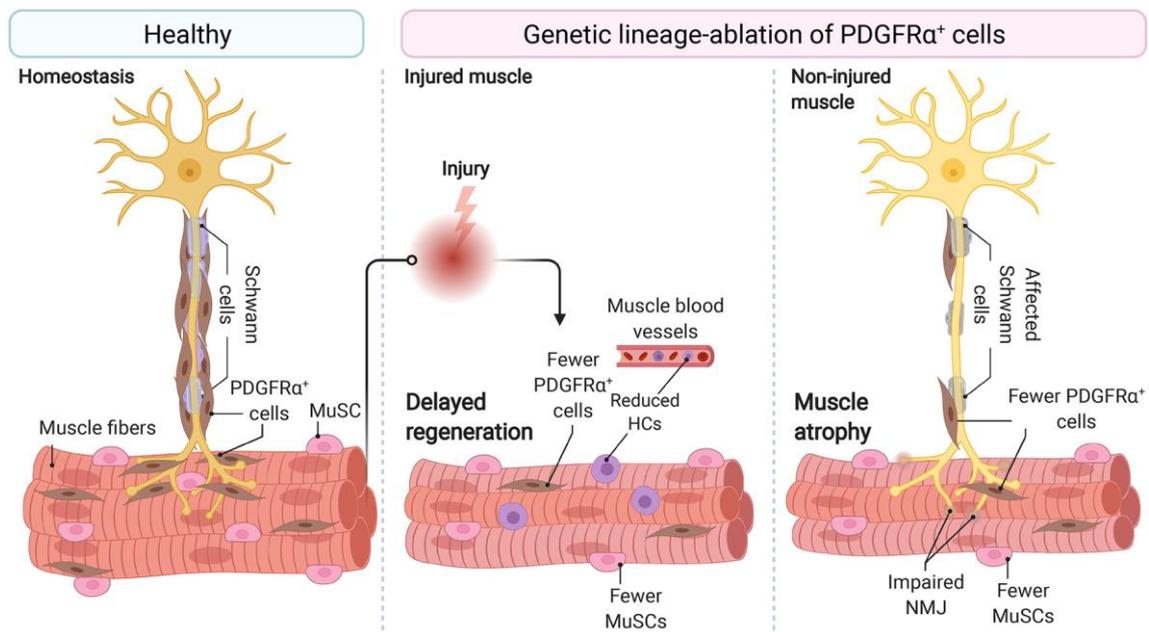


Figure 13 : La déplétion des FAPs conduit à un défaut de la régénération musculaire et une atrophie musculaire

Figure extraite de Theret et al. [119].

3.4.4 Rôle dans les POA

La première hypothèse concernant l'implication de progéniteurs issus du muscle dans le développement des POA remonte en 1975 par Chalmers *et al.* [120]. Ils montrèrent que l'injection d'acide chlorhydrique entraînait l'ossification du muscle et des fascias mais pas de la rate, du foie ni du rein. Des greffes de fascias

dans ces derniers permettaient cependant l'ossification de ces organes. Ils en conclurent 3 grandes conditions au développement osseux intramusculaire : la présence d'un agent ostéo-inducteur, la présence de cellules ostéogéniques et un environnement permissif à l'ostéogenèse.

L'étude de modèles d'injection de BMP-2 exogène a montré que les FAPs participaient à la néoformation de tissu osseux et cartilagineux, comme dans la FOP [66,95]. Dans un modèle de POA traumatique associant une ténotomie à une brûlure, Agarwal *et al.* ont observé l'accumulation de FAPs PDGFR α ⁺ exprimant le SOX9 au site lésionnel [121]. Ce même groupe a ensuite montré la présence des FAPs sur les sites de récurrences de POA d'origine traumatique [122]. Dans un modèle de parabiose, où un animal sain partage sa circulation sanguine avec un animal développant des POA, Loder *et al.* ont montré, la participation tardive de progéniteurs ostéogéniques SOX9⁺OSX⁺ circulants dans le développement des POA [123]. Cependant ces résultats sont contredits par une autre étude de parabiose qui conclue à l'absence de contribution de populations mésenchymateuses circulantes dans la genèse des POA [124].

Plus récemment, nous avons montré que les FAPs jouaient un rôle clé dans l'établissement des POAN dans le modèle murin de lésion médullaire précédemment décrit [96]. Un traçage des cellules sous contrôle du promoteur mésenchymateux *Prrx1* a permis d'établir la présence des FAPs au sein des nodules d'ossification ainsi que leur colocalisation avec du collagène I et de l'ostéocalcine. Lors de la transplantation de FAPs issus de patients POAN dans un biomatériau constitué d'hydroxyapatite chez la souris immunodéprimée, cette population mésenchymateuse montrait un fort potentiel à générer une matrice osseuse pouvant héberger une niche hématopoïétique [96]. Finalement, il est intéressant de noter que des populations cellulaires assimilables aux FAPs, qui sont d'origine mésenchymateuse, sont présentes dans d'autres organes tels que le poumon ou le rein, or ces organes n'étant pas assujettis au développement des POA, l'environnement musculaire semble constituer un support permissif au développement de ces ossifications ectopiques, comme suggéré par Chalmers *et al.* [95].

3.5 Les macrophages et l'inflammation

3.5.1 Rôle de l'inflammation dans la régénération musculaire

Le rôle de l'inflammation est central lors d'une lésion musculaire. De par ses capacités à orchestrer la coordination cellulaire via la sécrétion de facteurs solubles par les différents acteurs inflammatoires, celle-ci régule dans le temps l'activation de populations de la niche musculaire (**Figure 14**) [75,76,108]. Les macrophages et mastocytes résidents sont les cellules de l'immunité les plus abondantes dans un muscle sain. Ils assurent la détection précoce des signaux de dommage cellulaire et tissulaire (DAMPs) issus de la lésion aiguë [125]. Une fois activées, elles sécrètent des facteurs solubles tels que le TNF- α qui permet l'activation des SCs et le recrutement de neutrophiles, éosinophiles et granulocytes circulants qui vont s'infiltrer dans le tissu musculaire [126]. Ceux-ci vont ensuite entraîner le recrutement de monocytes qui se différencieront en macrophages lors de leur infiltration dans le muscle (**Figure 14**).

La polarisation précoce pro-inflammatoire M1-like des macrophages leur permet de réguler l'apoptose des FAPs via la sécrétion de TNF- α tandis que la polarisation anti-inflammatoire pro-régénérative M2-like, plus tardive, permet la sécrétion de TGF- β (**Figure 14** et **Figure 15**) [127]. Le TGF- β est une cytokine pléiotrope ayant ici pour effet d'induire la sécrétion de MEC par les fibroblastes et FAPs résidents. Toutefois, il est suggéré que la perturbation de la régénération permet l'existence de polarisations intermédiaires sécrétant les deux cytokines, qui entraînerait une surproduction et une accumulation de MEC menant à une fibrose délétère à la résolution de la lésion [107]. Par ailleurs, un environnement pro-inflammatoire favorise la prolifération des SCs tout en réduisant leur potentiel de différenciation myogénique, à l'opposé d'un environnement anti-inflammatoire promouvant la différenciation myogénique (**Figure 14**) [127]. Il est intéressant de noter que les macrophages M1-like se localisent plus souvent à proximité des myoblastes en prolifération tandis que les macrophages M2-like se retrouvent régulièrement au contact de myocytes fusionnant [128]. Enfin, les macrophages M2 sont capables de produire et de sécréter du collagène VI et de la fibronectine, éléments de la MEC supportant l'auto-renouvellement des SCs [129].

Rôle de l'inflammation, des Progéniteurs Fibro-Adipogéniques (FAPs) et des Cellules Satellites (SCs) lors de la régénération musculaire

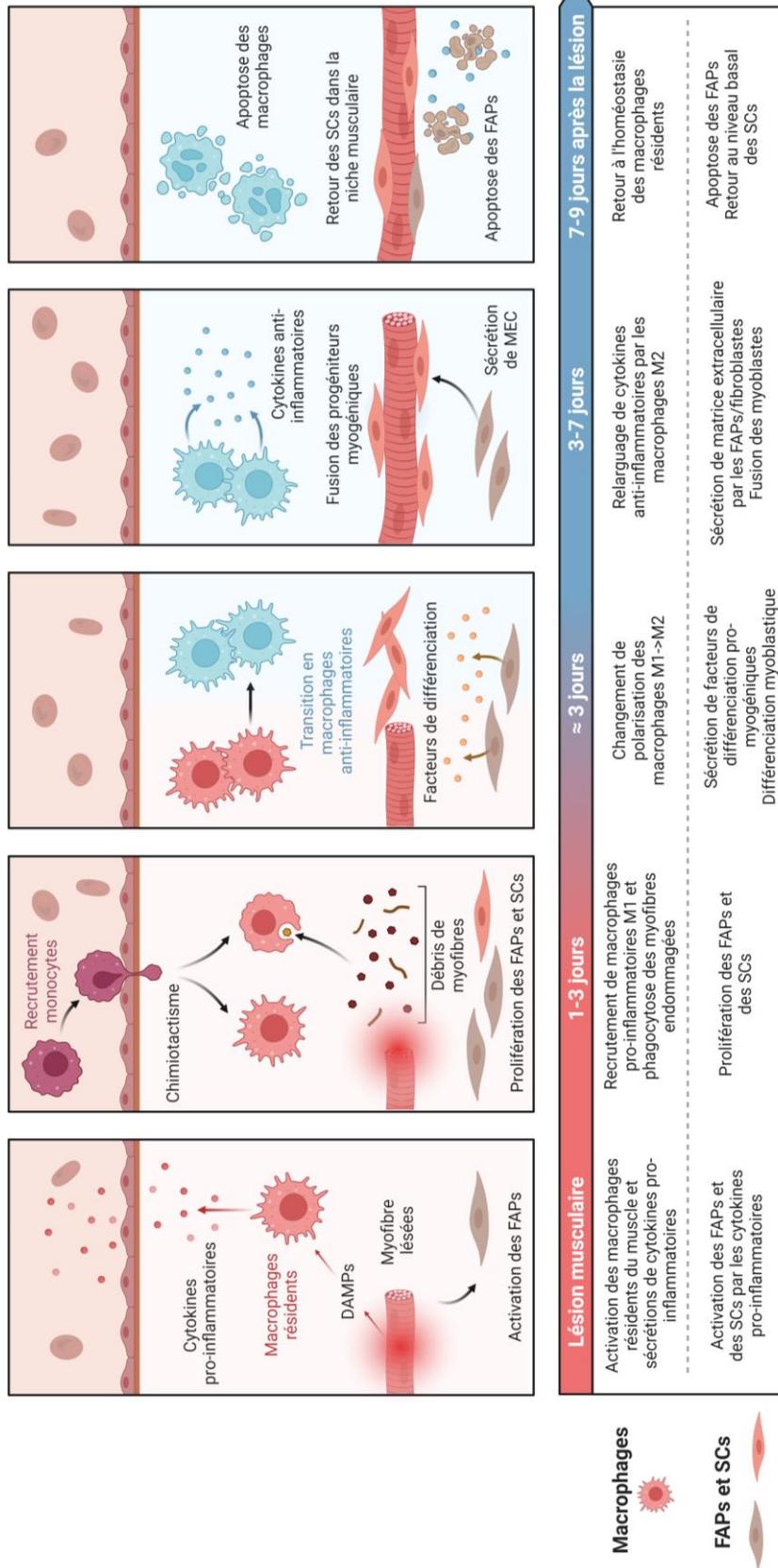


Figure 14 : Rôle de l'inflammation, des progéniteurs fibro-adipogéniques et des cellules satellites dans la régénération musculaire

La déplétion des macrophages pro-inflammatoires entraîne une persistance des débris cellulaires, une augmentation de la fibrose et de formation de tissu adipeux conduisant ultimement à un défaut de la régénération musculaire [130] (**Figure 15**). A l'inverse, la déplétion des macrophages anti-inflammatoires retarde la maturation des myofibres et entraîne l'émergence de myofibres calcifiées [131]. Ces propriétés intrinsèquement liées à la polarisation des macrophages montrent l'importance de la cinétique d'intervention des acteurs inflammatoires dans la régénération musculaire.

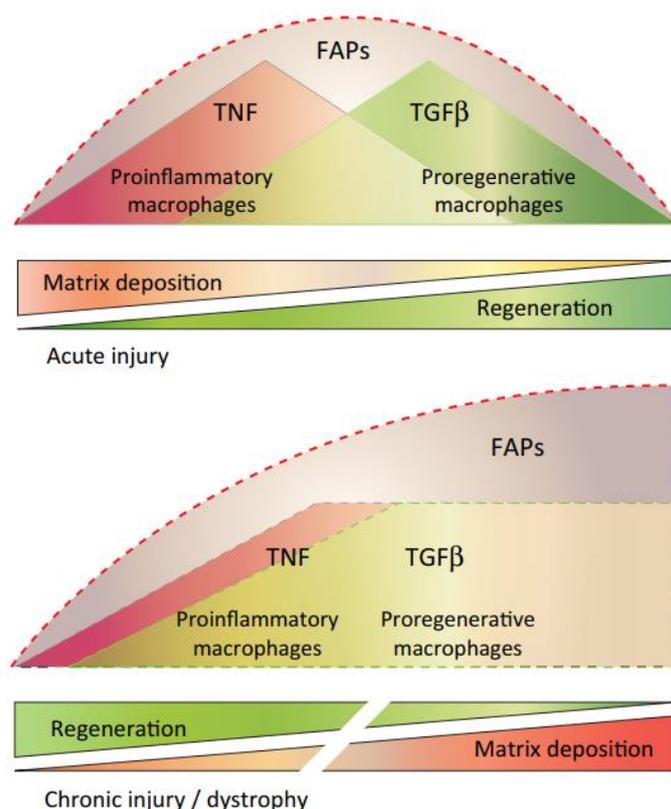


Figure 15 : La perturbation de la réponse inflammatoire médiée par les macrophages induit l'échec de la régénération musculaire au travers des FAPs

Figure extraite de Muñoz-Cánoves et al. [132].

3.5.2 Rôle de l'inflammation dans la régénération osseuse

L'inflammation joue aussi un rôle prépondérant dans le contrôle de l'initiation et du déroulement de la régénération osseuse, grâce à des médiateurs cellulaires et moléculaires communs entre le système immunitaire et les acteurs ostéogéniques (**Figure 16**). Cette communication passe par le recrutement de macrophages sur le site de fracture et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires permettant la prolifération des progéniteurs mésenchymateux, endothéliaux ainsi

que la mise en place d'un tissu de granulation et d'une angiogenèse précoce du cal néoformé [125]. Les macrophages sont aussi directement impliqués dans la différenciation ostéogénique des progéniteurs mésenchymateux, notamment via la sécrétion de facteurs pro-ostéogéniques tels que BMP-2 [133]. En outre, l'OSM, l'IL-10 et l'IL-17 sécrétées par les macrophages favorisent la régénération osseuse [134]. Lors du processus régénératif, la polarisation M1/M2 des macrophages est impliquée dans la différenciation ostéogénique des CSM, la polarisation M2 promouvant de surcroît la prolifération des progéniteurs mésenchymateux [135]. Parallèlement, la polarisation M2 semble particulièrement impliquée dans la vascularisation du cal ainsi que la diminution des dépôts fibreux au profit d'une meilleure formation de tissu osseux [136]. Niu *et al.* ont décrit trois rôles définis dans le temps des macrophages impliqués dans la régénération osseuse : les « nettoyeurs » lors de leur activité phagocytaire, les « médiateurs » dictant les signaux de migration cellulaire, de vascularisation et de remodelage matricielle, et les « instructeurs » induisant la différenciation ostéogénique des progéniteurs mésenchymateux (**Figure 16**) [137]. La perturbation de la dynamique ou de la balance entre macrophages pro/anti inflammatoires est susceptible d'entraîner des défauts dans les processus de régénération osseuse [138]. Il n'est donc pas anodin de retrouver l'inflammation comme élément central de la genèse des POA.

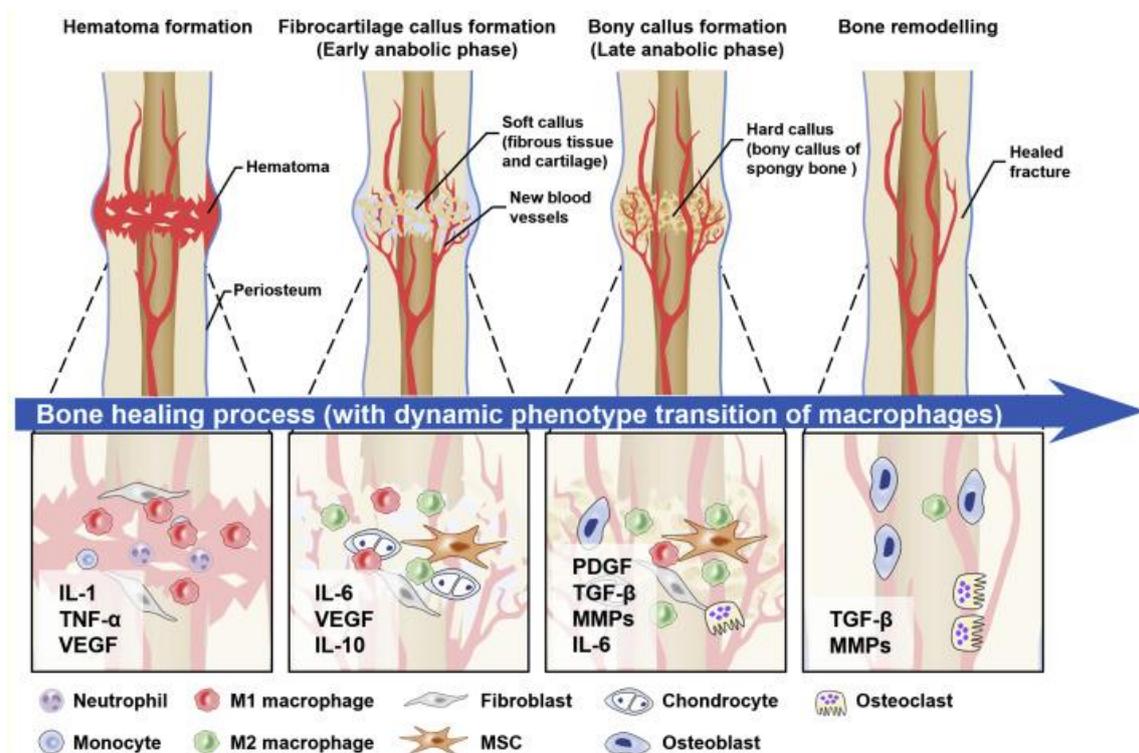


Figure 16 : Rôle de l'inflammation et des macrophages dans la régénération osseuse

Figure extraite de Niu *et al.* [137].

3.5.3 Rôle dans les POA

Genêt *et al.* ont démontré l'importance des macrophages et de l'inflammation dans le premier modèle murin de POAN, combinant SCI et lésion musculaire [32,139]. La déplétion de cette population à l'aide de liposomes chargés de clodronate disodique divisait par 10 la taille des POAN et prévenait totalement leur apparition dans certains cas. Il est intéressant de noter que les auteurs ont discriminé un effet lié à la perte de l'innervation, puisqu'une injection de CDTX dans un muscle innervé en sus-lésionnel permettait aussi l'apparition d'ossifications ectopiques, suggérant un mécanisme systémique. De plus, le plasma des souris développant des POAN était aussi capable d'induire la minéralisation *in vitro* de FAPs, confortant ainsi cette hypothèse [32]. Par ailleurs le nombre de monocytes pro-inflammatoires recrutés sur les sites lésionnels est plus important chez les animaux développant des POAN [140]. Enfin, le rôle des macrophages dérivés des monocytes dans la différenciation chondrocytaire aberrante des progéniteurs mésenchymateux a été confirmé par Sorkin *et al.*, ce groupe avançant un rôle prépondérant des macrophages M2 exprimant le TGF- β par rapport aux macrophages pro-inflammatoires (**Figure 17**) [141].

3.5.4 Cytokines impliquées dans le développement des POA

L'oncostatine M (OSM) et l'interleukine-1 β stimulent la différenciation ostéogénique des FAPs *in vitro* (**Figure 17**). Le blocage de ces cytokines et/ou la délétion de leur récepteur ont révélé leur implication dans le développement des POAN. L'inhibition de leur signalisation permettait en effet de réduire le volume des ossifications dans le modèle murin de POAN [15,16]. *A contrario* le TNF- α limite le volume des ossifications, potentiellement par sa capacité à induire l'apoptose des FAPs lors de la régénération musculaire [16]. Des concentrations sériques élevées en IL-6, IL-10, et CCL2/MCP-1 sont aussi associées au développement de POA, bien qu'il reste à démontrer, via des études fonctionnelles, leur implication dans la pathogenèse (**Figure 16**) [142]. Par ailleurs, de nombreuses études ont montré le potentiel rôle du TGF- β dans l'induction de la pathologie, notamment par son rôle dans la différenciation chondrogénique, la délétion ou le blocage de la protéine prévenant la formation et le développement des POA chez l'animal [21,143].

3.5.5 Polarisation pro-inflammatoire M1-like dans les POA

Calqué sur le modèle de la polarisation lymphocytaire Th1/Th2, la classification des macrophages M1 classiquement activés et M2 alternativement

activés est caricaturale et ne rend pas compte de la plasticité de ces populations cellulaires et de la complexité des phénotypes retrouvés *in vivo*. Cette classification a tout de même pour avantage de conceptualiser simplement et rapidement les rôles remplis par ces acteurs majeurs de l'inflammation [144,145]. Caractérisés par une forte expression de Ly6C à leur surface, les macrophages M1 se polarisent au contact de cytokines pro-inflammatoires de type 1 telles que l'interféron- γ (INF- γ), le TNF- α ou encore les lipopolysaccharides (LPS) présents à la surface des bactéries. Il existe une grande hétérogénéité des profils de macrophages impliqués dans les processus inflammatoires ainsi que le développement des POA [141]. Dube *et al.* ont montré que les macrophages M1 étaient capables de sécréter du BMP-2, tandis que Kan *et al.* ont relevé l'implication de la substance P (SP) dans le développement des ossifications ectopiques au travers de la signalisation BMP, suggérant ainsi le potentiel rôle de la polarisation M1 dans le développement des POA (**Figure 17**) [146,147]. Enfin, il est intéressant de noter que selon les définitions de Niu *et al.*, les cytokines sécrétées par les macrophages M1 correspondent aux cytokines ostéoinductrices du rôle « instructeur » de la régénération osseuse, suggérant le fort potentiel de cette polarisation dans le développement et la progression ostéogénique des POA (**Figure 16**) [137].

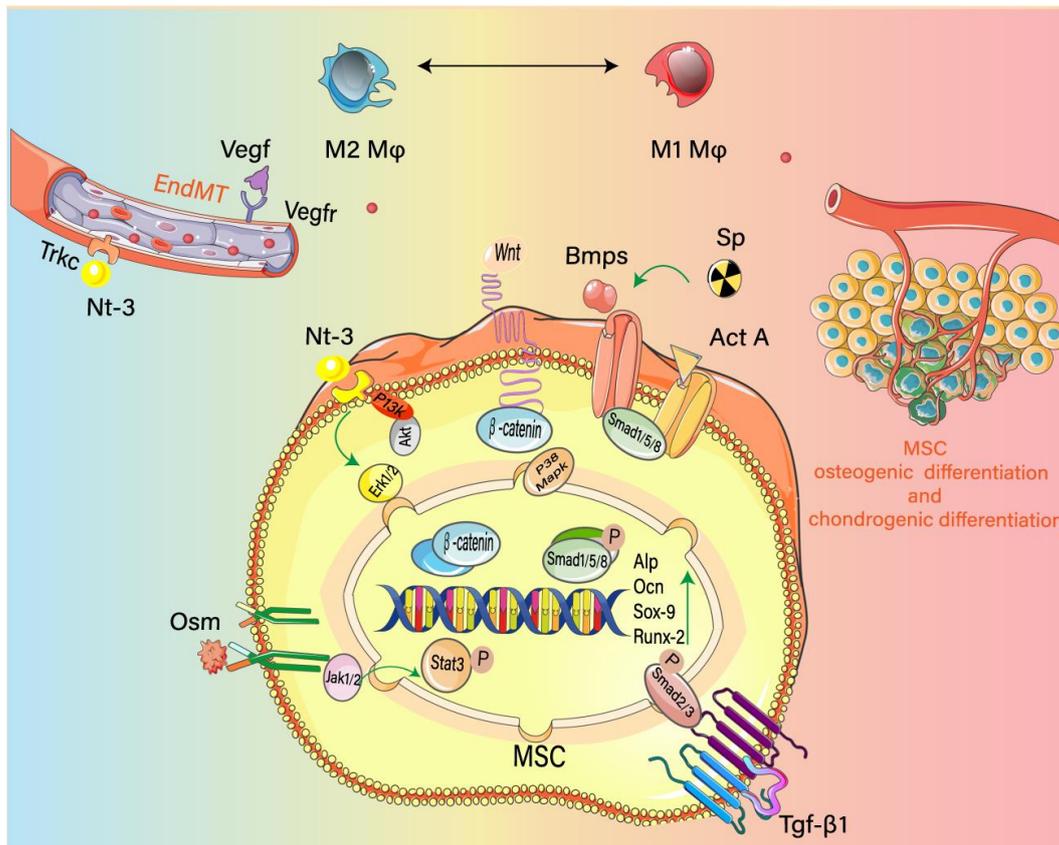


Figure 17 : Rôle des polarisations M1 et M2 des macrophages sur les progéniteurs mésenchymateux dans le développement des POA

Les macrophages activés sécrètent de l'OSM, du TGF- β , des BMPs, de la SP et du VEGF- α . Ces molécules vont induire différentes cascades de signalisations, y compris SMAD2/3 par le TGF- β et SMAD1/5/8 par les BMPs, induisant conjointement une différenciation ostéo-chondrogénique des CSM, l'angiogenèse ainsi que la formation d'un microenvironnement musculaire favorable au développement des POA.

Figure extraite de Huang et al. [143].

3.5.6 Polarisation anti-inflammatoire M2-like dans les POA

Physiologiquement, l'activation M2 des macrophages, s'effectue sous la pression de cytokines de type 2 telles que l'IL-4, IL-13, IL-10, IL-21 et est caractérisée par une faible expression de Ly6C à leur surface [148]. Initialement connus pour leurs propriétés anti-inflammatoires, ils permettent la régulation et la diminution de l'activité oxydative et cytotoxique des macrophages M1 et neutrophiles nécessaires à la régénération musculaire [149]. Ils sont impliqués dans

de multiples processus biologiques tels que l'angiogenèse ou la régénération tissulaire, via la sécrétion de facteur de croissance vasculaire- α (VEGF- α) ou de TGF- β (**Figure 16**) [150]. Toutefois, une suractivation ou une activation chronique de cette population peut conduire à des dérives pathologiques comme des fibroses ou des POA [151]. La neutralisation de la signalisation du TGF- β permet ainsi de réduire le volume des POA ainsi que l'angiogenèse. Par ailleurs, la suractivation de la signalisation du TGF- β est notamment retrouvée chez l'Homme, suggérant l'implication de cette sous-population M2 dans le développement des POA (**Figure 17**) [152].

Cette population, qui a été décrite pour son rôle dans la régénération osseuse, présente les mêmes caractéristiques phénotypiques que les macrophages présents lors du développement de POA dans un modèle BMP-2 exogène [153]. Dans un modèle murin de POA traumatique, Sorkin *et al.* ont mis en évidence la colocalisation de macrophages M2 et de progéniteurs mésenchymateux PDGFR α + associés au développement des POA ainsi que l'implication de la signalisation du TGF- β [141]. La délétion exclusive de macrophages M2 exprimant TGF- β permettait paradoxalement de réduire la réponse inflammatoire des monocytes infiltrants au niveau du site lésionnel. Les souris déficientes en macrophages M2 développaient des ossifications ectopiques d'un volume moindre. Enfin, une administration systémique d'un peptide d'activation du CD47, prévenant la polarisation M2 des macrophages via l'inhibition de la signalisation du TGF- β , inhibait la différenciation chondrogénique des progéniteurs mésenchymateux et réduisait le volume des ossifications néoformées (**Figure 17**) [141]. Les points de contrôles immunitaires (PCI) sont des récepteurs présents à la surface des cellules immunitaires et gérant les transitions entre les étapes clés de la réponse immunitaire par le biais de rétrocontrôles positifs et négatifs [154]. Kan *et al.* ont montré qu'une modulation dans les PCI des macrophages permettait d'influer sur l'apparition et la taille des POA dans un modèle transgénique associé à une lésion musculaire de la pathologie. La neutralisation des PCI inhibiteurs permettait de réduire la génération d'ossifications ectopiques en entraînant l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires et un blocage de la polarisation M2 des macrophages. A l'inverse, la neutralisation des PCI stimulants induisait une aggravation du volume des POA [155].

La dichotomie entre le rôle des macrophages pro-inflammatoire M1 et anti-inflammatoire M2 dans la pathogenèse des POA n'est donc pas encore bien définie, ces deux acteurs, malgré leur rôle théoriquement opposé, bien que collaboratif, étant en effet tout deux capables d'induire l'apparition de la pathologie.

3.5.7 Cas des neutrophiles et lymphocytes

La délétion des lymphocytes ne modifie pas l'apparition ou la taille des POAN [156]. Toutefois, dans un modèle transgénique de POA, la délétion de ces acteurs permet la réduction du volume des ossifications développées, bien que n'altérant pas leur fréquence d'apparition [6,157]. Ces différences soulignent une fois encore l'hétérogénéité des acteurs et des réponses impliquées dans la pathogenèse en fonction de l'étiologie et du modèle utilisé. Un rôle des neutrophiles a également été écarté, malgré leurs capacités à sécréter des cytokines pro-inflammatoires typiques du développement ostéochondral des POA telle que l'OSM [158].

3.6 Les cellules endothéliales

3.6.1 Rôle physiologique

Les cellules endothéliales (ECs) forment la paroi interne des vaisseaux sanguins et constituent une barrière entre le sang et les tissus environnants. Par leurs propriétés de perméabilité sélective, elles permettent la régulation de processus inflammatoires complexes. Les ECs sont des acteurs majeurs de l'angiogenèse et les lésions ou les dysfonctionnements des ECs sont une caractéristique de nombreuses pathologies minéralisantes, comme par exemple les calcifications vasculaires [159]. Ces cellules représentent une barrière perméable doublée d'un organe paracrine et endocrine multifonction. Celui-ci est en effet impliqué dans la réponse immunitaire, les processus d'hémostase, de coagulation ainsi que la régulation de la croissance et de la production d'éléments de la MEC [160].

3.6.2 Rôle dans les POA

Lounev *et al.* avaient originellement identifiés les ECs comme potentiellement impliquées dans la genèse des POA en se basant sur des expériences de traçage de lignée Tie2⁺ [94]. Dans un modèle murin d'implantation ectopique de matrigel imprégné de BMP-2, ceux-ci avaient démontré l'absence de participation des progéniteurs myogéniques au profit de l'implication des ECs aux stades fibroprolifératifs, chondrogéniques et ostéogéniques de la pathologie. Cependant, Wosczyzna *et al.* ont depuis démontré l'existence d'une population Tie2⁺ d'origine non endothéliale résidant dans l'interstitium musculaire, possédant une

importante activité ostéogénique et partageant les marqueurs caractéristiques des FAPs [95,99]. Ces résultats furent confirmés par l'absence de contribution aux POA des populations CD31⁺ et VE-Cadhérine⁺, deux marqueurs des populations endothéliales [95]. Enfin leur implication n'a pas été étudiée dans les modèles de POAN.

3.7 Autres populations du muscle et du tendon

3.7.1 Les cellules souches dérivées du tendon (CSDT)

Les CSDT, qu'il convient de différencier des ténocytes (qui sont des fibroblastes en différenciation terminale logés entre les fibres collagéniques du tendon) représentent 95% de sa densité cellulaire et disposent de capacités de différenciation ostéo-chondro-tendino-adipogéniques [161]. Les CSDT sont mises en cause dans le développement des POA, tout particulièrement lors de la phase précoce chondrogénique. Plusieurs études dont une dans un modèle d'ossification traumatique du tendon ont montré leur participation dans 40% du cartilage final et 25% du tissu osseux néoformé [162]. Bien qu'il soit admis que ces cellules ne soient pas entièrement responsables des processus d'ossification des POA, leur implication à ce jour n'a pas été contredite. Toutefois, il est important de noter que la présence de cette population au sein du muscle est encore débattue [161].

3.7.2 Les péricytes

Les péricytes sont une population hétérogène de cellules mésenchymateuses murales définie par leur localisation anatomique à la périphérie des vaisseaux sanguins, enchâssées dans la membrane basale. Bien que NG2 soit fréquemment utilisé pour caractériser cette population, aucun marqueur spécifique n'a à ce jour été découvert, complexifiant leur étude [66]. Ils sont impliqués dans de nombreux processus pathologiques et leur implication dans les POA a été suggérée à deux reprises dans des modèles d'ossification ectopique induit par la surexpression de BMPs [163,164]. Cependant du fait que les études de traçage de lignée évoquées précédemment ne se limitaient pas exclusivement aux péricytes, couplé à des publications excluant les péricytes de la formation de POA ainsi qu'à la co-expression de marqueurs confondants entre les péricytes et les FAPs, ne permettent pas de conclure sur la participation de ces cellules à la pathogenèse [66,163].

3.8 L'impact des lésions neurologiques

Un traumatisme sévère du SNC peut entraîner une dérégulation endocrinienne ainsi qu'une modification de l'environnement cellulaire et moléculaire du muscle. Madaro *et al.* ont par exemple démontré qu'une lésion neurologique, aussi bien périphérique (dénervation) que centrale (lésion médullaire), induisait au sein du muscle la production d'IL-6, l'activation de la signalisation STAT3, la prolifération anormale des FAPs et l'atrophie musculaire [165]. Par ailleurs, les lésions du SNC dérégulent le système neuroendocrinien, provoquant la libération systémique anormale de médiateurs pouvant déclencher le développement des POAN tels que la substance P (SP) ou le TGF- β [32].

3.8.1 Effets systémiques d'une lésion médullaire

La lésion médullaire induit des changements systémiques se répercutant par un bouleversement des cascades de signalisations locales. Il est intéressant de noter que chez les patients victimes d'une lésion médullaire, les POAN n'apparaissent pas exclusivement en zone sous-lésionnelle paraplégique, tandis que l'immobilisation et la perte de contraintes mécaniques des patients neurolésés sont traditionnellement associées à une perte de masse osseuse [166].

A l'échelle cellulaire, nous avons observé dans notre modèle murin de POAN la persistance pathologique des FAPs au sein du muscle lésé. Ce phénomène est lié à un défaut d'apoptose 3 jours après la lésion musculaire et médullaire couplé à une prolifération post lésionnelle plus tardive, rompant avec la dynamique cellulaire de la régénération musculaire [96]. Ainsi, nous avons suggéré que ce mécanisme soit régulé par la surexpression du récepteur membranaire PDGFR α des FAPs contrôlant leur prolifération.

En parallèle, nous avons aussi décrit une potentialisation de la réponse inflammatoire, caractérisée par un recrutement plus important de monocytes et macrophages Ly6C⁺ pro-inflammatoires ainsi que le maintien de l'expression et l'accumulation d'OSM [15,140]. Ces résultats concordent avec l'augmentation de la réponse inflammatoire systémique observée chez les patients victimes d'une lésion médullaire [167,168]. De plus, il a été observé qu'une lésion du SNC induisait une augmentation de la concentration plasmatique de substance P tandis que son inhibition réduisait le volume des POAN [32,169]. Debaud *et al.* ont observé des niveaux élevés en substance P une heure après l'induction du modèle et le relargage d'adrénaline à l'échelle systémique à 24h [170]. Ainsi, l'utilisation d'inhibiteurs des catécholamines permettait de réduire le volume des POAN

développés, confirmant le lien étroit entre inflammation et lésion médullaire. Enfin, le relargage de DAMPs a été décrit lors de lésions du SNC comme un promoteur de l'expression des cytokines inflammatoires et BMPs par les macrophages, lui suggérant un rôle délétère dans les processus de neuro-inflammation (**Figure 18**) [171].

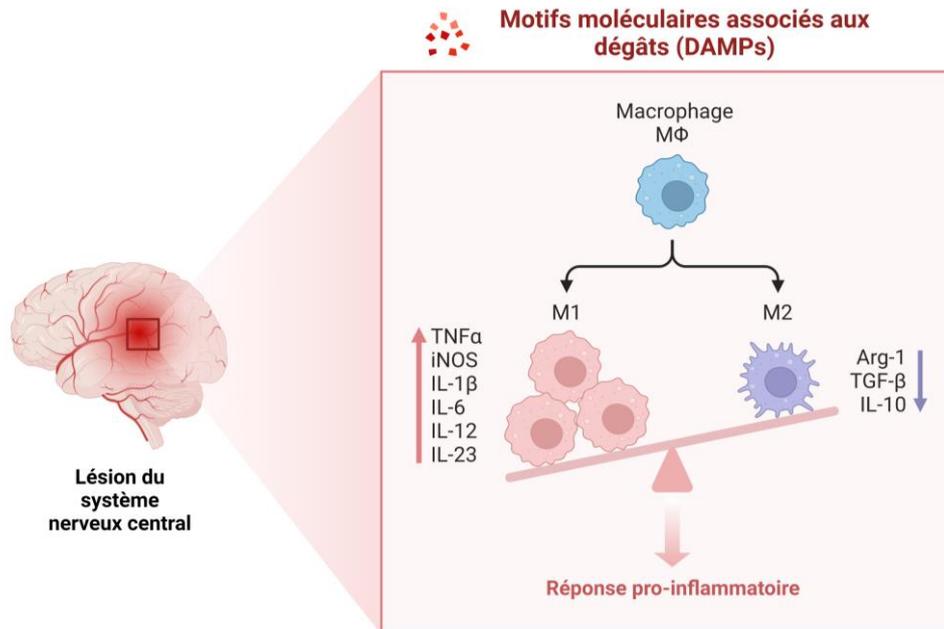


Figure 18 : La lésion du système nerveux central perturbe la balance cytokinique et exacerbe la réponse inflammatoire

L'atteinte lésionnelle du SNC induit le relargage de DAMPs altérant le microenvironnement local et activant les macrophages de façon exacerbée.

3.8.2 Effets systémiques d'un traumatisme crânien

Les traumatismes crâniens induisent aussi un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS) [172]. Il a été décrit chez les patients TC un meilleur potentiel de réparation d'une fracture, suggérant l'existence d'un mécanisme ostéogénique neuro-sensible [173]. Cependant, en absence de fracture, les TC induisent une perte de volume osseux, soulignant la nécessité du traumatisme tissulaire au potentiel ostéoinducteur des TC [174]. Par ailleurs, le liquide céphalo-rachidien de patients présentant un TC sévère présente des propriétés ostéoinductives sur une lignée d'ostéoblastes humains, sans pour autant contenir des concentrations en BMP-2 et -7 plus élevées [12]. En outre, les dysfonctionnements hypophysaires induits par les TC sont capables d'altérer le relargage d'hormone de croissance impliquée dans des processus ostéogéniques

physiologiques et potentiellement impliquée dans le développement des POA [175]. Enfin, des pistes concernant cette communication os-cerveau ont récemment été décrites au travers de micro-ARNs [176]. Xia *et al.* ont montré que le potentiel ostéoinducteur induit par les TC lors d'une fracture relevait de deux micro-ARNs issus de l'hippocampe endommagé, sécrétés dans le plasma dans des vésicules extracellulaires et adressés au tissu [176]. Cette étude révèle le mécanisme d'action de cette communication longue distance entre le SNC et le squelette et met en exergue la complexité des acteurs moléculaires impliqués lors d'une lésion neurologique.

La faible compréhension des mécanismes ostéogéniques induits par les TC, et plus globalement les lésions du SNC, restreignent actuellement la capacité à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour développer les prophylaxies et traitements efficaces dans le cadre des POAN. Pris de façon globale, ces résultats convergent vers l'existence d'un processus neuro-inflammatoire commun impliqué dans la pathogénèse des POAN à la suite d'une lésion médullaire ou d'un traumatisme crânien qu'il reste à élucider.

3.9 Facteurs additionnels

3.9.1 Protéines de morphogénèse osseuse (BMPs)

BMP-2, BMP-4 et BMP-7 ont été étudiés dans la pathogénèse des POA [21,177]. Il a été établi qu'ils participent au développement des POA en favorisant la prolifération et la différenciation ostéo-chondrogénique des progéniteurs mésenchymateux. La transduction du signal est réalisée par la phosphorylation des protéines effectrices SMAD 1, 5 et 8, tandis que SMAD 2 et 3 assurent la transduction du signal du TGF- β (**Figure 19**) [178,179]. Peterson *et al.* ont démontré que la modulation de la phosphorylation de SMAD1/5/8, par le biais d'inhibiteurs ciblant l'activité tyrosine-kinase du récepteur aux BMPs, atténue la formation des POA, tandis que Agarwal *et al.* ont montré qu'une stratégie de piégeage des BMPs aboutissait à un résultat similaire dans un modèle traumatique de POA [180,181]. Ces études d'inhibitions fonctionnelles des BMPs indiquent que cette signalisation est essentielle au développement des POA d'origine traumatique.

D'autre part, les BMPs sont fortement associés aux macrophages et à l'inflammation. Plusieurs études ont montré que les macrophages augmentaient

l'expression des BMPs par les progéniteurs mésenchymateux et pouvaient eux-mêmes en sécréter [146,157,182]. Par ailleurs, il est intéressant de noter que les BMPs sont impliqués dans la polarisation des macrophages et affectent donc directement les stades de la réponse inflammatoire, soulignant une nouvelle fois l'intrication entre les composantes inflammatoires et ostéogéniques [183].

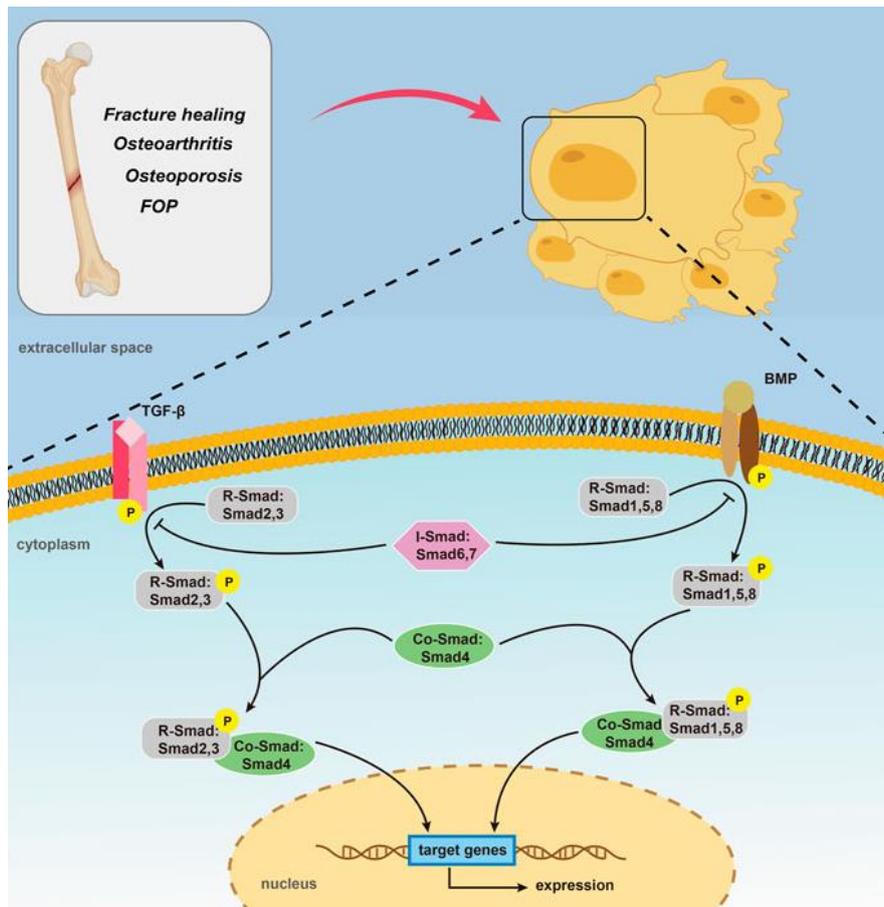


Figure 19 : Cascade d'activation du TGF-β et des BMPs et transduction du signal par les SMAD des progéniteurs ostéogéniques

Figure extraite de Zou et al. [184].

3.9.2 Hypoxie et hypervascularisation

L'hypoxie est une condition étroitement associée au dommage tissulaire et à l'inflammation [185]. Plusieurs études ont montré que l'hypoxie est un facteur contribuant au développement des POA génétique ou acquise [121,186]. Celle-ci est impliquée dans le développement osseux. Provot *et al.* ont montré que l'agrégation des CSM induisait une hypoxie locale et l'expression du facteur de transcription chondrogénique SOX9 [187]. L'hypoxie amplifie la réponse inflammatoire, augmentant notamment la sécrétion d'IL-1 β et de TNF- α [188,189]. Agarwal *et al.* ont démontré un lien entre l'inflammation et l'hypoxie dans trois modèles murins de POA différents [121].

Par ailleurs, l'angiogenèse est un évènement nécessaire à la formation de tissu osseux, assurant l'apport en oxygène requis à la différenciation ostéogénique et au dépôt de matrice calcique minéralisée sur le substrat cartilagineux [190]. La relation hypoxie/angiogenèse a été étudiée dans des pathologies inflammatoires telles que l'ostéoarthrite, dans laquelle les facteurs inflammatoires induits par l'hypoxie tissulaire promeuvent une hypervascularisation du cartilage et *in fine* la formation d'ostéophytes [191]. Par analogie, dans le développement des POA, Hwang *et al.* ont observé une expression aberrante du VEGF- α par les FAPs, tandis que l'augmentation du signal en échographie doppler retrouvée chez les patients développant des POA est caractéristique d'un tissu hypervascularisé [192,193]. Ce soutien trophique de l'angiogenèse au développement des POA conduit à la néoformation et à la maturation d'un os hématogène [20]. En outre, l'inhibition des processus angiogéniques réduit les volumes de POA dans des modèles par BMP exogène et traumatique, soulignant le rôle prépondérant de ce mécanisme dans la pathogenèse des POA [192,194].

L'ensemble de ces études confirment le rôle de l'inflammation, et plus particulièrement des macrophages, dans le développement d'un environnement hypoxique puis angiogénique via la stabilisation d'HIF-1 α , entraînant une cascade de signalisation pro-angiogénique et pro-ostéogénique caractéristique du développement des POA.

3.9.3 Mécanotransduction

La spasticité musculaire induite par la lésion médullaire pourrait aussi contribuer au développement des POA chez l'Homme [195]. Elle entraîne une augmentation de la raideur musculaire liée à une hyperactivité des myofibres et

pourrait induire un profond changement des cascades de signalisations mécano-sensibles. L'impact de la rigidité du support dans la différenciation ostéo-chondrogénique des CSM a été démontrée dans de nombreuses études [196,197]. En étudiant des supports de culture de rigidité croissante, Frith *et al.* ont montré que la signalisation mTOR était réduite et induisait en aval des signaux et l'expression de micro-ARN mécano-dépendants facilitant la différenciation ostéogénique des CSM [196]. De plus, des CSM cultivées *in vitro* sur substrat rigide surexprimaient l'intégrine α -5 (ITGA5) et les marqueurs ostéogéniques ostéocalcine et RUNX2 [197]. L'activation aberrante des cascades de mécano-transduction dans le développement des POA a aussi été rapportée dans un modèle murin de FOP [198]. Par ailleurs, du point de vue clinique, un retard dans la prise en charge et la mobilisation du patient neurolésé est corrélé à une occurrence accrue des POAN, soulignant l'importance de la gestion du stress mécanique dans un organe physiologiquement asservi à la mobilité de l'organisme [54]. Enfin, Salga *et al.* ont observé que le blocage de la jonction neuromusculaire (NMJ) par injection de toxine botulique augmentait le volume des POAN, suggérant un effet inducteur de la NMJ dans le développement des POAN [199].

Nous avons vu au fil de cette introduction, que le développement des POA est d'origine multifactorielle. Celle-ci implique des acteurs cellulaires tels que les FAPs et les macrophages intervenant dans la genèse de processus chondrogéniques, ostéogéniques mais aussi myogéniques, angiogéniques et leurs cascades de signalisation associées. De cette complexité découle la difficulté à isoler les effecteurs spécifiques de la pathologie, celle-ci impliquant de nombreux mécanismes semblables à la chondrogenèse ou l'ostéogenèse physiologique aux stades précoces de la pathologie.

4 Les micro-ARN

Découverts en 1993 par Lee *et al.*, les micro-ARNs (miARN) sont de courts ARN non codants d'une vingtaine de nucléotides [200]. Ce sont des régulateurs post-transcriptionnels de l'expression des gènes, qui induisent la dégradation ou le blocage traductionnel de leur ARN messager (ARNm) cible [201]. Les miARN sont pléiotropes et redondants : chaque miARN interagit avec des centaines de cibles du transcriptome cellulaire et chaque transcrit est la cible potentielle de dizaines de miARN. Cette architecture de fonctionnement complexe par redondance implique donc des difficultés, pour un seul miARN, à moduler le phénotype d'une cellule ou d'un organisme [202]. On dénombre entre 2000 et 3000 miARN chez l'Homme. Ils sont très conservés au fil de l'évolution, représentent 1 à 2% du transcriptome et ciblent probablement la totalité de celui-ci [203,204]. L'expression d'un miARN peut être spécifique d'un type cellulaire ou ubiquitaire.

4.1 Biogenèse des micro-ARN

Il existe plusieurs voies de biogenèse par lesquelles les miARN vont être transcrits et vont maturer au travers de la voie canonique, prédominante ou d'une multitude d'autres voies impliquant différentes combinaisons d'acteurs moléculaires.

4.1.1 Voie canonique

Dans la cascade canonique, les miARN sont transcrits depuis une séquence intronique, intergénique ou polycistronique de l'ADN sous la forme de longs ARN « pri-miARN » comportant de nombreuses structures tiges-boucles (**Figure 20**) [205,206]. Ceux-ci vont être clivés une première fois à la base de ces structures tige-boucles dans le noyau de la cellule par un complexe enzymatique constitué de DROSHA et DGCR8, devenant des « pré-miARN » d'une longueur d'environ 70 nucléotides. Ces nouvelles structures sont ensuite exportées dans le cytoplasme et à nouveau élaguées par un complexe composé de DICER et TRPB. En résulte un ARN double brin, un duplex de miARN, d'une vingtaine de nucléotides environ (**Figure 20**) [205,206].

4.1.2 Voies non-canoniques

Les voies non-canoniques induisent la production des duplexes de miARN similaires à ceux vu précédemment, via d'autres acteurs impliqués dans la transcription et la maturation de ceux-ci. Brièvement, ils se catégorisent en deux grandes voies principales : l'une indépendante de DROSHA, l'autre de DICER [206]. La voie indépendante de DROSHA effectue sa maturation en miARN précurseur via le splicéosome, servant traditionnellement à la suppression des introns et à l'épissage des exons, tandis que la voie indépendante de DICER produit des pré-miARN trop courts pour cette enzyme et nécessitent l'intervention d'AGO2 pour exercer leur potentiel de répression post-transcriptionnelle [206]. La redondance de ces voies de biogenèse permet d'assurer une réduction minimale de l'expression des miARN en cas de perturbation de l'une d'entre elle. Une déplétion de 90% de l'enzyme DICER n'entraîne par exemple que 40% de réduction d'expression des miARN [207]. Par ailleurs, certains miARN proviennent aussi de la dégradation et du clivage de longs ARN non codants.

4.1.3 Mécanisme d'action

Les miARN agissent en régulant l'expression génique entre la transcription et la traduction des gènes. Le miARN va s'assembler à la protéine Argonaute, être dénaturé en deux miARN simple brin et perdre le brin « passager » pour ne garder que le brin « guide » dans le complexe [205]. Celui-ci va ensuite induire la dégradation par des endonucléases ou inhiber la traduction par encombrement stérique de leurs transcrits cibles avec lesquels ils s'associent (**Figure 20**) [206,208]. Ce complexe est qualifié de miRISC pour « miRNA induced silencing complex », et va s'hybrider, via une région « seed » de 6 à 8 nucléotides du brin « guide », de façon complémentaire avec ses ARNm cibles, principalement dans la région 3'UTR de ces derniers. La sélection du brin guide dépend de nombreux paramètres dont sa stabilité thermodynamique, et peut être différente pour un même miARN en fonction de l'environnement et du type cellulaire [205,206].

Les deux miARN simple brin issus du duplex sont appelés 5' et 3' en fonction de leur position sur le transcrit pri-miARN initial. Le processus d'inhibition post-transcriptionnel, est dépendant de la complémentarité avec l'ARNm cible. Une plus grande complémentarité induit une dégradation par les endonucléases et une faible complémentarité un blocage de la traduction par encombrement stérique [206,208]. Il est important de noter que l'inhibition terminale des miARN induit traditionnellement une baisse de la quantité de protéine d'environ 50% par rapport

au niveau basal, suggérant l'implication de mécanismes à effets de seuil plutôt qu'une inhibition totale de l'expression de la protéine cible [209,210].

Les miARN agissent au sein de la cellule productrice mais peuvent aussi être exportés, via des vésicules extracellulaires (VEs) ou associés à des complexes protéiques, et avoir un effet paracrine et endocrine sur la modulation de processus extracellulaires [176,211,212]. Cependant, l'importance de cette communication intercellulaire est remise en cause par certaines études montrant qu'une faible partie des VEs contient des miARN, et ce en faible concentration [213,214].

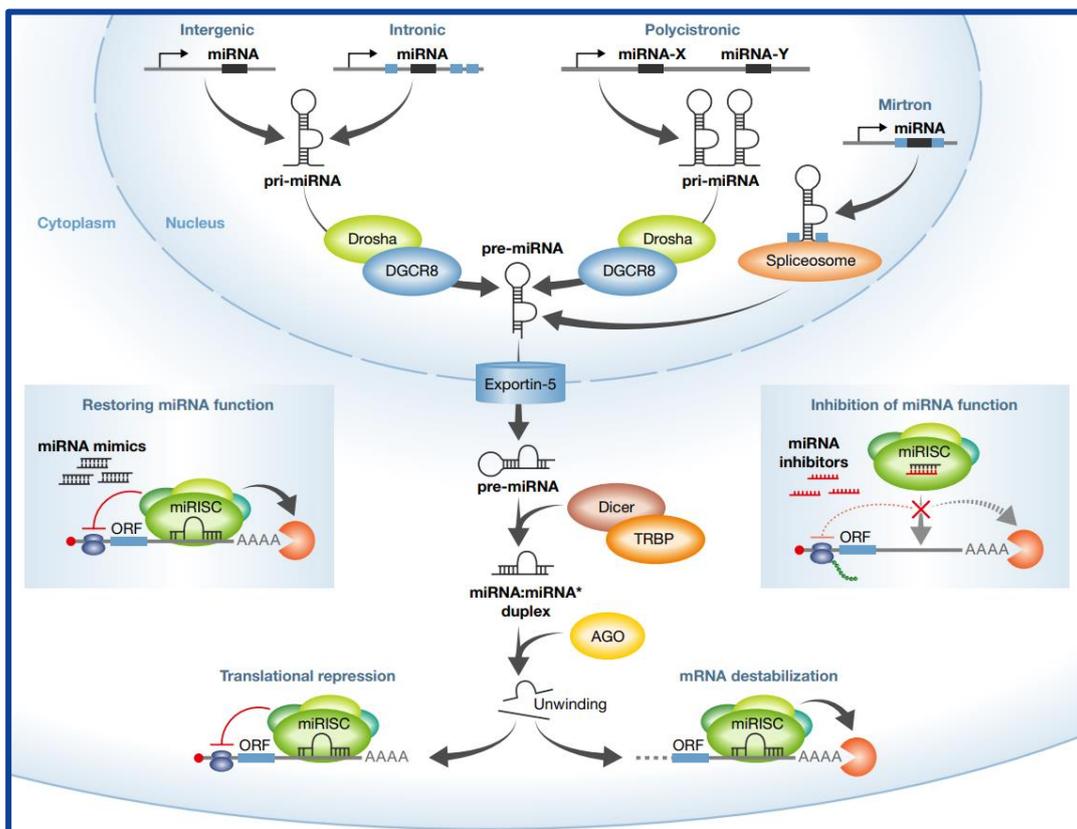


Figure 20 : Biogenèse, activité et modulation des mécanismes d'action des micro-ARNs

Les miARN sont transcrits sous forme d'ARN non codant composés de tige-boucles puis exportés dans le cytoplasme pour y exercer leur activité de suppresseur post-transcriptionnel après avoir subi différents clivages enzymatiques pour atteindre leur forme mature.

Figure extraite de Rooij et al. [205].

4.2 MiARN : à la fois cibles et effecteurs thérapeutiques

L'expression aberrante ou la sous-expression d'un ou plusieurs miARNs peut être à l'origine de diverses pathologies, leur rôle et leur signature ayant été extensivement étudiés dans la pathogenèse des cancers notamment [215]. Dans ces pathologies, certains miARN peuvent agir comme des oncogènes ou promouvoir la résorption de la tumeur. Cependant, un même miARN peut avoir deux rôles différents en fonction de la cellule cible. MiR-222 est par exemple considéré comme un oncogène dans le cancer du foie car inhibant PTEN, tandis qu'il inhibe l'oncogène c-KIT dans les leucémies, avec donc des propriétés anti-oncogéniques [216]. Ces résultats soulignent la complexité de l'étude des miARNs dans un tissu composé de nombreuses populations cellulaires différentes, où chaque miARN peut posséder un effet biologique différent en fonction de la cellule étudiée. L'étude de populations cellulaires isolées permet en partie de palier à ce problème. Le potentiel pléiotrope des miARN à cibler différents gènes d'une même cascade de signalisation, de voies synergiques ou totalement indépendantes, est une des raisons principales de leur potentiel thérapeutique [215]. A l'heure actuelle, deux stratégies ont été développées pour agir sur les dérégulations de miARN, utilisables à la fois *in vitro* et *in vivo*. La première consiste à restaurer la fonction d'un miARN pathologiquement sous-exprimé via l'utilisation d'analogues synthétiques « mimics » tandis que la seconde se base sur l'inhibition d'un miARN surexprimé via des séquences antisens complémentaires « antimiRs » du miARN cible (**Figure 20** et **Figure 21**) [205,215].

Les limites d'une approche thérapeutique basée sur les miARN reposent sur les progrès qu'il reste à réaliser concernant la méthode de délivrance pour maximiser leurs effets tout en réduisant leur toxicité [215,217]. Les paramètres de stabilité dans l'organisme sont des éléments bien maîtrisés grâce au développement de procédés de stabilisation et modifications chimiques tels que des squelettes LNA ou phosphorothioates. Bien que différents vecteurs d'administration viraux, liposomes ou polymères, aient été développés, les méthodes d'adressage à un tissu spécifique sont toujours en cours d'élaboration [215]. En outre, la dose administrée est un paramètre essentiel à l'apparition du phénotype souhaité lors de l'utilisation de mimics. Khan *et al.* ont décrit une compétition pour le complexe protéique miRISC entre les miARN endogènes et administrés *in vitro*, créant un effet de saturation, et résultant à une perte la régulation génique physiologique et une surexpression des miARN endogènes dans un effet compensatoire [218]. D'un intérêt croissant, le nombre d'essais cliniques, principalement dans le traitement de différents cancers mais aussi de pathologies

infectieuses et cardiovasculaires, ne cesse d'augmenter, bien que la plupart en soient encore au stade I [217,219].

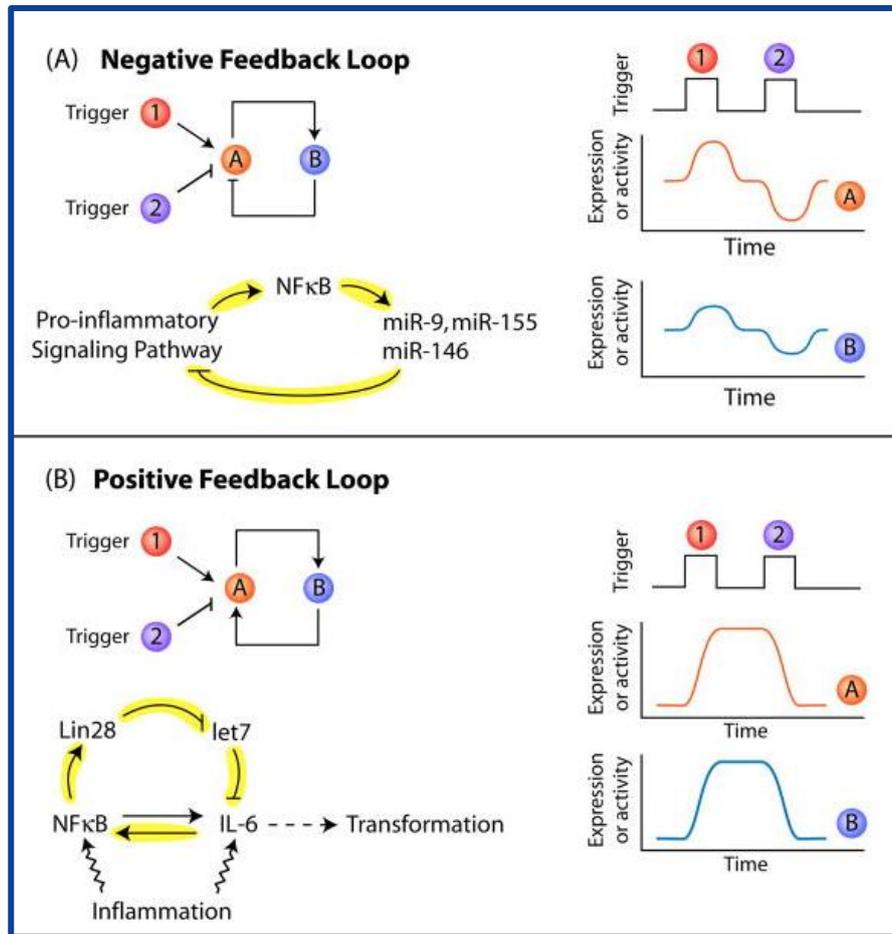


Figure 21 : Stratégies de régulation des voies de signalisation par les miARN

(A) Boucle de rétrocontrôle négative, lorsque le signal déclencheur disparaît, les niveaux d'expression des acteurs retournent à un niveau basal, l'activation n'est donc que transitoire. Ex : La réponse inflammatoire est contrôlée dans le temps par l'inhibition d'NF- κ B via miR-9, miR-155 et miR-146a eux même induit par ce même facteur de transcription [220].

(B) Boucle de rétrocontrôle positive, les niveaux d'expression des acteurs restent élevés tant qu'un signal inhibiteur n'est pas déclenché, de plus les acteurs sont exprimés ou non de façon synchrone. Ex : L'IL-6 sécrétée lors d'un événement inflammatoire induit l'activation de Lin28, un inhibiteur de let-7, lui-même inhibiteur de l'IL-6. Cette boucle de rétrocontrôle induit la production prolongée d'IL-6 comme démontré par Iliopoulos et al. [221].

Figure adaptée de Leung et al. [222].

4.3 MiARN dans l'environnement musculaire

4.3.1 Les miARN musculaires ou myomiR

Plusieurs études ont isolé des miARN spécifiquement exprimés dans le muscle (myomiR), et ont suggéré leur rôle dans la régulation de la dynamique, plasticité musculaire, prise de masse et type de fibre musculaire exprimée [223,224]. Ces myomiR sont exprimés dans les muscles squelettiques striés et cardiaques, certains ayant une spécificité d'expression dans les fibres musculaires lentes ou rapides [225–227]. Ils participent à la régulation de l'activation, la prolifération, la différenciation et la fusion des cellules satellites et des progéniteurs myogéniques. MiR-1, miR-133a, miR-206, miR-208, miR-486 et miR-499 sont spécifiques du tissu musculaire et qualifiés de myomiR, cependant il est important de souligner que rien n'exclut qu'un miARN ubiquitaire puisse être impliqué dans des processus myogéniques (**Figure 22** et **Figure 24**) [228,229]. Ces miARN vont avoir pour cibles des acteurs du cycle cellulaire tels que *CDC25*, *CCND* impliqués dans l'activation et la prolifération des progéniteurs myogéniques ou encore des facteurs de transcription myogéniques tels que *PAX3*, *PAX7*, *MYOG* et *MYOD* engagés dans l'activation et la différenciation myoblastique.

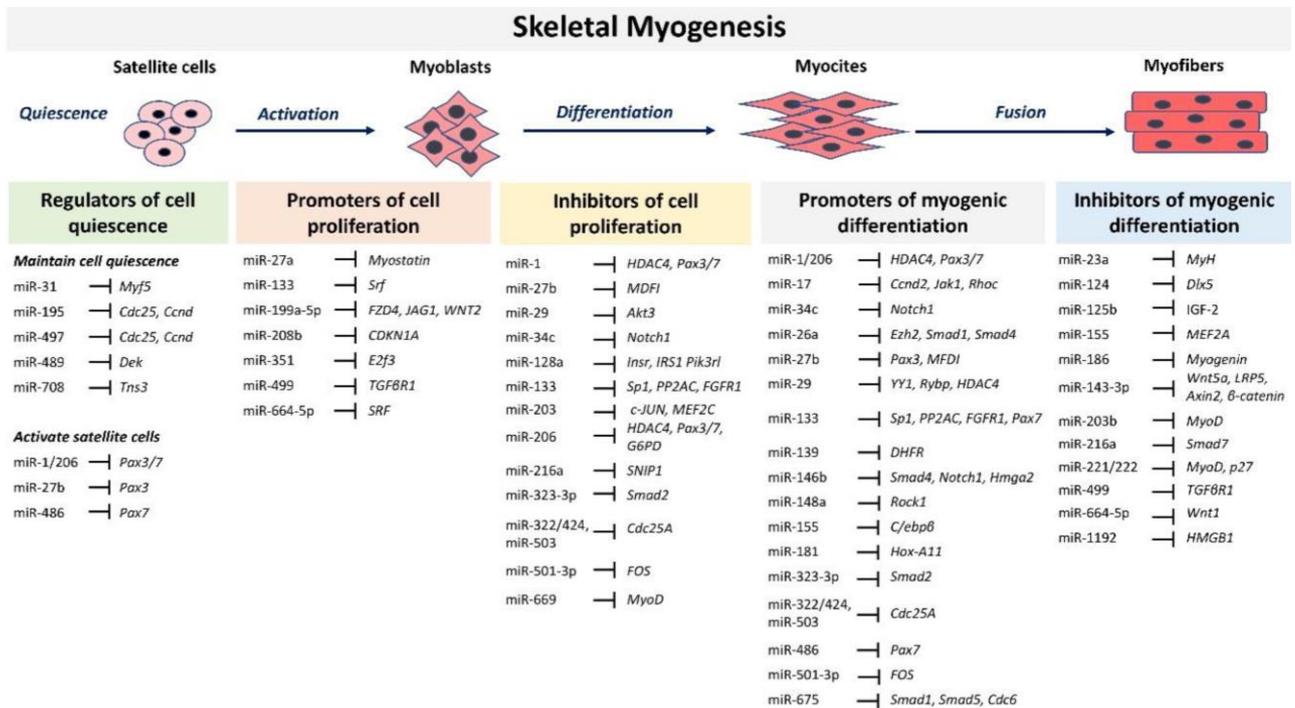


Figure 22 : Rôle et cibles des miARN dans la myogenèse

Figure extraite de Fochi et al. [228].

De nombreux miARN sont vitaux au développement embryonnaire de l'organisme. Des études ont montré que la délétion des myomiR, exprimés par les myofibres, tels que miR-1 ou miR-133a entraînaient un phénotype cardiaque dysfonctionnel, léthal, avec pénétrance complète des individus [230,231]. Certains myomiR sont capables d'induire un phénotype musculaire dans des cellules non musculaires, comme lors de la transfection de miR-1 dans une lignée HeLa [232]. De nombreux miARN induisent la prolifération et/ou l'engagement myogénique de progéniteurs musculaires tels que miR-16, miR-24, miR-124, miR-214 et miR-378 [233,234]. La régulation des miARN musculaires résulte de différents paramètres tels que l'activité musculaire, l'âge ou l'état pathologique du muscle [235–237]. Toutefois la variation des miARN du muscle dans un contexte de spasticité musculaire associé à une lésion neurologique n'a, à ma connaissance, jamais été étudiée.

Enfin, une délétion conditionnelle des myomiR dans le muscle strié n'entraîne aucun phénotype délétère tel qu'une atrophie musculaire ou un bouleversement de la répartition des myofibres, contrairement à un muscle en régénération, suggérant donc l'implication de ces miARN dans l'embryogenèse et la réponse à un stress lésionnel plutôt que dans le maintien de l'homéostasie musculaire [224,230].

4.3.2 Régénération musculaire

La délétion de la biogenèse des miARN dans un muscle lésé induit un défaut de régénération, sans pour autant altérer le nombre de cellules satellites PAX7⁺, leur prolifération ou leur différenciation. Cela suggère l'implication des miARN dans ce processus physiologique indépendamment des progéniteurs myogéniques [238]. Plusieurs études ont ainsi montré que l'injection locale de myomiR, miR-1, miR-133, miR-206 et miR-486 permettait d'accélérer les processus régénératifs, en induisant l'expression protéique des marqueurs myogéniques MYOD et MYOG *in vivo* ainsi que la fusion des myoblastes *in vitro* [239,240]. Toutefois, l'étude des miARN est dépendante de l'environnement et de la cinétique, Yin *et al.* ayant par exemple montré un effet inverse de miR-133 sur la myogenèse lors de la régénération musculaire, celui-ci promouvant alors la différenciation adipogénique des cellules satellites (**Figure 24**) [241]. Certains miARN non spécifiques du muscle tels que miR-27 sont aussi capitaux dans l'activation et l'auto-renouvellement des cellules satellites, la prolifération des myoblastes et l'accélération de la régénération musculaire via l'inhibition de la myostatine, un facteur de croissance limitant la croissance du tissu musculaire [242,243]. En outre, miR-27 est un miARN sécrété

dans les vésicules extracellulaires de monocytes favorisant la polarisation M2 anti-inflammatoire et pro-régénérative des macrophages, suggérant l'implication au travers des miARN de ces acteurs de l'immunité dans la régénération musculaire [244]. Enfin, miR-223 participe à la coordination de la l'inflammation dans ce processus régénératif en ciblant l'IL-6 tandis que son inhibition exacerbe l'inflammation, la fibrose et détériore l'issue de la régénération musculaire [245].

4.3.3 Processus pathologiques

En tant qu'acteurs centraux de la biologie du tissu musculaire, les miARN sont aussi naturellement associés à des processus pathologiques lorsque dérégulés. Les fibromiR sont une catégorie de miARN impliqués dans les processus de fibrose musculaire [246]. Mir-21 et miR-214 sont deux fibromiR impliqués dans la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) [247]. Leur expression augmente les dépôts de collagènes I et IV par les FAPs, tandis que leur inhibition allège les symptômes de la DMD tels que l'atrophie et la fibrose musculaire tout en promouvant la différenciation myogénique des cellules satellites activées.

Comme évoqué précédemment, la spasticité musculaire des patients neurolésés est à même de modifier les signaux de mécanotransduction au sein du tissu musculaire. Une modulation de rigidité du support de culture module d'une part la morphologie des CSM et d'autre part leur signature miARN [196,248] (**Figure 23**). Parmi les miARN surexprimés sur un support rigide favorable à la différenciation ostéogénique, miR-100 et miR-143 étaient capables d'induire la minéralisation des CSM dans un hydrogel en 3D. Ces travaux confirment le rôle des miARN dans les voies de signalisation mécano-dépendantes et l'intérêt de leur étude dans la spasticité musculaire [196,249].

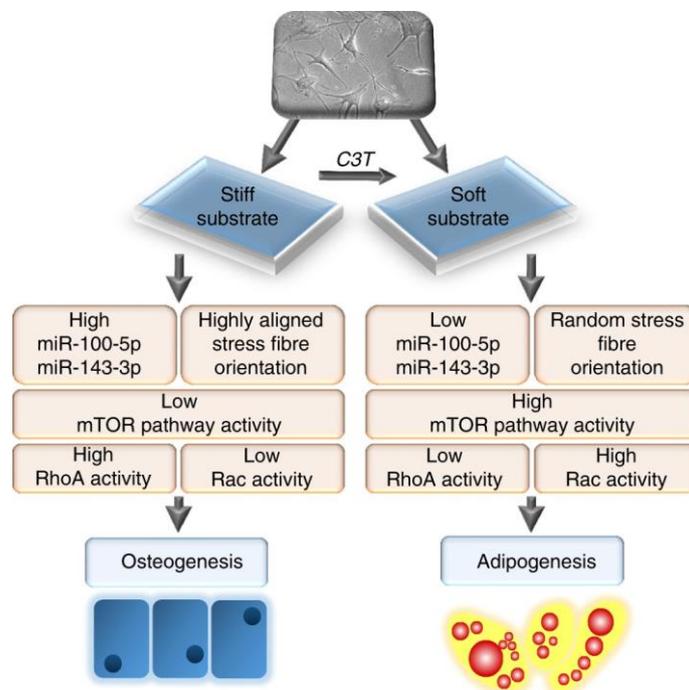


Figure 23 : Impact de la rigidité du substrat et de la mécanotransduction dans la signalisation des miARN et le devenir cellulaire

Un substrat rigide induit l'expression de miR-100 et miR-143 ciblant respectivement mTOR et RICTOR, régule négativement cette cascade de signalisation et augmente l'activité de la GTPase RhoA induisant la différenciation ostéogénique des CSM. A l'inverse, un substrat souple favorise la différenciation adipogénique des CSM.

Figure extraite de Frith et al. [196].

4.4 MiARN dans les processus ostéogéniques

4.4.1 Ossification endochondrale

Des centaines de miARN ont été identifiés dans le développement des tissus osseux et cartilagineux [250,251]. Les miARN sont impliqués dès le développement squelettique embryonnaire, comme en témoigne les défauts de morphogenèse et de croissance du squelette lors de la délétion conditionnelle de DICER dans les cellules de crêtes neurales et du tissu mésodermique [252].

Les miARN sont aussi impliqués dans la régulation dans le temps des processus ostéo-chondrogéniques. La signalisation canonique Wnt/ β -Caténine est par exemple typiquement associée à la régulation de la différenciation chondrogénique lorsque faiblement activée tandis qu'elle favorise un devenir ostéogénique en présence de niveaux élevés de β -Caténine [251]. Or de nombreux miARN ciblent des inhibiteurs de cette signalisation tels que miR-27, miR-29 ou miR-335 et sont potentiateurs de l'ostéogenèse [253,254]. De façon plus spécifique, miR-199a est un inhibiteur de la chondrogenèse et activateur de l'ostéogenèse, permettant ainsi la transition d'un tissu cartilagineux à un tissu osseux caractéristique de l'ossification endochondrale [255,256]. Un certain nombre de miARN anti-ostéogéniques ciblent directement des acteurs de l'ostéogenèse tels que RUNX2, ou agissent sur ces processus via l'inhibition d'intermédiaire, comme c'est le cas pour miR-214 ciblant ATF4, un facteur de transcription induisant l'expression de l'Osterix, promoteur de la différenciation ostéogénique et de la maturation des ostéoblastes [257(p4)]. Enfin, plusieurs miARN agissent aussi en favorisant la différenciation ostéo-chondrogénique des progéniteurs mésenchymateux au travers de l'inhibition des autres voies de différenciation comme dans le cas de miR-20a, un inhibiteur de PPAR γ responsable de la différenciation adipogénique des CSM, qui induit la différenciation ostéogénique de ces cellules, au travers de la surexpression de BMP-2 et RUNX2 (**Figure 24**) [258].

Prise dans son intégralité, la régulation post-transcriptionnelle des miARN favorise la dégradation de *RUNX2* et se comporte physiologiquement comme un suppresseur de l'ostéogenèse, Zhang *et al.* ayant démontré qu'une levée de cette inhibition était nécessaire à la différenciation chondrogénique et ostéogénique des précurseurs mésenchymateux [259]. La signalisation des BMPs/TGF- β est l'un des acteurs de cette levée d'inhibition puisque capable d'inhiber de nombreux miARN ciblant en retour *RUNX2* (**Figure 26**) [260,261]. En outre, la délétion de DICER entraîne une différenciation hypertrophique des chondrocytes, suggérant un rôle

suppressif des miARN sur la maturation hypertrophique de cette population cellulaire [262].

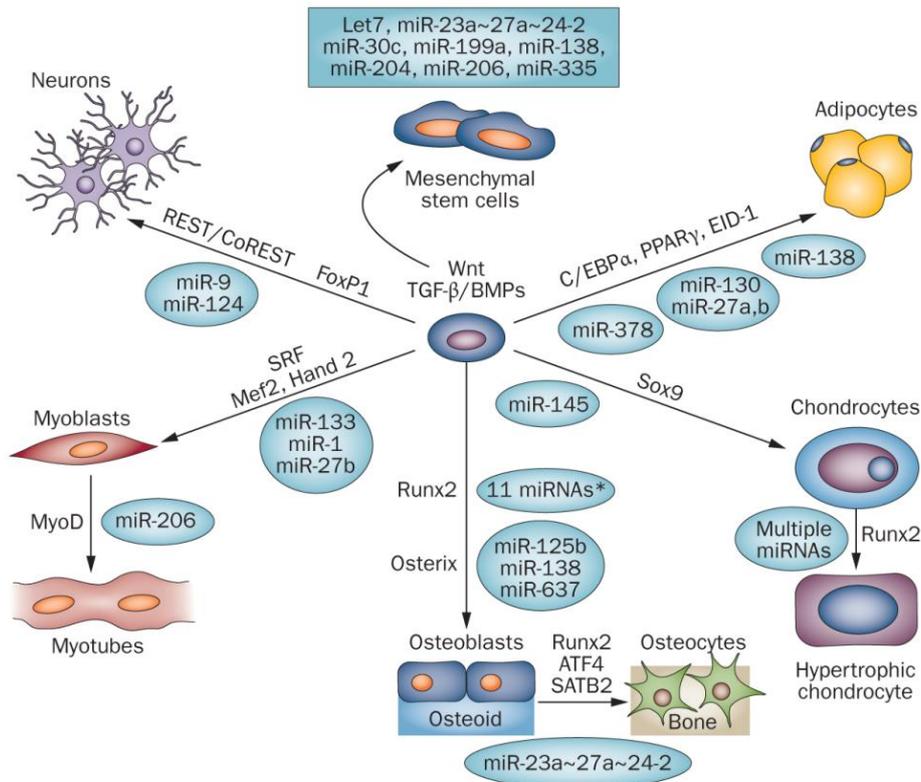


Figure 24 : Régulation des différentes voies d'engagement en différenciation des CSM par les miARN

Les miARN contrôlent le devenir cellulaire des CSM via leur capacité à inhiber de nombreux facteurs de transcription.

Figure extraite de Lian et al. [263].

4.4.2 Réparation osseuse

La réparation osseuse débute avec la formation d'un hématome, associé à une phase inflammatoire et hypoxique. Vient ensuite la migration de progéniteurs ostéogéniques de la moelle, du périoste et du tissu musculaire avoisinant permettant la formation du cal fibrocartilagineux en parallèle de la mise en place de l'angiogenèse. Enfin, le cal va s'ossifier sur les bases du tissu fibreux et cartilagineux pour parfaire le processus d'ossification endochondrale au centre du cal avant d'être remodelé par les ostéoblastes associés aux ostéoclastes. Etant le processus physiologique le plus semblable à la pathogenèse des POA, nous détaillerons brièvement ici les principaux miARN décrits dans les processus de régénération

osseuse, hormis ceux impliqués dans les processus inflammatoires qui seront décrits dans leur propre partie.

La phase précoce de la réparation implique l'apparition d'un environnement hypoxique favorable à la différenciation ostéogénique. Plusieurs études ont montré le rôle de miR-1, miR-21 et miR-199a dans la promotion de l'ostéogenèse en condition hypoxique, notamment via leurs propriétés à cibler *HIF-1AN* et *SMAD7*, respectivement deux inhibiteurs d'*HIF-1 α* et *RUNX2*, suggérant leur rôle dans la mise en place d'un environnement pro-ostéogénique très précoce [264,265]. L'hypoxie tissulaire stimule l'angiogenèse. Dans ces événements, miR-26a, miR-126 et miR-143 jouent un rôle pro-angiogénique. A l'inverse, miR-92, miR-195 et miR-222 possèdent un effet anti-angiogénique. Le premier groupe agit en augmentant l'expression du VEGF- α et de l'Angiopoïétine 1, tandis que le second groupe cible directement ces mêmes acteurs ainsi que des MMPs, réduisant le potentiel de remodelage de la MEC et interférant avec les capacités d'invasion des CSM et EC [266,267].

Comme abordé précédemment, de nombreux miARN sont potentiateurs ou inhibiteurs de la différenciation chondrogénique et ostéogénique des précurseurs mésenchymateux (**Figure 25**) [250,251,268]. La chondrogenèse nécessite, sous la pression des cytokines du TGF- β et des BMPs, la condensation des progéniteurs mésenchymateux, l'expression de SOX9 pour initier le processus, puis de RUNX2 pour finaliser la différenciation [269]. MiR-34, miR-101 et miR-145 favorisent la prolifération et la différenciation en progéniteurs chondrogéniques au début du processus tandis que miR-101 et miR-145 inhibent la différenciation terminale, soulignant l'importance de la temporalité de ces acteurs de la régulation post-transcriptionnelle. Enfin, les chondrocytes adoptent, sous le contrôle d'IGF-1, RUNX2 et MMP13, un phénotype hypertrophique permettant la sécrétion de Collagène X et de matrice minéralisée [270,271]. Cette étape est aussi sous la régulation de miARN tels que miR-1 et miR-365.

	Chondrogenèse	Ostéogenèse	Minéralisation		Chondrogenèse	Ostéogenèse	Minéralisation
let-7		↑		miR-181a	↑	↓	
let-7f		↑		miR-182		↓	
miR-1	↓	↓		miR-186		↑	↓
miR-9		↑	↑	miR-187		↑	
miR-10		↓	↓	miR-188		↓	
miR-10b		↓		miR-193a		↓	↓
miR-15b		↑		miR-194		↓	
miR-16		↓		miR-199a	↑	↑	
miR-17		↓	↓	miR-200a		↓	↓
miR-19b		↑		miR-203		↓	
miR-20a		↑		miR-204		↓	
miR-21		↑	↑	miR-205		↓	↓
miR-22		↓		miR-206	↓	↓	
miR-23		↓		miR-210		↓	
miR-23a			↑	miR-211		↓	
miR-23b		↑		miR-212		↓	
miR-24		↓		miR-214	↓	↓	
miR-25		↑		miR-217		↓	
miR-26a		↑		miR-218	↑	↑	↑
miR-26b	↓	↓		miR-219		↑	
miR-27a			↑	miR-221	↑	↓	
miR-29a	↑	↑	↑	miR-222		↓	
miR-29b		↑	↓	miR-223		↑	↑
miR-30	↓	↓	↓	miR-224		↑	
miR-31		↓		miR-296		↑	↑
miR-33a		↑		miR-302a		↑	
miR-34a	↑	↓		miR-320a		↓	↓
miR-34c		↓	↑	miR-320b		↓	
miR-92	↓	↑		miR-335	↑	↑	
miR-93		↓		miR-337	↑		
miR-98		↑		miR-342		↓	
miR-99a		↓		miR-346		↑	
miR-100		↑		miR-363		↓	
miR-101	↑	↑		miR-374b		↑	
miR-103		↓	↓	miR-375		↓	
miR-106		↓		miR-381		↓	
miR-124		↓	↓	miR-383		↓	
miR-125a		↓		miR-384		↓	
miR-125b	↓	↓	↓	miR-409		↑	↓
miR-126		↓	↑	miR-424		↑	
miR-128			↑	miR-433		↑	
miR-132		↓		miR-449b		↓	
miR-133a		↓	↓	miR-451		↑	↑
miR-133b		↓		miR-486		↑	
miR-135		↑		miR-496		↓	
miR-135b		↑	↑	miR-503		↑	↑
miR-137		↑		miR-505		↓	
miR-138		↓	↓	miR-532		↓	↓
miR-139		↑	↓	miR-542		↓	↓
miR-140	↑	↓		miR-545		↓	
miR-141		↓	↓	miR-608		↓	
miR-142		↑	↑	miR-637		↓	
miR-143		↑		miR-664		↓	
miR-144		↓		miR-765		↓	
miR-145	↑	↓		miR-877		↑	
miR-146a	↓	↓		miR-889		↓	
miR-148a			↓	miR-1271		↓	
miR-149		↑		miR-3077		↓	
miR-150		↓	↑	miR-3648		↑	
miR-151b		↓		miR-3960		↑	
miR-152		↑		miR-5106		↑	
miR-153		↓		miR-7025		↓	
miR-155		↓	↓	miR-8485	↑		

Figure 25 : Tableau récapitulatif du rôle des miARN dans les processus ostéogéniques

Résumé de la littérature sur l'implication ostéo-chondrogénique des miARN, il est important de noter que la disparité en fonction des acteurs cellulaires et de l'environnement des études peut conduire à des résultats contradictoires.

L'étape cruciale de l'ossification endochondrale est la transition d'une matrice cartilagineuse à un tissu osseux trabéculaire. La migration des ostéoblastes de l'os et du périoste avoisinant ne constitue qu'une partie minoritaire des ostéoblastes présents dans le cal lors de la régénération osseuse, 60% des ostéoblastes provenant d'une transdifférenciation des chondrocytes hypertrophiques [272]. La différenciation ostéogénique est organisée en quatre stades : CSM, pré-ostéoblaste, ostéoblaste et ostéocyte tandis que la transdifférenciation à partir de chondrocytes hypertrophiques ne comporte que les deux derniers. Ces stades sont caractérisés par l'expression de facteurs de transcription eux-mêmes régulés par de multiples miARN (**Figure 25** et **Figure 26**) [273]. La fixation de RUNX2 sur son élément de réponse déclenche la transcription de gènes tels que l'ostéocalcine, l'ostéopontine, le collagène 1 et la phosphatase alcaline [274]. Une trentaine de miARN ciblant les trois principaux facteurs de transcription RUNX2, Osterix et ATF4 ont à l'heure actuelle été identifiés, démontrant la complexité du réseau de régulation entretenu par les miARN. La modulation d'acteurs tels que miR-9, miR-26a, miR-92 et miR-222 permettant d'améliorer *in vivo* la différenciation et la régénération osseuse à la suite d'une fracture témoigne de leur capacité à moduler l'ostéogenèse [275–277]. Certains miARN sécrétés par les macrophages, notamment anti-inflammatoires et pro-régénératifs M2 ont été décrits pour leurs effets pro-ostéogéniques soulignant le potentiel des miARN macrophagiques dans les processus ostéogéniques [268]. Enfin, les processus de minéralisation, par les chondrocytes hypertrophiques ou les ostéoblastes, peuvent aussi être altérés par les miARN [278,279].

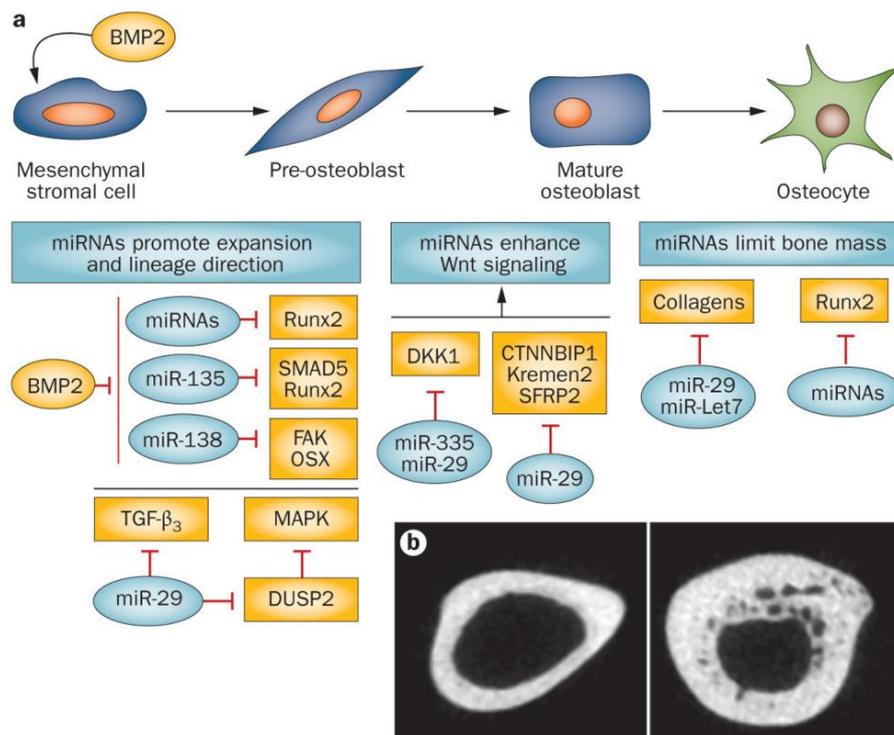


Figure 26 : Rôle des miARN dans la différenciation ostéogénique des CSM

- (A)** Les miARN sont impliqués à toutes les étapes de l'ostéogénèse des CSM, dans la prolifération, la différenciation, la maturation et leurs capacités de minéralisation.
- (B)** L'inactivation de DICER, et donc des miARN, dans les ostéoblastes induit la surproduction de tissu osseux (droite) par rapport au contrôle (gauche), démontrant le rôle anti-ostéogénique de la signalisation globale des miARN.

Figure extraite de Lian *et al.* [263].

4.4.3 Effecteurs d'une régulation longue distance

Nous avons décrit le rôle intracellulaire et paracrine des miARN dans la biogenèse et les processus de réparation musculaire et osseux, toutefois de nombreux auteurs ont aussi décrit un effet endocrine des miARN [280]. Les miARN peuvent être sécrétés et exportés dans des vésicules extracellulaires vers la circulation sanguine et adressés à des tissus spécifiques [281]. Au cours des dernières années, l'existence d'un axe de régulation entre l'os et l'encéphale a émergé [39,282]. Le tissu cérébral sécrète de nombreux facteurs régulant la masse osseuse tels que la leptine ou la sérotonine tandis que le tissu osseux adresse en retour de l'ostéocalcine nécessaire à la production de neurotransmetteurs [283,284]. Une étude de Xia *et al.* a démontré que cette régulation était en partie

médiée par les miARN [176]. Un traumatisme crânien induisait la sécrétion de vésicules extracellulaires contenant les miARN pro-ostéogéniques miR-150 et miR-328 par les neurones lésés (**Figure 27**). Ces miARN étaient capables d'améliorer *in vitro* la différenciation ostéogénique et la minéralisation d'une lignée de précurseurs ostéoblastiques et la réparation de la fracture *in vivo*. Par ailleurs, les auteurs ont montré que ces vésicules co-localisaient avec des marqueurs de dommage neuronal et étaient adressées spécifiquement au tissu osseux via la surexpression de fibronectine à leur surface (**Figure 27**) [176]. Ces résultats confirment doublement que l'interaction entre le tissu cérébral et osseux est en partie médiée par les miARN et qu'une lésion neurologique altère celle-ci, soulignant l'émergence de la fonction endocrine des miARN dans la régulation de processus physiopathologiques à longue distance.

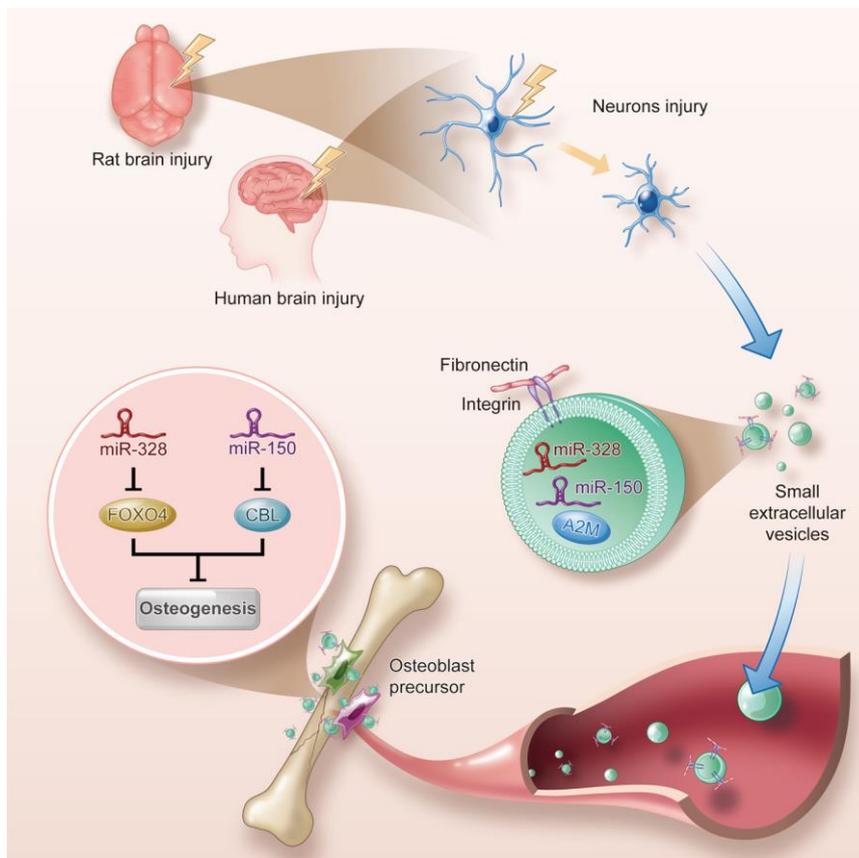


Figure 27 : Le traumatisme crânien améliore la régénération osseuse par la sécrétion de miARN ostéogéniques

Figure extraite de Xia et al. [176].

4.4.4 Processus pathologiques

La littérature fait état de nombreuses implications des miARN dans différentes pathologies [80,250]. La dérégulation de miR-21, un promoteur de l'ostéogenèse, est par exemple impliquée dans la pathogenèse de l'ostéoporose tandis que miR-181 est surexprimé dans les articulations de patients atteints d'OA et son inhibition permet de limiter les symptômes de cette pathologie [285,286]. En outre, miR-378 est aussi un acteur majeur de l'OA, inhibant la chondrogenèse de progéniteurs mésenchymateux et l'autophagie des chondrocytes, tandis que miR-181 est un acteur majeur de la régulation de la différenciation hypertrophique des chondrocytes [287,288]. Dans une autre pathologie inflammatoire ossifiante, la spondylarthrite ankylosante, Qin *et al.* ont observé des niveaux anormalement élevés de miR-17 dans les fibroblastes des ligaments, son inhibition réduisait leur différenciation ostéogénique et le développement des ossifications ectopiques [289].

Enfin, trois études ont évalué le rôle des miARN dans le développement des POA. Tu *et al.* ont ainsi démontré que la perte d'expression de miR-203 était impliquée dans le développement de POA d'origine traumatique, le sauvetage de l'expression de miR-203 permettant de réduire le volume des ossifications ectopiques développées [290]. Vasconcellos *et al.* ont quant à eux montré la surexpression de trois myomiR miR-1, miR-133 et miR-206 chez les patients développant des POA, tout en démontrant leur potentiel d'induction ostéogénique sur des progéniteurs mésenchymateux *in vitro* au travers du ciblage de SOX9 [291]. Toutefois le rôle de ces miARN reste très controversé dans la littérature, suggérant parfois un rôle suppresseur et parfois inducteur de l'ostéogenèse. Enfin, Sun *et al.* ont décrit le rôle de miR-630 sur la transition épithélio-mésenchymateuse, avançant une origine endothéliale précoce des POA traumatiques [292]. Le rôle des miARN dans le développement des POAN n'a cependant jamais été étudié.

4.5 MiARN et inflammation

4.5.1 Rôle des miARN dans le contrôle de la réponse inflammatoire

L'implication et le rôle des miARN dans les processus de l'immunité innée et adaptative ont été extensivement décrits [220]. Ils jouent entre autres un rôle dans la différenciation des progéniteurs lymphoïdes, myéloïdes ainsi que dans l'activation des macrophages et de l'amplitude de leur réponse aux signaux externes [220]. Cette introduction se concentrera uniquement sur leur rôle dans les

processus inflammatoires médiés par les macrophages comme étape clé du développement des POAN.

L'activation de la réponse inflammatoire par les macrophages implique la surexpression des miARN anti-inflammatoires miR-21, miR-146a et miR-155 [293,294]. Cette transcription est notamment induite par TNF- α et INF- γ et la cascade NF- κ B. Cette activation de miARN anti-inflammatoire permet la régulation dans le temps de l'activation des macrophages, et contrôle ainsi la durée d'un événement inflammatoire. MiR-146a exerce ses propriétés anti-inflammatoires en ciblant des acteurs de la cascade de signalisation induites par les récepteurs de type Toll (TLR) tels que des éléments associés aux récepteurs à l'IL-1 (IRAK1 et IRAK2) et au TNF- α (TRAF6) [295]. L'inactivation de ces miARN peut induire une surexpression de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β [296].

Ces miARN agissent donc comme un compte à rebours et un rétrocontrôle négatif de l'inflammation. NF- κ B suractive la transcription de miR-155 et miR-146a ainsi que d'autres gènes répondant à l'inflammation tels qu'IL-1 β et TNF- α (**Figure 28**) [297]. Alors que l'expression de ces gènes nécessitent environ 2h pour atteindre un pic, le pic d'expression des miARN n'arrive que plus tardivement, autour de 24h après l'induction de la réponse inflammatoire [294]. Cela crée donc un délai durant lequel la réponse inflammatoire aiguë n'est pas contrebalancée par ces miARN (**Figure 28**) [222]. Par ailleurs, il est intéressant de noter que certains des ARNm cibles de miR-155 et miR-146a sont eux-mêmes des acteurs de la signalisation pro-inflammatoire, tel que NF- κ B formant ainsi une boucle de rétrocontrôle négative de ce processus finement régulé (**Figure 21**) [293,298]. Cette régulation permet de contrôler dans le temps la durée de la réponse inflammatoire et de créer une tolérance à court terme permettant physiologiquement d'éviter une activation continue qui serait délétère aux tissus concernés (**Figure 28**).

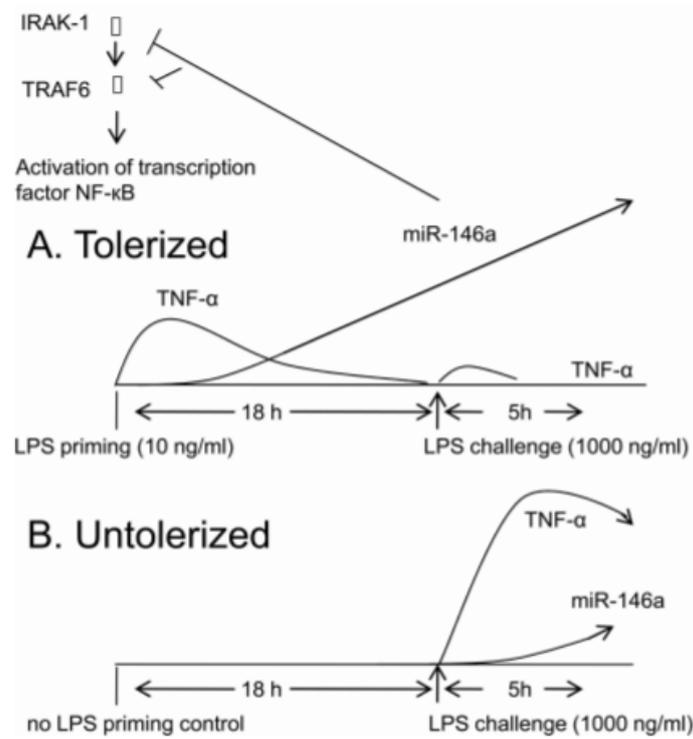


Figure 28 : Rôle de miR-146a dans le rétrocontrôle de l'inflammation et de la tolérance au stress inflammatoire

(A) Un stress inflammatoire induit la production et l'accumulation de miR-146a qui va agir sur la signalisation NF-κB comme un rétrocontrôle négatif de l'inflammation, régulant la durée de la réponse inflammatoire et prévenant toute nouvelle réactivation à court terme.

(B) L'absence de préconditionnement au stress inflammatoire induit une réponse inflammatoire exacerbée.

Figure extraite de Nahid et al. [298].

4.5.2 MiARN, acteurs de la polarisation des macrophages

Au-delà du contrôle direct de la réponse inflammatoire, des miARN interviennent dans la polarisation des macrophages [299,300]. MiR-155 est un acteur de la polarisation M1, sa délétion entraînant une altération de la polarisation pro-inflammatoire tandis que sa surexpression induisait une transition des macrophages M2 vers un profil M1 via l'inhibition du récepteur à l'IL-13 [301,302]. D'autres miARN possèdent un rôle identique tels que miR-125b et miR-127, par ailleurs capables d'induire la surexpression des cytokines pro-inflammatoires IL-1β, IL-6 et IL-10 [303,304].

Parmi les miARN favorisant la polarisation anti-inflammatoire M2, on retrouve miR-146a, qui de par ses propriétés à inhiber les gènes pro-inflammatoires, inhibe l'expression de multiples marqueurs M1 tels que iNOS, CD86, TNF α , IL-6 et la surexpression de marqueurs M2 tels que l'arginase (Arg1) et CD206 [305]. En outre, miR-214 est aussi capable d'orienter les macrophages vers un phénotype M2 anti-inflammatoire en ciblant GSK3B, tout comme miR-223 et miR-511 avec leurs propres cibles [299,306]. A défaut d'induire directement la polarisation des macrophages, certains miARN peuvent permettre de bloquer l'un ou l'autre des phénotypes, comme miR-720 qui induit la dégradation de GATA3, un facteur de transcription essentiel à la polarisation M2 [307].

4.5.3 Hypoxie et angiogenèse

De nombreux miARN sont dérégulés par un environnement hypoxique [308]. On retrouve parmi eux miR-17, miR-20a, miR-23, miR-24, miR-26, miR-27, miR-103 et miR-210, ce dernier étant considéré comme le miARN régulateur principal de la réponse à l'hypoxie. Les fonctions contrôlées par les miARN en condition hypoxique sont multiples : survie et apoptose, prolifération, inflammation, métabolisme et angiogenèse déjà abordés lors de la régénération osseuse. MiR-17 et miR-20a sont deux miARN impliqués dans la suppression de l'angiogenèse, leur inhibition induisant la formation de vaisseau dans un implant de Matrigel tandis que leur surexpression étant capable d'inhiber la migration et la formation d'un réseau primitif de cellules endothéliales, en parallèle de leurs effets ostéogéniques [309,310]. De façon intéressante, ces deux miARN appartiennent au même cluster 17~92, impliqué dans la gestion du cycle cellulaire et du métabolisme cellulaire, et central dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires, auto-immunes et neurodégénératives [311].

4.5.4 Processus pathologiques

De nombreux miARN jouant un rôle dans l'inflammation ont été identifiés dans des processus pathologiques tels que l'inflammation synoviale liée à l'ostéoarthrite ou des pathologies neurodégénératives [312,313]. Des régulateurs du stress oxydatif tels que miR-34a et miR-181a ainsi que des modulateurs de la réponse inflammatoire tels que miR-146a, miR-181c, miR-26a et miR-122 contribuent à la déstabilisation de la membrane synoviale associée au développement de l'OA. Le rôle de miR-146a, le miARN le plus abondant du SNC, sur le stress oxydatif a par ailleurs été décrit dans la progression de la maladie d'Alzheimer dans laquelle la dérégulation de ce miARN induit la production

d'espèces réactives de l'oxygène [314]. Fan *et al.* ont proposé que la perte d'expression de miR-146a était une caractéristique commune aux pathologies neurodégénératives, et qu'une restauration des niveaux d'expression permettait d'inverser les processus pathologiques via l'inhibition de la réponse inflammatoire [313].

De façon surprenante, l'évolution de l'expression de miR-146a lors d'une lésion liée à un TC ou une SCI est inverse. Dans le premier cas, on assiste à une augmentation de l'expression systémique du miARN corrélé à une réduction des cytokines pro-inflammatoires [315]. Dans le second, l'expression de miR-146a diminue aux temps précoces avant d'être surexprimé plus tardivement, suggérant que ce retard de l'inhibition de la cascade inflammatoire pourrait être à l'origine de l'amplification de la réponse inflammatoire bien connue et décrite à la suite d'une SCI [316,317].

Comme abordé au fil de cette 4^{ème} et dernière partie de l'introduction, les miARN sont des régulateurs post-transcriptionnels pléiotropes et redondants, intervenant dans tous les tissus de l'organisme, tous les types cellulaires et impactant de nombreux processus physiologiques tels que la myogenèse, l'ostéogenèse ainsi que l'inflammation. Leur dérégulation dans de multiples pathologies en fait des acteurs de choix pour décrypter les différents processus impliqués et des candidats thérapeutiques émergents de par leur capacité à réguler simultanément différentes cascades de signalisation, parfois même au sein de processus drastiquement différents.

II - Objectifs de la thèse

Depuis l'identification de l'inflammation comme protagoniste majeur de la pathogenèse des POAN, l'impact de la lésion neurologique sur les modifications profondes du paysage cellulaire et moléculaire impliquées dans le développement des POAN reste mal compris. Par ailleurs, la nécessité d'améliorer notre compréhension de la pathologie afin de mettre en place de nouvelles stratégies thérapeutiques et d'améliorer la prise en charge des patients reste d'un intérêt premier en vue de s'affranchir *in fine* d'une intervention chirurgicale lourde et complexe.

Le microenvironnement musculaire physiologique résulte d'interactions complexes entre les différents acteurs impliqués dans l'homéostasie et la régénération musculaire, mais aussi osseuse, au travers de contacts focaux, de sécrétions de facteurs solubles, miARN ou de protéines de la matrice extracellulaire. Les FAPs sont les cellules à l'origine du développement des POAN, sous l'effet de stimuli notamment inflammatoires. Les miARN sont des molécules impliquées dans de nombreux processus physiologiques au sein du muscle et leur implication dans la pathogenèse des POAN a été suggérée.

Les objectifs de ces travaux de thèse ont ainsi consisté à identifier les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la pathogenèse des POAN, tout particulièrement au travers de l'étude de la régulation des miARN. Cette étude est axée sur trois objectifs :

- Identifier les miARN dont l'expression est altérée précocement au cours du développement des POAN dans le modèle murin
- Etudier leur expression dans les FAPs et MPs
- Etudier l'effet fonctionnel d'une modulation de ces miARN sur le potentiel ostéogénique des FAPs humains

Nous avons décrit ces régulations en se basant sur une analyse, dans notre modèle de POAN, du miRnome et des transcrits du muscle pathologique puis de miARN sélectionnés dans les FAPs, MPs et macrophages. Les cibles ont fait l'objet d'analyses fonctionnelles ostéogéniques, myogéniques et inflammatoires avec des FAPs et MPs de patients, afin d'apprécier leur implication dans la pathogenèse des POAN.

III - Démarche expérimentale

Afin de répondre à nos objectifs, nous avons établi une démarche expérimentale autour de l'utilisation du modèle murin de POAN combinant une injection intramusculaire de cardiotoxine (CDTX) ainsi qu'une section de la moelle épinière (SCI) ou leur contrôles respectifs (injection de PBS et chirurgie SHAM) (**Figure 30**). Nous avons décliné une série d'analyses histologiques, immunohistochimiques ainsi qu'un criblage des miARN et des marqueurs ostéogéniques, myogéniques et inflammatoires sur le muscle entier (**Figure 29**).

Nous avons ensuite isolé les cellules impliquées dans la pathogenèse des POAN afin d'identifier séparément les dérégulations pathologiques des miARN et ARNm. Nous avons aussi isolé les progéniteurs musculaires, FAPs et MPs, du muscle avoisinant l'ostéome chez les patients POAN afin de confirmer nos observations précédentes. Nous avons caractérisé le potentiel ostéogénique des FAPs ainsi que la cinétique d'expression des transcrits ostéogénique lors d'une induction en présence de milieux conditionnés de macrophages pro-inflammatoires. De plus, nous avons réalisé des analyses fonctionnelles via la surexpression ou l'inhibition des miARN précédemment identifiés sur les FAPs et les MPs tout en évaluant leur potentiel de différenciation ostéogénique et myogénique.

Nous avons finalement caractérisé la régulation ARNm et miARN des macrophages du modèle murin de POAN en parallèle des milieux conditionnés de macrophages. Les propriétés ostéo-chondrogéniques de ces derniers ont ensuite été évaluées. Enfin, le potentiel des miARN à réguler les processus inflammatoires a été étudié à travers la stimulation des FAPs aux LPS ou de la coculture de ces derniers avec des macrophages préalablement transfectés.

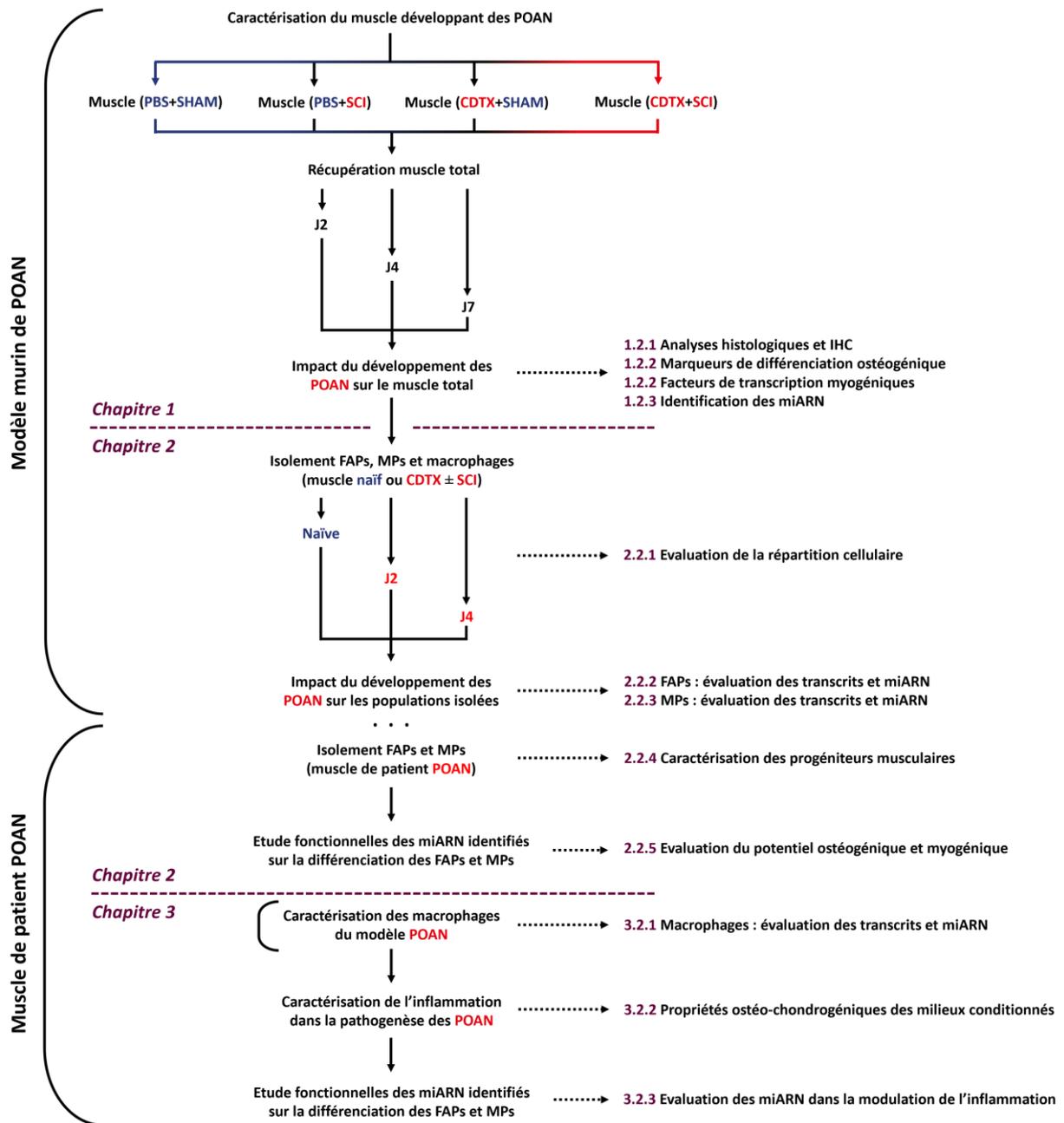


Figure 29 : Etapes clés de la démarche expérimentale développées autour du modèle murin et des cellules de patients POAN

IV - Matériels et méthodes

1.1 Modèles expérimentaux

1.1.1 Progéniteurs musculaires issus des POAN humains

1.1.1.1 Isolement et culture

Les chirurgies d'exérèse des POAN génèrent des résidus opératoires de tissu musculaire se localisant en périphérie de l'ostéome excisé. Avec l'accord des patients, l'approbation du Comité de protection des personnes (CPP n°09025, BANKHO) et de la Commission nationale de l'informatique et des libertés (CNIL n° Eyo1066211J), les résidus opératoires sont récupérés à l'Hôpital Raymond-Poincaré à la suite des chirurgies de POAN de patient souffrant de traumatisme crânien, lésion médullaire ou d'accidents vasculaires cérébraux. Ces fragments musculaires sont séparés des tissus fibreux et adipeux puis émincés mécaniquement avant de subir une digestion enzymatique à la pronase (P5147, 1g, Sigma-Aldrich) à 1,5mg/ml dans un milieu α -MEM (01-042-1A, Biological Industries) sans sérum de veau fœtal (SVF) au bain-marie à 37°C pendant 45 min. La réaction enzymatique est stoppée par l'ajout de milieu α -MEM, 10% SVF décomplémenté (56°C au bain-marie, 30 min, SV30160.03, Hyclone), 1% Pénicilline/Streptomycine (P/S) (15140-122, ThermoFisher). La suspension cellulaire est ensuite passée sur des tamis 100 μ m puis 40 μ m puis les cellules sontensemencées à 4000 cellules/cm² et amplifiées dans un milieu α -MEM, 15% SVF décomplémenté, 1% P/S à 37°C et 5% CO₂. Le lendemain, les cellules sont lavées au PBS afin d'éliminer les cellules non-adhérentes et le milieu est renouvelé et supplémenté de bFGF à 10 ng/mL de milieu (233-FB/CF 25 μ g, R&D Systems). Le milieu de culture des progéniteurs musculaires adhérents est par la suite renouvelé tous les 2-3 jours et les cellules sont passées par un traitement de 5 min à la trypsine (15400-054, ThermoFisher) lorsqu'elles atteignent 70 à 80% de confluence. Une fois amplifiées, ces cultures primaires sont directement triées ou congelées entre 1.10⁶ et 2.10⁶ cellules/mL dans leur milieu de culture avec une concentration finale en DMSO à 10% (D2650-100mL, Sigma-Aldrich) et stockées à l'azote liquide. Les progéniteurs musculaires d'un donneur sain opéré pour une ligamentoplastie du ligament croisé antérieur (LCA) ont aussi été récupérés en suivant ce protocole afin de servir de contrôles.

1.1.1.2 Tri cellulaire

La stratégie de tri se base sur l'expression du récepteur A du facteur de croissance dérivé des plaquettes PDGFR α et de la molécule d'adhésion des cellules neuronales CD56/NCAM respectivement exprimés par les FAPs et MPs. Les cellules sont sélectionnées selon un rapport de taille, leur singularité, leur viabilité et enfin leur capacité à exprimer PDGFR α ou CD56.

Après amplification ou décongélation, les progéniteurs musculaires sont incubés 30 min dans un tampon PBS, 2% SVF décomplémenté, 2mM EDTA (E-0270, Sigma Aldrich), en présence des anticorps anti-CD56 PE (20 μ L par 10^6 cellules, clone B159, 555516, BD Pharmigen) et anti-PDGFR α biotinylé (4 μ L par 10^6 cellules, BAF322, R&D Systems). Après lavage, la suspension cellulaire est à nouveau incubée 30 min avec une streptavidine APC/Cy7 (au 1:200, 262040, ICyt) et le marqueur de viabilité 7-AAD (2 μ L par 10^6 cellules, 2702020, Sony) avant d'être filtrée à 30 μ m (Sysmex 04-004-2326). Les cellules sont ensuite séparées et triées au FACS (FACS Aria III SORP, BD Biosciences). Les contrôles isotypiques utilisant une IgG1 PE (A07796, Beckman Coulter) et une IgG biotinylée (BAF108, R&D Systems) ont été réalisés parallèlement en suivant les mêmes étapes du protocole. Les populations isolées de MPs CD56⁺ PDGFR α ⁻ et FAPs CD56⁻ PDGFR α ⁺ sont ensuite ensemencées à 3000 cellules/cm² dans un milieu α -MEM 20% SVF décomplémenté, 1% P/S et amplifiées pendant deux semaines.

1.1.2 Progéniteurs mésenchymateux issus des ostéomes humains

Des résidus opératoires d'ostéomes ont été récupérés à la suite de la chirurgie d'exérèse des POAN. Les pièces d'os trabéculaire sont découpées en morceaux de quelques centimètres puis flushées dans une flasque avec du milieu α -MEM, 10% SVF décomplémenté, 1% P/S. Le milieu est changé dès le lendemain avec de nombreux lavages pour éliminer les gouttelettes lipidiques et érythrocytes et permettre la sortie par explant des CSM de moelle (MO). A sous confluence, les MO, adhérentes au plastique, sont ensuite passées par un traitement à la trypsine et ensemencées à 4000 cellules/cm² dans ce même milieu de culture. Des CSM issues de moelle osseuse aspiré et cultivées dans les mêmes conditions ont été utilisées comme contrôles.

1.1.3 Modèle murin de POAN

Les expérimentations animales ont été réalisées à l'animalerie de l'UMS33 (Hôpital Paul Brousse, Villejuif) et ont été approuvées par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche via l'autorisation de projet #25901-2020060515467494, comité d'éthique n°26. En amont de chaque session, les animaux ont été acclimatés aux locaux et habitués au personnel et à la nourriture deux semaines avant les premières expérimentations. Les chirurgies sous anesthésie ont été réalisées en plaçant la souris sur un tapis chauffant pour éviter l'hypothermie et du gel oculaire a été appliqué sur les yeux pour prévenir leur dessèchement. En aval des chirurgies, un enrichissement adapté à la condition physique particulière des animaux a été mis en place dans les cages afin d'améliorer leur bien-être tout au long des différentes sessions.

Ce modèle murin de POAN est basé sur le modèle développé par Genêt *et al.* associant une lésion médullaire (SCI) à une lésion musculaire par injection de cardiotoxine (CDTX) [32]. La concomitance de ces deux opérations induit alors la formation de POAN dans le muscle lésé. Nous avons cependant procédé à un changement de groupe musculaire injecté à la CDTX initialement réalisée dans les muscles ischio-jambiers de la cuisse. Nous avons fait le choix de léser le muscle gastrocnémien (MG) du mollet. Il permet un meilleur rendement cellulaire ainsi qu'une meilleure reproductibilité dans l'injection de la CDTX, celui-ci ne comportant que deux chefs musculaires au lieu de trois pour les ischio-jambiers. En outre, les possibilités de mobilisation musculaires sont plus répandues pour le MG que le TA, rendant toute étude ultérieure sur l'impact de la mobilisation dans le développement des POAN plus aisée à mettre en place. Les souris femelles C57/Bl6 sauvages âgées de 6 à 8 semaines, là où le métabolisme osseux est le plus stable, ont été fournis par Janvier tandis que la cardiotoxine est issue des élevages de Latoxan (L8102).

1.1.3.1 Induction chirurgicale des POAN

Les animaux sont placés sous anesthésie transitoire à l'isoflurane (2% dans 98% d'air) afin de réaliser une injection intrapéritonéale de kétamine (Virbac France, 75 mg/kg) et médétomidine (Domitor, 0,5 mg/kg) pour induire une anesthésie profonde ainsi que l'injection sous cutanée d'analgésique (Buprénorphine, 0,05 mg/kg) en prémédication et sans réaliser de contention vigile. Le temps que cette prémédication et que les anesthésiants fassent effet, le dos et les pattes postérieures des souris sont rasés et désinfectés.

La procédure chirurgicale débute avec une incision dorsale à la base du cou à la première gibbosité, les tissus sous-cutanés sont décollés et la graisse brune refoulée vers la tête de l'animal. Les muscles spinaux sont ensuite incisés latéralement, parallèlement à la moelle épinière, pour permettre la saisie de cette dernière. Le corps vertébré est ensuite recouvert d'anesthésique (Lidor, 4 mg/kg) pendant 2 min avant de procéder à une incision perpendiculaire de celui-ci entre les vertèbres T11 et T12. Une deuxième incision permet de sectionner la moelle épinière alors exposée. Les saignements sont résorbés avec un coton tige stérile tandis que les muscles spinaux sont suturés avec du fil résorbable 4/0. Les éléments graisseux et cutanés sont alors remis en place et suturés avec du fil 4/0. Les animaux contrôles « SHAM » subissent les mêmes gestes chirurgicaux à l'exception de l'incision des vertèbres et de la moelle épinière.

La procédure expérimentale est complétée par l'injection de 75 µL de CDTX dans chaque chef du MG droit, soit 150 µL par patte, la patte opposée servant de contrôle et étant injecté avec du PBS (diluent de la cardiotoxine) dans les mêmes volumes. La procédure se conclut par l'injection intrapéritonéale d'atipamezole (Antisedan, 1 mg/kg), un inhibiteur de la médétomidine. La surveillance se poursuit jusqu'au réveil de l'animal. Le soir même les souris reçoivent une injection sous-cutanée d'antibiotique (Baytril, 10 mg/kg) et de 300 µL d'une solution NaCl.

1.1.3.2 Suivi de l'animal

Chaque jour, le suivi des animaux est effectué par le biais d'une feuille de score permettant d'apprécier l'état physique et comportemental des animaux (Annexe 0). Celle-ci comprend entre autres la pesée des souris permettant de suivre une perte de poids trop sévère mais aussi l'évaluation de leur comportement social vis-à-vis des autres animaux ou encore la complétion de la paralysie des membres postérieurs. Les animaux dont la section médullaire n'est que partielle ont été exclus des différents groupes d'analyses. Enfin, ce score permet de déterminer le seuil critique d'un animal en souffrance, tout score de 3 dans une catégorie ou un score général supérieur à 10/18 entraînant une euthanasie précoce de ce dernier. Par ailleurs les animaux spinalisés nécessitent deux vidanges vésicales par jour, le matin à 8h et le soir à 18h jusqu'à leur euthanasie à J2, J4 ou J7 post induction. La technique de miction utilisée est semblable à la manœuvre de Crédé, où l'opérateur exerce une pression manuelle et constante sur la vessie. Ces visites bijournalières permettent aussi l'injection d'analgésique (Buprénorphine, 0,05 mg/kg) le matin et d'antibiotique (Baytril, 10 mg/kg) et NaCl (300 µL) matin comme soir, afin de faciliter la réhydratation des animaux. La réhydratation passe aussi par l'ajout dans les cages d'hydrogels riches en nutriments.

1.1.3.3 Euthanasie et prélèvements biologiques

L'euthanasie de l'animal est réalisée par surdosage de pentobarbital (Dolethal, 1 mL/kg) sous anesthésie transitoire à l'isoflurane. Les MG sont prélevés par sections des tendons puis plongés et congelés instantanément dans l'isopentane refroidi à l'azote liquide pour les analyses histologiques et moléculaires sur muscle total. Pour le tri des populations cellulaires du muscle, les MG récupérés ont été brièvement conservés dans du PBS à 4°C avant la procédure expérimentale d'isolement.

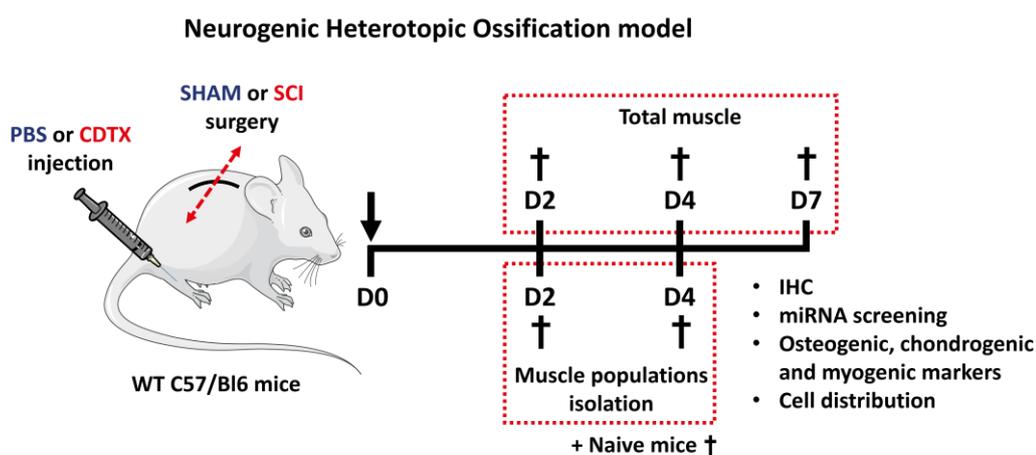


Figure 30 : Modèle murin de POAN et démarche expérimentale associée

1.1.3.4 Isolement des populations d'intérêt

Le protocole d'isolement des FAPs, MPs, macrophages et ECs est adapté de la publication de Latroche *et al.* [318]. Celui-ci consiste en l'élimination des tissus tendineux résiduels, le broyage mécanique du tissu musculaire et sa digestion par la collagénase B (10 mg/mL, 11 088 831 001, Roche) et la dispase II (2,4 U/mL, 17101015, Gibco) à 37°C pendant 30 min. La réaction est arrêtée par l'ajout d' α MEM, 50% SVF, et la suspension cellulaire est filtrée sur tamis 70 μ m et reprise dans un tampon FACS (PBS, 2% SVF, 2 mM EDTA). Les érythrocytes sont lysés avec un tampon industriel (130-094-183, Miltenyi). La suspension cellulaire est numéree puis incubée pendant 30 min avec un bloqueur des récepteurs Fc (130-092-575, Miltenyi) et enfin en présence des anticorps ou isotypes aux concentrations décrites dans le tableau ci-dessous (**Tableau 1**). Après incubation, les cellules sont lavées et filtrées sur tamis 30 μ m en amont du tri.

Isotypes	Fournisseur	Référence	m_i	[c]_i	m_f	V_f
Rat IgG2a Isotype FITC	Invitrogen	11-4321-80	25 μ g	0,5 μ g/ μ L	1,25 μ g	2,5 μ L
Rat IgG2b Isotype PE	Invitrogen	12-4031-82	100 μ g	0,2 μ g/ μ L	0,1 μ g	0,5 μ L
Rat IgG2b Isotype eFluor 450	Invitrogen	48-4031-82	100 μ g	0,2 μ g/ μ L	0,1 μ g	0,5 μ L
Rat IgG2a Isotype PerCP-Cy5-5	Invitrogen	45-4321-80	25 μ g	0,2 μ g/ μ L	0,1 μ g	0,5 μ L
Rat IgG2a Isotype APC-eFluor 780	Invitrogen	47-4321-82	100 μ g	0,2 μ g/ μ L	0,25 μ g	1,25 μ L
Rat IgG2a Isotype PE-Cy7	Invitrogen	25-4321-82	100 μ g	0,2 μ g/ μ L	0,6 μ g	3 μ L
Rat IgG2B Isotype Alexa Fluor 647	Biotechne	IC013R	200 tests	5 μ L/10 ⁶ cells	NA	1 μ L
Anticorps	Fournisseur	Référence	m_i	[c]_i	m_f	V_f
Anti CD34-FITC	Invitrogen	11-0341-82	100 μ g	0,5 μ g/ μ L	1,25 μ g	2,5 μ L
Anti CD45-PE	Invitrogen	12-0451-82	100 μ g	0,2 μ g/ μ L	0,1 μ g	0,5 μ L
Anti CD31-eFluor450	Invitrogen	48-0311-82	100 μ g	0,2 μ g/ μ L	0,1 μ g	0,5 μ L
Anti Sca1-PerCP-Cy5.5	Invitrogen	45-5981-82	100 μ g	0,2 μ g/ μ L	0,1 μ g	0,5 μ L
Anti F4/80 APC-eFluor780	Invitrogen	47-4801-82	100 μ g	0,2 μ g/ μ L	0,25 μ g	1,25 μ L
Anti CD140a PE-Cy7	Invitrogen	25-1401-82	100 μ g	0,2 μ g/ μ L	0,6 μ g	3 μ L
Anti α 7 integrin-647	Biotechne	FAB3518R	100 μ g	0,2 μ g/ μ L	2,5 μ g	12,5 μ L

Tableau 1 : Anticorps utilisés pour l'isolement et le tri des différents acteurs de la régénération musculaire

La stratégie de tri se base sur l'utilisation de 7 fluorochromes différents, nécessitant les contrôles appropriés : isotypes contrôles puis chaque fluorochrome seul et enfin tous les fluorochromes moins un, répété pour chacun. Les populations

d'intérêt sont ensuite isolées suivant les marqueurs phénotypiques indiqués ci-dessous, en tenant compte des paramètres de taille et de singularité abordés précédemment (**Tableau 2**).

Population cellulaire	Marqueurs
Macrophages	CD45⁺ F4/80⁺
Cellules endothéliales	CD45 ⁻ F4/80 ⁻ Sca1⁺ CD31⁺ CD34⁺
Cellules satellites	CD45 ⁻ F4/80 ⁻ Sca1 ⁻ CD31 ⁻ CD34^{low} α7intégrine⁺
Progéniteurs Fibro-Adipogéniques	CD45 ⁻ F4/80 ⁻ Sca1⁺ CD31⁻ CD34⁺ CD140⁺

Tableau 2 : Récapitulatif de la stratégie d'isolement et tri des différents acteurs de la régénération musculaire

Une première étape permet de séparer les macrophages avec le marqueur de la lignée hématopoïétique CD45 et monocytaire/macrophagique F4/80. Les FAPs, MPs et ECs sont ensuite séparées en fonction de leur expression de Sca-1, non exprimé par les MPs, et du CD31, un marqueur des cellules endothéliales. L'isolement de ces populations est ensuite confirmé par l'expression du CD34, du PDGFR α ou de l'intégrine α 7. A la fin du tri, les suspensions cellulaires sont centrifugées et reprises dans 700 μ L de réactif de lyse QIAzol (79306, Qiagen) pour l'extraction des ARNm et miARN.

1.2 Modèles fonctionnels

1.2.1 Isolement de monocytes et macrophages CD14⁺ et production de milieux conditionnés

Les couches leuco-plaquettaires provenant de filtres de déleucocytation issus de dons de sang totaux sont récupérés au service de préparation du centre de transfusion sanguine des armées et centrifugées sur un gradient Ficoll (Pancoll, Pan-Biotech) (**Figure 31**). Les PBMC sont dénombrés puis les monocytes et macrophages sont triés des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) via une incubation et marquage par un anticorps anti-CD14 (130-050-201, Miltenyi Biotec). Ce dernier est couplé avec des billes magnétiques et va être retenu lors du passage dans une colonne de rétention MicroBeads sur aimant (130-042-401, Miltenyi Biotec) et élué avec un tampon PBS, 2 mM EDTA, 20% albumine. Les monocytes et macrophages CD14⁺ ainsi retenus puis élués sontensemencés à 1,25.10⁶ cellules/mL en plaque 48 puits, puis cultivés en milieu α -MEM à 10% SVF décomplémenté, 1% P/S et stimulés ou non aux lipopolysaccharides (LPS) (100 ng/mL, L6529, Sigma). Les surnageants sont centrifugés après 3 jours d'incubation et congelés à -80°C [319]. Ils seront par la suite présentés sous la dénomination MC LPS- et MC LPS+, regroupés et utilisés au 1:10 lors de la réalisation de tests de différenciation ostéogénique.

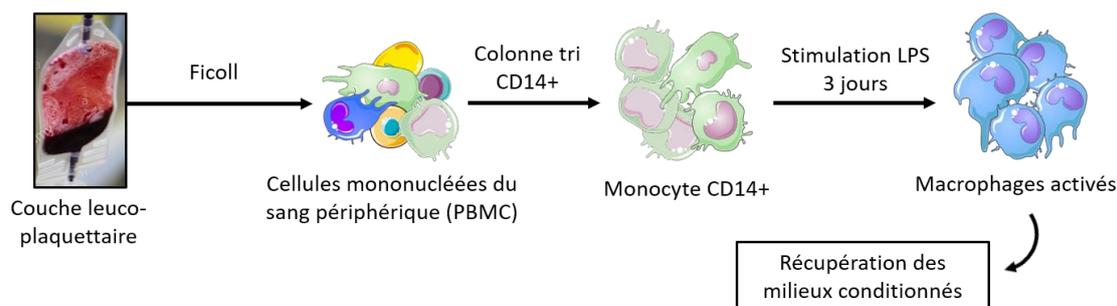


Figure 31 : Stratégie de tri et d'activation des CD14⁺ isolés à partir de PBMC de dons de sang

1.2.2 Transfection

Les transfections des oligonucléotides d'intérêts ont été effectuées sur populations cellulaires entre 70 et 80 % de confluence via l'utilisation d'inhibiteurs (miRCURY LNA Power Inhibitors, 339121, Qiagen) et d'analogues « mimics »

(miRCURY LNA Mimics, 339173, Qiagen) de miARN. Les concentrations utilisées ont fait l'objet d'une mise au point afin d'éviter une saturation des complexes RISC comme décrit par Khan *et al.* et ont été déterminées à 10 nM pour les inhibiteurs et 1 nM pour les mimics [218]. La procédure expérimentale consiste à incuber les oligonucléotides avec un vecteur lipidique (Lipofectamine RNAimax, 13778075, ThermoFisher) à raison de 1,5 µL/mL final dans de l'α-MEM dépourvu de SVF et antibiotiques. Pour se faire, 5 nmol d'oligonucléotides sont resuspendus dans 75 µL d'eau stérile à une concentration de 66,6 µM puis 5 µL de cette solution sont dilués pour atteindre une concentration de 10 µM prête à l'emploi (10X). Pour chaque condition, les oligonucléotides et la lipofectamine doivent être respectivement dilués dans 25 µM d'α-MEM avant d'être ajouté l'un dans l'autre. Cette solution est ensuite incubée pendant 5 min à température ambiante afin de charger les complexes lipidiques avec les oligonucléotides, puis elle est ajoutée aux populations cellulaires d'intérêt en culture depuis 24h. Après 48h de transfection, le milieu contenant le vecteur et les oligonucléotides est remplacé par un nouveau milieu d'intérêt en fonction de la procédure voulue. L'efficacité de transfection est évaluée via l'utilisation d'oligonucléotides contrôles fluorescents en cytométrie en flux.

1.2.3 Test de différenciation ostéogénique

Les différentes populations de progéniteurs musculaires isolées du muscle et CSM de moelle osseuse sont ensemencées à 6300 cellules/cm² en milieu α-MEM à 10% SVF décomplémenté, 1% P/S dans des plaques 24 puits. Après 3 jours d'incubation, le milieu est remplacé par un milieu d'induction ostéogénique composé d'α-MEM à 10% SVF décomplémenté, 1% P/S, 0,052 µg/mL de dexaméthasone (D-1159, 50mg, Sigma), 12,8 µg/mL d'acide ascorbique (A-8960, 5g, Sigma) et 2,15 mg/mL de β-glycérophosphate (G-9422, 10g, Sigma) ou du milieu contrôle (α-MEM, 10% SVF décomplémenté, 1% P/S). Les cellules sont cultivées pendant 14 jours avec deux renouvellements de milieu par semaine par renversement [320]. Les milieux conditionnés de macrophages sont utilisés au 1:10 à chaque changement de milieu pour les conditions concernées. En fin d'induction ostéoblastique, les cellules sont lavées trois fois au PBS puis fixées à l'éthanol 70%. Elles sont ensuite lavées à l'eau distillée et incubées 5 min en présence d'une solution de rouge alizarine à 20 g/L, préfiltrée et tamponnée à pH 4,2 (A5533-25G, Sigma-Aldrich). Le colorant en excès est éliminé par 3 lavages à l'eau distillée. Le colorant fixé à la matrice calcique minéralisée, typique de la différenciation ostéogénique, a ensuite été extrait avec une solution d'acide chlorhydrique à 0,5N à

5% SDS et dosé en fonction d'une gamme étalon de 10 à 200 mg/L de rouge alizarine [321]. L'absorbance à 415 nm est mesurée sur un lecteur de plaque.

1.2.4 Modèle de coculture FAPs et macrophages

Les FAPs sontensemencées à 6300 cellules/cm² en milieu α -MEM à 10% SVF décomplémenté, 1% P/S dans des plaques 24 puits. En parallèle, les CD14⁺ isolées de PBMC sontensemencées à 1,14.10⁶ cellules/cm² dans des transwell 1,0 μ m avec ce même milieu de culture (MCRP24H48, Miltenyi). Les transfections CD14⁺ sont ensuite réalisées comme décrit en 1.2.2 puis celle-ci sont activés 72h aux lipopolysaccharides (LPS) (100 ng/mL, L6529, Sigma). Les surnageants de culture sont récupérés et congelés à -80°C tandis que les transwell sont ajoutés aux puits de culture de FAPs préalablement induits en différenciation ostéogénique tel que décrit en 1.2.3. pour 14 jours avant révélation au rouge alizarine.

1.2.5 Test de différenciation adipogénique

Les FAPs sontensemencées à 4000 cellules/cm² dans des plaques 24 puits. A la confluence des cellules, quatre cycles d'induction adipogéniques sont induits par alternance entre un milieu de maintenance, DMEM high glucose (Gibco), 10 % de SVF, 1% P/S et insuline à 0,01 mg/mL (Sigma), et d'un milieu d'induction adipogénique, DMEM high glucose, 10 % SVF, 1% P/S, insuline à 0,01 mg/mL, dexaméthasone 1 μ mol/L, indométacine 0,2 mmol/L (Sigma) et IBMX 0,5 mmol/L (Sigma). Lors des trois premiers cycles (lundi-jeudi, vendredi-lundi, mardi-vendredi), les cellules alternent entre milieu d'induction et milieu de maintenance. Lors du dernier cycle (lundi-vendredi), le milieu est changé pour du milieu de maintenance uniquement. Un puit contrôle est traité en milieu de maintenance pendant toute la durée de l'expérimentation. Au bout des quatre cycles, à 21 jours, les cellules sont fixées à l'éthanol et marquées à l'Oil Red O afin de visualiser la formation de gouttelettes lipidiques typique de la différenciation adipocytaire (kit Cayman Chemical).

1.2.6 Test de différenciation chondrogénique

Les FAPs sont placées en suspension dans un tube de 15 mL à raison de 250 000 cellules par tube afin de former des sphéroïdes. Après centrifugation douce pendant 5 min sans frein, le culot cellulaire est repris dans du milieu chondrogénique incomplet, DMEM high glucose, 10 % SVF, 1% P/S, 0,1 μ M de

dexaméthasone, 0,35 mM de L-proline (Sigma), ITS 1X (Sigma), acide linoléique à 5,3 µg/mL (Fluka), acide ascorbique à 0,17 mmol/L (Sigma) et 1,25 mg/mL d'albumine, puis remis en centrifugation douce pendant 5 min sans frein. Le culot cellulaire est repris dans 1mL de milieu chondrogénique complet, milieu incomplet supplémenté de 0,01 µg/mL de TGF-β3 (Sigma) ou incomplet pour les contrôles. Chaque tube est enfin remis en centrifugation douce pendant 5 min sans frein. Ceux-ci sont incubés à 37°C avec le bouchon entrouvert pour permettre les échanges gazeux. Le milieu est changé tous les deux ou trois jours avec 500 µL de milieu complet ou incomplet. Après 21 jours de culture, les chondrocytes forment alors des sphéroïdes qui sont fixées au formol et incluses en paraffine. Une coloration au bleu alcian est alors réalisée sur des coupes de 5 µm afin de mettre en évidence la matrice de glycosaminoglycane typique de la différenciation chondrogénique.

Pour les tests de transdifférenciation chondro-ostéogénique, les FAPs sont ensemencées à 6300 cellules/cm² en milieu α-MEM à 10% SVF décomplémenté, 1% P/S dans des plaques 24 puits. Après 3 jours, elles sont passées en milieu de différenciation chondrogénique DMEM high glucose, 10 % SVF, 1% P/S, 0,1 µM de dexaméthasone, 0,35 mM de L-proline (Sigma), ITS 1X (Sigma), acide linoléique à 5,3 µg/mL (Fluka), acide ascorbique à 0,17 mmol/L (Sigma), 1,25 mg/mL d'albumine et 0,01 µg/mL de TGF-β3 (Sigma) ou milieu contrôle puis incubées dans une chambre à hypoxie à 5 % O₂. Le milieu est renouvelé au bout de 3 jours puis celui-ci est changé pour un milieu de différenciation ostéogénique décrit en 1.2.3 renouvelé tous les 3 jours pendant une semaine. Les milieux conditionnés de macrophages sont utilisés au 1:10 à chaque changement de milieu pour les conditions concernées.

1.3 Caractérisations cellulaires et tissulaires

1.3.1 Cytométrie en flux et phénotypage

Pour chaque donneur et chaque marquage APC/PE, 100 000 cellules sont resuspendues dans 18 μ L de tampon FACS, PBS 1X w/o Ca^{2+} Mg^{2+} , albumine 2% (56446995, LFB), IgGh humaines à 2mg/mL (1-001-A, R&D Systems). Les cellules sont incubées avec 2 μ L d'anticorps primaires pendant 20 min à 4°C (**Tableau 3**). La suspension cellulaire est centrifugée à 400 g pendant 2 min à 4°C puis les culots sont lavés deux fois au PBS avant d'être repris dans 200 μ L de PBS 1% formol. Les cellules sont ensuite phénotypées par cytométrie en flux (Cytoflex, Beckman Coulter). L'analyse des résultats est effectuée avec FlowJo. La stratégie pour évaluer les cellules positives à un marqueur est établie par rapport aux contrôles isotypiques négatifs après présélection de la population d'intérêt selon les mêmes critères de taille, viabilité et singularité décrits lors de l'isolement des CSM.

Anticorps	Fournisseur	Référence	Clone	[c]
Anti CD31-PE	BD Pharmingen	555446	WM59	1:10
Anti CD34-APC	Beckman Coulter	IM2472	581	1:10
Anti CD45-APC	Beckman Coulter	IM2473	J33	1:10
Anti CD56-PE	BD Pharmingen	555516	B159	1:10
Anti CD73-PE	BD Pharmingen	550257	AD2	1:10
Anti CD90-APC	BD Pharmingen	561971	5E10	1:10
Anti CD105-PE	Beckman Coulter	AO7414	Poly	1:10
Anti PDGFR α -Biotine	R&D Systems	BAF322	Poly	1:10

Tableau 3 : Anticorps utilisés pour le phénotypage des progéniteurs musculaires, FAPs et MPs, issus de muscle de patient POAN

1.3.2 Extraction des ARNm et miARN

Les ARN totaux ont été extraits des MG entiers de souris POAN, des populations isolées de MG ou de progéniteurs musculaires cultivés en utilisant le réactif de lyse QIAzol (79306, Qiagen) et une extraction au chloroforme dans un ratio de 5:1 (C2432, Sigma-Aldrich). Après forte agitation, une centrifugation à 12 000 g à 4°C pendant 15 min permet de séparer la phase aqueuse de la phase

organique. Cette dernière est délicatement récupérée puis les ARN sont précipités à l'isopropanol (34965, Sigma-Aldrich) en présence de glycoène coprécipitant permettant la visualisation des culots (GlycoBlue, AM9515, Ambion) pendant 20 min à -20°C. Les culots ainsi formés à la suite d'une centrifugation à 12 000 g pendant 10 min à 4°C sont lavés deux fois à l'éthanol 75 % (20824.321, BDH Chemicals) avant d'être remis en suspension dans de l'eau stérile. La concentration et la pureté de l'ARN total ont été quantifiés par NanoDrop (ThermoFisher), pré-diluée à 20 ng/μL pour l'évaluation des ARNm et/ou 5 ng/μL pour les miARN puis stockée à -80°C.

En amont de l'extraction, les coupes de MG entiers ont été lysées mécaniquement par l'utilisation de billes de céramiques dans un TissueLyser II (Qiagen), 2 min à 30 aller-retour/sec à froid. Par ailleurs, l'extraction des ARN totaux en solution aqueuse a été réalisée avec du Trizol LS (10296010, ThermoFisher) au ratio 1:4 puis en suivant les mêmes étapes décrites ci-dessus.

1.3.3 RT et RT-qPCR

Pour les ARNm, les transcriptions inverses ont été réalisées avec le kit QuantiTect Reverse Transcription Kit (205311, Qiagen). L'ADN génomique de 100 ng d'échantillon ARN extraits est dégradé avec 2 μL de tampon gDNA Wipeout PCR pendant 2 min à 42°C puis incubé sur glace. Le mix réactionnel composé de 1 μL de transcriptase inverse (TR), 4 μL de tampon Quantiscript contenant les nucléotides et 1 μL d'amorces pour la TR est ajouté à chaque condition et incubé 30 min à 42°C pour générer l'ADNc, puis inactivée 3 min à 95°C. Les ADNc post-RT ont été dilués au 1:80 avant l'amplification par RT-qPCR à l'aide des kits QuantiTect SYBR Green RT-PCR (204243, Qiagen). Brièvement, 2 μL d'ADNc sont mis en contact de 5 μL de mix réactionnel SYBR Green, 1 μL de mix d'amorce sens et anti-sens et 2 μL d'eau stérile. Les réactions subissent ensuite une activation de la polymérase pendant 15 min à 95°C puis 45 cycles décomposés en 15 sec de dénaturation à 94°C, 25 sec d'hybridation à 55°C et 20 sec d'extension à 72°C. En fin de réaction, une montée en température progressive jusqu'à 95°C permettra de libérer le SYBR Green incorporé et de confirmer la taille et la spécificité de tous les produits formés.

Pour les miARN, les transcriptions inverses ont été réalisées avec le kit miRCURY LNA RT (339340, Qiagen). 10 ng d'échantillon ARN extraits est ajouté au mix réactionnel composé de 1 μL de transcriptase inverse (TR), 2 μL de tampon miRCURY contenant les nucléotides et 5 μL d'eau stérile puis incubé 60 min à 42°C pour générer l'ADNc, et enfin inactivée 5 min à 95°C. Les ADNc post-RT ont été dilués au 1:20 avant l'amplification par RT-qPCR à l'aide des kits miRCURY LNA

SYBR Green (339345, Qiagen). Brièvement, 4 μ L d'ADNc sont ajoutés à 5 μ L de mix réactionnel SYBR Green et 1 μ L de mix d'amorce 5' ou 3'. Les réactions subissent ensuite une activation de la polymérase pendant 2 min à 95°C puis 45 cycles décomposés en 10 sec de dénaturation à 95°C, et 60 sec d'hybridation et d'extension combinés à 56°C. En fin de réaction, une montée en température progressive jusqu'à 95°C permettra de libérer le SYBR Green incorporé et de confirmer la taille et la spécificité de tous les produits formés. Enfin, le criblage des miARN des souris POAN a été réalisé à l'aide du panel miRNome Mouse&Rat I+II (V5, 339322, Qiagen).

Des contrôles négatifs de RT ont été réalisés en remplaçant l'ARN extrait par de l'eau stérile et de façon similaire pour les PCR en remplaçant l'ADNc par de l'eau stérile. Ces deux contrôles permettant de valider la RT-qPCR en l'absence de tout signal.

1.3.4 Méthode de normalisation

Pour chaque modèle expérimental, plusieurs gènes ou miARN de références ont été mesurés, les plus stables ont été sélectionnés à l'aide du logiciel Genorm (v3.4) utilisé pour la normalisation [322]. Les échantillons ont ainsi pu être normalisés en adaptant la méthode de Livak via la réalisation d'une moyenne géométrique de $1,9^{(\Delta Ct \text{ par rapport au gène de référence})}$ des trois gènes ou miARN de référence.

Les gènes de référence suivants ont été utilisés dans leurs modèles expérimentaux respectifs :

- Criblage muscle total, FAPs, MPs et macrophages isolés du modèle murin de POAN (*in vivo*) : Hprt, Rplp0, Ppia
- Progéniteurs musculaires (FAPs et MPs) isolés de muscle de patient POAN (*in vitro*) : FGFR1, ITGA1, BGN

Les miARN de référence suivants ont été utilisés dans leurs modèles expérimentaux respectifs :

- Criblage muscle total POAN : hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-125b-5p
- FAPs et MPs du modèle murin POAN : hsa-miR-23b-3p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-125b-5p
- Macrophages modèle murin POAN : hsa-miR-23b-3p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-27b-3p

- Progéniteurs musculaires *in vitro* : hsa-miR-24-3p, hsa-miR-103a-3p, hsa-miR-143-3p

Toutes les séquences utilisées sont disponibles dans la section VIII - 1.6 des annexes.

1.3.5 ELISA

Les concentrations protéiques en solution ont été dosées via des kit ELISA DuoSet de chez R&D Systems, IL-1 β (DY501), IL-1 α (DY200), IL-1RA (DY280), IL-6 (DY206), IL-6R (DY227), TNF- α (DY510).

1.3.6 Extraction protéique

Les tapis cellulaires sont lavés du milieu de culture précédant contenant du SVF au PBS et incubés 10 min sur glace en présence de tampon de lyse protéique à raison de 8 μ L/cm², PBS, 1 % de NP40 (Sigma), 1 % Triton X-100 (Prolabo), 0,1% de SDS (Fluka), et 5 mg/mL d'acide désoxycholique (Sigma). Un cocktail d'inhibiteur des protéases (11697498001, Roche) et des phosphatases 1 et 2 (Sigma) est ajouté extemporanément. Le tapis cellulaire est ensuite récupéré au râteau pendant 1 min afin de lyser mécaniquement les cellules puis incubé 20 min sur glace dans le tampon de lyse protéique avant une centrifugation de 13 000 g pendant 15 min à 4°C. Chaque échantillon est ensuite congelé à -80°C ou directement dosé par l'utilisation d'un kit BCA ((23252, ThermoFisher).

1.3.7 Western Blots

Des gels StainFree de polyacrylamide à 10 % en présence de sodium dodécylsulfate sont préparés (SDS-PAGE). Le gel de concentration, la partie supérieure, est produit à partir de l'addition des solutions de concentrations A et B au ratio 1:1 (1610183, BioRad), supplémenté de 0,5 % d'APS (Biorad) et 0,05 % de Temed (Biorad). Le gel de résolution, la partie inférieure, est réalisée à partir de l'addition des solutions de résolution A et B au ratio 1:1, supplémenté de 0,5 % d'APS et 0,05 % de Temed. Les gels coulés par ce kit incorporent des groupement trihalo permettant le marquage des groupements tryptophane et ainsi de l'ensemble du protéasome via la fluorescence présente sur chaque bande et ainsi quantifier les protéines d'intérêt sur celui-ci plutôt que sur une seule protéine de référence.

Les échantillons issus des extractions protéiques sont placés sur glace et dilués avec un tampon Laemmli, eau distillée, 1 % de SDS (Invitrogen), 5 % de β -mercaptoéthanol (Sigma), 0,05 mol/L de TRIS base (Sigma), 20 % Glycérol (Sigma), et 0,025 % de bleu de bromophénol (SERVA) en respectant un ratio 1:1. Une incubation de 3 min à 95°C est réalisée pour dénaturer les protéines avant d'être incubées sur glace. 40 μ g de protéine par échantillon et le marqueur de poids (BioRad) sont déposés dans les puits des gels et leur migration est initiée dans du tampon de migration, eau distillée, 24,8 mmol/L de Tris base, 152 mmol/L de Glycine (Sigma), 0,1 % de SDS, pH 8,3, sous 200V de tension jusqu'à l'arrivée du front de migration en bas du gel.

A la fin de la migration, une activation des groupements trihalo contenus par le gel StainFree est nécessaire afin de les lier de façon covalente aux groupements tryptophane des protéines ayant migrées. Celle-ci est réalisée par une exposition de 45 sec aux UV sur un imageur BioRad. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de PVDF dans du tampon de transfert, eau distillée, 24,8 mmol/L de Tris base, 152 mmol/L de Glycine et 5 % de méthanol, sous 25V de tension et 1,25 A d'intensité pendant 10 min (Trans-Blot Turbo, BioRad). A la fin du transfert, la qualité de ce dernier est vérifiée sur l'imageur ChemiDoc, une photo est prise pendant 1 min d'exposition et permettra par la suite la normalisation des protéines d'intérêt entre les différents échantillons.

La membrane de PVDF est ensuite découpée au niveau des protéines d'intérêt. Après un rinçage de la membrane à l'eau distillée, la membrane est incubée dans du tampon de blocage, PBS à 5% de protéines de lait, sous agitation et à température ambiante pendant deux heures. Les anticorps primaires sont dilués à leur concentration d'utilisation dans du tampon de blocage puis les membranes sont incubées à 4°C sur la nuit (**Tableau 4**).

Le lendemain, les membranes sont lavées avec du tampon PBS contenant 2 % de Tween 20, pendant trois cycles de 10 min sous agitation. Les membranes sont ensuite incubées avec l'anticorps secondaire anti-lapin couplé à l'HRP (ab205718, Abcam) dilué dans du tampon de blocage pendant 1 heure. Les membranes sont ensuite lavées dans du tampon de lavage pendant trois cycles de 10 min sous agitation. La révélation est réalisée par l'addition d'ECL (170-5061, BioRad) et le signal de chimiluminescence est acquis sur l'imageur ChemiDoc. Les données sont finalement analysées à l'aide du logiciel Image Lab et la densité de chaque bande est normalisée sur l'intensité totale de sa piste.

Anticorps	Fournisseur	Référence	[c]
HRP	Abcam	ab205718	1:200000
OSX/SP7	Abcam	ab209484	1:500
SOX9	Abcam	ab185966	1:1000
RUNX2	Abcam	ab192256	1:1000
MTOR	CST	#29785	1:1000
ATF4	CST	#25177	1:1000

Tableau 4 : Anticorps utilisés en Western Blot

1.3.8 Dosage de l'activité de la phosphatase alcaline

L'activité de la phosphatase alcaline (PAL) a été dosée en suivant les instructions du fournisseur (AP0100, Sigma). Brièvement, le tapis cellulaire est récupéré de façon similaire à la réalisation de Western Blot détaillée précédemment. Après dosage des protéines totales, les échantillons sont mis en présence d'un substrat de la PAL, le pNPP, qui va être hydrolysé par l'enzyme et générer une augmentation de l'absorbance à 405 nm. La mesure de cette absorbance en fonction de la concentration en protéine totale permet de déterminer l'activité enzymatique de la PAL.

1.3.9 Contrôle de la viabilité cellulaire

Afin de déterminer la viabilité cellulaire à la suite des transfections, les cellules transfectées ont été marquées par du DAPI à 5 µg/mL pendant 5 min. La fluorescence témoignant de l'incorporation de DAPI et donc de mortalité cellulaire a par la suite été quantifiée en cytométrie en flux (CytoFLEX, Beckman Coulter).

1.3.10 Histologie et immunohistochimie

Les marquages histologiques ont été réalisés sur des cryosections de 8 µm séchées puis colorées à l'hématoxyline-phloxine safran (HPS) (Dako). Pour la coloration Von Kossa, ces cryosections ont été incubées dans 1% de nitrate d'argent 30 min à température ambiante dans l'obscurité, suivis de 15 min d'incubation dans une chambre UV et d'une contre-coloration au rouge nucléaire. Toutes les sections ont été analysées à l'aide d'un scanner de lames Panoramic Midi II sur le logiciel Case Viewer (3D HISTECH Ltd.).

Pour les colorations immunohistochimiques, les cryosections ont été fixées au paraformaldéhyde (PFA) à 4 % pendant 10 min, puis perméabilisées 15 min dans du PBS-Triton 0,5 % et enfin pendant 1h dans du PBS-BSA 1 % à température ambiante. Les sections des MG ont été incubées avec des anticorps polyclonaux de lapin anti-laminine, anti-ostéocalcine ou anti-collagène III dans du PBS-BSA 1% pendant la nuit à 4°C (**Tableau 5**). Une IgG polyclonale de lapin correspondante a été utilisée comme contrôle négatif. Les coupes ont été lavées avec du PBS puis incubées avec des anticorps secondaire anti-lapin Alexa Fluor 594 ou anti-lapin Alexa Fluor 488 dans du PBS-BSA 1% 1h à RT. Les lames ont finalement été montées avec une solution Vectashield antifade et DAPI (Vector). Toutes les sections ont été analysées à l'aide d'un microscope à fluorescence inversée (DMI8, Leica) et du logiciel Fiji (ImageJ).

Anticorps	Fournisseur	Référence	[c]
Anti-Laminine	ab11575	Abcam	1:200
Anti-Ostéocalcine	ab93876	Abcam	1:100
Anti-Collagène III	ab7778	Abcam	1:500
Anti-lapin Alexa Fluor 594	R37119	ThermoFis-	1:500
Anti-lapin Alexa Fluor 488	A-11008	ThermoFis-	1:500
IgG de lapin	ab-105-c	Biotechne	1:300

Tableau 5 : Anticorps utilisés pour les analyses histologiques et immunohistochimiques

1.4 Statistiques

Les graphiques et analyses statistiques ont été réalisées sous la version 9.1.1 de Graphpad Prism. Tous les histogrammes représentent la moyenne des jeux de données tandis que les barres d'erreurs représentent les écarts types (SD) des différents échantillons biologiques. Les différences statistiques ont été calculées à l'aide du test U de Wilcoxon-Mann-Whitney non paramétrique pour les comparaisons simples en absence de distribution normale ou avec le t test de Student et le test de correction de Welch lorsque l'égalité des variances n'a pu être vérifiée. Pour les comparaisons multiples, un test non paramétrique de Friedman pour les mesures appariées corrigé par le test post-hoc de Dunn ou des ANOVA une voie avec correction post hoc de Tukey ont été réalisées. Enfin des ANOVA deux voies avec correction post hoc de Tukey ou de Šidák ont été respectivement réalisées pour les comparaisons multiples intra-groupes ou inter-groupes. Dans tous les cas, la valeur-p est indiquée directement ou en fonction de la nomenclature suivante : *=p<0,05, **=p<0,01, ***=p<0,001.

V - Résultats

1 Chapitre 1 : Caractérisation du microenvironnement musculaire des POAN

1.1 Introduction

Nous avons dans un premier temps choisi de caractériser l'environnement musculaire précoce dans le modèle murin de POAN [32]. Ce premier chapitre va permettre d'introduire ce modèle au travers d'une description histologique et immunohistochimique complétée par une caractérisation des acteurs transcriptomiques du tissu musculaire où se développent les POAN. Nous avons ensuite réalisé un criblage des miARN dans le muscle squelettique entier.

Les objectifs de ce chapitre sont d'établir un profil de miARN dérégulés positivement ou négativement aux temps précoces de la pathogenèse ainsi que leur évolution, et d'identifier les différents acteurs moléculaires impliqués dans ces processus d'ossification du tissu musculaire.

Nous avons prélevé le muscle gastrocnémien (MG) à 2, 4 et 7 jours après induction des POAN dans 4 groupes expérimentaux : PBS+SHAM, injection de PBS et chirurgie contrôle ; PBS+SCI, injection de PBS et spinalisation de l'animal ; CDTX+SHAM, injection de cardiotoxine et chirurgie contrôle ; CDTX+SCI, injection de cardiotoxine et spinalisation de l'animal (**Figure 32**). Ces muscles ont été rapidement congelés entiers dans l'isopentane glacial avant de réaliser des cryosections transversales ou d'en extraire les ARN.

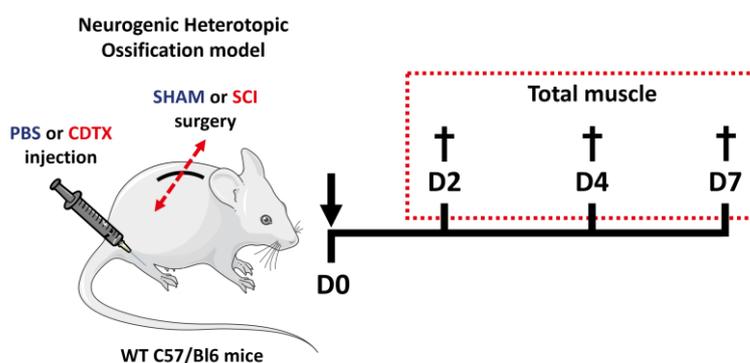


Figure 32 : Représentation schématique du modèle murin de POAN combinant lésion musculaire et neurologique pour l'étude du muscle entier

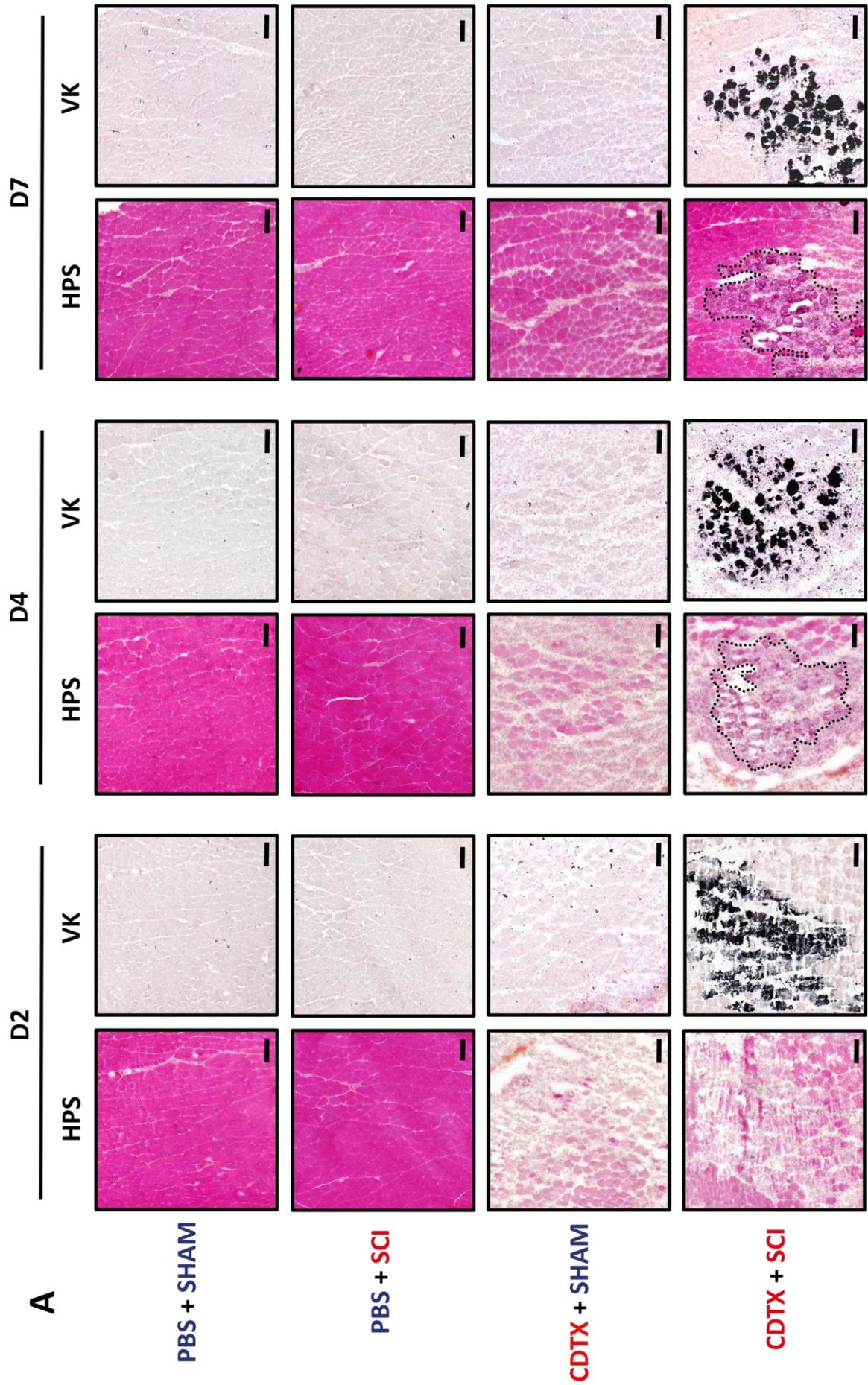
1.2 Résultats

1.2.1 Développement des POAN dans le muscle endommagé chez la souris neurolésée

Nous avons tout d'abord réalisé un marquage Hématoxyline Phloxine Safran (HPS) marquant les noyaux en violet, les cytoplasmes en rose et les fibres de collagènes en rose orangé (**Figure 33**). La nécrose des myofibres associée à une importante infiltration de cellules mononuclées observées à J2 et J4 dans les conditions CDTX témoigne du succès de la lésion musculaire et de la mise en place des acteurs de la régénération musculaire. Par ailleurs, l'apparition de myofibres néoformées dans la condition CDTX+SHAM à J7, et dans une moindre mesure CDTX+SCI, est caractéristique de ce processus de régénération. Les surfaces de section de fibres n'ont pas été quantifiées, mais comme attendu, le diamètre des myofibres issues des muscles PBS+SCI semblait réduit, suggérant une atrophie musculaire induite par la SCI. La coloration de Von Kossa, révélant les dépôts calciques en noir, permet de constater que les trois premières conditions expérimentales n'ont pas généré de minéralisation intra-musculaire, *a contrario* de la condition CDTX+SCI, pour laquelle les dépôts noirs témoignent de la présence de myofibres calcifiées dès 2 jours après l'induction des POAN. La formation de matrice et nodules calcifiés à J7 et de signes de défauts de myogenèse observés en coloration HPS confirment la mise en place des processus de minéralisation (**Figure 33**).

↓ **Figure 33 : Histologie du muscle gastrocnémien dans le modèle de POAN**

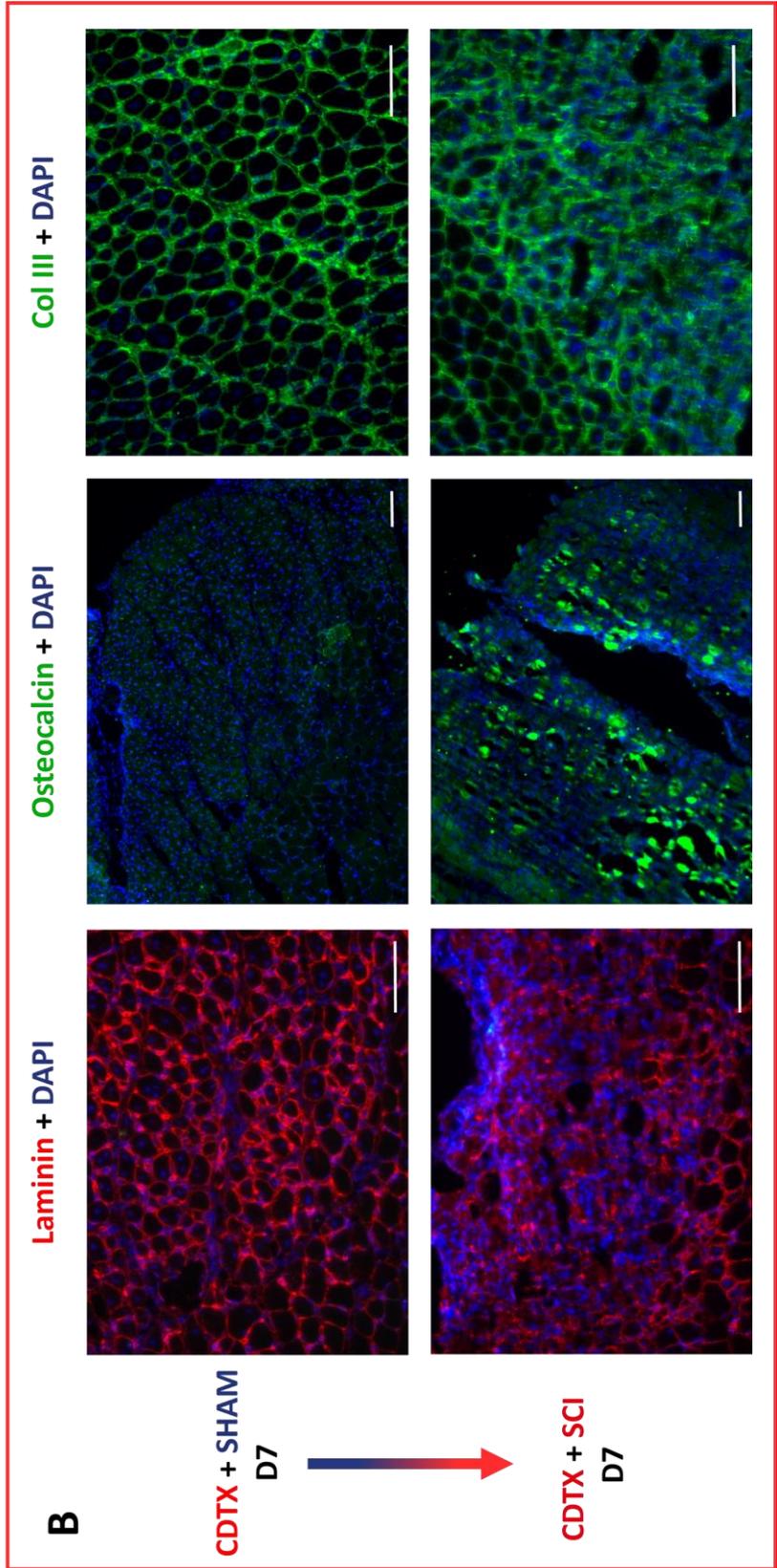
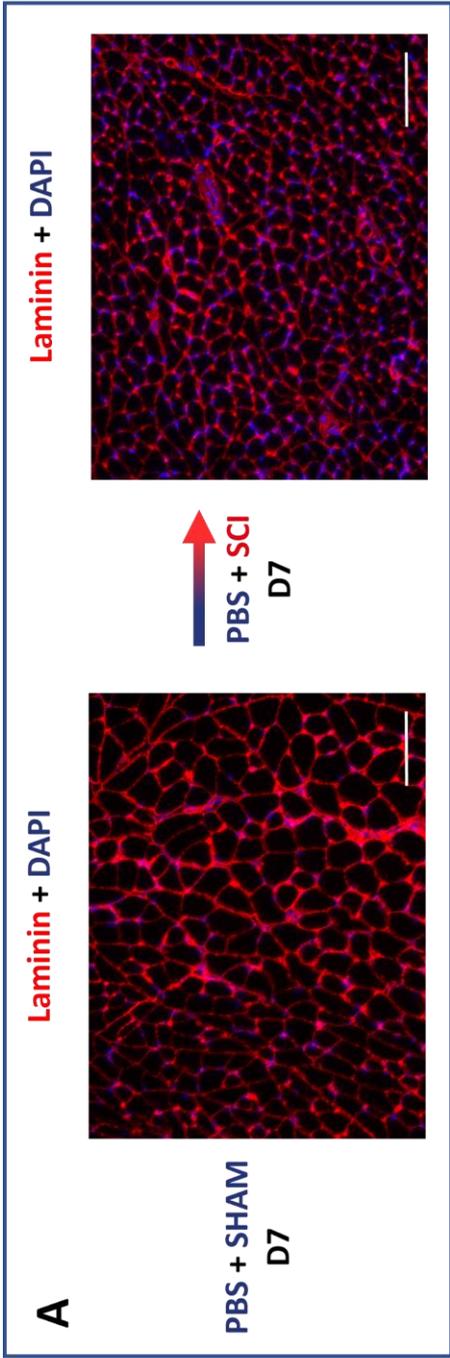
Colorations histologiques HPS et Von Kossa dans quatre conditions expérimentales (PBS+SHAM, PBS+SCI, CDTX+SHAM et CDTX+SCI) à trois temps post-induction (J2, J4 et J7). Cryocoupes transversales de MG, la ligne noire délimite les zones d'apparition intramusculaires de nodules calcifiés (grossissement 10X, barre d'échelle = 100 µm).



Afin d'évaluer la qualité des fibres musculaire et plus globalement l'aspect du tissu musculaire, nous avons réalisé différents immunomarquages 7 jours après l'induction du modèle (**Figure 34**). Un premier marquage des laminines (marquant la membrane basale) a permis de confirmer l'aspect atrophique du muscle des souris neurolésées (**A**). Par ailleurs, les différences histologiques entre un muscle CDTX+SHAM et CDTX+SCI soulignaient l'échec de la myogenèse, caractérisée par une accumulation de cellules mononuclées et l'absence de néoformation de fibres musculaires (**B**). Par ailleurs, un marquage de l'ostéocalcine, produite et sécrétée par les ostéoblastes matures, révélait la présence de cet élément de la matrice calcique ostéogénique chez les souris neurolésées. Enfin, un marquage du collagène III, un composant structurel de la matrice extracellulaire (MEC), témoignait de l'accumulation anormale de MEC au sein du muscle CDTX+SCI (**Figure 34**).

↓ **Figure 34 : Immunomarquages du MG dans le modèle de POAN**

*Marquages IHC de la laminine (**A** et **B**), de l'ostéocalcine et du collagène III (**B**) dans quatre conditions expérimentales (PBS+SHAM, PBS+SCI, CDTX+SHAM et CDTX+SCI), 7 jours après induction du modèle. Cryocoupes transversales de muscle gastrocnémien, les noyaux sont marqués en bleus, la flèche reflète l'effet de la lésion médullaire (SCI) (grossissement 20X pour la laminine et le collagène III et 10X pour l'ostéocalcine, barre d'échelle = 100 µm).*



1.2.2 Dérégulation des ARNm du muscle POAN

Nous avons dans un premier temps étudié le profil d'expression de marqueurs ostéogéniques, chondrogéniques, inflammatoires et matriciels du muscle total à J2, J4 et J7 des quatre conditions expérimentales (**Figure 35**).

Nous avons observé l'augmentation de l'expression de *Runx2*, *Sox9*, *Col10a1* et *Sp7* dans les muscles lésés à la CDTX par rapport aux muscles sains, indépendamment de la lésion médullaire (**Figure 35**). Tous ces facteurs ostéo-chondrogéniques étaient surexprimés dans les muscles en régénération des animaux neurolésés (CDTX+SCI) par rapport aux contrôles de régénération (CDTX+SHAM). En effet, l'expression du régulateur de la chondrogenèse *Sox9* augmentait dès 2 jours après induction tandis que les niveaux d'expression de *Runx2*, régulateur principal de l'ostéogenèse, *Col10a1*, marqueur de l'hypertrophie des chondrocytes et *Sp7*, codant pour l'ostérix, augmentaient en réponse à la lésion médullaire au bout de 7 jours. *A contrario*, l'expression de *Bmp2*, un acteur extensivement décrit dans l'apparition des POA, ne semblait pas modulée à l'échelle transcriptionnelle dans notre modèle. Nous avons également observé un effondrement de l'expression de la phosphatase alcaline (*Alpl*) et du *Vegfa* lors de la lésion musculaire et/ou de la lésion neurologique, à contrepartie de leurs rôles respectifs dans les processus de minéralisation et d'angiogenèse post-lésionnel.

L'inflammation étant un élément central de la pathogenèse des POAN, nous avons recherché la potentielle modulation par les conditions expérimentales de facteurs inflammatoires tels que l'oncostatine M (*Osm*) ou le *Tgfb1* (**Figure 35**). Nous avons observé l'augmentation de leur expression dans le muscle lésé. Cependant leurs niveaux d'expression persistaient après 4 jours dans la condition CDTX+SCI comparés aux muscles CDTX+SHAM où l'expression se résorbait à J7, suggérant un délai dans l'activation et une persistance de la réponse inflammatoire chez les animaux neurolésés. De façon intéressante, cette surexpression de *Tgfb1* coïncidait avec le dépôt aberrant de collagène de type III 7 jours après l'induction des POAN. Similairement, l'expression de *Il-1β* était augmentée dans les deux conditions CDTX avec à nouveau une tendance accrue chez les animaux SCI, tandis que les niveaux d'expression d'*Atf4*, un facteur de transcription ostéogénique, restaient inchangés (données non affichées).

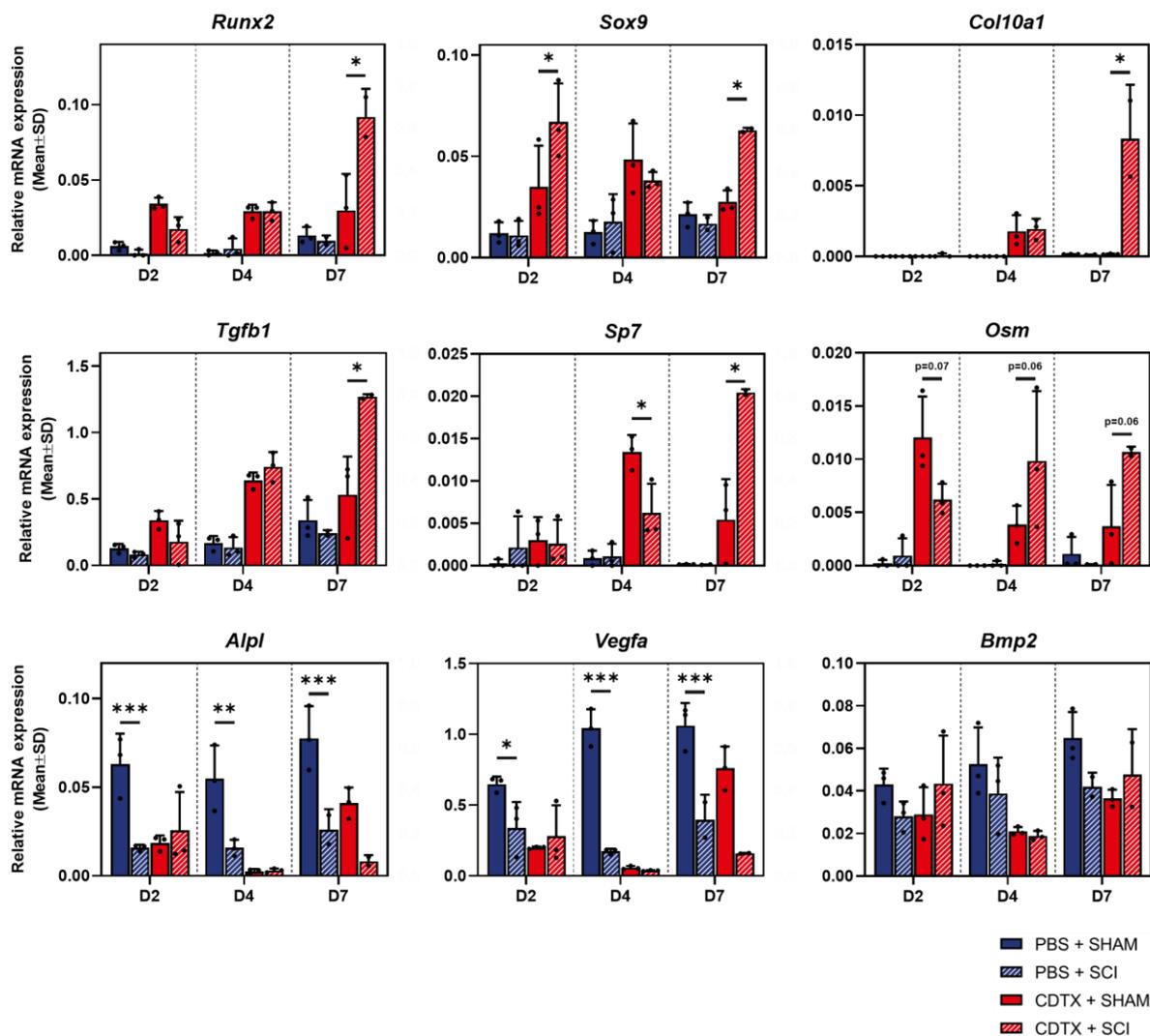


Figure 35 : Expression des ARNm codant pour des facteurs de transcription ostéogéniques, chondrogéniques, inflammatoires et matriciels du muscle entier

Abondance relative des ARNm mesurée en RT-qPCR du MG entier dans quatre conditions expérimentales (PBS+SHAM, PBS+SCI, CDTX+SHAM et CDTX+SCI) à trois temps post-induction (J2, J4 et J7) et regroupés par profils d'expression. Les histogrammes représentent la moyenne d'échantillons biologiques indépendants et les barres d'erreurs l'écart type, $n=3$. Les différences statistiques ont été calculées avec une ANOVA 2 voies et corrigées par le test post-hoc de Tukey (*= $p<0.05$, **= $p<0.01$, ***= $p<0.001$).

Enfin, les analyses histologiques et immunohistochimiques précédentes ayant montré un défaut de régénération musculaire, nous avons cherché à décrire le profil d'expression des principaux acteurs de la myogenèse (**Figure 36**). *Myod1*, *Myf5* et *Myog* sont trois facteurs de transcription impliqués dans les processus de

différenciation et de fusion des progéniteurs myogéniques (MPs). Les niveaux d'expression de *Myod1* et *Myf5* dans le muscle entier ne semblaient pas sensiblement modulés par la lésion musculaire et/ou neurologique. Cependant, nous avons observé une augmentation de l'expression de la myogénine à J7, plus marquée chez les animaux neurolésés, en parallèle d'une diminution de l'expression de *Pax7* dans ces mêmes conditions (**Figure 36**).

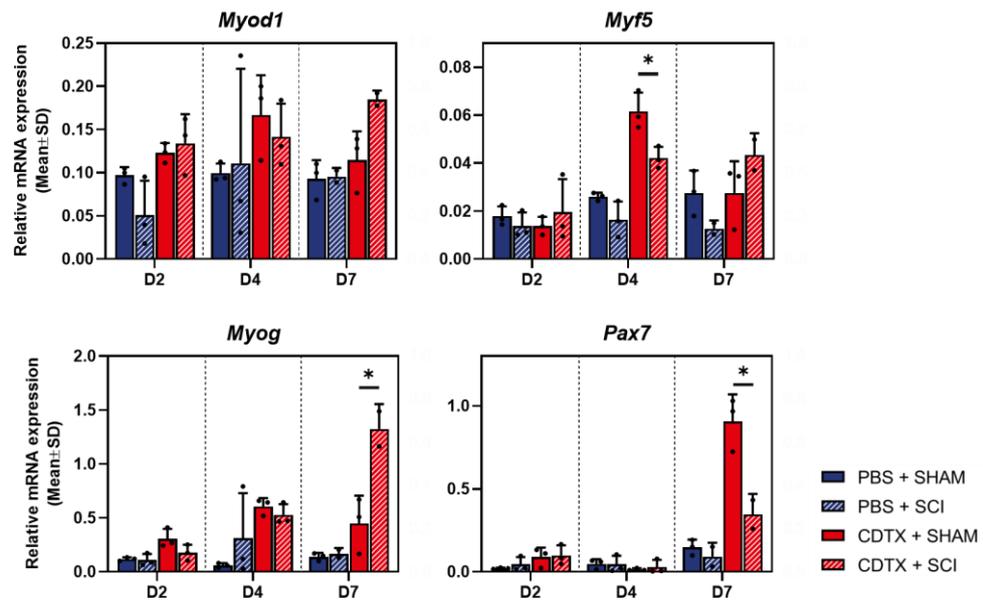


Figure 36 : Expression des ARNm codant pour des facteurs de transcription myogéniques du muscle entier

Abondance relative des ARNm mesurée en RT-qPCR du MG entier dans quatre conditions expérimentales (PBS+SHAM, PBS+SCI, CDTX+SHAM et CDTX+SCI) à trois temps post-induction (J2, J4 et J7). Les histogrammes représentent la moyenne d'échantillons biologiques indépendants et les barres d'erreurs l'écart type, $n=3$. Les différences statistiques ont été calculées avec une ANOVA 2 voies et corrigées par le test post-hoc de Tukey (*= $p<0.05$, **= $p<0.01$, ***= $p<0.001$).

1.2.3 Criblage des miARN du muscle POAN

Nous avons ensuite caractérisé les miRnomes de muscles entiers aux temps J2 et J4 des quatre conditions expérimentales PBS+SHAM, PBS+SCI, CDTX+SHAM et CDTX+SCI (**Figure 37**). Plus de 752 miARN ont été criblés par RT-qPCR et regroupés en fonction de leur profil d'expression (Annexe VIII - 1.5). Nous avons identifié les miARN les plus exprimés et dérégulés par la lésion musculaire (**A**) et par la lésion médullaire dans un contexte de muscle endommagé (**B**) aux temps J2 et J4 post-induction. Par l'interrogation des bases de données miRTarBase, KEGG, des analyses d'enrichissement des cibles (MIENTURNET [323]) et une étude minutieuse de la littérature associée, nous avons présélectionné les miARN impliqués dans les processus ostéo-chondrogéniques, myogéniques et inflammatoires les plus impactés par les conditions expérimentales (**C**).

La SCI induit la surexpression concomitante de miARN ostéogéniques : miR-21-5p, miR-20a-5p, miR-199a-5p, ostéo-chondrosuppressifs : miR-142-3p, miR-223-3p, miR-17-5p, miR-214-3p, et anti-inflammatoires : miR-146b-5p, à J2 et J4 post-induction (**Figure 37 A**). Par ailleurs, la lésion musculaire induisait aussi la perte d'expression de nombreux miARN spécifiques des myofibres (myomiR) tels que miR-1-3p, miR-133a-3p, miR-206 et miR-378a-3p ; de par la destruction de celles-ci et un relargage du contenu cytoplasmique dans le milieu extracellulaire. De façon intéressante, nous avons principalement observé une perte d'expression des miARN ostéo-chondrosuppressifs et anti-inflammatoires lors de la lésion neurologique à J2 et J4, notamment miR-142-3p, miR-146b-5p, miR-199a-3p, miR-574-3p et miR-214-3p (**Figure 37 B**). L'implication de ces miARN et de leurs cibles dans des processus ostéo-chondrogéniques, myogéniques et inflammatoires a par ailleurs été confirmée via la prédiction des bases de données Reactome et WikiPathways (**Figure 37 C** et données non affichées). Des cascades de signalisation impliquant différentes interleukines, le TGF- β , la signalisation du TLR4, le VEGF- α ou le facteur de transcription ostéogénique RUNX2 ont ainsi été mises en évidence.

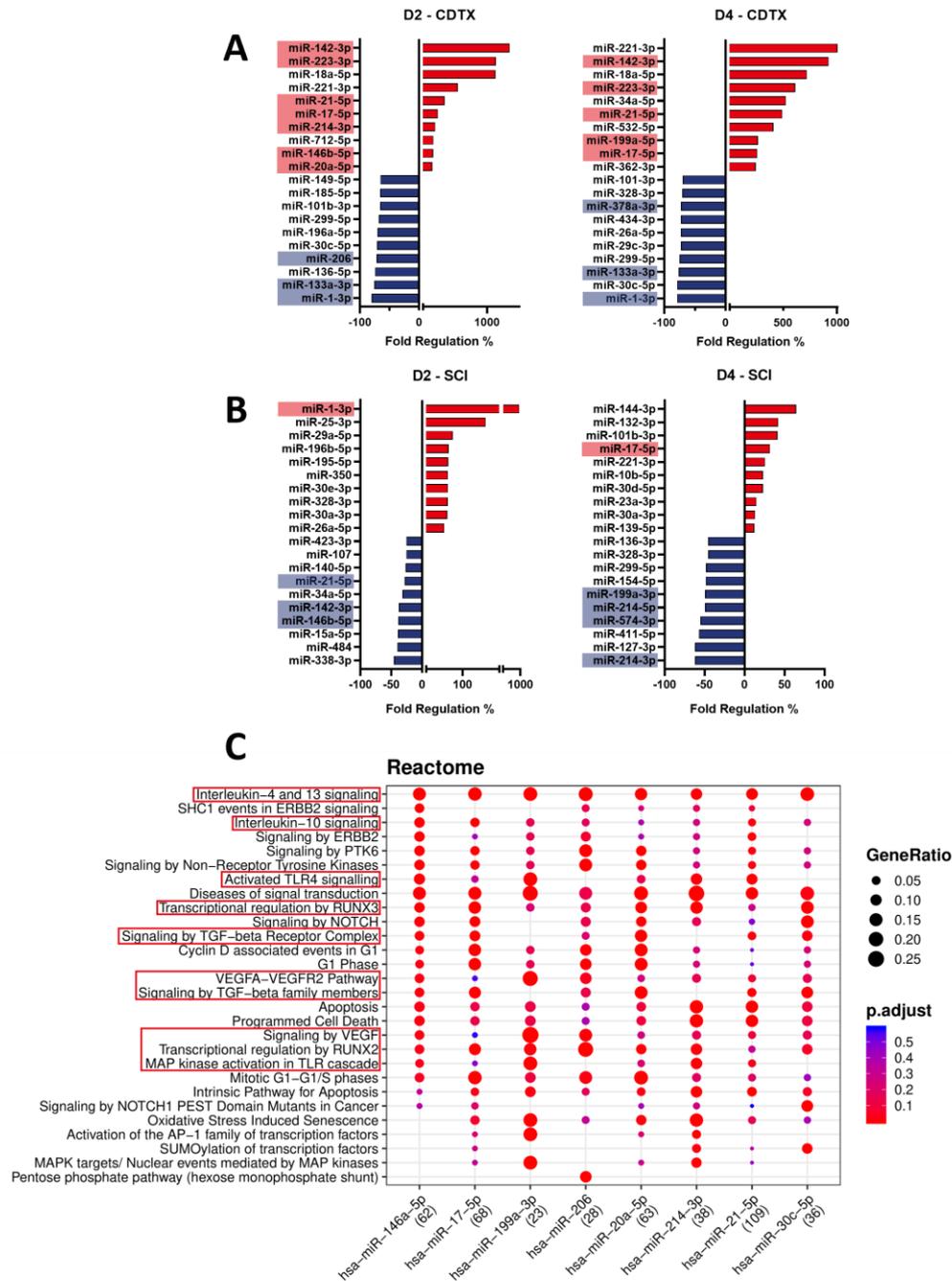


Figure 37 : Criblage des miARN dans le muscle entier

Evolution relative de l'abondance des 20 miARN les plus dérégulés mesurée en RT-qPCR du MG entier (A) CDTX+SHAM comparé à PBS+SHAM et (B) CDTX+SCI comparé à CDTX+SHAM à J2 et J4. Les miARN impliqués dans des processus ostéochondrogéniques, myogéniques et/ou inflammatoires sont identifiés en rouge (surexprimés) et bleus (sous-exprimés), exempts des miARN exprimés >32 Cp, n=1 regroupement de trois muscles dans chaque condition expérimentale. (C) Représentation des cascades de signalisations et processus biologiques identifiés par Reactome.

Le criblage étant réalisé sur des pools d'échantillons, nous avons ensuite mesuré les miARN d'intérêt sur les échantillons individuels dans les 4 conditions expérimentales (**Figure 38**). Nous avons observé une surexpression globale des miARN ostéo-suppressifs miR-17-5p, miR-142-3p, miR-146a-5p, miR-199a-3p, miR-214-3p et miR-223-3p dans les muscles lésés comparés aux muscles PBS. Toutefois, miR-199a-3p et miR-214-3p étaient régulés négativement à J4 par la condition CDTX+SCI par rapport à la seule injection de CDTX tandis que miR-17-5p, miR-142-3p et miR-223-3p étaient régulés positivement. De plus, l'expression de miR-30e-5p, et dans une moindre mesure miR-143-3p, étaient toutes deux inhibées par la SCI, indépendamment de toute lésion musculaire. Enfin, les miARN anti-inflammatoires miR-146a/b étaient surexprimés par la CDTX et miR-146b-5p était sous-exprimé en condition SCI-CDTX (**Figure 38**).

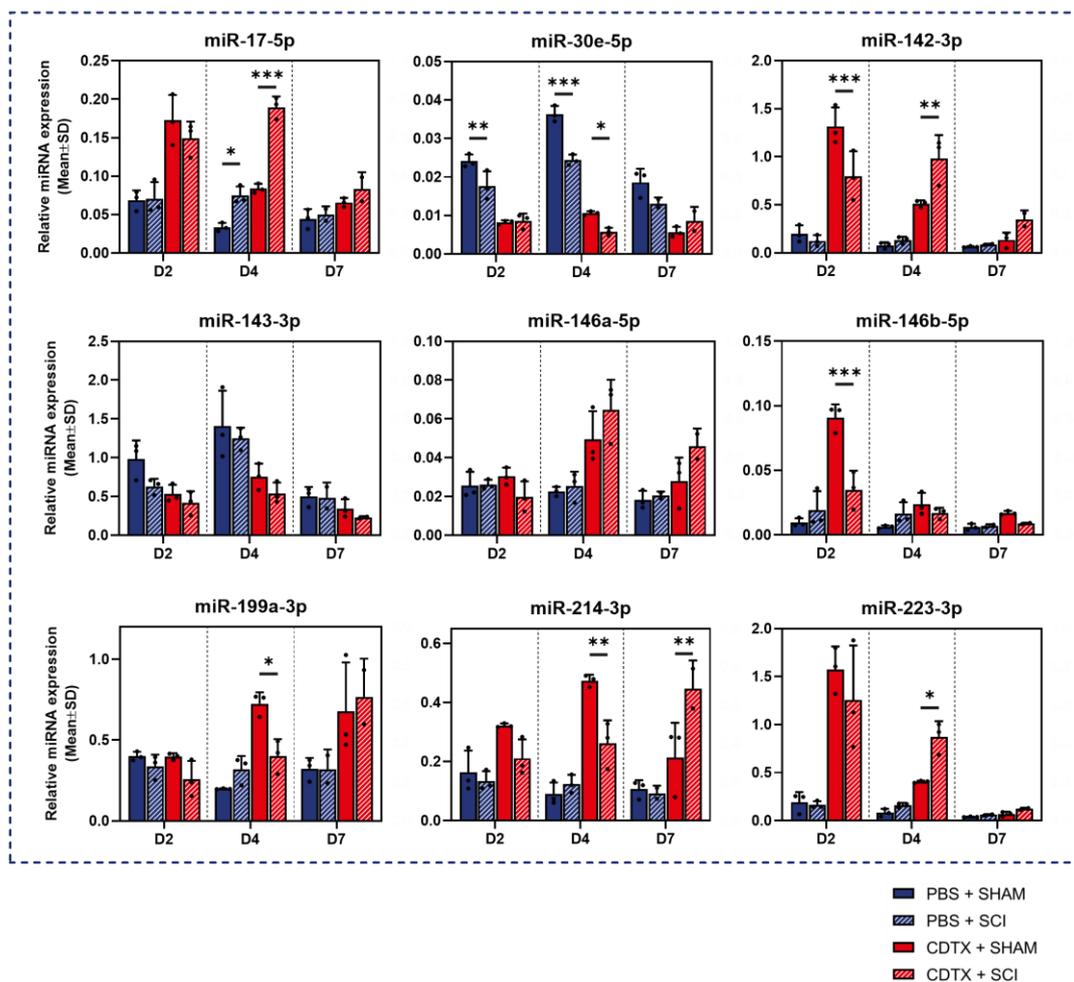


Figure 38: Expression des miARN ostéo-chondrosuppressifs et anti-inflammatoires du muscle entier

Abondance relative des miARN ostéo-chondrosuppressifs et anti-inflammatoires mesurée en RT-qPCR du MG entier dans quatre conditions

expérimentales (PBS+SHAM, PBS+SCI, CDTX+SHAM et CDTX+SCI) à trois temps post-induction (J2, J4 et J7) et regroupés par profils d'expression. Les histogrammes représentent la moyenne d'échantillons biologiques indépendants et les barres d'erreurs l'écart type, n=3. Les différences statistiques ont été calculées avec une ANOVA 2 voies et corrigées par le test post-hoc de Tukey (*=p<0.05, **=p<0.01, ***=p<0.001).

Les miARN ostéogéniques étaient surexprimés dans le muscle lésé à la CDTX (**Figure 39**). La lésion médullaire exacerbait cette expression à J4 pour miR-20a-5p, miR-21-5p et à J7 pour miR-21-5p et miR-199a-5p. MiR-20a-5p était par ailleurs aussi surexprimé par la lésion médullaire dans le muscle non lésé. De façon plus globale, la régulation des miARN ostéo-suppressifs semble retardée dans le temps tandis que la réponse des miARN ostéogéniques semble persister en condition CDTX+SCI comparée à la lésion musculaire seule (**Figure 38 et Figure 39**).

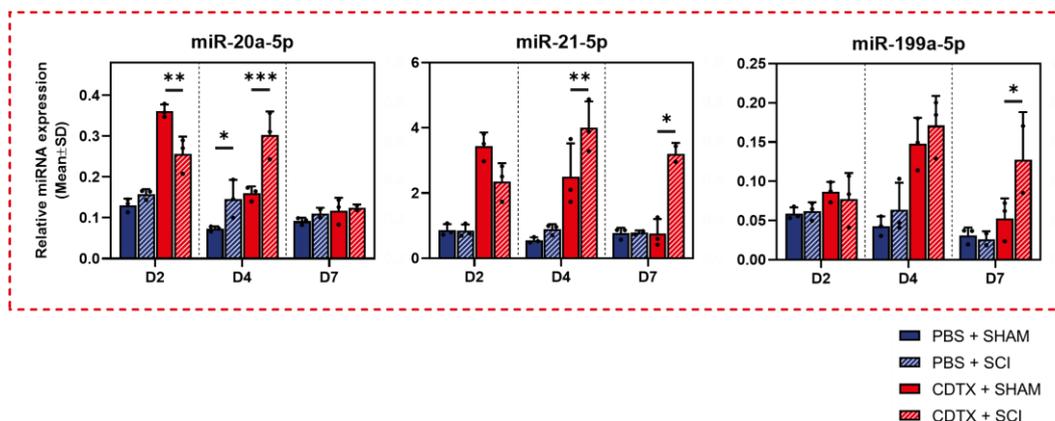


Figure 39 : Expression des miARN ostéogéniques du muscle entier

Abondance relative des miARN ostéogéniques mesurée en RT-qPCR du MG entier dans quatre conditions expérimentales (PBS+SHAM, PBS+SCI, CDTX+SHAM et CDTX+SCI) à trois temps post-induction (J2, J4 et J7). Les histogrammes représentent la moyenne d'échantillons biologiques indépendants et les barres d'erreurs l'écart type, n=3. Les différences statistiques ont été calculées avec une ANOVA 2 voies et corrigées par le test post-hoc de Tukey (*=p<0.05, **=p<0.01, ***=p<0.001).

Enfin, nous avons quantifié l'expression des myomiR (**Figure 40**). Outre la perte d'expression à J2 et J4 induite par la destruction des myofibres, la lésion médullaire augmentait l'expression de miR-206 à J4 tandis qu'elle inhibait l'expression en muscle sain de miR-1-3p à J4 et de miR-378a-3p en muscle lésé à

J7. Ces myomiR interviennent dans les processus de régénération musculaire via leur action sur l'activation des cellules satellites de par leur capacité à cibler *Pax7* pour miR-1-3p et miR-206 ou leur propriété à moduler la néo angiogenèse post lésionnelle du muscle pour miR-378a-3p.

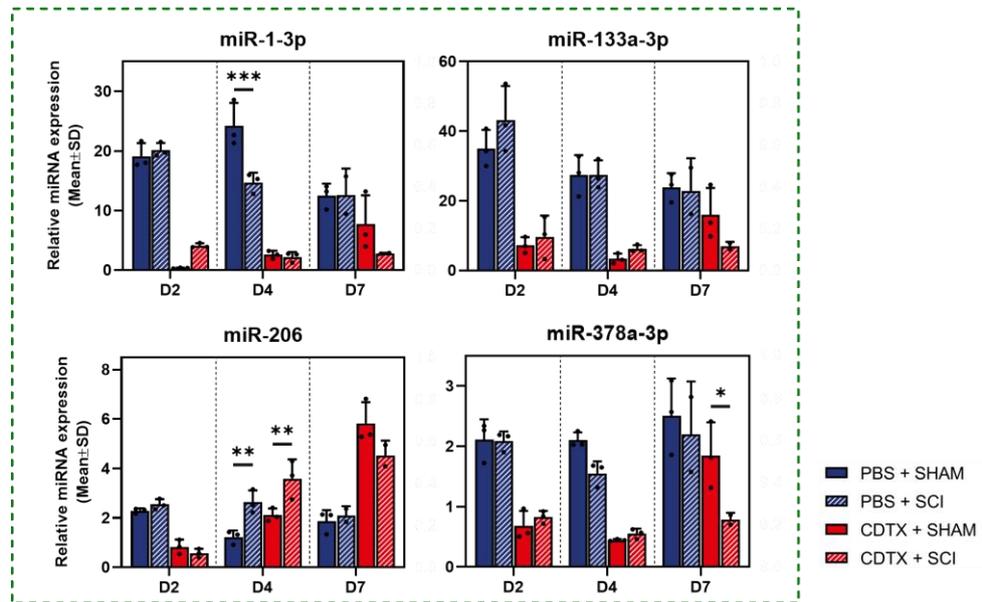


Figure 40 : Expression des myomiR du muscle entier

Abondance relative des myomiR mesurée en RT-qPCR du MG entier dans quatre conditions expérimentales (PBS+SHAM, PBS+SCI, CDTX+SHAM et CDTX+SCI) à trois temps post-induction (J2, J4 et J7). Les histogrammes représentent la moyenne d'échantillons biologiques indépendants et les barres d'erreurs l'écart type, $n=3$. Les différences statistiques ont été calculées avec une ANOVA 2 voies et corrigées par le test post-hoc de Tukey (*= $p<0.05$, **= $p<0.01$).

1.3 Synthèse et discussion

Ce premier chapitre nous a permis de caractériser le modèle murin de POAN tant du point de vue histologique, immunohistochimique que de l'étude des transcrits et du miRnome. Nous avons mis en évidence que :

- I. Le développement des POAN est caractérisé par le dépôt précoce d'une matrice calcique et collagénique associée à un échec de la régénération musculaire.
- II. La lésion neurologique induit la surexpression des marqueurs ostéo-chondrogéniques *Runx2*, *Sox9*, *Col10a1* et inflammatoires *Tgfβ1* et *Osm* dans le muscle endommagé.
- III. La lésion musculaire induit l'expression de miARN ostéogéniques et ostéo-chondrosuppressifs tandis que la combinaison des deux lésions entraîne la surexpression des premiers, tout en altérant l'expression de suppresseurs ostéo-chondrogéniques.

Dans cette première partie, nous avons décrit la cinétique d'apparition des POAN aux temps précoces J2, J4 et J7. Nous avons sélectionné pour la suite l'étude les temps J2 et J4, les processus ostéogéniques étant déjà mis en place à ces deux temps. Comme attendu, nous avons observé l'apparition d'un phénotype atrophique du muscle lors de la SCI seule, phénomène impliquant la signalisation STAT3 des FAPs qui sécrètent alors de l'IL-6 de façon aberrante [165]. Il est intéressant de noter que cette dérégulation peut mener à une fibrose du tissu musculaire ainsi qu'une perte des propriétés pro-myogéniques des FAPs. La SCI provoque ainsi une accumulation des FAPs résultant dans une production anormale de MEC. Nous avons montré une surexpression du *Tgfβ1* concomitante à une accumulation de collagène III. Cette cytokine joue un rôle dans la production d'éléments de la MEC ainsi que dans la différenciation fibroblastique des FAPs [324–326]. Cette étape pourrait permettre le dépôt d'une matrice collagénique facilitant la mise en place des processus ostéogéniques permettant la formation de nodules calcifiés à J7, le collagène III étant impliqué dans les premiers instants de l'ossification endochondrale [327].

Nous avons aussi observé la surexpression des facteurs de transcription ostéogéniques et chondrogéniques *Runx2*, *Sox9* impliqués dans l'ossification endochondrale et *Col10a1*, produit par les chondrocytes hypertrophiques, tout particulièrement durant la transition d'une matrice collagénique à une matrice calcique lors de la transdifférenciation chondro-ostéogénique [328,329]. De façon

intéressante, la surexpression de *Sox9* survient dès J2 tandis que la surexpression de *Runx2* et *Col10a1* est plus tardive à J7. Par ailleurs, *Runx2* est un régulateur positif de *Col10a1* et du phénotype hypertrophique des chondrocytes, suggérant une cinétique d'expression *Sox9* > *Runx2* > *Col10a1* par les progéniteurs responsables du dépôt de matrice calcique [330,331]. Toutefois, il est intéressant de noter que l'augmentation de l'expression des facteurs de transcription ostéogéniques est tardive (\approx J7) comparée à la cinétique d'apparition de minéralisation intramusculaire observée histologiquement (\approx J2), et correspond avec la surexpression de *Sox9*. Cela suggère la coexistence précoce de phénomènes chondrocytaires et minéralisants, tandis que les processus ostéogéniques semblent impliqués dans la maturation plus tardive en tissu osseux caractérisé par l'expression d'ostéocalcine à J7. Par ailleurs nous avons également identifié l'inhibition de l'expression de l'ALPL et du VEGF α dans le muscle intact chez l'animal neurolésé. La sous-expression du VEGF- α a été observée dans un modèle de dénervation musculaire [332]. L'évolution de l'expression d'ALPL n'a jamais été décrite, elle pourrait être liée à la perte de masse musculaire associée à la neurolésion, comme c'est le cas lors du dosage de son activité enzymatique [333].

Comme la lésion médullaire exacerbe les réponses inflammatoires, nous avons mesuré l'expression de différentes cytokines au sein du muscle [167,334]. Nous avons observé que la lésion neurologique modulait cette réponse, tout particulièrement pour le *Tgfb1* et l'*Osm*. Le rôle de ces cytokines est pléiotrope, les deux étant capables d'influencer positivement la différenciation ostéogénique en parallèle de leur rôle direct sur les processus inflammatoires [335,336]. Leur action sur l'ostéogénèse est commune, différents auteurs ont démontré que l'OSM inhibait l'expression de protéine de la MEC induite par le Tgfb1 et décrit une production de l'OSM par les ostéoblastes, suggérant un potentiel rôle de cette dernière dans la transition de la production d'une matrice collagénique à une matrice calcique [337,338]. Enfin, il est important de noter que ces cytokines sont aussi sécrétées par les macrophages recrutés sur le site lésionnel, et qu'elles sont impliquées dans le développement des POA et POAN [15,21,141,339]. L'IL-1 β , cytokine pro-inflammatoire dont nous avons démontré le rôle dans le développement des POAN, était trop faiblement exprimée au niveau transcriptionnel pour être quantifiée [16].

Afin de caractériser succinctement l'échec de la myogenèse à l'échelle du muscle entier, nous avons quantifié différents facteurs de transcription myogéniques. D'une part, l'absence d'augmentation de l'expression de *Pax7* après 7 jours de régénération musculaire combinée à la lésion neurologique suggère un défaut dans le retour en quiescence post activation des MPs [340]. D'autre part, la

surexpression de Myog en condition CDTX+SCI suggère une accumulation anormale des MPs, dont le pic de prolifération se situe physiologiquement 3 jours après la lésion musculaire [341]. Ces indicateurs témoignent d'une perturbation de l'homéostasie du muscle en régénération pouvant mener à une accumulation des MPs et conduisant à un défaut de la régénération musculaire [78,342]. Toutefois, il est important de remettre en perspectives que cette caractérisation porte sur les transcrits, et de considérer que de nombreux facteurs sont régulés de façon post-traductionnelle, tel qu'*Atf4*, un facteur de transcription ostéogénique induisant l'expression de l'ostéocalcine, pour lequel aucune variation d'expression n'a été mesurée dans les conditions expérimentales tandis que la protéine en aval est différentiellement régulée par la lésion neurologique associée à la lésion musculaire [343].

L'étude à l'échelle du tissu entier nous a permis d'identifier des séries de miARN décrits dans la littérature comme ostéogéniques, chondrogéniques, ostéo-chondrosuppressifs, myogéniques et inflammatoires les plus altérés en réponse aux conditions expérimentales. La lésion musculaire déclenche l'expression de miARN ostéogéniques tandis que la lésion médullaire altère et retarde la réponse des miARN ostéo-chondrosuppressifs, parmi lesquels miR-214-3p et miR-199a-3p. Ces deux miARN sont impliqués dans l'inhibition des processus ostéogéniques en ciblant des facteurs de transcription tels qu'*Atf4* ou l'enzyme *Kdm3a* [257,344]. Par ailleurs, les niveaux d'expression des miARN ostéogéniques miR-20a-5p, miR-21-5p, miR-199a-5p, sont augmentés par la même condition CDTX+SCI que *Runx2* ou *Sp7*. Ceux-ci sont activés par ces miARN suggérant leur implication dans la promotion des processus ostéogéniques en réponse à la lésion neurologique [255,260,345].

En émettant l'hypothèse que la lésion médullaire pouvait induire une altération du microenvironnement musculaire favorable à la différenciation ostéo-chondrogénique, nous avons étudié les niveaux d'expression des miRs dérégulés impliqués dans l'activation, la prolifération, la différenciation ou la fusion des MPs. Nous avons observé une régulation à la baisse de miR-1-3p, miR-133a-3p, miR-206 et miR-378a-3p dans le tissu musculaire 2 jours après la lésion musculaire. Par ailleurs, miR-1-3p et miR-378a-3p étaient régulés à la baisse par la lésion médullaire seule à respectivement J4 et J7, tandis que miR-206 était surexprimé. De façon intéressante, parmi les deux myomiR dérégulés par la lésion neurologique dans un muscle lésé miR-206, surexprimé, cible directement *Pax7*, dont la régulation est perturbée dans cette même condition expérimentale, et suggère un lien direct entre la modulation de ce myomiR par la lésion médullaire et la perturbation de la régénération musculaire [346,347]. La perte d'expression plus

tardive de miR-378a-3p pourrait quant à elle entraîner des conséquences sur la coordination des acteurs cellulaires suite à une lésion, Krist *et al.* ont récemment démontré qu'une délétion de celui-ci entraînait un recrutement aberrant de macrophages et une réduction de la néovascularisation *in vivo* à la suite d'une lésion ischémique du muscle [348].

Enfin, nous avons retrouvé parmi les miARN les plus altérés par la lésion médullaire un miARN principalement décrit dans les processus inflammatoire, miR-146b-5p. Ce miARN inhibe la réponse inflammatoire en réduisant l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β ou de leur récepteur comme TRAF6 pour le TNF α [349,293,350]. La perte d'expression de ce miARN au temps aussi précoce que J2 suggère son rôle dans l'aggravation de la réponse inflammatoires en réponse à la SCI ainsi qu'un potentiel défaut dans l'activation de la boucle de rétrocontrôle négative de l'inflammation, menant par exemple à la surexpression des cytokines *Tgf β 1* et *Osm* précédemment identifiées. Plus récemment, Pan *et al.* ont démontré le rôle de miR-146b-5p dans la suppression de la polarisation M1 des macrophages, suggérant ainsi qu'une perte de son expression pourrait être responsable d'une réponse inflammatoire aberrante aux temps précoces de la pathogenèse [351].

Pris dans leur ensemble, ces résultats montrent que l'expression des miARN dans le muscle squelettique est profondément modifiée en réponse aux dommages musculaires et que la SCI modifie de manière significative l'équilibre entre les miARN myogéniques, inflammatoires, ostéogéniques et ostéo-suppressifs dans le muscle en régénération. Toutefois, il est important de noter que les rôles des miARN sont multiples et complexes, cette étude ayant pris le parti de les catégoriser selon un seul rôle pour en faciliter sa compréhension. En effet, de nombreux miARN tels que miR-199a-3p ont une double capacité à inhiber les processus ostéogéniques et améliorer la régénération musculaire, son inhibition par la lésion médullaire ayant donc un effet double sur le phénotype du muscle traumatisé [352]. Cependant, l'étude du miRnome d'un tissu entier ne permet pas de tenir compte des bouleversements impliqués dans chaque population cellulaire. Les modulations au niveau tissulaire sont parfois le simple reflet d'un changement dans la répartition des acteurs cellulaires engagés, comme on l'imagine aisément dans le cas d'un muscle sain ou en régénération. Se limiter à l'étude de l'expression des miARN à l'échelle tissulaire expose donc au risque d'interpréter une augmentation de miARN par la simple augmentation d'une population cellulaire exprimant un niveau basal plus élevé de ce miARN [322].

2 Chapitre 2 : Caractérisation et analyse fonctionnelle des progéniteurs du muscle POAN

2.1 Introduction

L'étude d'un tissu entier trouve ses limites dès lors que la répartition cellulaire est altérée. Afin de pallier ce problème, nous avons mis en place une stratégie de tri visant à isoler les cellules impliquées dans la pathologie. Ainsi, les FAPs, MPs, ECs et macrophages ont été isolés puis les acteurs moléculaires et miARN ont été mesurés. La minéralisation apparaissant dès J2 et des progéniteurs ostéogéniques étant présents à J7, nous avons choisi de poursuivre avec l'étude de ces populations cellulaires aux temps précoces J2 et J4 (**Figure 41**).

Afin de confirmer ces résultats, nous avons caractérisé les progéniteurs du muscle avoisinant les POAN chez l'Homme. Nous avons exploré les miARN et ARNm identifiés dans le modèle murin puis les miARN dérégulés par les conditions expérimentales *in vivo* ont fait l'objet d'une validation fonctionnelle *in vitro* sur les FAPs et MPs de muscles de patients. Enfin, nous avons évalué le potentiel ostéogénique de ces deux populations et la capacité des myomiR à moduler le devenir cellulaire des progéniteurs myogéniques.

Synthétiquement, nous avons eu pour ambition dans ce deuxième chapitre, d'identifier *in vivo* et d'évaluer *in vitro* les miARN et ARNm impliqués dans la dérive pathologique ostéogénique des FAPs ou entraînant un défaut de myogenèse des MPs.

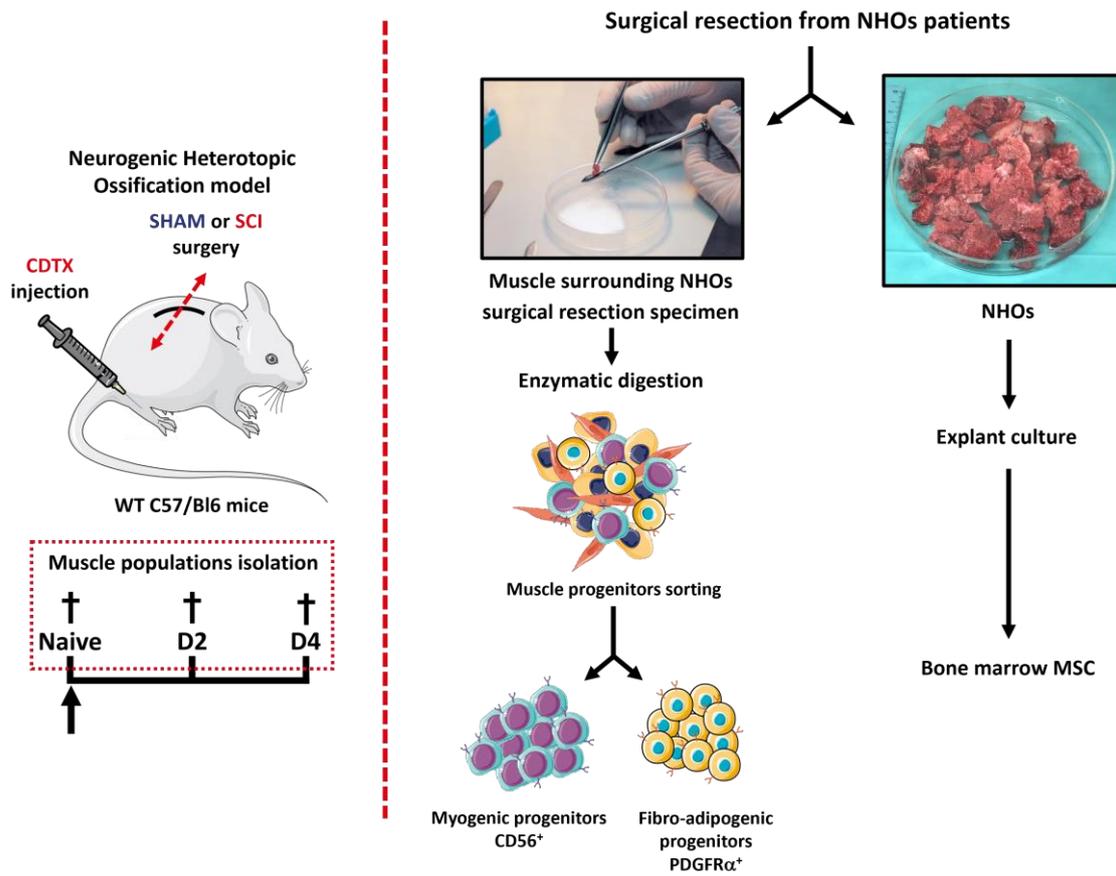


Figure 41 : Représentation schématique de la stratégie d'isolement cellulaire, d'identification in vivo puis d'évaluation in vitro des miARN sur les populations musculaires.

2.2 Résultats

2.2.1 Isolement des populations musculaires

Les macrophages, FAPs, MPs et ECs ont été triés suivant un protocole plus amplement décrit en section IV - 1.1.3.4 [318]. Brièvement, après digestion enzymatique les macrophages ont été triés sur l'expression des marqueurs CD45 et F4/80. Les populations cellulaires restantes ont toutes été présélectionnées sur leur absence de marquage au CD45 et F4/80 (**Figure 42 A**). Les FAPs ont été triés sur leur négativité au marqueur endothélial CD31 puis leur positivité aux marqueurs Sca1, CD34, CD140/PDGFR α tandis que les MPs ont été isolés sur l'absence d'expression de CD31 et Sca1 et la présence du CD34 et de l'intégrine α 7. Enfin, les cellules endothéliales CD31⁺ Sca1⁺ CD34⁺ ont aussi été isolées mais les contraintes temporelles inhérentes à ce projet n'ont pas permis l'inclusion de la caractérisation de cette population à cette étude.

Nous nous sommes intéressés à la répartition cellulaire à la suite des lésion musculaires et neurologiques. Lors de la régénération musculaire physiologique (CDTX+SHAM), nous avons observé dès J2 le recrutement des macrophages et le maintien de cette population dans le tissu lésé à J4 (**Figure 42 B**). A l'opposé, nous avons observé une baisse drastique du nombre d'ECs 2 et 4 jours après la lésion musculaire, probablement associée à la destruction partielle du réseau vasculaire du muscle. En outre, la proportion du nombre de FAPs semblait augmentée tandis que celle des MPs ne semblait pas sensiblement différente.

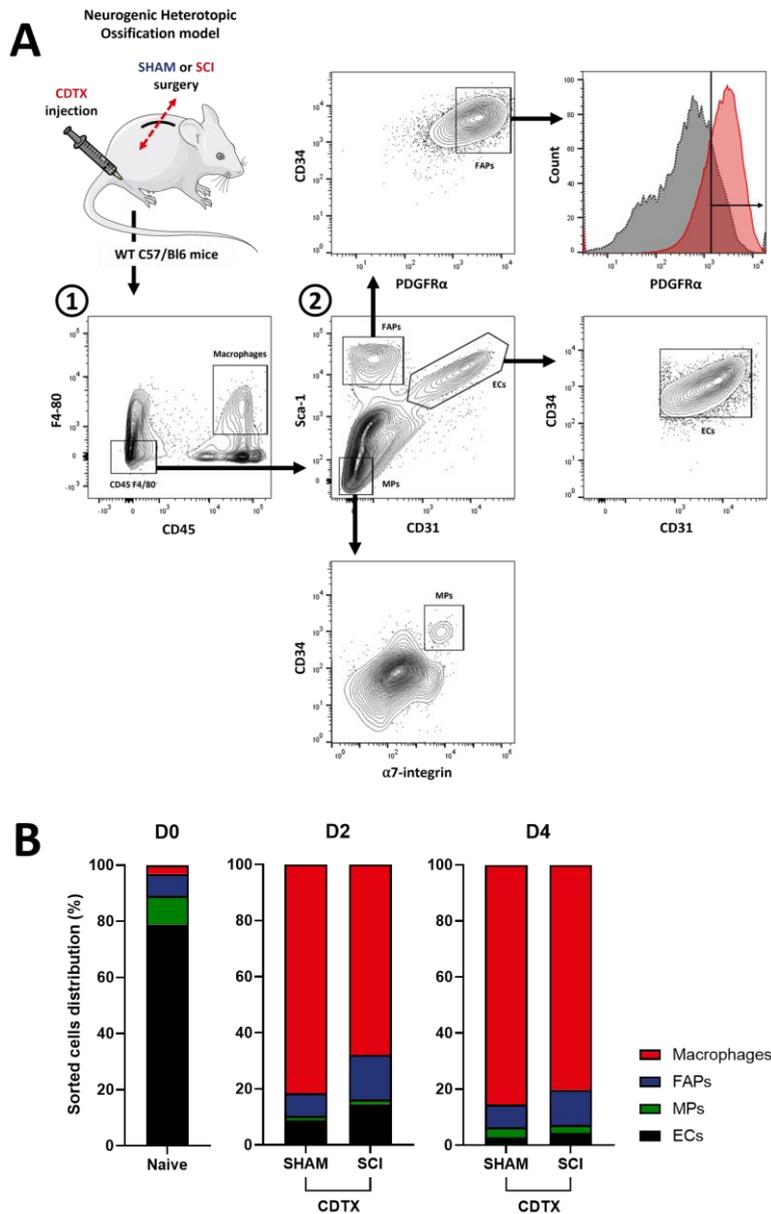


Figure 42 : Stratégie d'isolement cellulaire du modèle murin de POAN et répartition des populations résidentes du muscle

(A) Stratégie de gating pour l'isolement des FAPs, MPs, macrophages et ECs depuis les MG d'animaux naïfs (J0), CDTX+SHAM ou CDTX+SCI à J2 et J4 et (B) répartition des populations cellulaires en ratio dans ces conditions expérimentales. n=4-5

Afin de préciser ces observations, nous avons étudié la répartition de chaque population cellulaire en fonction du nombre de cellules totales pour les macrophages ou du nombre de cellules CD45⁺F4/80⁻ pour les FAPs, MPs et ECs (Figure 43). Les macrophages (A) étaient recrutés à 2 et 4 jours après la lésion musculaire. Par ailleurs le nombre de macrophages recrutés semblait inférieur dans

la condition CDTX+SCI par rapport à la lésion musculaire seule. A J2, la répartition des FAPs (**B**) n'était pas altérée tandis que leur nombre semblait plus important à J4 dans le groupe CDTX+SCI. A l'inverse, la lésion musculaire induisait une réduction du nombre de MPs (**C**) à J2 et une prolifération de ces derniers à J4. La neurolésion avait tendance à amplifier cette baisse du nombre de MPs à J2. Enfin, la proportion des ECs à J2 et J4 était fortement diminuée par la lésion musculaire, sans impact apparent de la neurolésion (**Figure 43**). Ainsi, nous avons observé que les populations $CD45^+ F4/80^-$ et $CD45^+ F4/80^+$ représentaient 90% des acteurs cellulaires d'un muscle intact tandis qu'elles ne représentaient que 20 à 30% lors de la lésion musculaire, suggérant le recrutement de nombreux autres acteurs de l'inflammation tels que les neutrophiles ou les granulocytes en parallèle des macrophages.

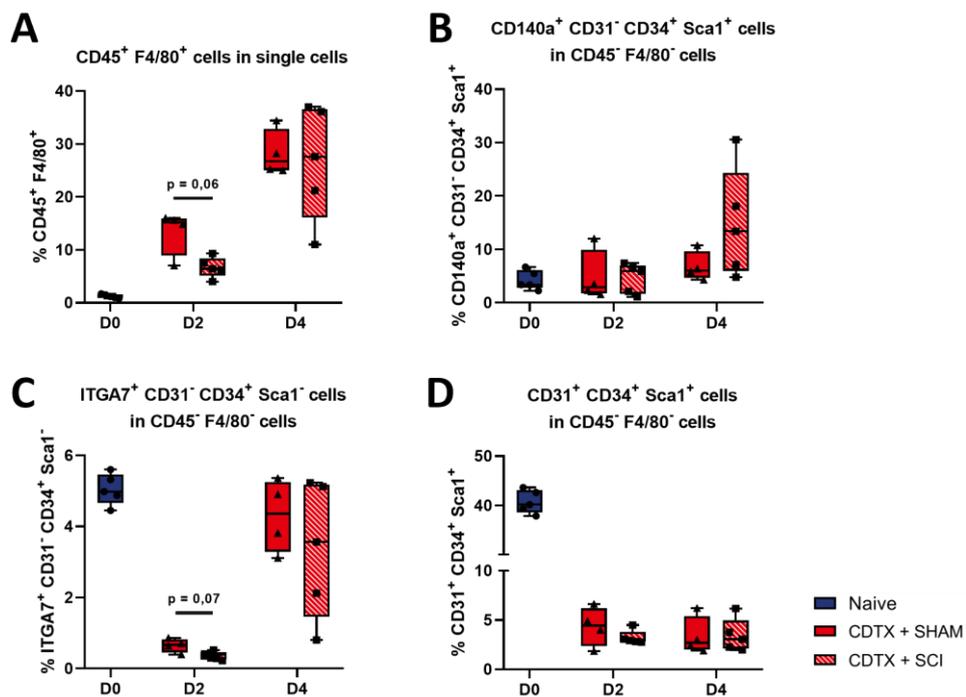


Figure 43 : Evolution des populations de macrophages, FAPs, MPs et ECs isolées en fonction de la condition expérimentale

Représentation en % des (A) macrophages dans la totalité des cellules uniques vivantes, et des (B) FAPs, (C) MPs et (D) ECs parmi les cellules $CD45^+ F4/80^-$ dans les MG naïfs (J0), CDTX+SHAM ou CDTX+SCI à J2 et J4 post-induction. Les différences statistiques ont été calculées avec un test U de Mann-Whitney, $n=4-5$

2.2.2 Caractérisation des transcrits ostéo-chondrogéniques et du miRnome des FAPs du muscle POAN

Ces différents isollements cellulaires de muscles naïfs et en régénération avec ou sans lésion neurologique nous ont permis de quantifier individuellement les modifications induites par ces conditions sur la régulation des transcrits et miARN dans les populations d'intérêt (**Figure 44**). Nous avons dans un premier temps observé l'évolution des transcrits ostéo-chondrogéniques des FAPs dans le muscle sain (naïf), CDTX+SHAM et CDTX+SCI. De façon intéressante, la lésion musculaire réduisait les niveaux d'expression d'*Alpl*, *Bmp2* et *Vegfa* après 2 et 4 jours post-lésionnel tandis qu'elle augmentait l'expression de *Runx2*, *Sox9* et *Tgfb1* comme dans le muscle total. Par ailleurs, la lésion neurologique réhaussait les niveaux d'expression précédemment réduits de *Alpl* et dans une moindre mesure *Bmp2* tandis qu'elle n'avait pas d'impact sur l'expression de *Runx2*, *Sox9* ou *Vegfa*. Enfin l'expression de *Tgfb1* semblait augmenter lors de la concomitance des deux lésions, suggérant une dérivation fibroblastique de ces progéniteurs résidents du muscle.

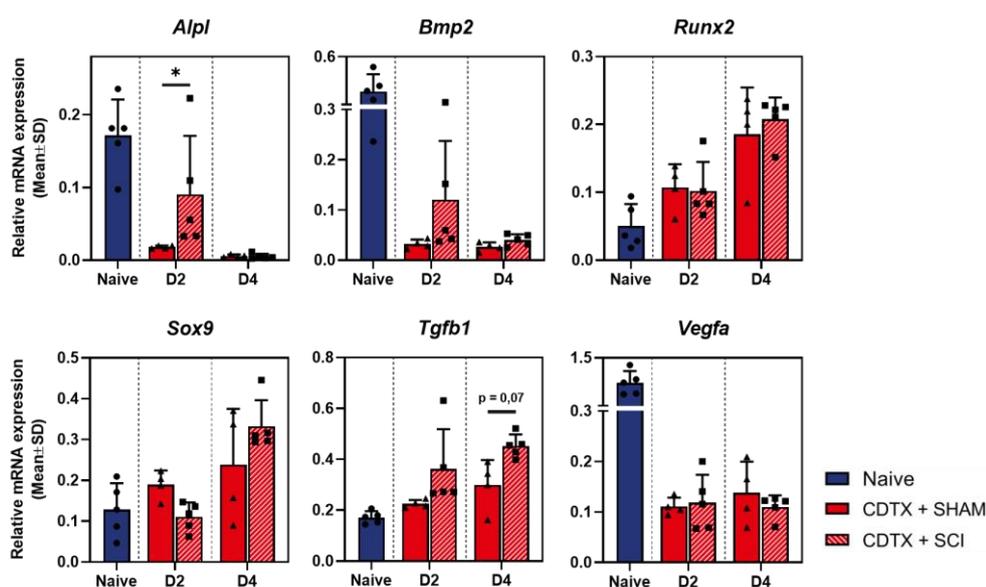


Figure 44 : Expression des transcrits ostéogéniques, chondrogéniques, matriciels et endothéliaux des FAPs

Abondance relative des ARNm mesurée dans les FAPs isolés en RT-qPCR dans trois conditions expérimentales (Naïve, CDTX+SHAM et CDTX+SCI) à deux temps post-induction (J2 et J4), $n=4-5$. Les différences statistiques ont été calculées avec une ANOVA 2 voies et corrigées par le test post-hoc de Šidák (*= $p < 0.05$).

Nous avons ensuite étudié la régulation des miARN dans les FAPs issus des muscles naïfs, CDTX+SHAM et CDTX+SCI (**Figure 45**). La totalité des miARN

possédant des propriétés suppressives des processus ostéo-chondrogéniques identifiés lors du criblage sur muscle entier, à savoir miR-16-5p, miR-17-5p, miR-93-5p, miR-199a-3p, miR-206, miR-214-3p, miR-223-3p, miR-328-3p, miR-378a-3p et miR-574-3p étaient activés en réponse au dommage musculaire à la CDTX. De plus, nous avons identifié une réduction systématique des niveaux d'expression de ces miARN 2 jours après la double lésion musculaire et neurologique, suggérant une perte des mécanismes ostéo-chondro-suppresseurs par la lésion médullaire. De façon intéressante, la double lésion CDTX+SCI induisait une stagnation des niveaux d'expression des miARN ostéo-chondro-suppressifs aux niveaux basaux du muscle naïf. Enfin, les miARN impliqués dans la régulation de processus inflammatoires, miR-146a/b-5p, étaient également activés en réponse à la lésion musculaire tandis que la lésion neurologique ne semblait pas impacter leur expression (**Figure 45**).

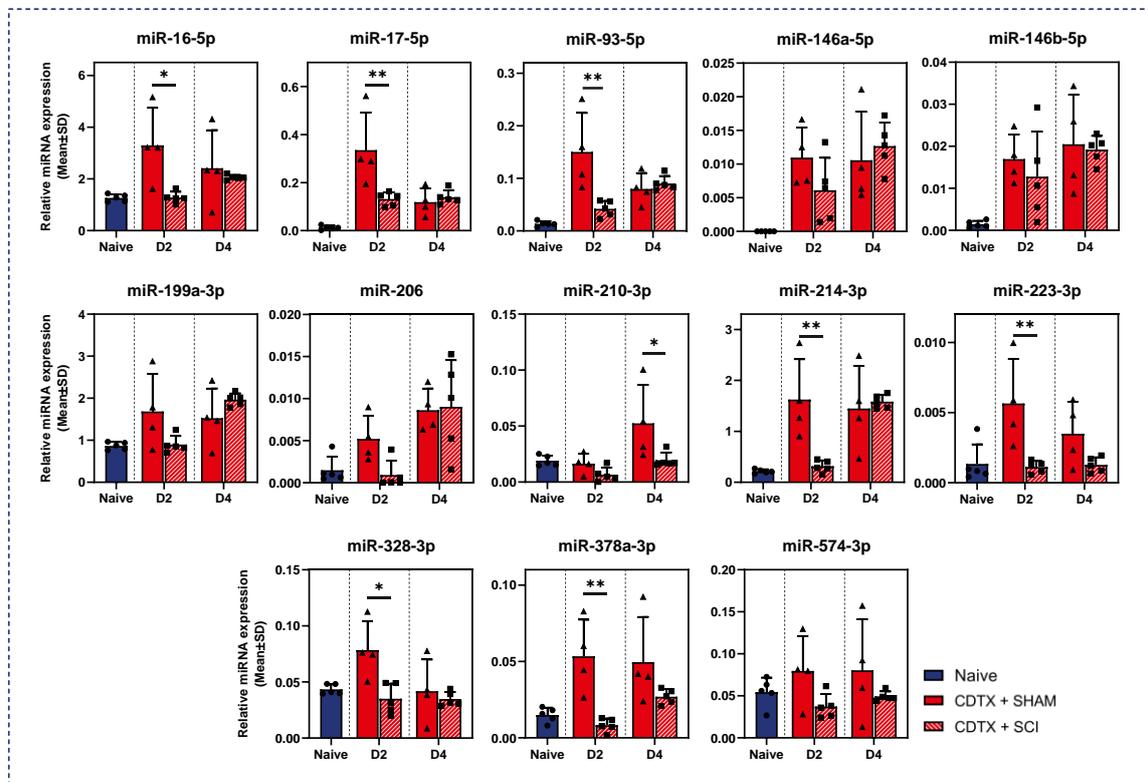


Figure 45 : Expression des miARN ostéo-chondrosuppressifs et anti-inflammatoires des FAPs

Abondance relative des miARN mesurée dans les FAPs isolés en RT-qPCR dans trois conditions expérimentales (Naïve, CDTX+SHAM et CDTX+SCI) à deux temps post-induction (J2 et J4), $n=4-5$. Les différences statistiques ont été calculées avec une ANOVA 2 voies et corrigées par le test post-hoc de Šidák (*= $p<0.05$, **= $p<0.01$).

Concernant les miARN ostéogéniques identifiés dans le premier chapitre de cette étude, l'expression de miR-20a-5p, miR-21-5p et miR-199a-5p était activée

par la lésion musculaire alors que la lésion neurologique bloquait en partie cette augmentation à J2 (**Figure 46**). La régulation de miR-143-3p était quant à elle indépendante de la lésion aigüe du muscle et ses niveaux d'expression étaient augmentés dans le muscle lésé chez les animaux spinalisés. Dans l'ensemble, la régulation des miARN des FAPs semblait suivre une régulation globale où le dommage musculaire associé à la lésion à la CDTX induit l'activation de nombreux miARN ostéogéniques et ostéo-chondro-suppressifs tandis que la lésion neurologique semble prévenir cette activation, tout particulièrement 2 jours après l'induction et coïncidant avec l'apparition de minéralisation ectopique intramusculaire.

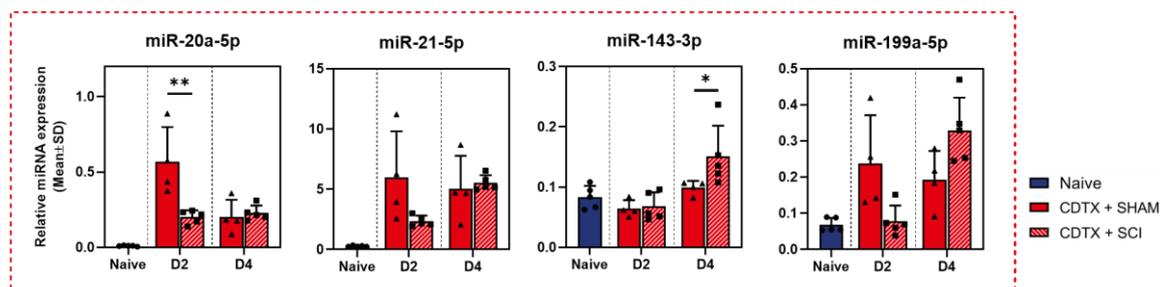


Figure 46 : Impact des lésions musculaire et neurologique sur les miARN ostéogéniques des FAPs

Abondance relative des miARN mesurée dans les FAPs isolés en RT-qPCR dans trois conditions expérimentales (Naïve, CDTX+SHAM et CDTX+SCI) à deux temps post-induction (J2 et J4), n=4-5. Les différences statistiques ont été calculées avec une ANOVA 2 voies et corrigées par le test post-hoc de Šidák (*=p<0.05, **=p<0.01).

2.2.3 Caractérisation des transcrits myogéniques et du miRnome des MPs du muscle POAN

Le développement des POAN étant associé à un défaut de myogenèse et une compromission de la régénération musculaire, nous nous sommes intéressés à la régulation des transcrits et miARN myogéniques et ostéo-chondrogéniques des progéniteurs myogéniques (MPs) du muscle naïf, CDTX+SHAM et CDTX+SCI à 2 et 4 jours après l'induction. Concernant les acteurs ostéo-chondrogéniques, nous avons observé l'inhibition d'*Alpl* et *Bmp2* et la surexpression de *Runx2* et *Sox9* par les MPs issus de muscle en régénération (CDTX+SHAM et CDTX+SCI) par rapport au muscle naïf (**Figure 47**). Par ailleurs, la lésion neurologique induisait une levée partielle de l'inhibition d'*Alpl* et *Bmp2* à J2 ainsi qu'une surexpression de *Sox9* à J4 en condition CDTX+SCI, suggérant une potentielle dérivation ostéo-chondrogénique des MPs. Les niveaux d'expression de *Runx2* n'étaient toutefois pas impactés par la lésion médullaire.

Afin d'évaluer les différents niveaux d'activation et d'engagement dans les processus de différenciation myogénique, nous avons étudié la régulation de facteurs de transcription myogéniques. Nous avons observé une baisse de l'expression de *Pax7* et *Myf5* dans les MPs isolés de muscles CDTX+SCI à J2. Par ailleurs les niveaux des facteurs de transcription *Myod1* et *Myog* étaient induits dans les MPs du muscle endommagé, tout particulièrement à J2 pour *Myod1* et J4 pour *Myog*. Enfin, l'activation de *Myog* codant pour la myogénine était inhibée par la concomitance des deux lésions musculaire et médullaire, suggérant potentiellement un défaut dans les processus de différenciation et de fusion des myoblastes dans le muscle développant des POAN (**Figure 47**).

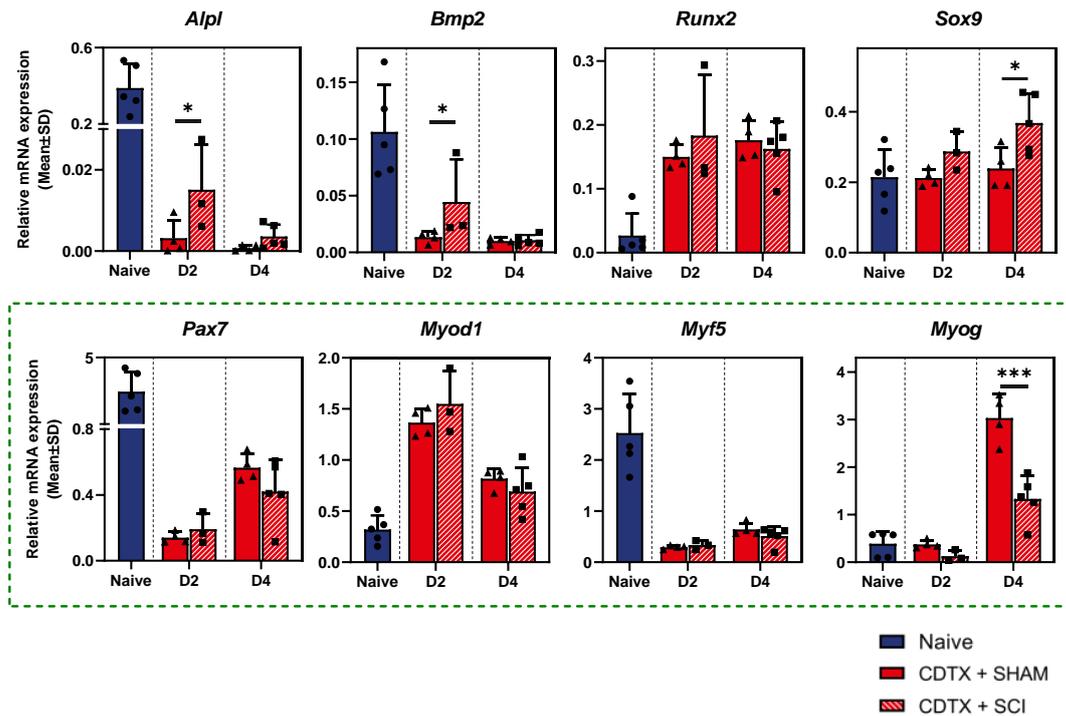


Figure 47 : Expression des transcrits ostéogéniques, chondrogéniques et myogéniques des MPs

Abondance relative des ARNm mesurée dans les MPs isolés en RT-qPCR dans trois conditions expérimentales (Naïve, CDTX+SHAM et CDTX+SCI) à deux temps post-induction (J2 et J4), $n=3-5$. Encadré vert : facteurs de transcription myogéniques. Les différences statistiques ont été calculées avec une ANOVA 2 voies et corrigées par le test post-hoc de Šidák (*= $p < 0.05$, ***= $p < 0.01$).

Nous avons ensuite mesuré l'expression des miARN identifiés lors du criblage sur muscle total (**Figure 48**). Nous avons observé une surexpression des miARN ostéogéniques miR-20a-5p et miR-21-5p des MPs du muscle lésé à partir de J2 (encadré rouge) tandis que les miARN anti-ostéogéniques miR-199a-3p et miR-214-3p étaient activés à J4 (encadré bleu). Par ailleurs, l'activation de miR-199a-3p, miR-21-5p et dans une moindre mesure miR-214-3p était amoindrie dans les MPs CDTX+SCI tandis que l'expression du miARN ostéogénique miR-20a-5p restait inchangée. Nous retrouvons ainsi le profil identifié dans les FAPs, où la lésion musculaire induit l'activation d'une réponse miARN de façon globale tandis que la lésion neurologique inhibe cette réponse. En outre, l'expression des miARN des MPs semble décalée dans le temps entre l'induction des miARN ostéogéniques à J2 et anti-ostéogéniques à J4.

Concernant les miARN impliqués dans les processus myogéniques, nous avons identifié la surexpression de miR-1-3p, miR-133a-3p, miR-206 et miR-378a-3p par les MPs en réponse à la lésion musculaire (encadré vert). Par ailleurs, cette activation était notamment réduite pour miR-1-3p et miR-378a-3p lors de la double lésion musculaire/neurologique, suggérant un potentiel de différenciation myogénique moindre des MPs issus de muscle POAN (**Figure 48**).

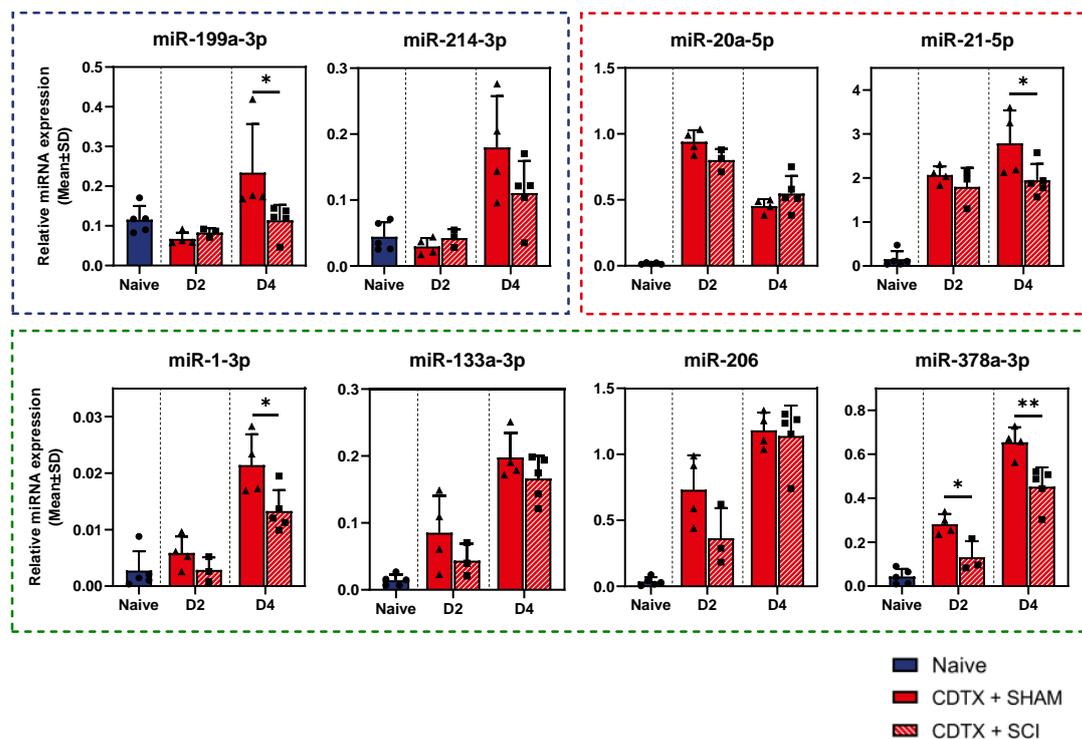


Figure 48 : Expression des miARN ostéo-chondrosuppressifs et myogéniques des MPs

Abondance relative des miARN mesurée dans les MPs isolés en RT-qPCR dans trois conditions expérimentales (Naïve, CDTX+SHAM et CDTX+SCI) à deux temps post-induction (J2 et J4), n=3-5. Encadré bleu : miARN ostéo-chondro-suppressifs, encadré rouge : miARN ostéogéniques, encadré vert : myomiR. Les différences statistiques ont été calculées avec une ANOVA 2 voies et corrigées par le test post-hoc de Šidák (*= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$).

2.2.4 Caractérisation des progéniteurs musculaires avoisinant les POAN chez l'Homme

2.2.4.1 Tri et évaluation de la multipotence des progéniteurs musculaires

Afin d'évaluer le potentiel fonctionnel des miARN précédemment identifiés et leur pertinence dans les FAPs et MPs humains, nous avons isolé ces deux populations de progéniteurs CD56⁺ pour les MPs ou PDGFR α ⁺ pour les FAPs. La stratégie de tri est présentée dans la **Figure 49**.

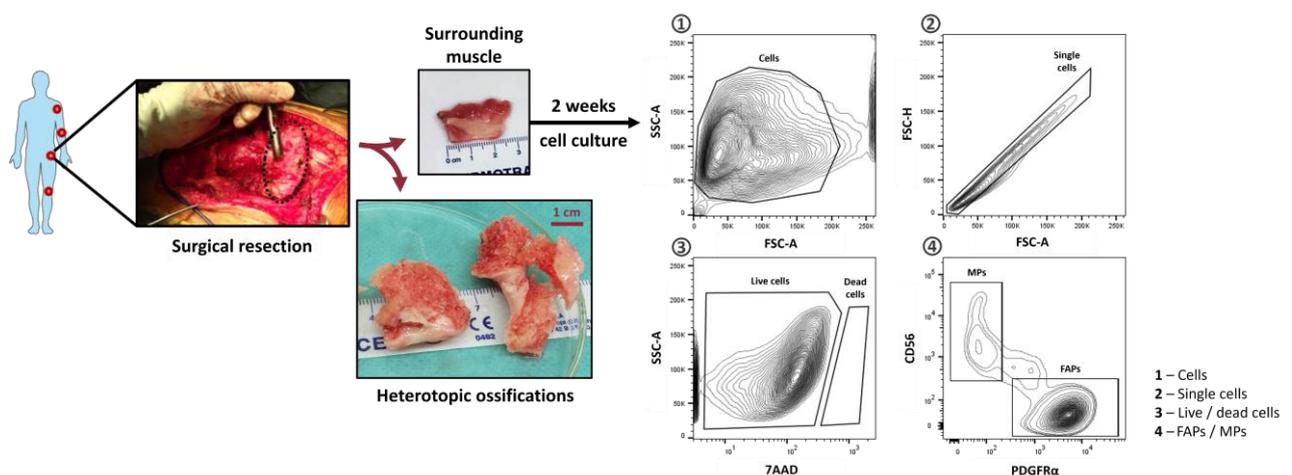


Figure 49 : Stratégie d'isolement cellulaire des muscles avoisinant l'ostéome des patients POAN

Les progéniteurs musculaires sont isolés de muscle avoisinant le(s) ostéome(s) de patient POAN après digestion, amplification et tri cellulaire. Les CSM de moelle d'ostéome (BMSC NHO) sont obtenues par culture d'explants d'ostéomes.

Nous avons dans un premier temps validé le caractère multipotent de ces cellules en évaluant leur capacité à s'engager en différenciation ostéogénique, adipogénique et chondrogénique (**Figure 50 A**). Nous avons observé que les FAPs CD56⁻PDGFR α ⁺ et MPs CD56⁺PDGFR α ⁻ issus de muscle avoisinant l'ostéome étaient tous deux capables de se différencier en ostéoblastes et de produire une matrice minéralisée mise en évidence par la coloration rouge Alizarine. Cependant, contrairement aux FAPs, les MPs n'étaient pas capables d'adipogenèse et leur différenciation chondrogénique était réduite (**Figure 50 A** et résultats de collaborateurs non affichés). Nous avons aussi évalué le potentiel de différenciation ostéogénique de progéniteurs mésenchymateux issues de plusieurs sources :

moelle osseuse aspirée (BMSC), moelle d'ostéome de patient POAN (BMSC NHO), FAPs isolées de muscle sain (FAPs) et de muscle avoisinant les POAN (FAPs NHO). Les cellules ont été incubées dans un milieu de différenciation ostéogénique (OB) supplémenté ou non de lipopolysaccharides (OB+LPS) pour simuler le contexte inflammatoire des POAN (**Figure 50 B**). La quantification de la minéralisation à 1, 3, 7 et 14 jours a montré un plus fort potentiel ostéogénique des BMSC NHO par rapport aux BMSC, disposant elles-mêmes d'un plus fort potentiel que les FAPs de muscle sain ou POAN. Enfin, l'addition de LPS augmentait légèrement le potentiel ostéogénique des BMSC et BMSC NHO tandis que celui des FAPs (sain et NHO) était augmenté de façon plus importante à J14 (effet condition LPS ; $p=0,0152$), confirmant le potentiel de la condition inflammatoire à induire la différenciation ostéogénique.

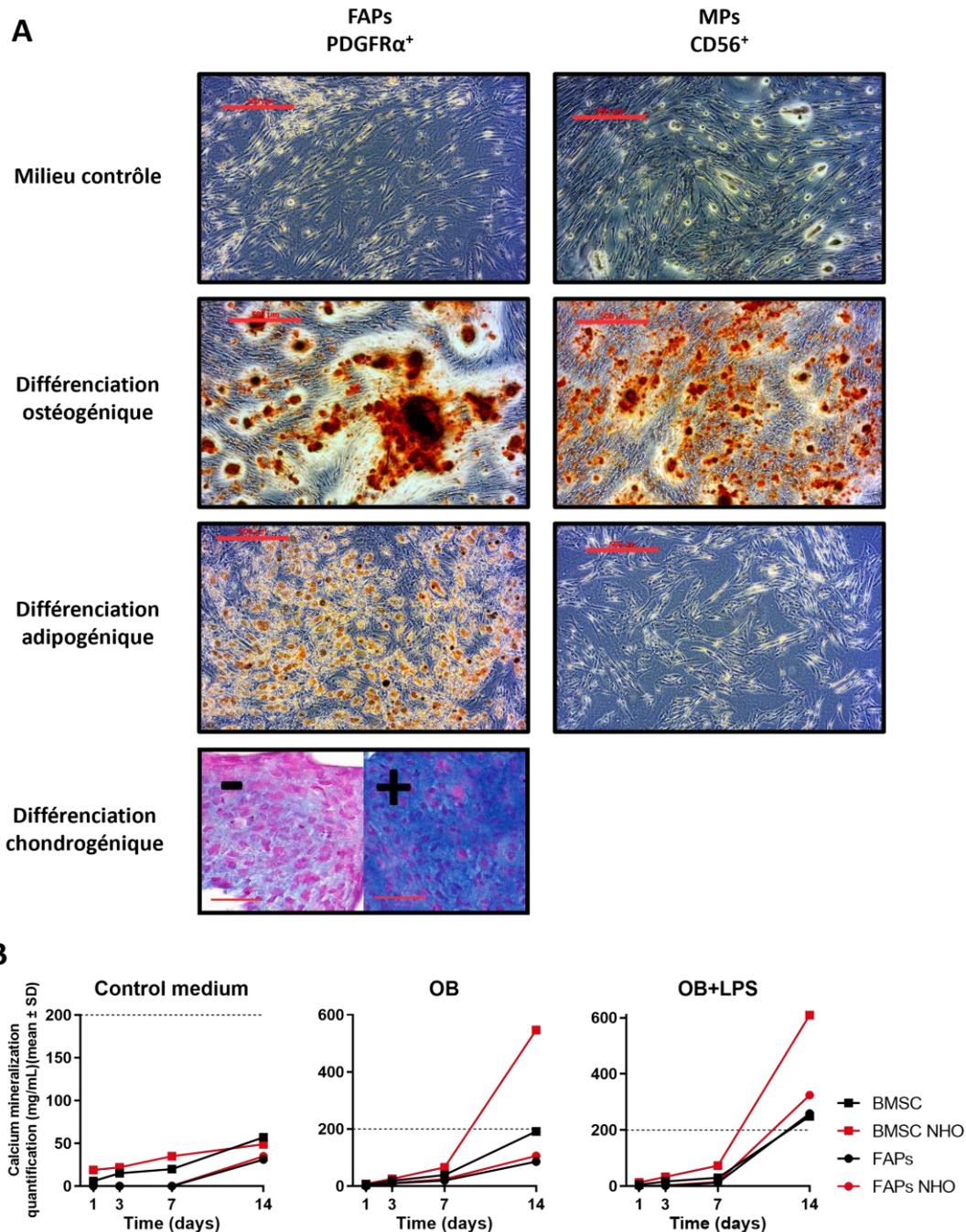


Figure 50 : Evaluation des capacités de différenciations des progéniteurs musculaires et comparaison du potentiel ostéogénique en fonction des sources de CSM

(A) Différenciation ostéogénique (500 μ m), adipogénique (500 μ m) et chondrogénique (50 μ m) des FAPs CD56 $^-$ PDGFR α^+ et MPs CD56 $^+$ PDGFR α^- et colorations rouge alizarine, oil red O et bleu alcian/rouge nucléaire. (B) Potentiel de différenciation ostéogénique des CSM de moelle aspirée (BMSC), de moelle POAN (BMSC NHO), FAPs de muscle sain (FAPs) et de muscle POAN (FAPs NHO) 1, 3, 7 et 14 jours après l'induction de la différenciation en milieu ostéogénique (OB) ou ostéogénique supplémenté de LPS (OB+LPS), n=1-3.

2.2.4.2 Cinétique d'expression des transcrits et miARN des FAPs en condition ostéogénique et inflammatoire

Nous avons mesuré l'expression des acteurs ostéogéniques et miARN identifiés dans le modèle de POAN murin. Afin de reproduire le contexte inflammatoire des POAN, nous avons utilisé des milieux conditionnés de macrophages stimulés au LPS (CM⁺) dont les propriétés seront plus amplement décrites en section 3.2.2 du 3^{ème} chapitre de cette étude. Nous avons effectué un premier criblage des marqueurs ostéo-chondrogéniques sur des pools d'échantillons en milieu de différenciation ostéogénique (OB) ou milieu OB supplémenté de CM⁺ (OB+CM⁺) puis nous avons confirmé les gènes d'intérêt identifiés sur les échantillons individuels après 1, 3, 7 et 10 jours de culture (**Figure 51**). Nous avons observé une augmentation croissante au cours du temps de l'expression des marqueurs ostéogéniques *BMP2*, *RUNX2* et *ATF4* lors de la différenciation ostéogénique en condition OB+CM⁺. Cette condition induisait un pic d'expression d'*ALPL* à J3. En outre, le facteur de transcription chondrogénique *SOX9* était inhibé lors de la culture en milieu OB et d'autant plus en milieu OB+CM⁺, à l'identique de *COMP*, protéine de la matrice cartilagineuse. A l'inverse, *COL10A1*, marqueur de l'hypertrophie des chondrocytes était plus exprimé. Les niveaux d'expression de *VEGFA*, *HIF1A*, *SOCS1*, *SMAD2* et *TWIST1* étaient augmentés par la condition inflammatoire tandis que l'expression de *BGLAP*, *TGFB2* et *FN1* restaient inchangés ou modulés uniquement par la condition OB. Par ailleurs, l'expression d'*ACVR1* impliqué dans le développement de la FOP, forme génétique de la pathologie, était inchangée. Ces résultats témoignent de la capacité des FAPs à répondre au stimulus pro-inflammatoire des CM⁺ et de leur capacité à induire l'expression de gènes ostéogéniques, angiogéniques et hypoxiques tout en réduisant l'expression des gènes chondrogéniques (**Figure 51**).

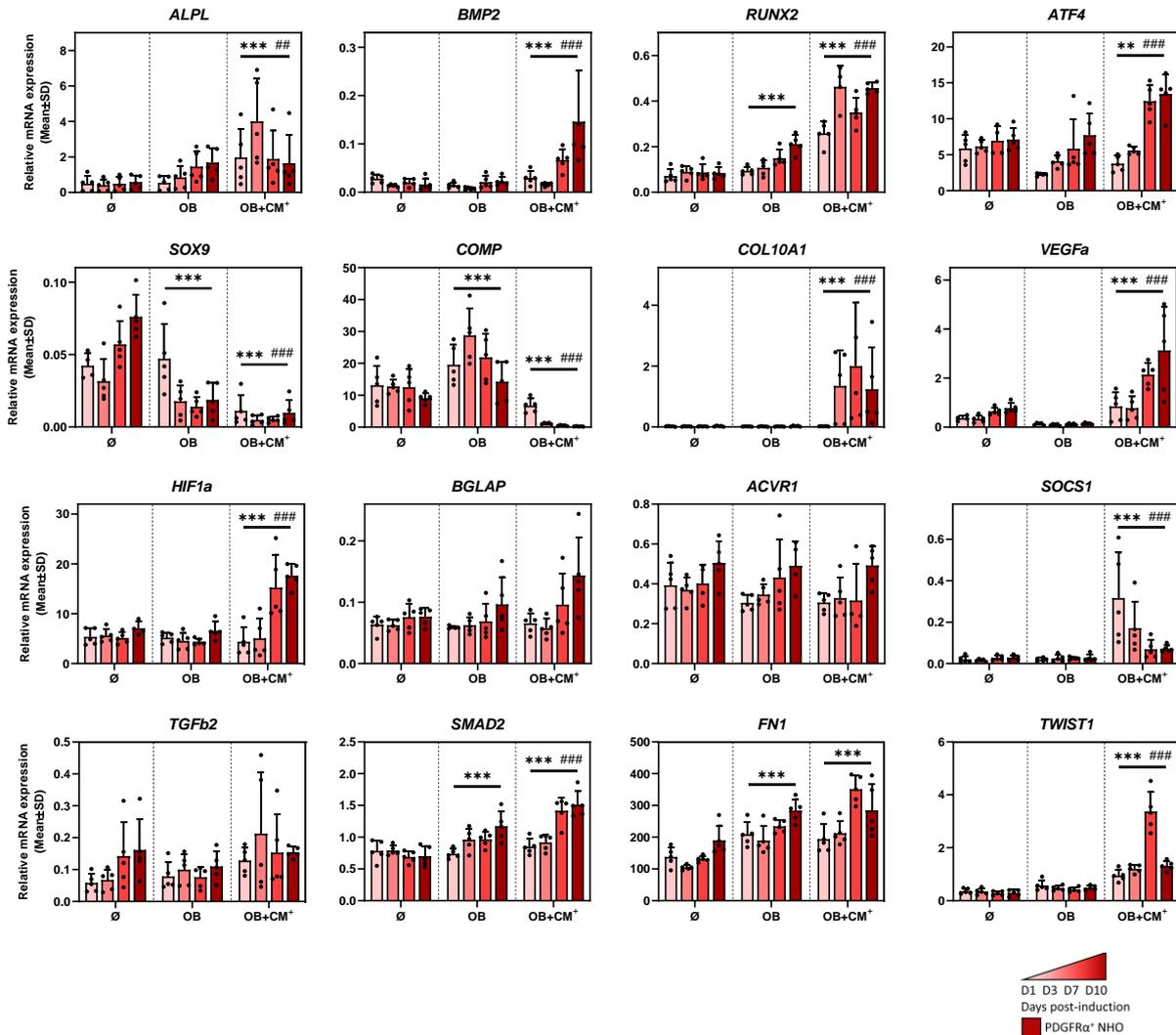


Figure 51 : Impact de la différenciation ostéogénique en milieu inflammatoire sur les transcrits ostéogéniques, chondrogéniques, matriciels et endothéliaux des FAPs

Abondance relative des ARNm mesurée dans les FAPs isolés en RT-qPCR dans trois conditions expérimentales (milieu contrôle Ø, milieu de différenciation ostéogénique OB et milieu OB supplémenté de milieu conditionné de macrophage OB+CM⁺) à quatre temps post-induction (J1, J3, J7 et J10), n=5. Les différences statistiques ont été calculées avec une ANOVA 2 voies et corrigées par le test post-hoc de Tukey (*= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$ comparé au contrôle Ø et #, ##, ### comparé au milieu OB).

Les miARN dérégulés et pré-identifiés dans le modèle ont aussi fait l'objet d'une étude chez les FAPs de muscle de patients POAN avoisinant l'ostéome (**Figure 52**). Le miARN ostéogénique miR-20a-5p était le seul miARN significativement activé par la différenciation ostéogénique seule. De surcroît, nous avons identifié une activation globale de la signalisation miARN en condition OB+CM⁺ aussi bien pour les miARN anti-ostéogéniques miR-17-5p, miR-30e-5p, miR-93-5p, miR-199a-3p, miR-210-3p, miR-214-3p, ostéogéniques miR-20a-5p, miR-21-5p, miR-34c-5p, miR-199a-5p ou anti/pro-inflammatoires miR-146a-5p et miR-155-5p. Ces résultats confirment la surexpression généralisée des miARN par les FAPs en condition inflammatoire, comme retrouvée dans le muscle en réponse à une lésion à la CDTX, ainsi que la pertinence de l'étude de cette population cellulaire isolée des patients POAN et des milieux conditionnés de macrophages pour l'étude des mécanismes ostéogéniques associés aux POAN *in vitro*.

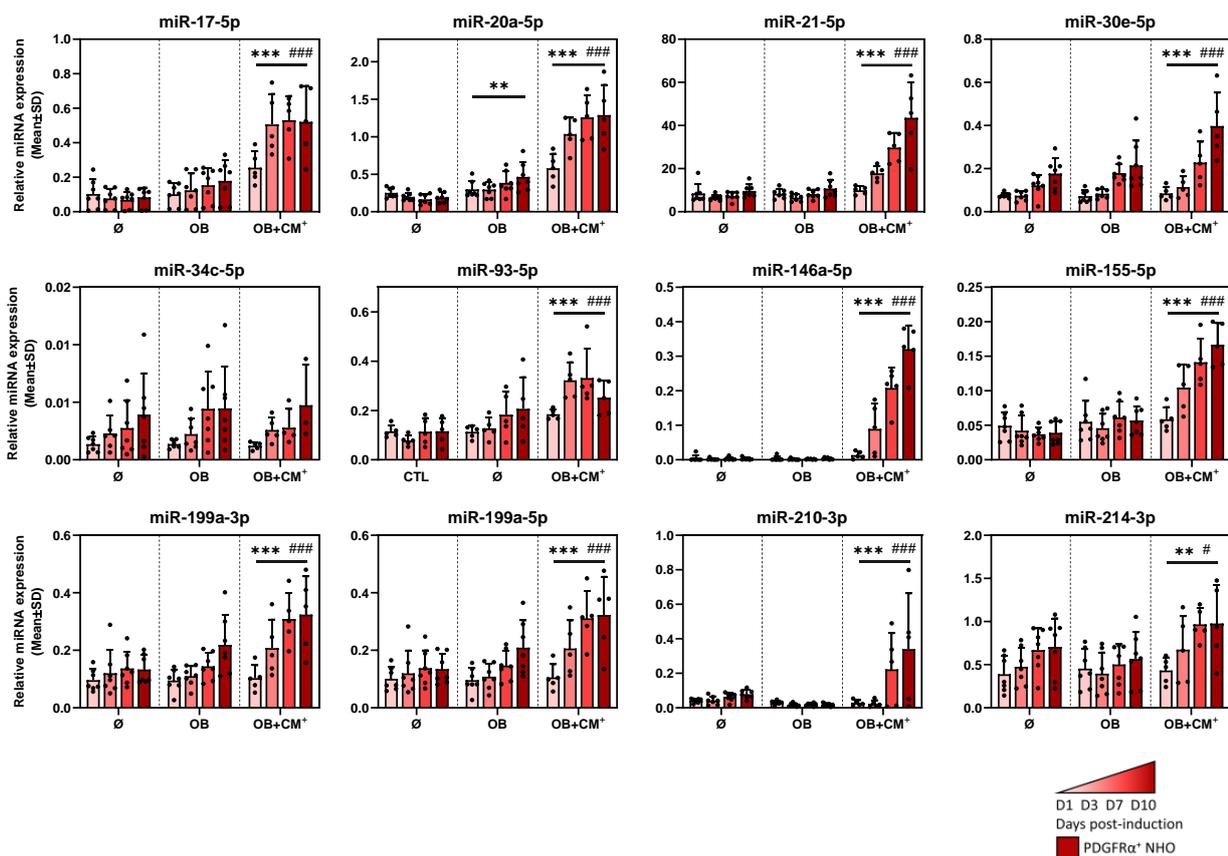


Figure 52 : Impact de la différenciation ostéogénique en milieu inflammatoire sur l'expression des miARN des FAPs

Abondance relative des miARN mesurée dans les FAPs isolés en RT-qPCR dans trois conditions expérimentales (milieu contrôle Ø, milieu de différenciation ostéogénique OB et milieu OB supplémenté de milieu conditionné de macrophage OB+CM⁺) à

quatre temps post-induction (J1, J3, J7 et J10), n=5. Les différences statistiques ont été calculées avec une ANOVA 2 voies et corrigées par le test post-hoc de Tukey (*= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$ comparé au contrôle Ø et #, ##, ### comparé au milieu OB).

2.2.5 Etude fonctionnelle des miARN dans la modulation du potentiel de différenciation des FAPs et MPs

2.2.5.1 Effet des miARN sur le potentiel ostéogénique des FAPs

Dans le but de valider l'intérêt et le rôle des miARN identifiés dans le développement des POAN, nous avons réalisé des transfections des miARN candidats dans des FAPs de patients POAN avant l'induction en différenciation ostéogénique. Pour ces études fonctionnelles, nous avons réalisé différentes mises au point afin d'obtenir le meilleur compromis entre répression ou surexpression des transcrits cibles (directs ou indirects), disponibilité du miARN analogue ou de son inhibiteur au long des processus de différenciation et impact du protocole expérimental et de la modulation des miARN sur la viabilité cellulaire (**Figure 53**). Une gamme de dose croissante de 0,1 pmol à 10 pmol de miARN contrôlé fluorescent a été réalisée et nous avons observé une augmentation de la fluorescence intracellulaire dès 1 pmol d'oligonucléotide utilisé (**A**). Des miARN analogues (mimics) et inhibiteurs de miARN (anti-miR) spécifiques de miR-20a-5p et miR-214-3p nous ont ensuite permis d'évaluer la cytotoxicité des oligonucléotides et du vecteur, des liposomes, utilisés lors de la transfection (**B**). Aucun effet sur la viabilité des cellules n'a été observé avec la concentration la plus élevée en analogues et inhibiteurs. Nous avons ensuite évalué l'effet de ces oligonucléotides sur l'expression des miARN candidats (**C**). A la dose la plus élevée, 10 pmol d'antimiR-20a-5p était capable de réduire de 50% les niveaux de miR-20a-5p tandis que la transfection d'analogue de miR-214-3p permettait d'obtenir des niveaux 70 fois plus élevés par rapport aux cellules transfectées avec les oligonucléotides contrôles, et ce à la dose la plus faible de 1 pmol. Par ailleurs, aucun effet n'a été observé sur la régulation d'autres miARN (résultats non affichés). Enfin, nous avons évalué l'expression de cibles directes de miR-214-3p et miR-20a-5p (**Figure 53 D et E**). Nous avons observé une tendance à l'augmentation de l'expression de *CSF1*, lors de l'inhibition de miR-214-3p et une tendance à une diminution de son expression lors de l'utilisation d'analogues (**D**). L'utilisation d'inhibiteurs de miR-20a-5p a permis de réduire les niveaux de *RUNX2*, tandis que *PPAR γ* , pourtant cible directe du miARN, était aussi sous-exprimé, soulignant ainsi la complexité et le faible recul des régulations médiées par les miARN (**E**). N'ayant pas d'impact sur la viabilité cellulaire et obtenant une modulation suffisante des transcrits cibles, nous avons utilisé les doses de 10 pmol pour les inhibiteurs et 1 pmol pour les analogues de miARN dans les analyses fonctionnelles suivantes.

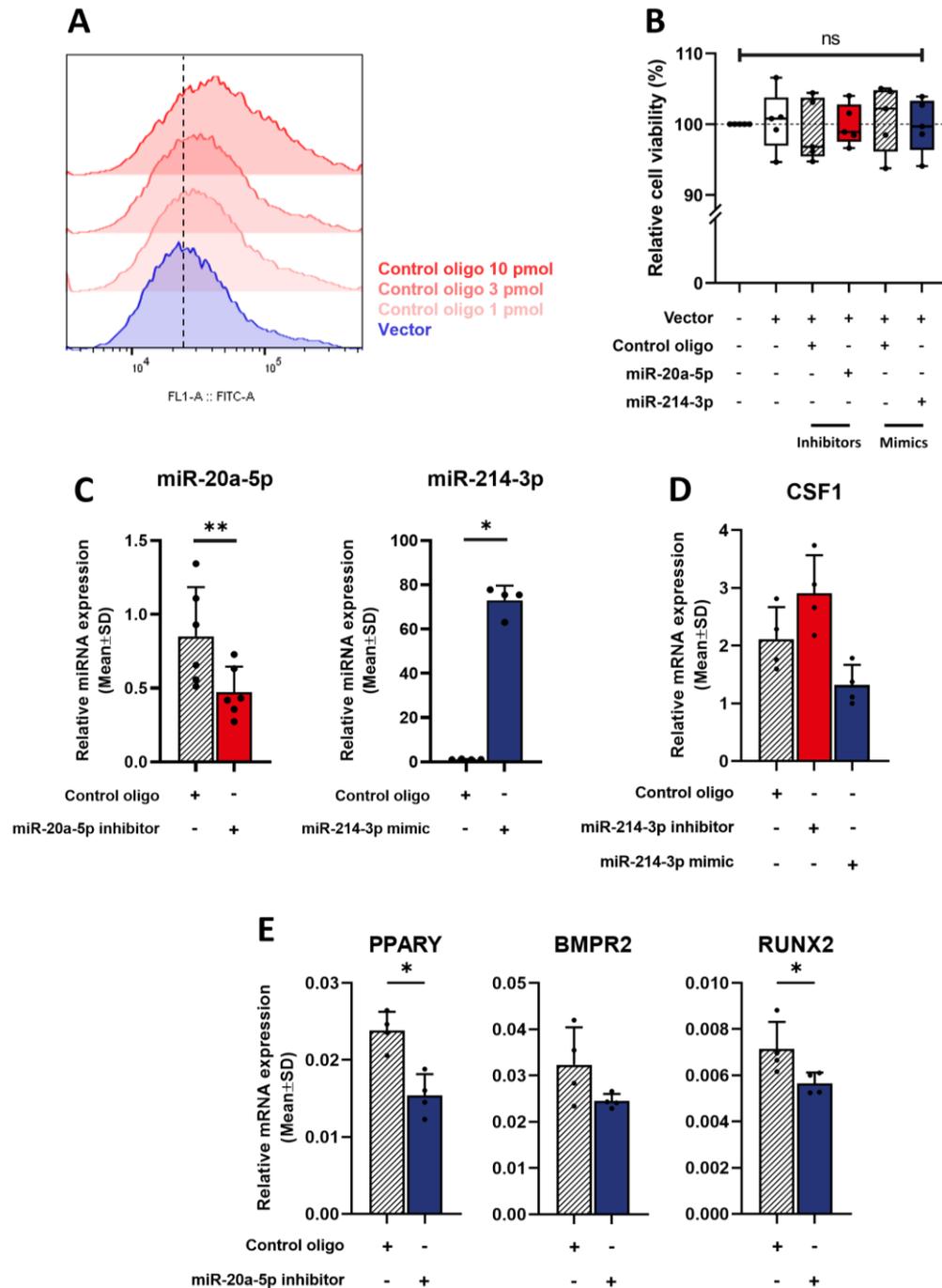


Figure 53 : Effet des miARN et du vecteur sur la viabilité, l'abondance des miARN intracellulaires et la modulation des transcrits cibles.

(A) Evolution de la fluorescence intracellulaire évaluée en cytométrie après l'intégration d'un miARN contrôle couplé à la GFP aux doses 1, 3 et 10 pmol. (B) Evolution de la viabilité cellulaire par incorporation de DAPI lors des transfections à 10 pmol pour les anti-miRs et 1 pmol pour les analogues ou du vecteur seul. (C) Abondance relative des miARN mesurés dans les FAPs après 3 jours de transfection, en RT-qPCR, n=4-6. Evaluation de (D) la surexpression de miR-214-3p et de (E)

l'inhibition de miR-20a-5p sur la modulation des transcrits. Les différences statistiques ont été calculées avec un test de Mann-Whitney (= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$).*

En se basant sur les résultats de criblages de miARN de FAPs croisés avec la littérature, nous avons retenu une dizaine de miARN candidats pour les études fonctionnelles. Ainsi, nous avons observé que la transfection d'inhibiteurs des miARN ostéogéniques miR-20a-5p, miR-199a-5p ainsi que d'analogues des miARN ostéo-suppressifs miR-146a-5p et miR-214-3p étaient capables de réduire la différenciation ostéogénique et les processus de minéralisation des FAPs humains (**Figure 54 A**). La transfection de l'ensemble de ces oligonucléotides permettait de réduire la minéralisation d'environ 50% comparée aux oligonucléotides contrôles. En outre, miR-17-5p, miR-21-5p, miR-126-3p, miR-133a-3p, miR-150-5p, miR-199a-3p, miR-204-5p, miR-206 et miR-424-3p mimics et inhibiteurs ont été évalués sans pour autant obtenir une modulation significative de la différenciation ostéogénique des FAPs (résultats non affichés). Nous avons souhaité confirmer la réduction du potentiel ostéogénique des FAPs par l'évaluation de marqueurs protéiques de ce processus (**Figure 54 B et C**). Nous avons observé la diminution de l'expression protéique de MTOR et RUNX2 lors de l'inhibition de miR-20a-5p (**B**) tandis que les analogues de miR-214-3p inhibaient OSX, SOX9 ainsi que RUNX2 (**C**).

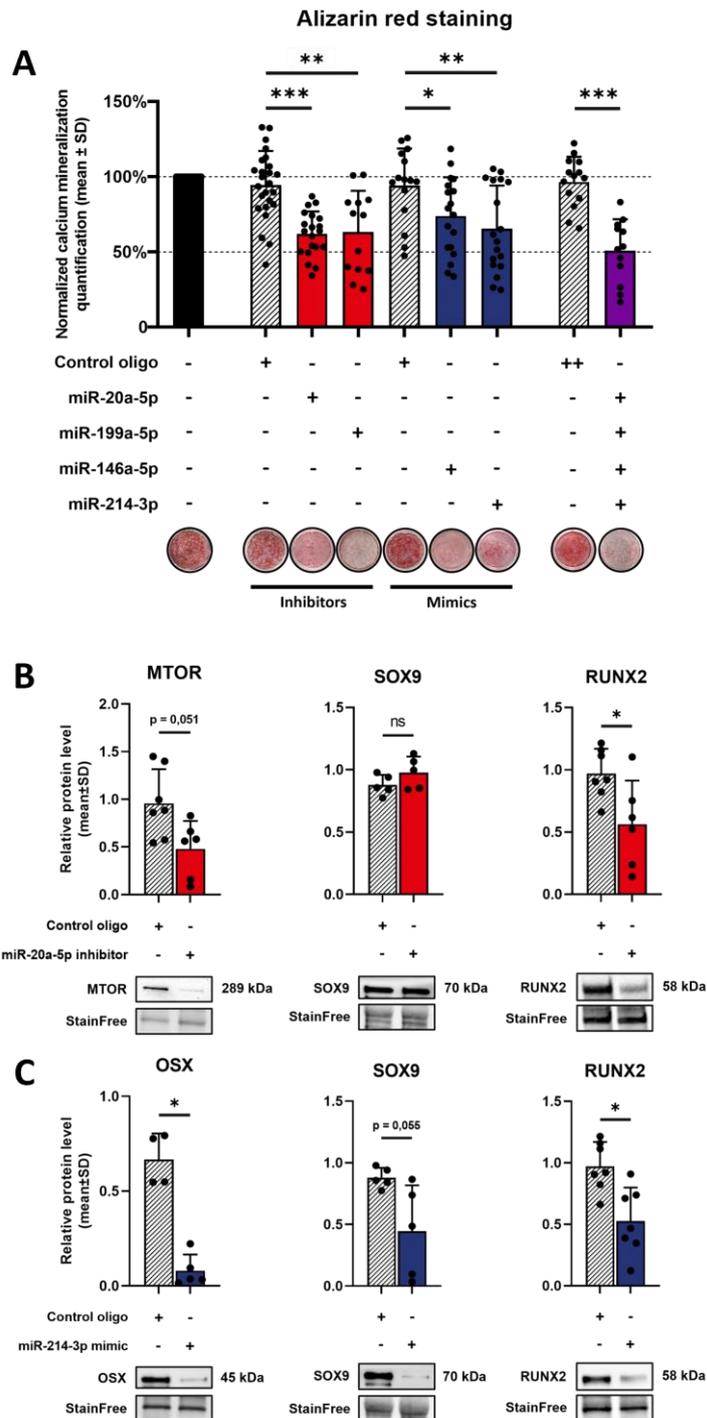


Figure 54 : Effet des miARN sur la différenciation ostéogénique des FAPs et la modulation des marqueurs ostéogéniques

(A) Quantification de la minéralisation calcique après 14 jours d'induction ostéogénique des FAPs transfectés en présence de 10 pmol d'inhibiteurs de miARN ou 1 pmol de miARN analogues, $n=12-25$, test de Student non apparié avec correction de Welch. (B et C) Modulation des niveaux protéiques après 7 jours d'induction ostéogénique normalisés sur la totalité des protéines transférées sur la membrane, $n=4-7$, (*= $p<0.05$, **= $p<0.01$, ***= $p<0.001$).

Enfin, nous avons validé la spécificité de ces résultats en réalisant des transfections en miroir des précédentes, c'est-à-dire en utilisant des analogues de miR-20a-5p et des inhibiteurs de miR-214-3p, où nous n'avons retrouvé aucune modification significative (**Figure 55 A**). Par ailleurs, afin d'étudier les processus de compétition entre les analogues, le nombre de complexe RISC nécessaires à la régulation des ARNm par les miARN étant limité, nous avons réalisé des transfections combinant des analogues ostéogéniques de miR-20a-5p ainsi qu'ostéo-suppressifs de miR-214-3p comme observé précédemment (**Figure 55 B**). Nous avons observé une tendance à la réduction de la différenciation ostéogénique des FAPs toutefois inférieure à l'inhibition médiée par miR-214-3p seul, et possiblement impactée par la moindre disponibilité des complexes permettant la fonctionnalisation de miR-214-3p.

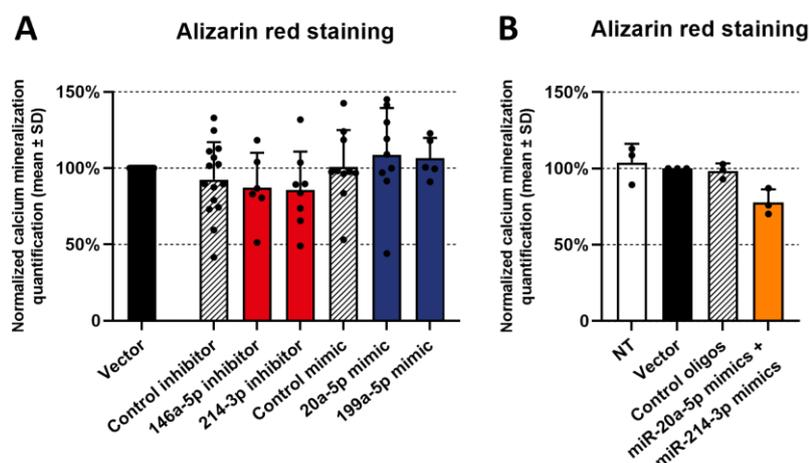


Figure 55 : Validation de la spécificité de l'effet biologique à la séquence des miARN et de la compétition de deux miARN au rôle antagoniste

(A) Quantification de la minéralisation calcique après 14 jours d'induction ostéogénique des FAPs transfectés en présence de 10 pmol d'inhibiteurs de miARN ou 1 pmol de miARN analogues, $n=5-15$. (B) Quantification de la minéralisation calcique lors de la transfection en compétition d'un miARN ostéogénique, miR-20a-5p et ostéo-suppresseur, miR-214-3p.

2.2.5.2 Effet des miARN sur le potentiel ostéogénique des MPs

Bien que les cellules satellites ne contribuent pas au développement des POAN à 2 et 4 semaines post-induction, aucuns travaux n'a permis d'exclure la participation précoce des MPs, qui disposent de propriétés ostéogéniques *in vitro*. L'apparition de ces ossifications s'effectuant dans des zones d'accumulation de tissu fibreux, nous avons suggéré un lien plus précoce avec une myogenèse compromise.

Par ailleurs, nous avons précédemment observé une diminution de l'expression des myomiR des MPs à J2 et J4. Or ces miARN jouent un rôle dans les processus ostéogéniques des progéniteurs mésenchymateux et nous avons donc évalué leur capacité à favoriser un tel engagement cellulaire (**Figure 56**). Nous avons observé une importante réduction de la minéralisation et du potentiel de différenciation ostéogénique des MPs par la transfection d'inhibiteurs de miR-133a-3p, classiquement étudié pour son implication dans les processus de prolifération et de différenciation myoblastique. A l'inverse, sa surexpression, tout comme celle de miR-206 ou son inhibition, favorisait la différenciation des MPs en ostéoblastes (**Figure 56**). En outre, la modulation de miR-17-5p, miR-20a-5p, miR-21-5p, miR-146a-5p, miR-155, miR-199a-5p et miR-214-3p ne modifiait pas le potentiel ostéogénique des MPs (résultats non affichés). Ces résultats soulignent le potentiel des myomiR dans la différenciation ostéogénique et la nécessité de ne pas se limiter uniquement à leurs rôles traditionnellement attribués aux processus myogéniques de MPs.

L'ensemble de ces travaux ont mené à la soumission d'un article. Celui-ci retrace notre étude de l'impact de la lésion neurologique sur la régulation des miARN des FAPs et MPs dans le développement précoce des POAN ainsi que les études fonctionnelles permettant la modulation du potentiel ostéogénique des FAPs. Celui-ci est accessible sous sa forme non révisée en annexe VIII - 1.2.1.

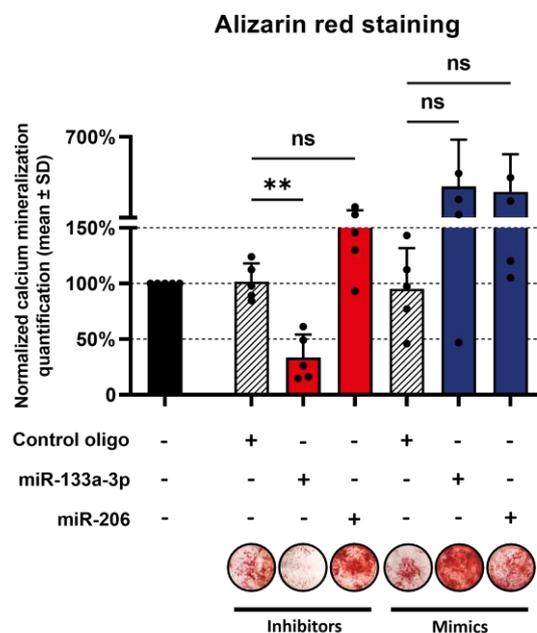


Figure 56 : Effet des miARN sur la différenciation ostéogénique des MPs

Quantification de la minéralisation calcique après 14 jours d'induction ostéogénique des MPs transfectés en présence de 10 pmol d'inhibiteurs de miARN ou 1 pmol de miARN analogues, $n=5$, test U de Mann-Whitney (**= $p<0.01$).

2.3 Synthèse et discussion

Dans ce second chapitre, nous avons démontré que plusieurs miARN dont l'expression est altérée dans le muscle développant des POAN sont sous-exprimés par les FAPs et les MPs, suggérant une levée de l'inhibition de processus anti-ostéogéniques et un défaut des processus myogéniques. Par ailleurs, les miARN sont régulés de façon semblable dans les FAPs du modèle murin de POAN que lors de la culture en condition inflammatoire de FAPs de patients POAN. Enfin, ces miARN sont capables de moduler le potentiel de différenciation ostéogénique des FAPs et des MPs *in vitro*.

Synthétiquement, nous avons mis en évidence au cours de ce chapitre les résultats suivants :

- I. Le muscle développant des POAN semble contenir une moindre proportion de macrophages et MPs 2 jours après induction, tandis que celle des FAPs semble supérieure à J4.
- II. La lésion musculaire induit l'expression par les FAPs de *Runx2* et *Sox9* tandis que les niveaux de *Tgfb1* et d'*Alpl* sont augmentés dans le muscle POAN. Par analogie, les MPs de muscle POAN surexpriment *Sox9* et disposent de niveaux de *Myog* réduits, suggérant une participation de ces deux acteurs dans les processus ostéo-chondrogéniques.
- III. Les miARN ostéogéniques et ostéo-chondro-suppressifs des FAPs sont uniformément activés en réponse au dommage musculaire et la lésion neurologique prévient cette activation. En outre, les myomiR des MPs sont négativement régulés lors de la concomitance des deux lésions musculaire et neurologique.
- IV. Les profils d'expression des acteurs ostéogéniques et miARN en réponse au stimulus inflammatoire sont similaires entre les FAPs de muscle POAN murin et les FAPs de muscle de patient POAN.
- V. L'inhibition de miR-20a-5p, miR-199a-5p et la surexpression de miR-146a-5p et miR-214-3p permet de réduire le potentiel de différenciation ostéogénique des FAPs. Par ailleurs, l'inhibition du myomiR-133a-3p permettait ce même effet sur les MPs.

L'étude des populations cellulaires isolées nous a permis de décrire la répartition des acteurs impliqués dans la régénération musculaire physiologique et son altération lors du développement des POAN. Ainsi, nous avons observé une diminution de la proportion des MPs à J2 et des ECs à J2 et J4 lors de la lésion

musculaire, témoignant d'une surmortalité cellulaire ainsi qu'une perte du réseau vasculaire comme décrit précédemment [96]. Toutefois nous n'avons pas retrouvé de nette augmentation de la proportion des FAPs et macrophages dans les muscles POAN, au contraire, le recrutement des macrophages ainsi que le nombre de MPs, semble réduit par rapport à un muscle en régénération, suggérant l'impact de la lésion neurologique sur ces populations. Ces bouleversements pourraient engendrer une perte de coordination cellulaire et une réponse inflammatoire exacerbée, caractéristique des lésions neurologiques comme évoqué par Madaro *et al.* dans l'étude de la dérive fibrogénique des FAPs lors de la dénervation du muscle [165].

Nous avons ensuite mesuré des transcrits des FAPs et MPs du muscle en régénération ou développant des POAN. Nous avons observé une surexpression de *Runx2* et *Sox9* lors d'une simple lésion musculaire n'entraînant pourtant pas de POAN, une régulation de la forme protéique de ces acteurs pourrait prévenir un engagement ostéo-chondrogénique lors de la régénération musculaire. L'étude des miARN a démontré que la lésion musculaire induit une surexpression globale des miARN ostéogéniques mais aussi ostéo-chondro-suppressifs et myogéniques et révélant ainsi l'existence d'une réponse des miARN activée lors de ce processus régénératif. Cependant, avec la double lésion, cette activation est restreinte, maintenant les niveaux d'expression de certains miARN proche des niveaux du muscle naïf. Or, il a été démontré que la délétion de DICER, et donc de la biogenèse globale des miARN dans les ostéoblastes, augmente la prise de volume osseux *in vivo*, suggérant un rôle ostéo-suppressif de la signalisation miARN dans ces conditions [353]. De plus cette inhibition pourrait ne pas être entièrement révélée par les analyses transcriptomiques car les miARN peuvent bloquer la traduction d'un transcrite sans pour autant le dégrader [206,354]. Ainsi, les miARN joueraient un rôle permettant de prévenir l'engagement ostéogénique de ces progéniteurs lors de la régénération musculaire, qui serait aboli lors d'un dommage neurologique par un processus encore non identifié.

Par ailleurs, bien qu'il ait été démontré que les FAPs soient une source paracrine de VEGF- α , et qu'un environnement hypoxique favorise le développement des POAN, l'expression de ce facteur par les FAPs n'est pas affectée par la neurolésion aux temps étudiés [98]. Toutefois, la surexpression du *Tgfb1* par les FAPs issus de muscle POAN suggère un phénotype fibroblastique potentiellement à l'origine d'une compromission des processus de régénération musculaire à l'image du profil des FAPs dans les dystrophies et myopathies [98,355,356]. De façon intéressante, *Sox9* est surexprimé par les MPs de muscle POAN, suggérant son potentiel rôle sur la chondrogenèse des MPs mais aussi sur le

défaut de myogenèse, celui-ci étant en effet capable d'inhiber la production de sarcoglycanes impliqués dans les processus myogéniques [357]. Par ailleurs, cette surexpression s'effectue en parallèle d'une moindre expression de la myogénine. L'expression de miR-378a-3p est réduite lors du développement des POAN, or celui-ci régule la signalisation du TGF- β et favorise la différenciation myogénique, tout comme miR-1-3p dont l'expression est aussi altérée par la lésion neurologique [358–360]. Enfin, à l'inverse de *Runx2* et *Sox9*, *Alpl* et *Bmp2* sont régulés négativement par la lésion musculaire dans les FAPs et les MPs. De plus, la lésion neurologique semble lever partiellement l'inhibition de ces deux facteurs, témoignant une nouvelle fois de la levée d'inhibitions de l'ostéogenèse dans le muscle POAN.

Avant de procéder aux analyses fonctionnelles, nous avons caractérisé les FAPs de patients POAN. Nous avons observé qu'ils possèdent toutes les caractéristiques des CSM, ainsi qu'un potentiel de différenciation ostéogénique identique aux CSM de moelle osseuse en milieu inflammatoire. De plus, en présence de milieu conditionné de macrophages pro-inflammatoires (CM⁺), les FAPs surexpriment au cours du temps *ALPL*, *BMP2*, *RUNX2* et *ATF4*. La condition inflammatoire réduit l'expression de *SOX9* et *COMP*, tout en activant l'expression du *COL10A1* caractéristique des chondrocytes hypertrophiques [361]. De plus, *SMAD1-5-8*, effecteurs de la transduction du signal BMP n'étaient pas altérés par nos conditions expérimentales tandis que *SMAD2*, plus exprimé en condition inflammatoire est un effecteur de la cascade du TGF- β , suggérant potentiellement une plus forte implication de cette cascade de signalisation [362]. Les FAPs partagent de nombreuses caractéristiques avec les progéniteurs ostéogéniques du périoste, et sont capables d'engager une différenciation fibroblastique, chondrogénique puis ostéogénique lors des processus de réparation osseuse [116,117]. Enfin, l'ensemble de ces résultats confirme le potentiel de la condition inflammatoire *in vitro* à induire l'expression de gènes ostéogéniques, tel qu'observé *in vivo* lors de l'activation de la réponse inflammatoire suite à une lésion musculaire.

Nous avons ensuite évalué les différents miARN identifiés dans le muscle développant des POAN ainsi que les FAPs et MPs humains. L'inhibition de miR-20a-5p, miR-199a-5p et la surexpression de miR-146a-5p et miR-214-3p permettent de réduire le potentiel de différenciation ostéogénique des FAPs. MiR-20a-5p et miR-199a-5p sont décrits pour leurs rôles dans la différenciation ostéogénique des CSM de moelle osseuse, ciblant respectivement la signalisation des BMP et d'HIF-1 α [255,260,310]. Par ailleurs, miR-146a-5p et miR-214-3p sont capables de réguler négativement les processus ostéogéniques en inhibant respectivement *ATF4* et *SIRT1* [257,363,364]. De plus, l'inhibition du myomiR miR-133a-3p est aussi capable

de prévenir la différenciation ostéogénique des MPs. Enfin, nous avons observé que la régulation induite par les miARN sur la forme protéique des acteurs ostéochondrogéniques semble plus importante que celle appliquée aux transcrits. Ces résultats pourraient s'expliquer par une dégradation partielle et/ou un blocage de la traduction des ARNm cibles par les miARN, ces derniers restant alors mesurables en RT-qPCR, et soulignent l'importance d'évaluer les niveaux protéiques des acteurs d'intérêt.

Nous avons ainsi décrit dans ce second chapitre un potentiel mécanisme d'action de la lésion neurologique sur l'induction ostéogénique des FAPs et MPs, au travers d'une perturbation de l'équilibre de la réponse des miARN induite par le dommage musculaire. Les processus inflammatoires induisent la surexpression des marqueurs ostéogéniques et miARN tandis que la lésion neurologique maintient l'expression de ces marqueurs mais inhibe l'activation de la réponse miARN, induisant l'engagement ostéogénique des FAPs. Une des hypothèses avancées menant à cette perturbation de la balance miARN serait la suractivation de la réponse inflammatoire classiquement décrite lors d'un trauma neurologique provoquant une altération de la coordination cellulaire au sein du muscle [167,334].

3 Chapitre 3 : Rôle de l'inflammation sur les propriétés ostéo-chondrogéniques des FAPs

3.1 Introduction

Dans ce troisième et dernier chapitre, nous avons investigué et caractérisé l'expression des transcrits et miARN des macrophages isolés de muscle POAN. Les CSM, et par extension les FAPs, possèdent des propriétés immunomodulatrices et sont capables de réguler la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α ou l'IFN γ par les cellules de l'immunité [365]. Ces dernières années, les miARN ont été décrits comme des acteurs de la polarisation des macrophages M1 ou M2 [299,366,367]. Afin d'évaluer leur implication et leurs capacités d'immunomodulation, nous avons développé un modèle de coculture des FAPs de patients et macrophages préalablement stimulés ou non au LPS. Ainsi, nous avons pu évaluer le potentiel du blocage ou de la surexpression des miARN inflammatoires précédemment identifiés. Ces résultats ont en parallèle été confirmés par une stimulation plus directe au LPS ou via l'utilisation de milieu conditionné de macrophages naïfs ou stimulés au LPS (CM $^-$ et CM $^+$).

3.2 Résultats

3.2.1 Caractérisation des transcrits inflammatoires, ostéo-inducteurs et du miRnome des macrophages du muscle POAN

Basé sur les isollements cellulaires de muscles naïfs, CDTX+SHAM ou CDTX+SCI, nous avons étudié les conséquences sur l'activation et la polarisation des macrophages [368]. Nous avons observé une augmentation de l'expression des marqueurs pro-inflammatoires (encadré rouge) *Nos2* (iNos), *Il1b* et *Osm* par les macrophages lors de la lésion musculaire, tandis que l'expression de *Cd86* était réduite (**Figure 57**). Toutefois, nous n'avons pas observé de différence entre le muscle lésé et le muscle POAN pour aucun des marqueurs cités. Concernant les marqueurs anti-inflammatoires (encadré bleu), *Arg1* était surexprimé par les macrophages du muscle lésé tandis que l'expression de *Mrc1* (CD206) s'en trouvait diminuée. Les macrophages de muscle POAN surexprimaient *Arg1* et *Tgfb1* à respectivement J2 et J4 tandis que l'expression de *Cd84* et de *Vegfa* était inchangée. Ces résultats, bien que suggérant une polarisation M2 anti-inflammatoire, pro-régénérative, ne permettent pas de déterminer un phénotype classique des macrophages du muscle POAN. Par ailleurs, l'expression de *Runx2*, était activée dans les macrophages de muscle lésé et singulièrement augmentée dans ceux issus de muscle POAN à J4 (**Figure 57**).

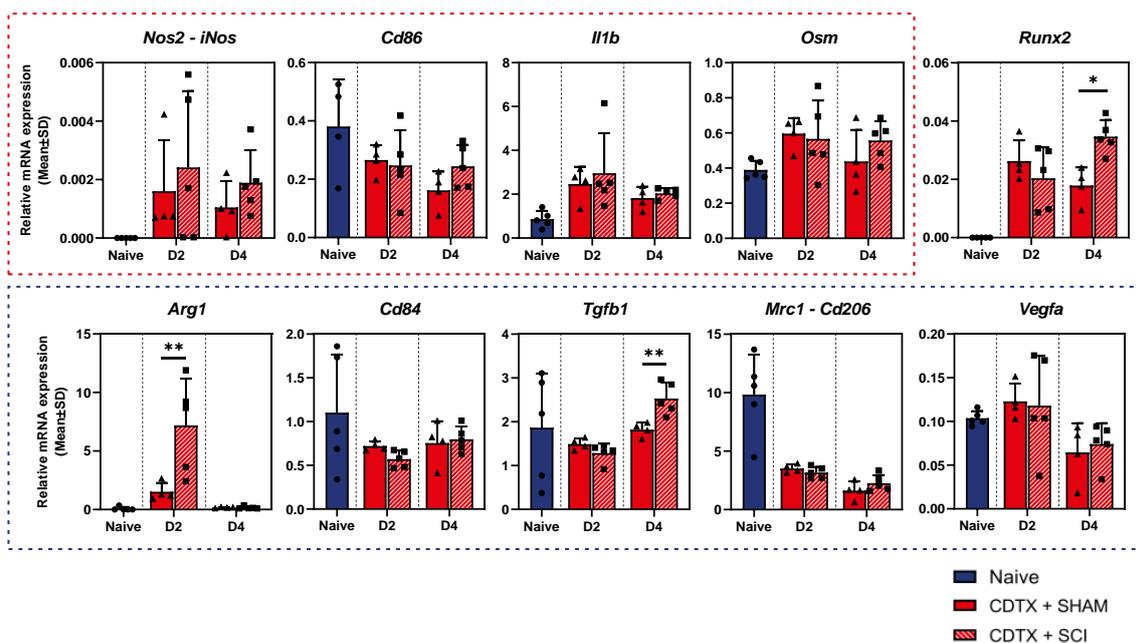


Figure 57 : Expression des marqueurs pro- et anti-inflammatoires des macrophages

Abondance relative des ARNm mesurée dans les macrophages isolés en RT-qPCR dans trois conditions expérimentales (Naïve, CDTX+SHAM et CDTX+SCI) à deux temps post-induction (J2 et J4), n=4-5. Encadré rouge : marqueurs M1, encadré bleu : marqueurs M2. Les différences statistiques ont été calculées avec une ANOVA 2 voies et corrigées par le test post-hoc de Šidák (= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$).*

Nous avons ensuite étudié les modulations de 25 miARN sur la base des criblages réalisés sur les muscles POAN et de la littérature sur le rôle de ces miARN dans l'activation ou la polarisation des macrophages [299,366,367]. Parmi les miARN modulés par une ou plusieurs conditions expérimentales, 3 miARN impliqués dans des processus de polarisation M1 (encadré rouge) et 9 miARN impliqués dans les mécanismes de polarisation M2 (encadré bleu) ont été identifiés (**Figure 58**). Nous avons observé l'augmentation de l'expression des miARN pro-M1 miR-20a-5p, miR-21-5p et miR-221-5p par les macrophages à J2. Par ailleurs, miR-21-5p et miR-221-5p étaient respectivement surexprimés à J2 et J4 par les macrophages de muscle POAN par rapport au muscle lésé. L'expression de tous les miARN pro-M2 était réduite par la lésion musculaire à J2 et J4, à l'exception de miR-210-3p. De plus, miR-16-5p, miR-125a-5p, miR-133a-3p, miR-146b-5p, miR-199a-3p et dans une moindre mesure miR-103a-3p, miR-142-3p, miR-210-3p et miR-214-3p étaient surexprimés par les macrophages de muscle POAN par rapport au muscle lésé (**Figure 58**). Ces résultats suggèrent une expression précoce plus élevée des miARN décrits dans les processus de polarisation des macrophages, particulièrement M2, ainsi qu'un maintien à J4 du miARN impliqué dans les transitions M2 vers M1 des macrophages, miR-221-5p, dans le muscle POAN par rapport au muscle en régénération.

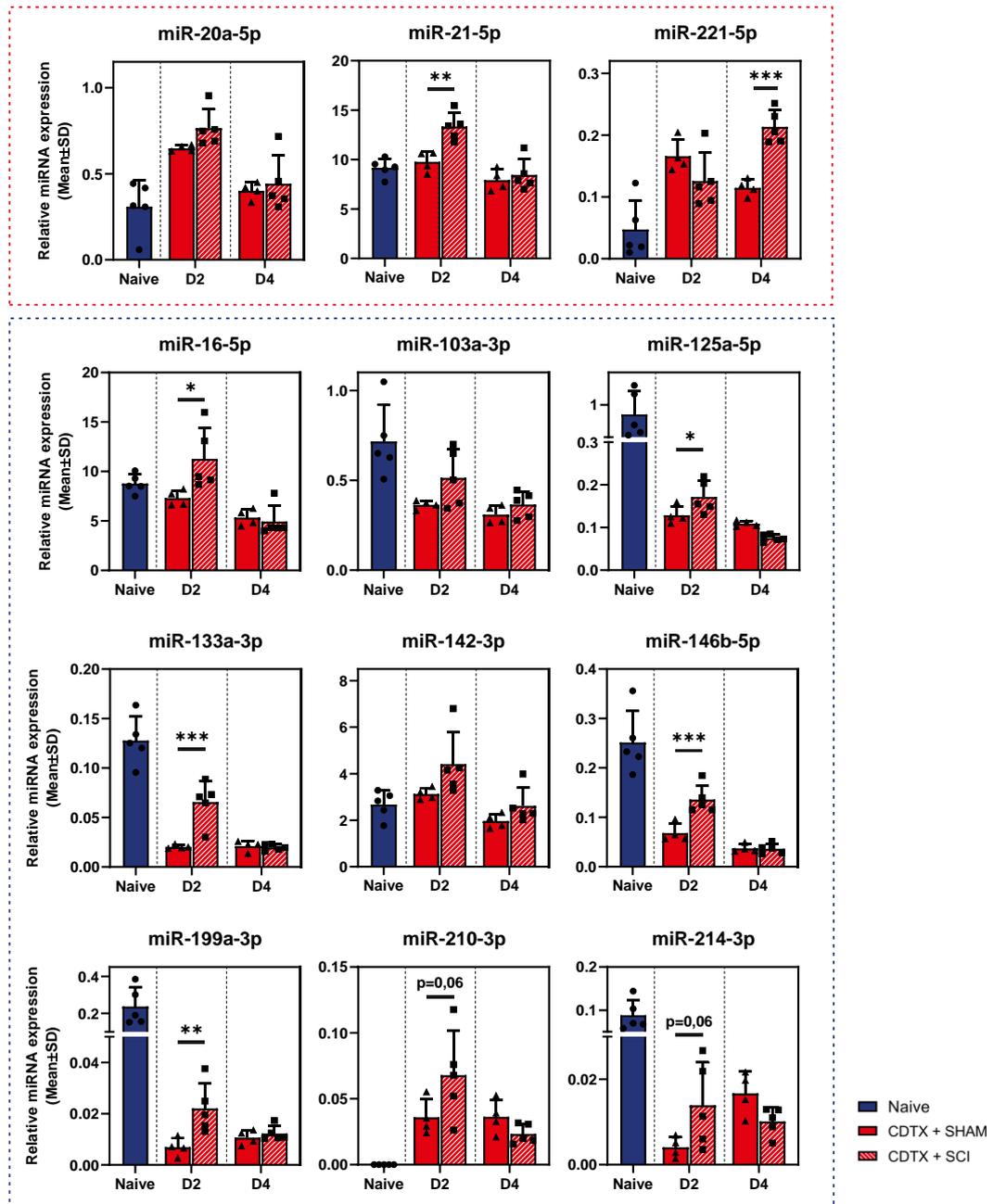


Figure 58 : Expression des miARN impliqués dans les processus d'activation et de polarisation des macrophages

Abondance relative des miARN mesurée dans les macrophages isolés en RT-qPCR dans trois conditions expérimentales (Naive, CDTX+SHAM et CDTX+SCI) à deux temps post-induction (J2 et J4), n=4-5, Encadré rouge : miARN impliqués dans des processus de polarisation M1, encadré bleu : miARN impliqués dans des processus de polarisation M2. Les différences statistiques ont été calculées avec une ANOVA 2 voies et corrigées par le test post-hoc de Šidák (*= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$).

3.2.2 Caractérisation des propriétés ostéoinductrices et chondro-suppressives des milieux conditionnés de macrophages

Nous avons exploré les propriétés ostéogéniques et chondrogéniques des milieux conditionnés de macrophages pro-inflammatoires (CM⁺) sur le devenir des FAPs (**Figure 59**). Après 14 jours d'induction ostéogénique (OB), nous avons observé une augmentation de la minéralisation induite par les CM⁺ ainsi qu'une augmentation de l'expression des protéines OSX et RUNX2 dès 7 jours (**A** et **B**). L'activité de la phosphatase alcaline était augmentée lors de la culture des FAPs en présence de CM⁺ (**C**).

Pour évaluer la chondrogenèse, les FAPs ont été placés en hypoxie 5 % O₂ puis ont été incubés dans un premier temps avec du milieu contrôle, OB ou chondrogénique (CB) avec ou sans CM⁺ (**Figure 59 D**). Après une semaine, les FAPs ont été passés en milieu OB avec ou sans CM⁺ afin d'évaluer le potentiel de transdifférenciation en conditions inflammatoires. Nous avons observé une minéralisation plus importante en condition CB→OB par rapport à CT→OB. Le potentiel de différenciation de la condition CB→OB était tout aussi importante qu'en OB→OB en l'absence de CM⁺, suggérant une capacité de transdifférenciation chondro-ostéogénique des FAPs. Toutefois, en présence de CM⁺, bien que les niveaux globaux de minéralisation étaient plus élevés, les FAPs en CB→OB présentaient des niveaux de minéralisation à 14 jours similaires aux FAPs en CT→OB, suggérant une réduction du potentiel chondrogénique et/ou de transdifférenciation des FAPs par les CM⁺ (**D**). Enfin, lors de l'induction en différenciation chondrogénique en sphéroïdes, les FAPs mis en présence de CM⁺ présentaient une moindre coloration au bleu alcian ainsi qu'une réduction des immunomarquages de l'agrécan, du collagène II et de SOX9, révélateurs d'une matrice cartilagineuse moins développée et plus globalement d'un potentiel chondrogénique réduit (**E**).

Ainsi, ces résultats confirment le potentiel ostéo-inducteur et chondro-suppressif des CM⁺ identifiées au travers de la modulation des marqueurs ostéo-chondrogéniques en partie 2.2.4.2 du chapitre 2.

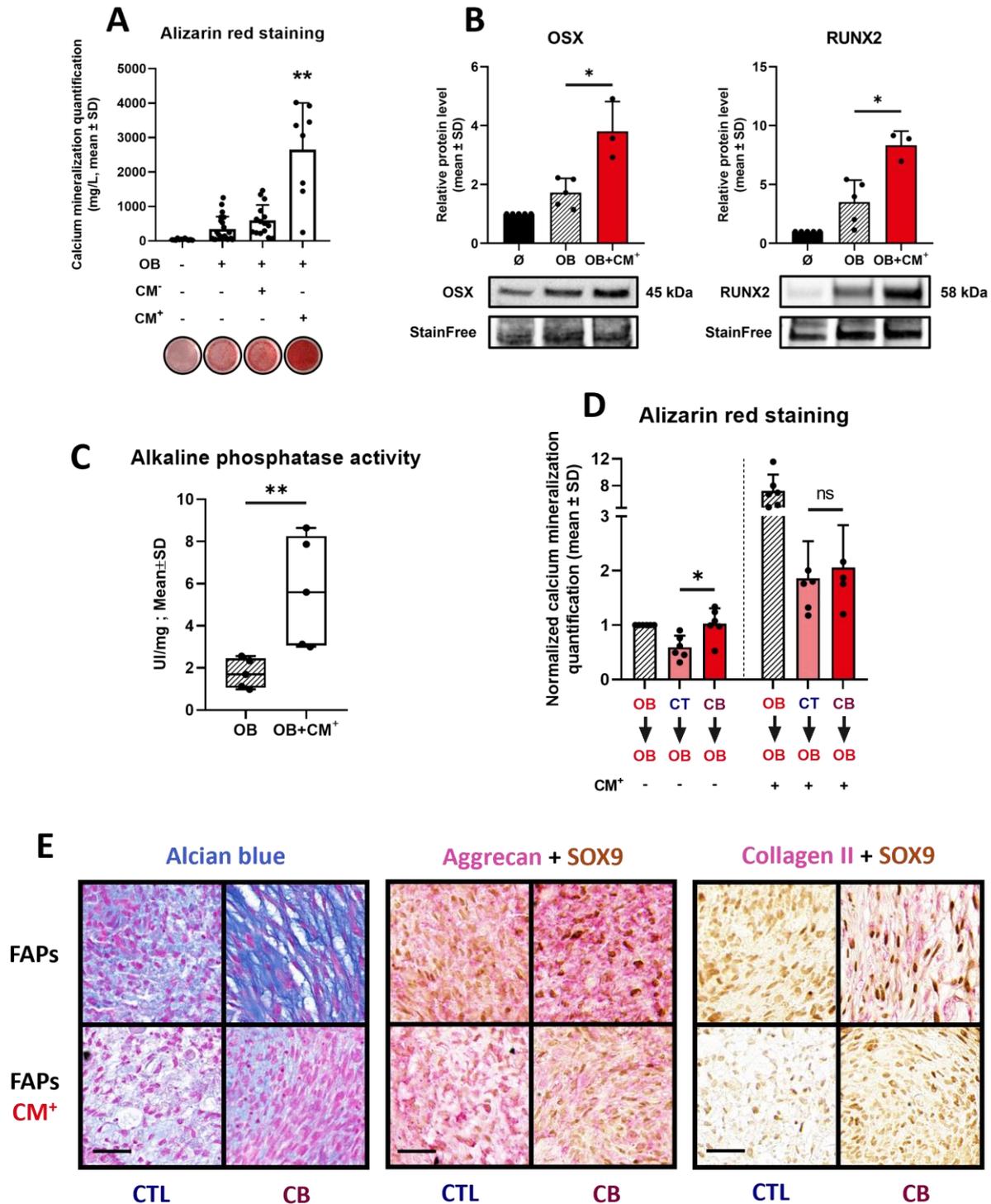


Figure 59 : Caractérisation des propriétés ostéogéniques et chondro-suppressives des CM⁺

(A) Potentiel de différenciation ostéogénique des FAPs de muscle POAN 14 jours après l'induction de la différenciation en milieu ostéogénique (OB), supplémenté ou non de milieu conditionné de macrophage \pm LPS (CM⁻ et CM⁺), $n=8-15$. (B) Modulation des niveaux protéiques après 7 jours d'induction ostéogénique \pm CM⁺

normalisés sur la totalité des protéines transférées sur la membrane, $n=3-5$. **(C)** Dosage de l'activité de la phosphatase alcaline après 7 jours d'induction OB \pm CM⁺, $n=5$. **(D)** Evaluation par quantification du rouge alizarine de l'effet des CM⁺ sur la transdifférenciation contrôle (CT) ou chondrogénique (CB) - ostéogénique (OB) des FAPs. **(E)** Colorations histologiques au bleu alcian/rouge nucléaire, et immunomarquages de l'agrécan, du collagène II et de SOX9 de FAPs en différenciation CT ou CB \pm CM⁺ (50 μ m). Toutes les différences statistiques ont été évaluées avec le test non paramétrique de Mann-Whitney (*= $p<0.05$, **= $p<0.01$).

Nous avons ensuite évalué l'effet de l'activation des macrophages aux LPS sur la signalisation des miARN, au niveau intracellulaire et sécrétés dans le milieu de culture (**Figure 60**). De façon surprenante, nous n'avons pas observé de modulation des miARN d'intérêts dans les macrophages issus de PBMC ou d'une lignée THP-1, y compris pour miR-146a-5p pourtant impliqué dans le rétrocontrôle des processus pro-inflammatoires (**Figure 60 A** et données non affichées). MiR-199a-5p et miR-214-3p n'étaient pas exprimés, tandis que la transfection d'analogues des deux miARN permettait d'observer leur expression. Nous avons mesuré les miARN sécrétés dans le milieu lors de l'activation des macrophages (**Figure 60 B**). Contre toute attente, miR-199a-5p et miR-214-3p étaient présents dans les milieux, et à des niveaux plus faibles en condition LPS. Par ailleurs, les niveaux de miR-20a-5p étaient stables tandis que ceux de miR-146a-5p semblaient augmentés lors de l'activation des macrophages.

Ces résultats, à la vue du faible nombre d'échantillons et de l'importante dispersion, complexifient toute conclusion sur une similarité entre les profils d'expression des miARN par les macrophages issus de muscle POAN et ceux des macrophages issus de PBMC et stimulés aux LPS.

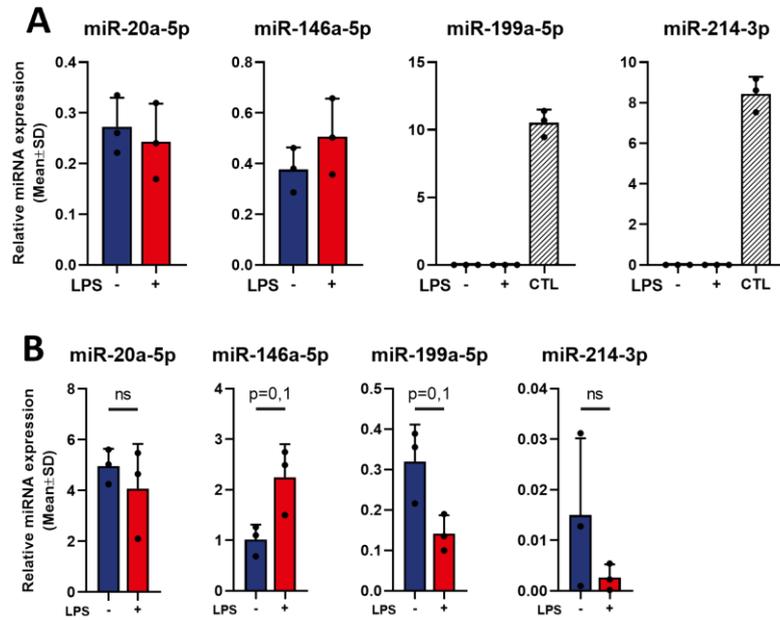


Figure 60 : Impact de l'activation aux LPS des macrophages sur les miARN intracellulaires et sécrétés

Abondance relative des miARN (A) intracellulaires et (B) sécrétés des macrophages issus de PBMC mesurée en RT-qPCR 3 jours après l'activation aux LPS, $n=3$. Les différences statistiques ont été évaluées avec le test non paramétrique de Mann-Whitney.

3.2.3 Potentiel des miARN à moduler la réponse des FAPs et macrophages au stimulus inflammatoire

Nous avons ensuite réalisé une étude fonctionnelle des miARN sur la différenciation ostéogénique de FAPs en environnement inflammatoire. Nous avons induit une différenciation ostéogénique supplémentée de LPS chez des FAPs préalablement transfectés avec des inhibiteurs ou mimics de miARN (**Figure 61 A**). Nous avons observé que la surexpression de miR-146a-5p et dans une moindre mesure miR-214-3p tendait à diminuer l'induction ostéogénique (**A**). L'activation aux LPS étant capable de moduler l'expression des miARN par les macrophages et leurs milieux conditionnés (CM⁺), nous avons par la suite développé un modèle de coculture indirecte entre les FAPs et macrophages (**B**). Les macrophages étaient ainsi transfectés avec les miARN candidats, puis activés aux LPS avant que les transwell ne soient ajoutés aux puits de culture des FAPs en induction ostéogénique afin d'explorer un potentiel rôle paracrine de miRNA de macrophages. Cependant, nous n'avons pas observé de modulation du potentiel ostéogénique des FAPs lors de la transfection d'analogues de miR-146a-5p et miR-214-3p chez les macrophages (**C**). Les transfections des miARN impliqués dans les processus inflammatoires miR-17-5p, miR-20a-5p, miR-21-5p, miR-133a-3p, miR-155-5p, miR-199a-5p et miR-214-3p ou de leurs inhibiteurs ont été réalisées, sans pour autant mettre en évidence de modifications du potentiel ostéogénique des FAPs en condition inflammatoire (résultats non affichés). Toutefois, en plus de la surexpression de *TRAF6*, *IRAK1* et *ATF4* par les macrophages stimulés aux LPS, l'expression des cibles directes de miR-146a-5p, *TRAF6* et *IRAK1*, et de miR-214-3p, *ATF4*, semblait en partie réduite lors de la surexpression respective de ces miARN (**D**).

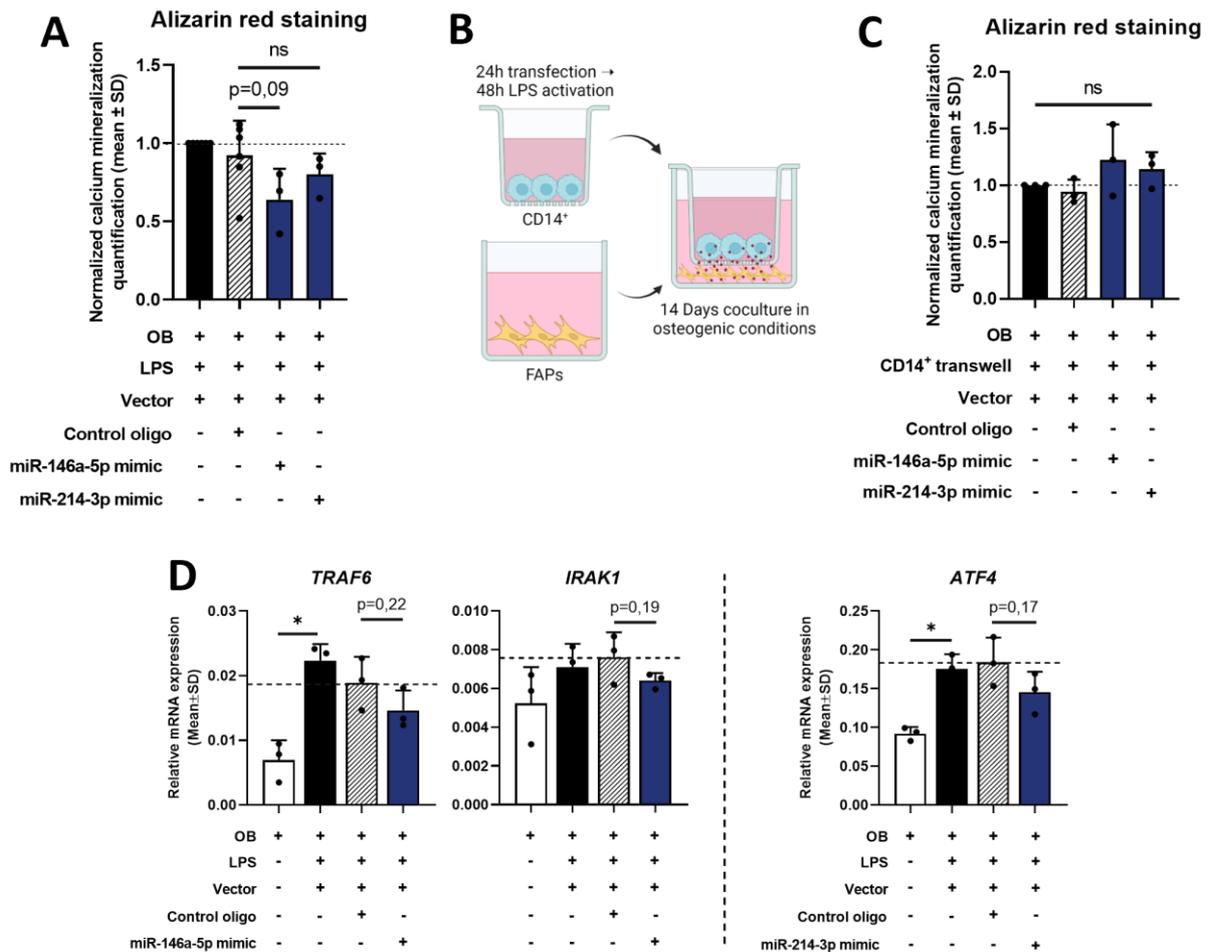


Figure 61 : Evaluation du potentiel des miARN à moduler la réponse des FAPs et macrophages au stimulus inflammatoire

(A) Potentiel de différenciation ostéogénique des FAPs de muscle POAN 14 jours après l'induction de la différenciation en milieu ostéogénique (OB), supplémenté de LPS, $n=3$. (B) Schéma du modèle de coculture des FAPs et macrophages préalablement transfectés. (C) Potentiel de différenciation ostéogénique des FAPs en coculture indirecte avec des macrophages transfectés avec miR-146a-5p ou miR-214-3p, $n=3$. (D) Abondance relative des ARNm des macrophages mesurée en RT-qPCR 7 jours après transfection, $n=3$. Les différences statistiques ont été calculées avec le test non paramétrique de Friedman pour les mesures appariées et corrigées par le test post-hoc de Dunn ($*=p<0.05$).

3.3 Synthèse et discussion

Dans ce dernier chapitre, nous avons décrit la modulation des miARN des macrophages. De plus, nous avons caractérisé le potentiel ostéogénique et chondrogénique des milieux conditionnés de macrophages (CM⁺) et la capacité des miARN à altérer la réponse des FAPs et macrophages au stimulus inflammatoire. Ainsi, nous avons mis en évidence les points suivants :

- I. Les macrophages de muscle POAN ne présentent pas un phénotype classiquement décrit bien que surexprimant des marqueurs de la polarisation M2 tels que l'arginase (*Arg1*) à J2 et le *Tgfb* à J4.
- II. Ces macrophages expriment des miARN associés à la fois aux polarisations M1 et M2 dès 2 jours après la double lésion musculaire et neurologique.
- III. Les CM⁺ potentialisent la différenciation ostéogénique des FAPs et inhibent leur différenciation chondrogénique.
- IV. L'activation aux LPS altère la régulation miARN des macrophages tandis que miR-146a-5p prévient partiellement la différenciation ostéogénique des FAPs en milieu inflammatoire.

Nos2 (iNos), *Cd86* et les cytokines pro-inflammatoires *Il-1β* et *OSM* sont des marqueurs caractéristiques des populations pro-inflammatoires M1 tandis que *Arg1*, *Cd84*, *Tgfb1*, *Mrc1* (CD206) et *Vegfa* sont classiquement exprimés par les macrophages anti-inflammatoires M2 [368,369]. Toutefois, dans le modèle murin, nous n'avons pas observé de phénotype assimilable à un profil M1 ou M2, ces résultats semblant plutôt être le reflet d'une polarisation hybride ou d'un défaut de cette dernière. Ainsi, il sera nécessaire de caractériser les macrophages de muscle POAN en cytométrie pour identifier les différents profils pathogéniques de ces acteurs de l'immunité. La polarisation M2 peut être actrice de processus pathologiques d'accumulation matricielle tels que les fibroses [151,370,371]. Ces résultats se rapprochent avec ceux décrits par Sorkin *et al.* dans un modèle de POA traumatique combinant brûlure et section du tendon [141]. Leur étude a démontré que l'expression du TGF-β par les macrophages contribuait à un phénotype pathologique et était en partie responsable du développement des POA. Par ailleurs, un traitement avec un peptide d'activation du CD47 permettait de diminuer l'expression du TGF-β par les macrophages, de réduire l'expression d'*Arg1* et *Mrc1/Cd206* et *in fine* de limiter la polarisation M2 classiquement décrite comme pro-cicatrisante [141]. Patel *et al.* ont récemment mis en évidence l'implication de cette signalisation dans le développement des POA traumatiques [339]. Par ailleurs,

une étude a montré que l'expression tissulaire d'*Arg1* était augmentée en condition inflammatoire lors de pathologies neurologiques ou auto-immunes, tandis que son inhibition permettait de réduire la réponse inflammatoire et le rétablissement des animaux, suggérant le rôle de ces macrophages M2, transitoires et d'une extrême plasticité, dans ces processus inflammatoires [372]. Enfin, l'expression de *Runx2* par ces populations a été identifiée comme un acteur de leur fusion puis de la différenciation ostéoclastique [373]. Nous mesurons une augmentation de *Runx2* dans le muscle POAN à J4, pouvant ainsi refléter la mise en place de ce processus de la résorption osseuse en parallèle de l'engagement ostéogénique des FAPs. Ces observations seront à confirmer en étudiant d'autres marqueurs de la différenciation ostéoclastique tels que RANK, ainsi qu'en confirmant la présence de ces acteurs par des marquages IHC du muscle développant des POAN.

Nous avons ensuite étudié l'expression des miARN des macrophages de muscle POAN, ces acteurs moléculaires jouant un rôle dans l'activation et la polarisation des macrophages [299,366,367]. Parmi les miARN dont l'expression était altérée par la lésion musculaire et neurologique, 3 miARN impliqués dans les processus « M1 » et 9 dans les processus « M2 » ont été identifiés. Les miARN « M1 » étaient surexprimés lors de la lésion musculaire tandis que les miARN « M2 » étaient sous-exprimés dans cette même condition comparée aux macrophages résidents du muscle naïf, témoignant de l'activation précoce de profils pro-inflammatoires. MiR-20a-5p et miR-21-5p, plus exprimés dans les macrophages de muscles POAN, contrôlent respectivement la régulation de CSF1R et de PGE2, la réduction de leur expression limite le potentiel de polarisation M2 des macrophages [374,375]. En outre, miR-221-3p influe sur la transition M2 vers M1 via l'inhibition de la signalisation JAK/STAT. Sa surexpression plus tardive à J4 dans le muscle POAN pourrait traduire un bouleversement de la balance M1/M2 [376].

Concernant les miARN pro-M2, nous avons identifié la surexpression de miR-16, un inhibiteur de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α [377,378]. Par ailleurs, miR-103a-3p, ciblant *STAT1* et prévenant la différenciation M1 [379], miR-142-3p, réduisant le potentiel de réponse aux LPS [380], miR-125a-5p, favorisant la polarisation M2 via l'induction de l'IL-4 [381] et miR-133a-3p, contrôlant l'expression du GM-CSF et inhibant ainsi la polarisation M1 [382], étaient surexprimés dans le muscle doublement lésé. MiR-146a/b-5p sont induits par les processus inflammatoires, et sont surexprimés dans le muscle POAN [383,384]. MiR-199a-3p réduit le profil pro-inflammatoire des macrophages tandis que miR-210-3p est surexprimé en condition hypoxique et favorise un devenir profibrotique des macrophages [385,386]. Enfin, nous avons aussi retrouvé la

surexpression de miR-214-3p, inducteur de la polarisation M2 des macrophages via la dégradation de *GSK3B*, par les macrophages de muscle POAN [306]. Ainsi, l'ensemble de nos résultats suggère une perturbation de la polarisation des macrophages. De façon intéressante, les miARN promouvant une polarisation pro-inflammatoire jouent aussi un rôle ostéogénique dans différents tissus et populations cellulaires tandis que les miARN impliqués dans des processus anti-inflammatoires sont généralement décrits pour leurs rôles ostéo-suppressifs, témoignant de l'étroit lien entre ces deux processus au travers d'une voie commune de miARN. Toutefois, la caractérisation des miARN des macrophages ne permet pas de déterminer s'ils sont le simple reflet de l'état de polarisation ou de réels déterminants de cette dernière.

Afin d'évaluer le rôle de l'inflammation sur la différenciation ostéochondrogénique des FAPs et la modulation des miARN par les macrophages, nous avons produit des milieux conditionnés de macrophages stimulés aux LPS (CM⁺). Comme classiquement décrit, ces CM⁺ sont capables d'induire la différenciation ostéogénique des FAPs [15,319]. Toutefois, le potentiel de chondrogenèse, de production de matrice cartilagineuse et de transdifférenciation chondro-ostéogénique était réduit. Ils sont toutefois capables d'induire une différenciation terminale des chondrocytes hypertrophiques tandis que nous avons observé la surexpression de *COL10A1* par les FAPs lors de leur induction ostéogénique en présence de CM⁺ [387]. Ces CM⁺ ont précédemment été décrits pour leur activité chondro-suppressives, notamment dans l'ostéoarthrite où les processus inflammatoires médiés par les macrophages sont à l'origine d'une dégradation de la matrice cartilagineuse et d'une ossification progressive de cette dernière, via l'apoptose et la maturation hypertrophique des chondrocytes [388,389]. De plus, il est intéressant de noter dans notre modèle murin de POAN, malgré la surexpression des marqueurs chondrogéniques, aucune différenciation chondrogénique initiale ne semble intervenir. Ceci évoque donc plus un processus d'ossification intramembranaire, contrairement à la pathologie humaine où l'ossification endochondrale est avérée. Par ailleurs, l'expression de nombreux miARN a été évaluée dans ces conditions expérimentales, l'augmentation globale de l'expression des miARN identifiés *in vivo* n'est pas retrouvée, suggérant un profil sensiblement différent entre les macrophages du muscle POAN et les macrophages stimulés aux LPS *in vitro*.

Finalement, nous avons évalué l'impact de miR-146a-5p et miR-214-3p sur le potentiel de différenciation ostéogénique des FAPs en condition inflammatoire. Nous avons observé une diminution de la minéralisation de FAPs lorsque ces derniers surexprimaient miR-146a-5p, suggérant le rôle de ces derniers dans la

réponse au stimulus inflammatoire [390]. De plus, miR-146a-5p peut moduler le phénotype inflammatoire des CSM, sa surexpression induisant une réponse amoindrie aux stimuli inflammatoires [391,392]. Nous avons alors proposé miR-146a-5p comme candidat pour prévenir la différenciation ostéogénique en condition inflammatoire. Nous avons investigué son potentiel dans la régulation de l'activation des macrophages aux LPS et de leur potentiel inflammatoire. Toutefois, la surexpression de ce miARN ne semblait pas réduire la surexpression d'*IRAK1* et *TRAF6*, ni prévenir l'effet ostéogénique des macrophages sur la différenciation des FAPs. Ces observations pourraient être expliquées par l'induction aux LPS d'un profil macrophagique pro-inflammatoire trop caricatural, ne permettant pas à un simple miARN de moduler le devenir de cette population cellulaire dans nos conditions expérimentales.

Dans ce dernier chapitre, nous avons observé au travers des transcrits et miARN macrophagiques, les modulations induites par la lésion neurologique sur la répartition et la polarisation de ces acteurs impliqués dans les processus inflammatoires et régénératifs. Par ailleurs, nous avons identifié miR-146a-5p pour son potentiel à atténuer la réponse des FAPs aux processus inflammatoires dont l'amplitude et la cinétique sont altérées par des modifications profondes de l'équilibre et de la coordination des acteurs cellulaires du muscle développant des POAN.

VI - Discussion et perspectives

1.1 Discussion générale

1.1.1 Les progéniteurs myogéniques et myofibres, entre initiateurs et témoins du développement des POAN

Le rôle prédominant des FAPs dans le développement endochondral des POA et POAN est maintenant bien établi [95,96,326,393]. Pour autant, il est difficile d'affirmer catégoriquement que seules ces cellules participent à cette pathogenèse dans un tissu aussi complexe que le muscle. Les MPs, tout aussi abondants, disposent de propriétés ostéogéniques importantes et participent même sous certaines conditions aux processus de régénération osseuse [92,394]. Ainsi, bien que le développement des POAN chez l'homme ne soit pas conditionné à une lésion musculaire aiguë et que ces cellules soient absentes des zones de minéralisations chez l'animal, l'implication précoce des MPs ne devrait pas être complètement exclue. Schmidt *et al.* ont par exemple démontré que la surexpression de SOX9 inhibe la différenciation myogénique et l'expression de la myogénine, des facteurs communs que nous avons identifiés chez les MPs issus de muscle développant des POAN [395]. Ces observations confortent ainsi la corrélation entre un défaut des processus myogéniques et l'engagement intramusculaire de processus d'ossification.

De façon intéressante, dans le muscle intact des animaux spinalisés, les myomiR miR-1-3p et miR-206 étaient respectivement sous-exprimés et surexprimés. Ces miARN favorisent les processus myogéniques tels que l'activation, la prolifération ou la différenciation des SC/myoblastes en ciblant HDAC4 [360,396]. La littérature suggère un rôle anti-ostéogénique de ces deux miARN sur les CSM [397,398]. Lors des études fonctionnelles, nous avons montré que la surexpression de miR-206 augmentait de près de 7 fois le potentiel de minéralisation des MPs humains, suggérant un rôle différent de ce miARN entre MPs et FAPs pourtant phénotypiquement proches. Parallèlement, l'inhibition de miR-133a-3p réduisait la différenciation ostéogénique des MPs, dont le rôle a pourtant été décrit comme inhibiteur du potentiel ostéogénique des CSM, soulignant le rôle ambivalent des miARN [399,400]. Nous avons identifié la sous-expression du myomiR ostéo-suppressif miR-1 dans les MPs de muscle POAN, soulignant l'impact de la lésion neurologique sur la régulation des miARN musculaires, et ce même dans des muscles intacts.

1.1.2 Influence de la lésion neurologique sur la signalisation des miARN

Les observations cliniques des effets positifs des traumatismes crâniens (TC) et lésions médullaires (LM) sur les processus de consolidation osseuse ont longtemps posé question [173,401]. Des premiers travaux ont montré que le sérum des patients TC était vecteur de facteurs ostéogéniques tels que *SP7* ou *RUNX2*, deux cibles respectivement directes et indirectes de miR-214-3p [11,402]. Des études ont depuis montré que les TC provoquaient une modulation de l'expression des miARN dans la région de l'hippocampe et relargués dans le plasma [403,404]. Ainsi, deux études du même groupe ont montré le rôle de miR-26a-5p et miR-92a-3p, surexprimés lors d'un TC, dans la différenciation ostéogénique, l'augmentation de l'activité des ostéoblastes et la régénération osseuse [405,406]. Par ailleurs, Xia *et al.* ont montré que le relargage par les neurones de l'hippocampe lésés du miARN ostéogéniques miR-328a-3p dans des vésicules extracellulaires adressées aux progéniteurs ostéogéniques améliorait les processus de régénération osseuse [176]. Ces travaux décrivent pour la première fois le lien entre neurolésion, miARN et régénération osseuse au travers de l'adressage des miARN aux cellules cibles exprimant *FN1*. Nous avons observé que l'expression de *FN1* était augmentée dans les FAPs de muscle de patient POAN lors de leur exposition à un stimulus inflammatoire et Arrighi *et al.* ont montré que l'inhibition de miR-214-3p, augmentait l'expression de *FN1* [247]. Ainsi le relargage systémique des miARN lors de ces différentes lésions pourrait être une piste à explorer. Dans ce contexte, il est intéressant de noter que nos résultats recourent avec le faible nombre d'études abordant le rôle des miARN lors d'une neurolésion, en rapportant la levée de freins ostéo-suppressifs lors d'une lésion neurologique associée à un traumatisme tissulaire, qu'il soit musculaire ou osseux. Ainsi, un mécanisme d'action commun à ces processus pourrait être à l'œuvre dans l'amélioration de la régénération osseuse et le développement des POAN chez les patients neurolésés.

1.1.3 Rôle des miARN sur le devenir cellulaire

Nous avons observé la surexpression de nombreux miARN impliqués dans l'inhibition de l'ostéogénèse lors de la lésion musculaire, surexpression bloquée par la lésion neurologique concomitante. Kobayashi *et al.* ont démontré que la délétion de DICER, protéine clé de la biogenèse des miARN, entraîne l'hypertrophie des chondrocytes des plaques de croissances, attribuant à l'ensemble de la régulation des miARN un rôle dans la maturation des chondrocytes [262]. De même, la

délétion des miARN dans les progéniteurs ostéogéniques, entraîne la surexpression des marqueurs ostéogéniques et le développement incontrôlé de la masse osseuse [353]. Enfin, la sous-expression de l'entièreté de la signalisation des miARN est souvent retrouvée dans différentes pathologies conduisant à l'acquisition de propriétés de prolifération, différenciation et migration aberrante, tel que certains cancers [407]. Ces résultats confortent nos observations sur la dérivation ostéo-chondrogénique des progéniteurs du muscle lors de la levée de l'inhibition des miARN et de la surexpression des marqueurs ostéo-chondrogéniques *RUNX2*, *SOX9*, *COL10A1* des FAPs et MPs issus de muscle développant des POAN.

La surexpression de miR-20a-5p et miR-17-5p (faisant parti du même cluster miR-17~92), a été décrite lors de lésions médullaires (**Figure 62**) [408,409]. Dans ce cadre, ils induisent la dégradation de *Ngn1*, un facteur de transcription impliqué dans la survie cellulaire, les processus d'auto-renouvellement et la neurogenèse, et sont responsables du déclenchement d'événements secondaires délétères de la neurolésion tels que l'apoptose des motoneurones et la neuro-inflammation [410]. Ainsi la modulation de miR-20a-5p chez les patients SCI permettrait à la fois de contrer ses propriétés ostéoinductrices et d'améliorer les déficits fonctionnels induits par sa surexpression [409]. Cependant, miR-20a-5p n'est pas le seul miARN à posséder des propriétés biologiques ambivalentes. Plus récemment, une étude a montré le rôle de miR-214-3p dans l'induction du profil fibrotique des FAPs sous contrôle du TGF- β , or cette étape est nécessaire aux processus régénératifs du muscle. La sous-expression identifiée dans notre étude suggère un potentiel fibrogénique moindre et détourné en faveur d'un engagement ostéogénique des FAPs du muscle en régénération lors de la lésion neurologique [247,257]. La signalisation JAK/STAT transduit le signal OSM produit par les macrophages menant à la formation des POAN [140]. Or miR-214-3p est capable de cibler *JAK1* et pourrait donc être un inhibiteur du développement des POAN en inhibant cette signalisation en parallèle de son rôle plus direct sur l'inhibition d'*ATF4* [411,412].

Finalement, miR-214-3p a aussi un rôle dans l'ostéoarthrite [413]. Cao *et al.* ont montré qu'il était sous-exprimé dans les chondrocytes de cartilage ostéoarthritique, son inhibition aggravant le modèle. L'injection *in vivo* d'analogues permettait au contraire de prévenir la minéralisation du cartilage [414]. L'ostéoarthrite fait partie des pathologies pour lesquelles le rôle des miARN a été extensivement décrit, avec d'autres candidats tels que miR-146a-5p, miR-17-5p ou encore miR-210-3p [415,416]. Enfin, dans une dernière pathologie caractérisée par des phases inflammatoires chroniques, l'athérosclérose, miR-146a-5p a également été mis en avant pour ses propriétés à réduire les calcifications vasculaires [417]. Ces résultats concordent avec le rôle des miARN identifiés dans la pathogenèse des

POAN, ceux-ci induisant dans tous les cas la conversion de tissus pourtant initialement très différents en tissu osseux (**Figure 62**).

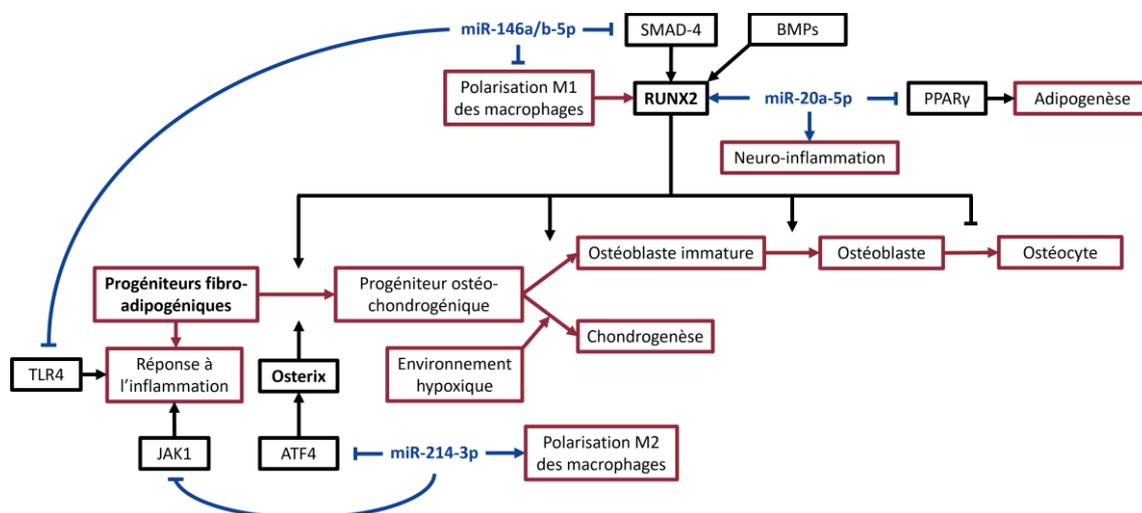


Figure 62 : Cibles ostéogéniques et inflammatoires des principaux miARN identifiés dans la pathogenèse des POAN

1.1.4 Altération des processus inflammatoires lors des lésions neurologiques et propriétés de modulation de l'inflammation des miARN

Au cours de cette étude, nous avons vu que le profil des macrophages impliqués dans le développement des POAN était contrasté, et se définissait probablement plus au travers de profils de transition associés à une perte de coordination de la réponse inflammatoire caractéristique de la lésion neurologique (**Figure 63**) [418]. Lors d'un TC la perturbation de l'axe hypothalamo-hypophysaire provoque un dérèglement de la réponse anti-inflammatoire compensatoire [419]. Par ailleurs, lors d'une SCI, une inflammation systémique est observée avec la persistance de l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 ou le TNF- α pendant plusieurs semaines [168]. Lors de la lésion neurologique, nous avons observé le maintien ou l'augmentation de l'expression de marqueurs M1 à J4 tandis que la cinétique traditionnellement observée lors de la régénération musculaire est caractérisée par une diminution du nombre de macrophages pro-inflammatoires trois jours après la lésion [420]. Dans le modèle POAN, la persistance à J4 des macrophages M1 a par ailleurs été retrouvée [140]. A l'opposé, la surexpression du *Tgfb1* à J4 suggère la présence de macrophages impliqués dans

les processus de remodelage des tissus [421,422]. Ces résultats suggèrent un mécanisme d'action commun entre l'établissement des POAN et POA chez l'animal, Sorkin *et al.* et Patel *et al.* ayant récemment décrit le rôle de macrophages M2 et leur production de TGF- β dans le développement des POA traumatiques [141,339]. De façon intéressante, nous avons retrouvé la surexpression du *Tgfb1* par les macrophages mais aussi par les FAPs de muscle POAN, suggérant l'implication de cette signalisation dans la pathologie. En outre, l'induction de la signalisation du TGF- β lors de la régénération du tendon a révélé un effet pro-ostéogénique induisant le développement des POA, et confirmant ainsi les précédentes observations [423]. Toutefois, il est important de rappeler que ces classifications M1/M2 restent caricaturales du continuum d'états d'activation simultanément présents dans les tissus en régénération.

Chez l'Homme, dans le contexte inflammatoire systémique et chronique intrinsèquement lié à la lésion neurologique ainsi que face aux risques infectieux accrus, il est capital d'améliorer notre compréhension des processus inflammatoires impliqués dans la pathogenèse des POAN. D'abord décrites pour leurs propriétés immunorégulatrices, les CSM sont capables d'altérer leur phénotype en fonction de leur environnement [424]. La modulation de leur réponse aux stimuli inflammatoires pourrait être un axe de recherche prometteur. Les miARN, par leur capacité à cibler des transducteurs du signal inflammatoire, tels que le TLR4 et TRAF6 pour miR-146a/b-5p [417,425], ou à favoriser les polarisations M1/M2 des macrophages sont des acteurs idéaux pour exercer cette modulation [299,426]. Peng *et al.* ont démontré que miR-214-3p était capable d'induire la polarisation macrophagique anti-inflammatoire M2 tout comme miR-146a-5p [305,306]. Leur potentiel a par ailleurs été démontré dans la physiopathologie des TC. MiR-146a-5p, exprimé dans le plasma à la suite d'un TC, réduit la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires dans l'encéphale via l'inhibition de la signalisation NF- κ B (**Figure 62**) [427]. Enfin, miR-221-3p promeut la transition de M2 à M1, ciblant JAK3 et induisant l'expression de cytokines pro-inflammatoires tout en diminuant la production d'IL-10 [376]. L'ensemble de ces résultats convergent ainsi vers une dérégulation des acteurs de l'inflammation lors des processus régénératifs faisant suite à une lésion neurogène et conduisant au développement des POAN.

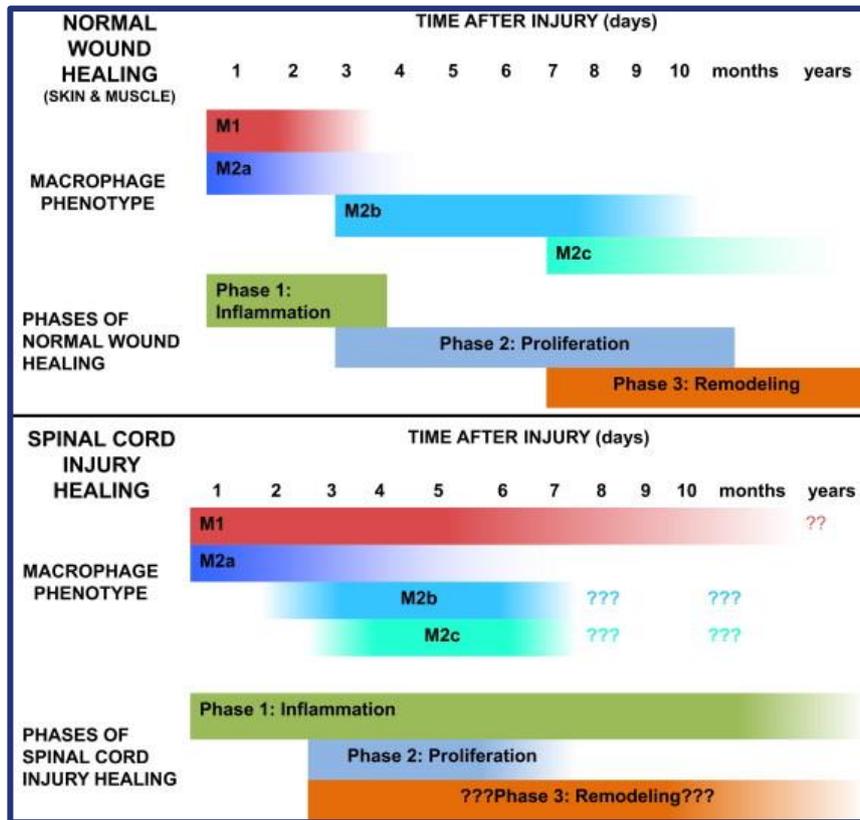


Figure 63 : Recrutement et coordination des acteurs inflammatoires lors d’une lésion musculaire traumatique ou d’une lésion médullaire

Figure extraite de Gensel et al. [418].

1.1.5 Rôle de la mécanotransduction sur l’expression des miARN et le devenir cellulaire

Une lésion médullaire provoque très souvent une spasticité musculaire, modifiant les contraintes mécaniques. L’étude de la jonction neuromusculaire (JNM) a permis de mettre en évidence le rôle de ces contraintes dans le développement des POAN. Salga *et al.* ont montré qu’un blocage des JNM par injection locale de toxine botulique augmentait le volume des POAN [199]. Par ailleurs, les FAPs sont capables de répondre à une perte de fonction de la JNM, de nombreuses études ayant démontré la dérive pathologique de cette population, dans des pathologies neurodégénératives telles que l’amyotrophie spinale ou la sclérose latérale amyotrophique [165,428,429]. L’effet de la lésion neurologique sur la pathogenèse des POAN dépasserait ainsi l’effet systémique sur l’exacerbation des processus inflammatoires. L’altération de l’environnement mécanique musculaire peut être responsable de la modulation de l’expression de miARN mécanosensibles [430].

L'expression de la majorité des miARN étudiés au cours de notre travail, tels que miR-20a-5p, miR-146a-5p ou miR-214-3p, est dépendante de la rigidité du tissu ou du substrat [248,431–433]. Ainsi, l'altération des miARN ostéogéniques et ostéo-suppressifs des muscles POAN pourrait être liée à un changement de spasticité musculaire induite par le traumatisme neurologique. Wang *et al.* ont montré la surexpression de miR-214-3p en l'absence de stress mécanique d'un membre et sa contribution à la perte de masse osseuse et du potentiel ostéogénique des ostéoblastes [257]. A l'inverse l'exercice physique diminue l'expression de miR-214-3p et prévient la perte osseuse en absence de contrainte mécanique [434]. Nous avançons alors l'hypothèse selon laquelle l'hyperactivité musculaire du muscle spastique à la suite d'une lésion neurologique inhiberait l'expression de miR-214-3p, de concert avec de multiples miARN ostéo-suppressifs identifiés dans notre modèle de POAN, et induirait, en convergence avec les facteurs inflammatoires, le devenir ostéogénique des FAPs.

A l'échelle des modalités de prise en charge des patients risquant de développer des POAN, l'étude de la mobilisation des articulations ou tissus périarticulaires par kinésithérapie est d'un intérêt majeur. Daud *et al.* ont montré qu'une mobilisation articulaire tardive chez les patients, c'est-à-dire supérieure à 7 jours après lésion médullaire, était corrélée à une augmentation du risque de développer des POAN [54]. Une adaptation des protocoles incluant une mobilisation articulaire passive précoce pourrait être une piste à explorer.

1.1.6 Limitations inhérentes à l'utilisation du modèle murin de POAN

Notre modèle de POA est le seul qui inclue une lésion médullaire. Il existe cependant une divergence dans les mécanismes physiopathologiques entre l'Homme et notre modèle. En effet, ce dernier se caractérise par une ossification intramembranaire avec l'absence histologique de chondrocytes et de matrice cartilagineuse, tandis que la pathologie chez l'Homme se développe au travers d'un processus d'ossification endochondrale [16,18,96]. Ce phénomène pourrait s'expliquer par la combinaison de la nécrose musculaire et section de moelle épinière, avec une phase hyper-inflammatoire, probablement caricaturale des processus inflammatoires retrouvés chez l'Homme. Toutefois, ces observations restent cohérentes avec les résultats obtenus sur les milieux conditionnés de macrophages et leur potentiel à amplifier la différenciation ostéogénique tout en inhibant les marqueurs et la différenciation chondrogénique. De façon intéressante, ce mécanisme concorde avec les études décrivant le rôle chondro-suppressif et

ostéo-inducteur de milieux pro-inflammatoires riches en macrophages M1, tels que les liquides synoviaux d'articulation sujette à un développement ostéoarthritique [388,435]. L'hyper-inflammation liée à la double lésion provoquerait ainsi l'inhibition de la chondrogenèse et une différenciation directe des FAPs en ostéoblastes, caractéristique de l'ossification intramembranaire. Les temps d'apparition sont aussi très différents, en quelques heures seulement dans le modèle murin de POAN contre plusieurs semaines chez l'Homme, soulignant le caractère extrême du modèle animal.

1.1.7 Vers un essor de l'utilisation des miARN dans les thérapies géniques ?

L'intérêt pour la modulation des miARN à des fins thérapeutiques n'a fait que croître ces 10 dernières années [215,416]. De nombreuses stratégies utilisant des analogues ou des inhibiteurs de miARN sont en cours d'évaluation [219,436]. A l'heure actuelle, la quasi-totalité des essais sont en phase préclinique ou en phase I. Le Miravirsen, un anti-sens de miR-122-5p utilisé pour traiter l'infection au virus de l'hépatite C et à l'évaluation depuis 2013, est le premier à être entré en phase II. Cependant, bien que le nombre d'articles promouvant l'utilisation d'un miARN pour contrecarrer une pathologie donnée soit en constante augmentation, le dogme du « 1 miARN = 1 pathologie » semble incomplet et utopique, en particulier à cause de la redondance de ces acteurs moléculaires.

L'intérêt de l'utilisation des miARN en traitements prophylactiques, le plus pertinent dans le cadre d'une hypothétique utilisation dans la prévention des POAN, a déjà été démontré [437]. Ainsi, la surexpression de miR-214-3p dans des processus délétères à l'ostéogenèse tels que l'absence de stress mécanique ou l'ostéoporose [257,434], en parallèle de sa sous-expression dans des processus ostéogéniques tels que l'ostéoarthrite ou notre modèle de POAN [413,416], font de ce miARN un candidat particulièrement intéressant. D'autre part, miR-146a/b-5p est un suppresseur des processus inflammatoires, sa surexpression pourrait permettre d'altérer la réponse aux stimuli inflammatoires retrouvés dans de nombreuses pathologies. Des nanoparticules chargées de miR-146a-5p permettent de réduire l'inflammation des macrophages alvéolaires lors de la respiration artificielle [438]. Par ailleurs, miR-146a-5p améliore la phase inflammatoire associée à la SCI, et atténue la dégradation du cartilage dans un modèle d'OA [317,439]. Ces résultats soulignent une fois de plus le rôle pléiotrope de ces miARN, et donnent des

arguments pour l'utilisation de miR-214-3p et miR-146a-5p pour leurs doubles actions sur les processus ostéogéniques et inflammatoires des POAN.

Toutefois, la majorité des travaux s'intéresse à la régulation des miARN surexprimés dans les processus pathologiques, en cherchant à en réduire l'activité, et porte un intérêt moindre aux miARN sous-exprimés pourtant potentiellement tout aussi importants. Un des avantages à utiliser une stratégie d'inhibition plutôt que de surexpression est lié à une meilleure spécificité d'action. Khan *et al.* et Jin *et al.* ont en effet démontré que le phénotype observé lors de l'utilisation d'analogues des miARN était souvent lié à une dérégulation profonde et aspécifique de la régulation des ARNm, le nombre de complexes RISC permettant l'activité des miARN sur leur cibles étant limité. Ainsi, l'addition d'un grand nombre d'oligonucléotides entraîne une compétition avec les miARN endogènes [218,440]. De plus, les inhibiteurs, simples brins, ne nécessitent pas forcément l'utilisation de vecteur pour intégrer le cytoplasme cellulaire contrairement aux analogues, bicaténaires [441]. L'utilisation de séquences inhibitrices des miARN permet alors de s'affranchir de ces limites. Cependant, de nombreux paramètres sont à définir pour l'administration de miARN, notamment les méthodes virales, de systèmes lipidiques, polymériques, inorganiques ou de VE. L'administration, systémique ou spécifique d'un tissu grâce à un adressage utilisant des saccharides, des anticorps, des peptides ou des protéines sont autant de facteurs à prendre en compte dans l'élaboration de ces nouvelles stratégies thérapeutiques [442,443]. Par ailleurs, la biodisponibilité du miARN dans l'organisme, sa stabilité et les potentiels effets aspécifiques devront être évalués [444].

1.2 Perspectives

Ces travaux nous ont permis de décrire le rôle des miARN dans la physiopathologie des POAN et d'identifier des candidats impliqués dans les processus ostéogéniques et inflammatoires. Cependant, bien que nos connaissances de la pathogenèse s'accroissent de jour en jour, l'absence d'un certain nombre d'éléments viennent obscurcir notre compréhension des POAN.

Dans un premier temps, il sera essentiel de valider les candidats identifiés sur le modèle murin de POAN, principalement dans le cas de miR-146a-5p et miR-214-3p pour leur rôle dans la suppression des mécanismes de l'ostéogenèse et de l'inflammation, et ainsi évaluer leur capacité à moduler le devenir des FAPs et prévenir le développement des POAN *in vivo*. A cette fin, deux choix dans le protocole d'injections multiples s'offre au nous, en injection prophylactique ou post-lésionnelle. Afin de se rapprocher au maximum d'une logique clinique, le choix d'injections combinées en amont de l'induction du modèle semble tout désigné, avec 3 injections intramusculaires espacées de 2 jours avant l'initiation de la procédure expérimentale basée sur les travaux de Wang *et al.* [257]. Le choix du vecteur et la dose d'oligonucléotides utilisés seront également des paramètres à évaluer dans la mise en place du modèle.

Ensuite, et afin de décrire plus précisément le rôle de miR-146a-5p dans la régulation des processus inflammatoires, il sera intéressant d'élaborer une nouvelle stratégie d'activation des macrophages. Les LPS activant les macrophages comme lors de leur contact avec un agent pathogène externe, et bien que les patients POAN présentent un risque infectieux élevé, cette activation pourrait être trop caricaturale des phénomènes inflammatoires rencontrés lors d'une lésion neurologique. L'utilisation de DAMPs, tel qu'HMGB1 ou un broyat de tissu musculaire, nous permettrait de nous rapprocher des conditions pathologiques retrouvées chez l'homme et de plus finement évaluer l'impact de miR-146a-5p sur le phénotype des macrophages [445,446]. La quantification des DAMPs lors de l'utilisation ultérieure du modèle murin de POAN sera aussi nécessaire afin d'identifier le rôle de la lésion neurologique dans le relargage de ces derniers. En outre, l'étude du rôle du TGF- β sécrété par les macrophages activés sur la prolifération, la survie et la différenciation ostéogénique des FAPs sera importante pour valider l'implication de cette voie de signalisation dans la pathogenèse et l'évolution des POAN.

Les résultats développés dans ce manuscrit se basent sur les temps très précoces à 2 et 4 jours après l'induction du modèle de POAN. La présence de

minéralisation intramusculaire est déjà observable à 2 jours, et la caractérisation des bouleversements de la signalisation des FAPs, MPs et macrophages dans les premières heures de la pathogenèse sera grandement bénéfique à l'identification d'un point de bascule phénotypique. Les macrophages sont d'un intérêt tout particulier puisque qu'initiateurs du devenir pathologique des FAPs. Ainsi, la caractérisation précoce de leur pathogénicité et hétérogénéité, au travers d'analyses single cell, RNA-seq ou ATAC-seq combinées à des marquages iNOS et CD206 dans le tissu musculaire développant des POAN permettrait de compléter les résultats déjà accumulés sur la perturbation de la réponse inflammatoire. De plus, l'isolement des macrophages de muscles sains ou POAN permettront d'identifier les cascades de signalisation préférentiellement activées lors de la neurolésion par ces acteurs de l'immunité dans les premières heures du développement des POAN.

Madaro *et al.* ont décrit un rôle délétère des FAPs de muscle dénervé sur la myogenèse [165]. La mise en place d'un modèle de coculture entre les FAPs et les MPs afin d'évaluer le potentiel d'induction de la myogenèse par les FAPs de muscle sain ou POAN permettrait d'évaluer l'impact de la neurolésion sur les propriétés de ces acteurs de la régénération musculaire. L'ischémie tissulaire étant un élément clé de la pathogenèse des POA d'origine traumatique, l'évaluation de la dérégulation des miARN et des transcrits des cellules endothéliales permettrait de tirer des conclusions quant à l'implication commune de l'hypoxie comme facteur favorisant entre les deux origines de la pathologie [447]. De plus, l'étude fonctionnelle des cellules endothéliales dans un modèle de vascularisation 3D permettrait mettre en évidence un potentiel défaut dans les processus de vascularisation lors d'une lésion neurologique. En parallèle, l'étude du potentiel de différenciation chondrogénique précoce des FAPs de muscle sain ou de patients POAN pourra être évalué dans le modèle de niche ectopique sur biomatériaux présenté en partie 0 qui permet le développement d'une ossification ectopique à l'inverse du modèle de POAN.

Afin d'évaluer l'implication des contraintes mécaniques notamment associées à la spasticité musculaire chez les patients neurolésés, nous avons entrepris le développement d'un modèle de culture 3D des FAPs pouvant être soumis à des contraintes mécaniques de type étirement uniaxial. Ce modèle permettra ainsi d'étudier la réponse des FAPs aux différents protocoles d'étirement, en condition inflammatoire ou non et d'identifier l'activation de voies de mécanotransduction. Les variations d'expression des miARN mécanosensibles seront également étudiées dans le temps en fonction de l'intensité appliquée. Ce travail s'effectue avec le Dr Etienne François, responsable de la plateforme de

mécanobiologie de l'UMR-S 1124 " Environmental Toxicity, Therapeutic Targets, cellular Signaling and Biomarkers – T3S" de Université Paris Descartes.

Finally, all these experimental results will be supported by the clinical study BENTHOS, a prospective study led by Dr Marjorie SALGA aimed at identifying biological and clinical predictive factors of POAN development in a cohort of spinal cord injury patients. The results thus obtained in research will be put in perspective with markers identified by this data bank in spinal cord injury patients, reinforcing thus the relevance of experimental observations and the interactions between research and clinical practice always in the objective of improving patient care.

VII - Conclusion

En dépit de l'amélioration de la prise en charge des patients, la résection chirurgicale, traitement de référence des POAN, reste associée à des risques opératoires et de récurrence. Afin de développer de nouvelles solutions thérapeutiques, une meilleure compréhension des mécanismes pathologiques est nécessaire. Dans ces travaux, nous avons successivement caractérisé le microenvironnement musculaire développant des POAN, le rôle des progéniteurs du muscle et des miARN sur leurs propriétés ostéogéniques ainsi que l'impact de l'inflammation sur le potentiel de différenciation des FAPs.

A l'échelle du muscle entier, nous avons mis en évidence la surexpression de marqueurs et miARN ostéo-chondrogéniques associée à un défaut de myogenèse dans les muscles développant des POAN. L'expression des myomiR par les MPs était réduite lors de la lésion neurologique. En caractérisant les FAPs, nous avons observé l'activation de signalisations ostéo-chondrogéniques lors de la phase inflammatoire aiguë associée au muscle en régénération, toutefois compensée par la surexpression parallèle de miARN ostéo-suppressifs. Cependant, lors de la concomitance de la phase inflammatoire et d'un traumatisme neurologique, les miARN des FAPs étaient sous-exprimés tandis que l'expression des marqueurs ostéo-chondrogéniques persistaient. De plus, la modulation des miARN identifiés permettait de réduire le potentiel ostéogénique des FAPs isolés de muscle de patients POAN, confirmant ainsi leur rôle dans le maintien du phénotype physiologique des FAPs. Enfin, nous avons observé la surexpression et la persistance de marqueurs associés à une polarisation plutôt anti-inflammatoire des macrophages de muscle POAN tandis que la modulation de certains miARN permettait de réduire la réponse ostéogénique des FAPs aux processus inflammatoires.

Pris dans leur ensemble, ces résultats identifient un mécanisme ostéo-suppressif des miARN des FAPs, activé lors de la réponse inflammatoire et inhibé lors de la lésion neurologique. Nous avons également mis en évidence le rôle central de miR-146a-5p et miR-214-3p dans la régulation des processus inflammatoires et ostéogéniques à l'origine de la pathologie. Ces travaux étayant notre compréhension des mécanismes physiopathologiques, fournissent de nouvelles pistes de réflexion sur les dynamiques cellulaires impliquées dans la pathogenèse et ouvrent la voie à des options thérapeutiques innovantes.

VIII - Annexes

1.1 Communications scientifiques

- Présentation d'un poster aux Journées de la Société Française de Myologie (JSFM) – 2021
- Présentation d'un poster aux Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés (JFBTM) – 2022
- Communications orales aux Journées des Doctorants IRBA – 2020-2021-2022
- Communications orales aux Journées de l'Ecole Doctorale – 2020-2021-2022

1.2 Publications scientifiques

- **Spinal cord injury dysregulates injured muscle miRNAs signaling to establish neurogenic heterotopic ossifications**

Journal of Pathology – Soumis

Jules GUEGUEN, Dorothée GIRARD, Bastien RIVAL, Marie-Emmanuelle GORIOT, Sébastien BANZET

- **Neurogenic Heterotopic Ossifications Recapitulate Hematopoietic Stem Cell Niche Development Within an Adult Osteogenic Muscle Environment**

Frontiers in Cell and Developmental Biology – 2021

Dorothée Girard, Frédéric Torossian, Estelle Oberlin, Kylie A. Alexander, **Jules Gueguen**, Hsu-Wen Tseng, François Genêt, Jean-Jacques Lataillade, Marjorie Salga, Jean-Pierre Levesque, Marie-Caroline Le Bousse-Kerdilès & Sébastien Banzet

- **Spinal cord injury reprograms muscle fibroadipogenic progenitors to form heterotopic bones within muscles**

Bone Research – 2022

Hsu-Wen Tseng, Dorothée Girard, Kylie A. Alexander, Susan M. Millard, Frédéric Torossian, Adrienne Anginot, Whitney Fleming, **Jules Gueguen**, Marie-Emmanuelle Goriot, Denis Clay, Beulah Jose, Bianca Nowlan, Allison R. Pettit, Marjorie Salga, François Genêt, Marie-Caroline Le Bousse-Kerdilès, Sébastien Banzet & Jean-Pierre Lévesque

- **Interleukin-1 Is Overexpressed in Injured Muscles Following Spinal Cord Injury and Promotes Neurogenic Heterotopic Ossification**

Journal of Bone and Mineral Research – 2022

Hsu-Wen Tseng, Irina Kulina, Dorothée Girard, **Jules Gueguen**, Cedryck Vaquette, Marjorie Salga, Whitney Fleming, Beulah Jose, Susan M Millard, Allison R Pettit, Kate Schroder, Gethin Thomas, Lawrie Wheeler, François Genêt, Sébastien Banzet, Kylie A Alexander, Jean-Pierre Lévesque

1.2.1 Article de thèse : Rôle des miARN dans le développement des POAN

Cet article en soumission reprend les éléments clés décrits extensivement dans le chapitre 1 et 2 des résultats de ce manuscrit.

En résumé, ces travaux, au travers de l'utilisation d'un modèle murin de POAN, ont permis de montrer que le muscle lésé surexprimait simultanément des acteurs ostéo-chondrogéniques tels que *RUNX2* et *SOX9* ainsi que des miARN ostéogéniques et ostéo-suppressifs lors de la régénération musculaire. De façon intéressante, lors de l'addition d'une lésion neurologique, les processus de régénération musculaires s'en retrouvaient compromis tandis que l'activation de plusieurs miARN ostéo-chondrosuppressifs était inhibée, perturbant ainsi l'équilibre entre ces derniers et les miARN ostéo-chondrogéniques. L'étude détaillée des progéniteurs musculaires FAPs et MPs a ensuite confirmé la surexpression des acteurs ostéo-chondrogéniques couplée à l'inhibition des miARN ostéo-chondrosuppressifs. En outre les niveaux d'expression des myomiR et de *Myog* dans les MPs étaient réduits par la lésion neurologique lors de la régénération musculaire. Enfin, nous avons montré que la surexpression des miARN lors de la lésion musculaire était retrouvée lors de l'induction ostéogénique en milieu inflammatoire de FAPs de patients. De plus, l'inhibition de miR-20a-5p, miR-199a-5p et la surexpression de miR-146a-5p, miR-214-3p permettait de réduire le potentiel ostéogénique et l'expression de marqueurs ostéogéniques des FAPs humains.

Pris dans leur globalité, ces résultats suggèrent que la lésion neurologique perturbe l'équilibre de la réponse des miARN en prévenant l'activation de miARN ostéo-chondrosuppressifs lors de la lésion musculaire, permettant ainsi l'engagement ostéogénique des FAPs du muscle en régénération.



**Spinal cord injury dysregulates fibro-adipogenic progenitors
miRNAs signaling to promote neurogenic heterotopic
ossification**

Journal:	<i>The Journal of Pathology</i>
Manuscript ID	Draft
Wiley - Manuscript type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Gueguen, Jules; Institut de recherche biomédicale des armées, INSERM UMRS-MD 1197, Centre de Transfusion sanguine des Armées GIRARD, Dorothée; Institut de recherche biomédicale des armées, INSERM UMRS-MD 1197, Centre de Transfusion sanguine des Armées Rival, Bastien; Institut de recherche biomédicale des armées, INSERM UMRS-MD 1197, Centre de Transfusion sanguine des Armées Goriot, Marie-Emmanuelle; Institut de recherche biomédicale des armées, INSERM UMRS-MD 1197, Centre de Transfusion sanguine des Armées Banzet, Sébastien ; Institut de recherche biomédicale des armées, INSERM UMRS-MD 1197, Centre de Transfusion sanguine des Armées
Portal Keywords:	spinal cord injury, heterotopic ossification, miRNA, Skeletal muscle, fibro-adipogenic progenitors
Tissue:	
Pathology:	
Technique:	

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Spinal cord injury dysregulates fibro-adipogenic progenitors miRNAs signaling to promote neurogenic heterotopic ossifications

Running title: miRNAs in neurogenic heterotopic ossifications

Authors:

Jules GUEGUEN^{1,2}, Dorothee GIRARD^{1,2}, Bastien RIVAL^{1,2}, Marie-Emmanuelle GORIOT^{1,2}
and Sébastien BANZET^{1,2}

Affiliations:

¹ Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Clamart, France

² INSERM UMR-MD 1197, Clamart, France

Conflicts of interest:

The authors have no conflict of interest to disclose

Word count of main body text: (Introduction to Discussion) (<4000 words)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Abstract

Neurogenic heterotopic ossifications (NHOs) are intra-muscular ectopic bone formations that develop following central nervous system damage such as spinal cord or traumatic brain injury. NHOs occur in the vicinity of major joints and induce ankylosis, acute pain, nervous and vascular compressions, ultimately impairing patients' recovery. At the cellular level, aberrant osteogenic commitment of fibro-adipogenic progenitors (FAPs) is responsible for NHOs development. The role of central nervous system lesion in the onset of NHOs is still poorly understood and the current treatment (surgical resection), remain difficult and unsatisfying.

MiRNAs are small non-coding mRNAs silencer involved in multiple biological processes. We measured miRNAs expression in the muscle tissue from a clinically relevant NHOs mouse model that combines muscle and spinal cord injuries. Sorted FAPs and myogenic progenitors (MPs) were also screened for osteo-chondrogenic and myogenic markers and miRNAs expression profile. Then we performed osteogenic functional analysis of identified miRNAs candidates on patient's FAPs isolated from muscle surrounding NHOs.

Our results showed the overexpression of osteo-chondrogenic markers *Runx2* and *Sox9* along with overexpression of osteo-suppressive miRNAs in injured muscle. SCI increased osteogenic miR-20a-5p expression 4 days after injury. When combining both muscle and neurological injury, intramuscular mineralization nodules developed and osteo-suppressive miR-199a-3p and miR-214-3p response was hindered. In isolated FAPs from damaged muscle, SCI induced a global downregulation of osteo-suppressive miRNAs while osteogenic markers *Runx2* and *Alpl* were overexpressed. MiRNAs candidates were able to inhibit human NHOs FAPs mineralization and osteo-chondrogenic markers *in vitro*.

We highlighted the existence of an osteo-suppressive mechanism regulated by miRNAs in response to muscle damage preventing FAPs spontaneous osteogenic commitment, that

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

seems to be ablated by the SCI. Altogether, these results suggest the involvement of multiple downregulated osteo-suppressive miRNAs driving early NHOs pathogenesis.

(2ème page, <300 mots)

Keywords (3-10) : Spinal cord injury, heterotopic ossification, miRNA, skeletal muscle, fibro-adipogenic progenitors

For Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Introduction

Neurogenic Heterotopic Ossifications (NHOs) are ectopic extra-skeletal bone formations, that occur after central nervous system injury, primarily spinal cord injury (SCI), traumatic brain injury (TBI) and stroke [1–3]. NHOs develop at the expense of skeletal muscle tissue, are located around major joints and can significantly impair limb mobility [4,5]. NHOs can induce joint ankylosis, nerve and vascular compressions and severe pain. Surgical resection is currently the most efficient and reliable treatment [5,6]. Up to 30% of SCI and 20% of TBI patients develop NHOs, leading to comorbidities and compromising patient's rehabilitation [6,7].

NHOs development involves a process of endochondral ossification and can lead to a mature bone containing a functional hematopoietic niche [8–10]. Fibro-adipogenic progenitors (FAPs) are muscle interstitium resident mesenchymal stromal cells that are major cellular actors in HOs development and specifically in NHOs [11–13]. Physiologically, FAPs support myogenic progenitors (MPs) proliferation and myoblastic differentiation upon muscle repair but can also lead to fibrosis under pathological conditions [14–17]. FAPs directly participate in bone fracture repair, exhibiting previously unsuspected physiological osteogenic capabilities [18]. Muscle regeneration after acute injury is orchestrated by MPs activation, proliferation, differentiation into myoblasts and fusion to form new myofibers [19–21]. Lineage tracing experiments have shown that MPs do not contribute to HOs nor NHOs but muscle regeneration seems to be compromised [13,22]. Inflammation is a key mechanism in NHOs pathogenesis. Pro-inflammatory cytokines and macrophages, but not neutrophils, are involved and mandatory to drive FAPs towards an osteogenic fate [23,24]. CNS injury triggers local and systemic inflammatory response [25,26]. Pro-inflammatory cytokines Interleukin-1 and Oncostatin M directly support NHOs pathogenesis in a mouse model and *in vitro* with patient's muscle progenitors [8,27]. Despite all previous studies, some aspects of NHOs pathogenesis are still unclear, specifically the impact of the CNS lesion on FAPs and MPs signalling and fate.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

MiRNAs are small non-coding single stranded RNA that post-transcriptionally regulate gene expression by binding and silencing their mRNA target [28,29]. Numerous miRNAs are physiologically involved in bone development and repair processes, they regulate osteoblast proliferation/differentiation or hypertrophic maturation of chondrocytes by targeting key molecular actors such as *Runx2*, *Sox9*, *Osx*, *Bmp2*, *Atf4* or their repressors [30–32]. While cellular actors and numerous cytokines have been thoroughly investigated in HOs, the potential involvement of miRNAs is still poorly described. MiR-17-5p and miR-203 regulate HOs in ankylosing spondylarthritis and in a non-neurogenic HO model respectively [33,34]. In a small cohort of human traumatized muscle samples, miRNA dysregulation was found in patients developing HOs and 2 myomiRs were proposed to contribute to ectopic ossification [35]. Although these studies demonstrate the involvement of miRNAs in HOs formation, their possible role in NHOs remains unclear.

We hypothesized that miRNAs could participate to NHOs formation and studied their expression in our NHOs mouse model combining SCI and acute cardiotoxin (CDTX) muscle injury [23]. In this model, SCI or muscle injury alone do not elicit NHOs, both injuries are needed. To understand why injured muscle fails to regenerate and engages in osteochondrogenic processes following SCI, we performed a large miRNAs profiling at early stages, in skeletal muscle tissue. Candidate miRNAs were then studied in mice FAPs and MPs isolated from our model. Dysregulated miRNAs were further studied *in vitro* in osteogenic differentiation conditions in FAPs isolated from NHOs patients muscle sample and functional assays were performed on human FAPs with the most relevant ones.

In this study, we identified early osteo-suppressive miRNAs downregulation in FAPs concomitant to myogenic miRNAs downregulation in MPs in the NHOs mouse model. We also confirmed that overexpression of these osteo-suppressive miRNAs could attenuate mineralization and osteogenic markers expression from human FAPs.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Materials and methods

NHOs mouse model

6-8 weeks old female CD57Bl/6 mice underwent spinal cord transection injury (SCI) between T11-T13 or SHAM surgery (control) followed by intramuscular injections of 12 μ M cardiotoxin or phosphate buffered saline (PBS) into the gastrocnemius (150 μ L). Mice were euthanized naive or at 2, 4 or 7 days post-surgery and both gastrocnemius were harvested and either processed for cell isolation or flash frozen in isopentane and embedded in OCT.

Muscle histology and immunohistochemistry

Cryosections were dried and stained with Hematoxylin Phloxine Saffron (HPS). For Von Kossa staining, cryosections were incubated in 1% silver nitrate followed by UV chamber incubation and nuclear fast red counterstain. For immunohistochemical staining, cryosections were fixed and incubated with anti-laminin, anti-osteocalcin or anti-collagen III antibody. Sections were washed with PBS and incubated with secondary antibody Alexa Fluor 594 or Alexa Fluor 488.

Murine FAPs, macrophages and MPs isolation

Cellular isolations were performed following an adapted protocol from Latroche et al. [36]. Briefly, gastrocnemius muscles were mechanically minced and incubated in collagenase B and Dispase II at 37°C for 30 minutes. Red blood cell lysis was performed. Cells were incubated in FcBlock for 30 minutes prior to antibodies incubation (see antibody table). Gating strategies are described in the manuscript.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

miRNAs screening and RT-qPCR analysis

Total RNAs were extracted from NHOs mice gastrocnemius muscle, sorted cell populations or cultured human FAPs using QIAzol lysis reagent and chloroform extraction. RNAs precipitation was performed using isopropanol and glycogen. Reverse transcriptions were performed with 20 ng/ μ L (mRNAs) or 5 ng/ μ L (miRNAs) from template RNAs. cDNA were respectively diluted to 1:80 and 1:20 before RT-qPCR amplification. Three reference genes and miRNAs were selected using Genom (v3.4) and normalized by the geometric mean of $1.9^{\Delta\Delta C_t}$ to reference gene).

Human PDGFR α ⁺CD56⁻ FAPs isolation

Muscle surrounding NHOs were collected from NHOs surgical wastes following their excision from patients with brain injuries, spinal cord injuries or strokes. Briefly, muscle fragments were minced mechanically, with pronase and adherent cells were cultured for 2 weeks prior to FACS sorting using CD56 and PDGFR α antibodies.

AntimiR and mimic transfection

Functional analyses were performed using miRCURY LNA Power Inhibitors (10 nM final) and miRCURY LNA Mimics (1 nM final). Oligonucleotides were incubated 5 minutes at room temperature with Lipofectamine RNAiMAX (1,5 μ L/mL) in α -MEM prior to cell supplementation. After 48h, culture medium was changed for osteogenic differentiation medium. Viability was assessed by measuring DAPI intensity in flow cytometry.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

In vitro osteogenic differentiation assay and mineralization quantification

Human PDGFR α ⁺CD56⁻ FAPs were seeded 3 days before culture medium was replaced by control medium or osteogenic medium for 13 days. At the end of the differentiation process, cells were washed, fixed and stained in 20 g/L Alizarin Red S. Staining was extracted and quantified by spectrophotometry at 405 nm.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism (9.1.1). All plots represent mean \pm standard deviation (SD) of different biological samples. Statistical differences were calculated using Mann-Whitney for simple comparisons, One-way ANOVA with Tukey post hoc correction for multiple comparisons and Two-way ANOVA with Tukey post hoc correction for multiple intra-groups comparisons or Šidák post hoc correction for multiple inter-groups comparisons (*=p<0.05, **=p<0.01, ***=p<0.001).

Supplementary materials and methods

Complete and detailed procedures for muscle histology, immunohistochemistry, murine cells isolation, miRNAs screening and RT-qPCR analysis, human FAPs isolation, preparation of conditioned medium (CM⁺), *in vitro* osteogenic differentiation assay and Western Blot are available in supplementary materials and methods. Antibody concentrations and RNAs sequences are also provided in separated tables.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Results

(FIGURE 1) SCI induces mineralization and exacerbates osteo-chondrogenic markers expression in CDTX damaged muscle

To investigate the role of miRNAs in NHOs, we used our mouse model that combines muscle injury by intramuscular injection of cardiotoxin (CDTX) and concomitant spinal cord injury (SCI) to generate ectopic ossification, or their controls (intramuscular PBS injection and SHAM surgery) [23] (Figure 1A). We collected gastrocnemius muscle 2, 4 and 7 days later. In injured muscle, the HPS staining showed classical myofiber necrosis with massive mononuclear cells infiltration at D2, D4 and regenerative myofibers at D7 (Figure 1B, top and middle panel). No mineralization was observed with Von Kossa staining with CDTX alone (Figure 1B, middle panel) nor with SCI alone (Figure S1). Undamaged muscle from SCI mice displayed myofibers atrophy at D7 (Figure S1). SCI combined with CDTX injection induced myofibers necrosis and cell infiltration at D2, D4 and D7 (Figure 1B, bottom panel). Von Kossa staining showed calcified necrotic fibers (D2, D4) and nodules (D7), consistent with previous findings [23]. Immunostaining analysis showed disrupted laminin staining and impaired muscle regeneration, concomitant to extracellular osteocalcin and collagen III deposition in SCI+CDTX muscles, demonstrating that osteogenic differentiation occurred (Figure 1C and S1). These results confirm that both muscle and spinal cord injuries are mandatory to the development of NHOs.

The kinetics of signaling pathways activation involved in the early stages of NHOs development is still poorly described, therefore we investigated the expression of osteo-chondrogenic and myogenic markers at the mRNA level in muscle tissue at D2, D4, D7 in PBS+SHAM, PBS+SCI, CDTX+SHAM, CDTX+SCI muscles (Figure 1D). We observed increased expression of osteo-chondrogenic markers *Runx2*, *Sox9* and *Sp7* induced by CDTX injection while CDTX+SCI significantly exacerbated *Sox9* expression compared to CDTX alone at D2. Moreover, *Runx2*, *Sox9*, *Col10a1*, *Sp7* and *Tgfb1* expression persisted at

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

D7 in CDTX+SCI muscle compared to CDTX alone. Surprisingly, *Alpl* and *Vegfa* expression levels were lowered in both CDTX conditions and PBS+SCI at each time point compared to PBS+SHAM while *Atf4* and *Bmp2* expression were not significantly altered. *Myf5* myogenic marker expression was significantly lowered in CDTX+SCI muscle compared to CDTX alone at D4 while *Myod1* and *Myog* expression did not change significantly (Figure 1D).

(FIGURE 2) Muscle injury triggers osteogenic miRNAs expression while SCI impairs and delays osteo-suppressive miRNAs response after muscle damage

Next, we investigated global miRNA expression in injured muscle at the early time points D2 and D4 using a RTqPCR profiling analysis (Figure 2) performed on pooled samples. CDTX injury alone induced the overexpression of several osteogenic miRNAs : miR-21-5p, miR-20a-5p and miR-199a-5p and osteo-suppressive miRNAs : miR-142-3p, miR-223-3p, miR-17-5p and miR-214-3p at D2 and D4 after muscle injury (Figure 2A). CDTX injury also decreased the expression of multiples muscle-specific miRNAs (myomiR) such as miR-1-3p, miR-133a-3p, miR-206 and miR-378a-3p (Figure 2A). Interestingly, the upregulation of several osteo-suppressive miRNAs was ablated by SCI (Figure 2B).

We next further explored the expression of relevant miRNAs candidates selected based on our miRNAs profiling (Figure 2A-B and S2) crossed with extensive literature analysis on osteo-chondrogenic, myogenic and inflammation related miRNAs. These candidates were measured on individual samples by RT-qPCR. In CDTX-injured muscle, we observed an upregulation of osteo-suppressive miR-17-5p, miR-142-3p, miR-146a-5p, miR-199a-3p, miR-214-3p and miR-223-3p compared to PBS injected muscle (Figure 2C). Among these osteo-suppressive miRNAs, miR-17-5p, miR-142-3p, miR-223-3p were further upregulated at D4 in CDTX+SCI compared to CDTX alone whereas miR-199a-3p and miR-214-3p were significantly downregulated. Osteo-suppressive miR-30e-5p expression was significantly reduced by SCI in PBS and CDTX muscle at D4, miR-143-3p followed the same trend

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

(Figure 2C). Osteogenic miRNAs miR-20a-5p, miR-21-5p and miR-199a-5p were upregulated in CDTX muscle with miR-20a-5p and miR-21-5p expression levels further increased in CDTX+SCI muscle at D4 (Figure 2D). Overall, osteo-suppressive miRNAs response appears to be delayed overtime while osteogenic miRNAs response to muscle damage seems to persist longer in CDTX+SCI muscle compared to CDTX muscle (Figure 2C-D).

SCI has previously been described to alter muscle microenvironment [17], so we hypothesized that SCI could set the path to an altered, pathologic muscle microenvironment that favours osteo-chondrogenic differentiation. We studied the expression levels of myomiRs involved in myogenic progenitors' (MPs) activation, proliferation, differentiation, or fusion. We observed a down regulation of miR-1-3p, miR-133a-3p, miR-206 and miR-378a-3p in muscle tissue 2 days after CDTX injury (Figure 2E). Interestingly miR-1-3p was downregulated by SCI alone at D4 compared to sham surgery, while in the meantime miR-206 was overexpressed in CDTX+SCI compared to CDTX alone.

(FIGURE 3) SCI upregulates osteogenic markers expression and impairs osteo-suppressive miRNAs expression in FAPs after muscle injury

We previously described FAPs to be at the origin of NHOs development and sought to understand how they adopt an osteo-chondrogenic fate by describing osteogenic markers temporality and selected miRNAs [13]. We sorted major mononuclear cell populations from muscles after enzymatic digestion: FAPs (CD34⁺ CD31⁻ Sca1⁺ PDGFR α ⁺ cells in CD45⁻ F4/80⁻ cells), MPs (α 7-Integrin⁺ CD34^{low} CD31⁻ Sca1⁻ cells in CD45⁻ F4/80⁻ cells), macrophages (CD45⁺ F4/80⁺ cells) and endothelial cells (ECs) (CD34⁺ CD31⁺ Sca1⁺ cells in CD45⁻ F4/80⁻ cells) (Figure 3A-B). Because mineralization appeared as soon as D2 and osteogenic differentiation was already observed at D7, we focused on D2 and D4 post injury. As expected, cell populations distribution was severely disrupted following CDTX injury with

1
2
3 fewer ECs, and a massive macrophages infiltration (Figure 3C). Surprisingly, macrophages
4 proportion was lower 2 days after CDTX+SCI compared to CDTX alone. Conversely, FAPs
5 distribution in CDTX+SCI muscle was not different from acute injured muscle 2 days after
6 injury, whereas FAPs tended to accumulate in those conditions after 4 days (Figure 3D).
7
8
9

10
11
12 Then we measured the expression of osteo-chondrogenic mRNA in FAPs. We observed a
13 drop in *Alpl* and *Bmp2* expression at D2 and D4 after CDTX injury compared to naive mice,
14 however their expression levels remained higher in CDTX+SCI (Figure 3E). *Runx2* and *Sox9*
15 expression were activated by the CDTX injury with no significant effect of SCI. Fibrosis
16 marker *Tgfb1* tended to be higher in FAPs from CDTX+SCI muscle compared to CDTX alone
17 (Figure 3E). Osteo-suppressive miR-16-5p, miR-17-5p, miR-93-5p, miR-146a-5p, miR-199a-
18 3p, miR-206, miR-214-3p, miR-223-3p, miR-378a-3p and miR-574-3p (Figure 3F) and
19 osteogenic miR-20a-5p, miR-21-5p, miR-199a-5p (Figure 3G) expression levels were
20 quantified and their expression followed a similar pattern, with increased expression at D2 in
21 CDTX+SHAM group. Their expression was dampened in CDTX+SCI group, interestingly
22 remaining close to naive FAPs expression levels (Figure 3F-G). Collectively, these results
23 suggest a miRNAs mediated osteo-suppressive mechanism activated in FAPs after CDTX
24 injury, that FAPs fail to activate in CDTX+SCI muscle where NHOs occurs.
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

43 **(FIGURE 4) Myogenic markers and miRNAs involved in muscle regeneration**
44 **are downregulated by SCI in MPs from injured muscle**
45

46
47
48 While we recently reported that MPs were absent from mineralized nodules in NHOs 14 days
49 post CDTX+SCI injuries, MPs remain a population of interest at the early stages of NHOs
50 pathogenesis since SCI impairs muscle regeneration [13]. MPs cell number drastically
51 decreased after CDTX injury, especially at D2 in CDTX+SCI muscle and rapidly expanded at
52 D4 (Figure 4A). Interestingly, MPs expression of *Alpl* and *Bmp2* followed the same trend as
53 FAPs with a lower expression in response to CDTX, partially alleviated in CDTX+SCI muscle
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

MPs (Figure 4B). MPs also expressed osteo-chondrogenic markers, *Runx2* was expressed similarly in CDTX and CDTX+SCI groups compared to healthy muscle while *Sox9* was higher in CDTX+SCI MPs compared to MPs from CDTX injured muscle at D4 (Figure 4B). *Pax7*, *Myf5* are markers of MPs quiescence while *Myod1* is a marker of MPs activated state. As expected, we observed the activation of MPs in response to acute muscle damage in both CDTX and CDTX+SCI muscles (Figure 4C), with a drop in *Pax7* and *Myf5* while *Myod1* expression increased. Lastly, *Myog* is involved in myogenic differentiation. We found an activation at D4 in response to CDTX that was blunted in CDTX-SCI mice suggesting a delayed differentiation (Figure 4C).

Osteo-suppressive miR-199a-3p and miR-214-3p expression levels were higher in MPs at D4 in CDTX group compared to CDTX+SCI and healthy muscle (Figure 4D). Osteogenic miR-20a-5p and miR-21-5p expression levels were induced by CDTX at D2 and D4 as found in FAPs (Figure 4D). MiR-1-3p, miR-133a-3p, miR-206 and miR-378a-3p participate in various stages of MPs activation, proliferation and myogenic differentiation. Their expression was induced after CDTX injury and was partially hindered in CDTX+SCI muscle at D2 and D4 (Figure 4E). Taken together, these results indicate that MPs from CDTX+SCI muscle express less *Myog*, myomiRs and more osteogenic markers in the initial stages of ectopic mineralization development compared to CDTX damaged muscle only.

(FIGURE 5) Conditioned medium from LPS stimulated-CD14⁺ macrophages (CM⁺) potentiates human FAPs osteogenic differentiation and increases osteo-chondrogenic markers and miRNAs expression

To confirm our findings and explore their relevance to human NHOs, we used PDGFR α ⁺CD56⁻ FAPs isolated from skeletal muscle surrounding NHOs surgical resection specimens (Figure 5A). FAPs expressed classical mesenchymal stromal cells markers such as CD73, CD90 and CD105 as we previously described [13,37] (data not shown). FAPs were

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

cultured in osteogenic conditions (OB) with conditioned medium from naive (CM⁻) or LPS stimulated CD14⁺ macrophages (CM⁺) to mimic the inflammatory environment. CM⁺ osteo-inducing potential and pro-inflammatory cytokines levels were described in previous work [8,27] and we confirmed its ability to enhance FAPs mineralization (Figure 5B) and alkaline phosphatase activity (Figure 5C). OSX and RUNX2 protein expression were upregulated by the addition of CM⁺ compared to OB alone (Figure 5D). We next quantified osteo-chondrogenic markers 1, 3, 7 and 10 days post osteogenic induction (Figure 5E). We observed that *ALPL*, *BMP2*, *RUNX2* and *ATF4* were upregulated by OB+CM⁺ compared to control growth medium or OB alone, with increased expression overtime. Intriguingly, chondrogenic markers *SOX9* and *COMP* were downregulated by OB+CM⁺ whereas *COL10A1*, a marker of chondrocyte hypertrophy, was expressed only in OB+CM⁺ condition (Figure 5E). Expression of *ACVR1*, a BMP receptor involved in *Fibrodysplasia Ossificans Progressiva* (FOP), the genetic form of HOs, was not altered by any experimental conditions (Figure 5E).

We next explored the expression of previously identified miRNAs candidates from our NHOs mouse model. Osteo-suppressive miR-17-5p, miR-146a-5p, miR-93-5p and miR-199a-3p as well as osteogenic miR-20a-5p, miR-21-5p and miR-199a-5p were overexpressed in the OB+CM⁺ culture condition compared to control or OB alone (Figure 5F). Interestingly, osteo-suppressive miR-214-3p was not significantly overexpressed in OB+CM⁺ cultured FAPs (Figure 5F). Hence, we confirmed that both osteo-suppressive and osteogenic miRNAs were upregulated in NHOs patients FAPs by a pro-inflammatory/pro-osteogenic environment, consistent with murine FAPs miRNAs response to CDTX injury.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

(FIGURE 6) Synthetic miRNAs inhibitors and mimics transfections suppress both calcium mineralization and osteo-chondrogenic markers in human FAPs

To determine whether our miRNAs candidates contribute to FAPs osteogenic differentiation in NHOs, we transfected mimics or anti-miR oligos in FAPs. Based on previous evidences, we selected two major candidates: the osteo-suppressive miR-214-3p and the osteogenic miR-20a-5p and two minor candidates: osteo-suppressive miR-146a-5p and osteogenic miR-199a-5p to perform functional analysis (Figure 6). We ensured that neither the transfection vector nor specific inhibitors and mimics altered cell viability (Figure 6A). As expected, miR-20a-5p inhibitor reduced miR-20a-5p expression and miR-214-3p mimics was abundant in transfected human FAPs (Figure 6B). We quantified alizarin red staining after inducing osteogenic differentiation of transfected FAPs and observed that both the inhibition of osteogenic miR-20a-5p/miR-199a-5p and the overexpression of osteo-suppressive miR-214-3p/miR-146a-5p decreased human FAPs osteogenic mineralization (Figure 6C). We also performed osteogenic differentiation assays in FAPs transfected with the 4 oligos and found a 50% decrease in mineralization compared to control (Figure 6C). Finally, we studied protein expression of direct and indirect osteo-chondrogenic targets of miR-214-3p and miR-20a-5p (Figure 6D). We found a decrease in MTOR and RUNX2 protein expression using miR-20a-5p inhibitor and a decrease in OSX, SOX9 and RUNX2 using miR-214-3p mimic in human FAPs (Figure 6D). Additionally, functional analysis of miR-17-5p inhibitor did not affect osteogenic properties of human FAPs, similarly to opposite oligos of precedingly described candidates (Figure S3).

Discussion

Although it is currently admitted that NHOs follow an intramuscular osteochondral development, the involvement of the CNS injury in the initial physiopathological stage remains unclear. Our results uncover a link between muscle FAPs and MPs miRNAs

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

expression and distant CNS injury leading to the onset of NHOs in a clinically relevant mouse model. After muscle injury, we found an increase in osteo-chondrogenic markers *Runx2*, *Sox9* and *Col10a1*. Osteogenic and most osteo-suppressive miRNAs were activated in CDTX-injured muscle tissue. SCI increased the expression of the osteogenic miR-20a-5p in both PBS and CDTX muscle at D4. Interestingly, the combination of muscle injury and SCI also prompted osteogenic miRNAs response while partially inhibiting osteo-suppressive miRNAs expression. Among the most SCI-downregulated miRNAs 4 days after injury, we identified suppressors of osteogenesis and chondrogenesis : miR-214-3p, miR-574-3p, miR-199a-3p [38–41]. These results show that miRNAs landscape in skeletal muscle is profoundly altered in response to muscle damage and that SCI significantly modifies the osteogenic/osteo-suppressive miRNA balance.

Because miRNAs expression in whole muscle may reflect not only active regulations but also profound changes in cell composition, we next investigated miRNAs signature in sorted FAPs, the cells of origin of NHOs. We initially hypothesized that FAPs osteogenic miRNAs would be upregulated as observed in CDTX+SCI muscle, however, their expression levels were lowered at D2 compared to CDTX alone. Similarly, while osteo-suppressive miRNAs were up-regulated in FAPs after injury, this response was blunted in CDTX-SCI group, including miR-214-3p, whereas osteo-chondrogenic markers expression was maintained. These results suggest a miRNAs osteo-suppressive mechanism activated by FAPs in response to muscle injury and osteogenic signaling in muscle damage, which is impaired by SCI.

Our mouse model is characterized by a SCI-induced failure of muscle regeneration and ectopic ossification. To understand how SCI impairs muscle regeneration and induces NHOs, we next studied MPs. As MPs do not contribute to NHOs formation, we anticipated limited modulation of osteogenic and osteo-suppressive miRNAs [13]. Our results showed however that MPs osteo-suppressive miRNAs were downregulated 4 days after NHOs induction, as observed for FAPs miRNAs downregulation after 2 days. However, it should be

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

noted that miR-214-3p has well-documented roles in myoblast proliferation and differentiation therefore the expression pattern we found may be totally disconnected from any osteogenic process [42,43]. Myogenic marker *Myog* and myomiRs were also downregulated in MPs from CDTX+SCI injured muscle suggesting myogenesis was altered or delayed. Interestingly, SCI downregulated myomiRs miR-1-3p which targets the master regulator of chondrogenesis *Sox9* found to be increased in those conditions [44].

We next studied human FAPs sorted from patient's muscle surrounding NHOs. We used our previously published model where FAPs are cultured with CM⁺ from macrophages to mimic NHOs muscle environment *in vitro* [8,27]. We confirmed that the osteogenic differentiation and osteogenic markers expression were significantly increased. Interestingly, osteo-suppressive miR-214-3p was the only miRNA identified in both models that was not overexpressed in mineralizing conditions, CDTX+SCI and OB+CM⁺. The functional analysis revealed that miR-20a-5p and miR-199a-5p inhibitors as well as miR-146a-5p and miR-214-3p mimics reduced FAPs mineralization. Direct and indirect osteo-chondrogenic targets were also decreased at protein level, including the key regulators RUNX2 and OSX. MiR-20a-5p and miR-199a-5p are involved in osteogenic differentiation of human stem cells, respectively regulating *BMP/SMAD* and *HIF1a* signaling [45–48]. On the other side of the spectrum, miR-214-3p and miR-146a-5p have both been described in osteo-suppressive mechanism by targeting *ATF4* and *SIRT1* [38,49]. As transfection of a mix of the four candidates could not significantly improve the osteogenic inhibition, we think that these miRNAs target similar osteogenic pathways in redundant ways. Taken together, our results suggest that in NHOs FAPs osteogenic differentiation is supported by blunted osteo-suppressive miRNAs response linked to SCI concomitant to osteogenic stimuli after muscle injury. Indeed, basal miRNAs expression levels prevent FAPs from undergoing osteogenic differentiation in healthy muscle or control medium, alike the simultaneous upregulation of both osteogenic and osteo-suppressive miRNAs in injured muscle. Hence, overexpression of osteogenic markers and

1
2
3 lack of osteo-suppressive miRNAs activation in CDTX+SCI muscle or OB+CM⁺ medium were
4
5 required to induce or increase osteoblastic differentiation and mineralization.
6
7

8 MiR-214-3p and miR-146a-5p have been reported to regulate M2 macrophage
9 polarization [50,51] while miR-20a-5p targets *TGFβ* signalling favouring M1 pro-inflammatory
10 macrophages phenotype [52,53]. As SCI exacerbates inflammation, those miRNAs could
11 represent promising targets to couple osteo-suppressive effect and pro-resolution
12 macrophages capacities [54]. Macrophages differentiation and polarization may be studied to
13 better understand how they affect NHOs development and how the SCI could potentially
14 skew miRNAs signaling leading to altered MΦ/M1/M2 activations. The question of a transfer
15 of miRNAs from macrophages to FAPs that could support their osteoblastic differentiation
16 goes beyond the aim of the present study but further investigations may be of great interest
17 since inflammation is a key mechanism in NHOs. Of further note, in a rat model of TBI,
18 injured brain neurons produced and released osteogenic miRNAs that accelerate bone
19 healing [55]. It should however be acknowledged that despite abundant literature describing
20 miRNAs signaling between cells, the importance of such mechanisms is still debated [56–
21 58].
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44

45 Conclusion

46 Our results show for the first time that CNS injury substantially modifies the miRNAs
47 landscape in both injured muscle and FAPs, the cells of origin of NHOs. The functional
48 analysis performed in a relevant model using patient's cells demonstrates that several
49 dysregulated miRNAs modify FAPs osteogenic differentiation. Our results suggest that NHOs
50 pathogenesis is not regulated by a single miRNA but rather by a finely tuned balance
51 between osteogenic and osteo-suppressive miRNAs. Muscle damage upregulates both
52 osteogenic and osteo-suppressive miRNAs while CNS damage disrupts this equilibrium by
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

lowering osteo-suppressive miRNAs response. More work is needed to determine whether intercellular miRNAs signaling also contributes to NHOs pathogenesis.

For Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Acknowledgements

The authors acknowledge the role of François Genêt, Marjorie Salga, Laure Gatin and Guillaume Genêt (AP-HP, Raymond Poincaré Hospital, Garches) who provide and oversee human NHOs specimen collection. The authors acknowledge the technical assistance of Denis Clay (INSERM UMS-44 Université de Paris-Saclay, Villejuif) for flow cytometry cellular sorting and Benoit Peuteman and his team (INSERM Lavoisier, SEIVIL, US 44) for mouse care.

Statement of author contributions

SB and DG conceived and designed the experiments. JG, DG, BR, and MG acquired, analyzed and interpreted data. JG, DG and SB wrote the manuscript. All the authors contributed to manuscript preparation and approved the final submitted version.

Funding statement:

This work was funded by BIOMEDEF SAN-1-0225 and BIOMEDEF SAN-1-2209 from the French Government Defense procurement and technology agency (DGA)

Ethics approval statement:

Mice experimental procedures were approved by the "C2EA-26" Ethics committee in accordance with French Ministry of Research regulations (#25901-2020060515467494). All human samples were obtained with the informed consent of the patients, the approval from the people protection committee (CPP approval n°09025, study BANKHO) and the approval from the National Commission for Informatics and Liberties (CNIL approval n°Eyo1066211J).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

References

- 1 Vanden Bossche L, Vanderstraeten G. Heterotopic ossification: a review. *J Rehabil Med* 2005; **37**: 129-136
- 2 Genêt F, Jourdan C, Schnitzler A, *et al.* Troublesome Heterotopic Ossification after Central Nervous System Damage: A Survey of 570 Surgeries. Feany M, ed. *PLoS ONE* 2011; **6**: e16632
- 3 Meyers C, Lisiecki J, Miller S, *et al.* Heterotopic Ossification: A Comprehensive Review: HETEROTOPIC OSSIFICATION. *JBMR Plus* 2019; **3**: e10172
- 4 Dejerine A, Ceillier A. Paraosteoarthropathies des Paraplégiques par Lésion Médullaire; Etude Clinique et Radiographique. In *Ann Med*, 1918.
- 5 Genêt F, Ruet A, Almangour W, *et al.* Beliefs relating to recurrence of heterotopic ossification following excision in patients with spinal cord injury: a review. *Spinal Cord* 2015; **53**: 340-344
- 6 Brady RD, Shultz SR, McDonald SJ, *et al.* Neurological heterotopic ossification: Current understanding and future directions. *Bone* 2018; **109**: 35-42
- 7 Hoyt BW, Pavey GJ, Potter BK, *et al.* Heterotopic ossification and lessons learned from fifteen years at war: A review of therapy, novel research, and future directions for military and civilian orthopaedic trauma. *Bone* 2018; **109**: 3-11
- 8 Torossian F, Guerton B, Anginot A, *et al.* Macrophage-derived oncostatin M contributes to human and mouse neurogenic heterotopic ossifications. *JCI Insight* 2017; **2**
- 9 Davis TA, Lazdun Y, Potter BK, *et al.* Ectopic bone formation in severely combat-injured orthopedic patients — A hematopoietic niche. *Bone* 2013; **56**: 119-126
- 10 Girard D, Torossian F, Oberlin E, *et al.* Neurogenic Heterotopic Ossifications Recapitulate Hematopoietic Stem Cell Niche Development Within an Adult Osteogenic Muscle Environment. *Front Cell Dev Biol* 2021; **9**
- 11 Oishi T, Uezumi A, Kanaji A, *et al.* Osteogenic Differentiation Capacity of Human Skeletal Muscle-Derived Progenitor Cells. Asakura A, ed. *PLoS ONE* 2013; **8**: e56641
- 12 Wosczyzna MN, Biswas AA, Cogswell CA, *et al.* Multipotent progenitors resident in the skeletal muscle interstitium exhibit robust BMP-dependent osteogenic activity and mediate heterotopic ossification. *J Bone Miner Res* 2012; **27**: 1004-1017
- 13 Tseng H-W, Girard D, Alexander KA, *et al.* Spinal cord injury reprograms muscle fibroadipogenic progenitors to form heterotopic bones within muscles. *Bone Res* 2022; **10**: 1-16
- 14 Joe AWB, Yi L, Natarajan A, *et al.* Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat Cell Biol* 2010; **12**: 153-163

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 15 Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N, *et al.* Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat Cell Biol* 2010; **12**: 143-152
- 16 Malecova B, Gatto S, Etxaniz U, *et al.* Dynamics of cellular states of fibro-adipogenic progenitors during myogenesis and muscular dystrophy. *Nat Commun* 2018; **9**: 3670
- 17 Madaro L, Passafaro M, Sala D, *et al.* Denervation-activated STAT3–IL-6 signalling in fibro-adipogenic progenitors promotes myofibres atrophy and fibrosis. *Nat Cell Biol* 2018; **20**: 917-927
- 18 Julien A, Kanagalingam A, Martínez-Sarrà E, *et al.* Direct contribution of skeletal muscle mesenchymal progenitors to bone repair. *Nat Commun* 2021; **12**: 2860
- 19 Lecourt S, Marolleau J-P, Fromigué O, *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 Yin H, Price F, Rudnicki MA. Satellite Cells and the Muscle Stem Cell Niche. *Physiol Rev* 2013; **93**: 23-67
- 21 Dumont NA, Bentzinger CF, Sincennes M-C, *et al.* Satellite Cells and Skeletal Muscle Regeneration. *Compr Physiol* 2015; **5**: 1027-1059
- 22 Lees-Shepard JB, Goldhamer DJ. Stem Cells and Heterotopic Ossification: Lessons from Animal Models. *Bone* 2018; **109**: 178-186
- 23 Genêt F, Kulina I, Vaquette C, *et al.* Neurological heterotopic ossification following spinal cord injury is triggered by macrophage-mediated inflammation in muscle: Macrophages drive heterotopic ossification after spinal cord injury. *J Pathol* 2015; **236**: 229-240
- 24 Tseng H-W, Kulina I, Salga M, *et al.* Neurogenic Heterotopic Ossifications Develop Independently of Granulocyte Colony-Stimulating Factor and Neutrophils. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 2020; **35**: 2242-2251
- 25 Anthony DC, Couch Y. The systemic response to CNS injury. *Exp Neurol* 2014; **258**: 105-111
- 26 Sun X, Jones ZB, Chen X-M, *et al.* Multiple organ dysfunction and systemic inflammation after spinal cord injury: a complex relationship. *J Neuroinflammation* 2016; **13**: 260
- 27 Tseng H-W, Kulina I, Girard D, *et al.* Interleukin-1 Is Overexpressed in Injured Muscles Following Spinal Cord Injury and Promotes Neurogenic Heterotopic Ossification. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 2022; **37**: 531-546
- 28 Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 2010; **11**: 597-610
- 29 O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, *et al.* Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol* 2018; **9**
- 30 Lian JB, Stein GS, van Wijnen AJ, *et al.* MicroRNA control of bone formation and homeostasis. *Nat Rev Endocrinol* 2012; **8**: 212-227

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 31 Zhao X, Xu D, Li Y, *et al.* MicroRNAs regulate bone metabolism. *J Bone Miner Metab* 2014; **32**: 221-231
- 32 Jing D, Hao J, Shen Y, *et al.* The role of microRNAs in bone remodeling. *Int J Oral Sci* 2015; **7**: 131-143
- 33 Qin X, Zhu B, Jiang T, *et al.* miR-17-5p Regulates Heterotopic Ossification by Targeting ANKH in Ankylosing Spondylitis. *Mol Ther - Nucleic Acids* 2019; **18**: 696-707
- 34 Tu B, Liu S, Yu B, *et al.* miR-203 inhibits the traumatic heterotopic ossification by targeting Runx2. *Cell Death Dis* 2016; **7**: e2436-e2436
- 35 de Vasconcellos JF, Jackson WM, Dimtchev A, *et al.* A microRNA Signature for Impaired Wound-Healing and Ectopic Bone Formation in Humans. *J Bone Joint Surg Am* August 2020
- 36 Latroche C, Weiss-Gayet M, Gitiaux C, *et al.* Cell sorting of various cell types from mouse and human skeletal muscle. *Methods* 2018; **134-135**: 50-55
- 37 Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; **8**: 315-317
- 38 Wang X, Guo B, Li Q, *et al.* miR-214 targets ATF4 to inhibit bone formation. *Nat Med* 2013; **19**: 93-100
- 39 Roberto VP, Gavaia P, Nunes MJ, *et al.* Evidences for a New Role of miR-214 in Chondrogenesis. *Sci Rep* 2018; **8**: 3704
- 40 Guérit D, Philipot D, Chuchana P, *et al.* Sox9-regulated miRNA-574-3p inhibits chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *PLoS One* 2013; **8**: e62582
- 41 Wu J-C, Sun J, Xu J-C, *et al.* Down-regulated microRNA-199a-3p enhances osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells by targeting Kdm3a in ovariectomized rats. *Biochem J* 2021; **478**: 721-734
- 42 Sun Y, Kuek V, Liu Y, *et al.* MiR-214 is an important regulator of the musculoskeletal metabolism and disease. *J Cell Physiol* 2019; **234**: 231-245
- 43 Liu J, Luo X, Xiong A, *et al.* MicroRNA-214 Promotes Myogenic Differentiation by Facilitating Exit from Mitosis via Down-regulation of Proto-oncogene N-ras*. *J Biol Chem* 2010; **285**: 26599-26607
- 44 Li J, Cao Y, Ma X, *et al.* Roles of miR-1-1 and miR-181c in ventricular septal defects. *Int J Cardiol* 2013; **168**: 1441-1446
- 45 Zhang J, Fu W, He M, *et al.* MiRNA-20a promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by co-regulating BMP signaling. *RNA Biol* 2011; **8**: 829-838
- 46 Cen X, Pan X, Zhang B, *et al.* miR-20a-5p contributes to osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells by regulating BAMBI and activating the phosphorylation of Smad5 and p38. *Stem Cell Res Ther* 2021; **12**: 421
- 47 Qi X-B, Jia B, Wang W, *et al.* Role of miR-199a-5p in osteoblast differentiation by targeting TET2. *Gene* 2020; **726**: 144193

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 48 Chen X, Gu S, Chen B-F, *et al.* Nanoparticle delivery of stable miR-199a-5p agomir improves the osteogenesis of human mesenchymal stem cells via the HIF1a pathway. *Biomaterials* 2015; **53**: 239-250
- 49 Zheng M, Tan J, Liu X, *et al.* miR-146a-5p targets Sirt1 to regulate bone mass. *Bone Rep* 2021; **14**: 101013
- 50 Peng L-Y, Li B-B, Deng K-B, *et al.* MicroRNA-214-3p facilitates M2 macrophage polarization by targeting GSK3B. *Kaohsiung J Med Sci* January 2022
- 51 Essandoh K, Li Y, Huo J, *et al.* MiRNA-Mediated Macrophage Polarization and its Potential Role in the Regulation of Inflammatory Response. *Shock Augusta Ga* 2016; **46**: 122-131
- 52 Fu X, Qie J, Fu Q, *et al.* miR-20a-5p/TGFBR2 Axis Affects Pro-inflammatory Macrophages and Aggravates Liver Fibrosis. *Front Oncol* 2020; **10**
- 53 Zhang F, Wang H, Wang X, *et al.* TGF- β induces M2-like macrophage polarization via SNAIL-mediated suppression of a pro-inflammatory phenotype. *Oncotarget* 2016; **7**: 52294-52306
- 54 Alexander KA, Tseng H-W, Fleming W, *et al.* Inhibition of JAK1/2 Tyrosine Kinases Reduces Neurogenic Heterotopic Ossification After Spinal Cord Injury. *Front Immunol* 2019; **10**
- 55 Xia W, Xie J, Cai Z, *et al.* Damaged brain accelerates bone healing by releasing small extracellular vesicles that target osteoprogenitors. *Nat Commun* 2021; **12**: 6043
- 56 Chevillet JR, Kang Q, Ruf IK, *et al.* Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes. *Proc Natl Acad Sci* 2014; **111**: 14888-14893
- 57 Witwer KW, Halushka MK. Toward the promise of microRNAs – Enhancing reproducibility and rigor in microRNA research. *RNA Biol* 2016; **13**: 1103-1116
- 58 Albanese M, Chen Y-FA, Hüls C, *et al.* MicroRNAs are minor constituents of extracellular vesicles that are rarely delivered to target cells. *PLOS Genet* 2021; **17**: e1009951

Figure legends

Figure 1: SCI induces mineralization and exacerbates osteo-chondrogenic markers expression in CDTX damaged muscle

(A) NHOs mouse model combines muscle injury (CDTX) and central nervous system damage (SCI) to induce intramuscular ectopic bone formation. PBS and SHAM surgery are

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

controls. Muscle were collected at 2, 4 and 7 days after induction from four experimental groups: PBS+SHAM, PBS+SCI, CDTX+SHAM, CDTX+SCI.

(B) Transversal gastrocnemius cryosections of PBS+SHAM (top panel), CDTX+SHAM (middle panel) and CDTX+SCI (bottom panel) stained with Hematoxylin Phloxine Saffron (HPS) or Von Kossa (VK) counterstained with nuclear fast red at day 2, 4 and 7. Mineralization nodules (black dotted line) appear in dark purple with HPS staining or in black with VK staining (magnification 10X, scale bar = 100 μ m).

(C) Laminin (left panel, magnification 20X, scale bar = 100 μ m) and osteocalcin (right panel, magnification 10X, scale bar = 100 μ m) immunostaining with DAPI co-staining on CDTX+SHAM or CDTX+SCI gastrocnemius transversal cryosections 7 days after injury.

(D) Relative mRNAs expression levels measured by RT-qPCR from whole muscle in PBS+SHAM, PBS+SCI, CDTX+SHAM, CDTX+SCI at days 2, 4 and 7. Myogenic markers are framed in green. Values are normalized on 3 reference genes and histograms represent mean \pm standard deviation (SD). Each dot represents independent biological samples from different mouse muscle. Statistical differences were calculated using Two-way ANOVA with Tukey post hoc correction for multiple comparisons (*=p<0.05, **=p<0.01, ***=p<0.001).

Figure 2: Muscle injury triggers osteogenic miRNAs expression while SCI impairs and delays osteo-suppressive miRNAs response after muscle damage

MiRnome analysis on whole muscle at day 2 and 4 presenting top 10 most overexpressed and underexpressed miRNAs from **(A)** CDTX+SHAM compared to PBS+SHAM **(B)** CDTX+SCI compared to CDTX+SHAM. MiRNAs involved in osteogenic, inflammatory and myogenic processes are highlighted in red (upregulated) or blue (downregulated). A threshold was established to exclude miRNAs expressed later than 32 Cp.

1
2
3 Relative miRNAs expression levels measured by RT-qPCR from whole muscle PBS+SHAM,
4
5 PBS+SCI, CDTX+SHAM, CDTX+SCI at days 2, 4 and 7 for (C) osteo-suppressive miRNAs,
6
7 (D) osteogenic miRNAs and (E) myomiRs.
8

9
10 Histograms represent mean \pm standard deviation (SD). Each dot represents independent
11
12 biological samples from different mouse muscle. Statistical differences were calculated using
13
14 Two-way ANOVA with Tukey post hoc correction for multiple comparisons (*= $p < 0.05$,
15
16 **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$).
17
18
19
20
21

22 **Figure 3: SCI upregulates osteogenic markers expression and impairs osteo-**
23 **suppressive miRNAs expression in FAPs after muscle injury**
24
25

26
27 (A) Experimental design of NHOs mouse muscle cellular subpopulations isolation in naive
28
29 muscle and at day 2 and 4 after CDTX+SHAM or CDTX+SCI.
30
31

32 (B) Fibro-Adipogenic progenitors (FAPs), myogenic progenitors (MPs), macrophages and
33
34 Endothelial Cells (EC) were sorted on the following strategy: macrophages were gated on
35
36 CD45⁺ F4/80⁺ while non-hematopoietic lineage populations were all CD45⁻ F4/80⁻ as well as
37
38 CD31⁻ Sca1⁺ CD34⁺ PDGFR α ⁺ for FAPs, Sca1⁻ CD31⁻ CD34^{low} α 7integrin⁺ for MPs and
39
40 Sca1⁺ CD31⁺ CD34⁺ for ECs.
41
42

43 (C) Muscle cell populations distribution on total sorted cells in naive muscle and
44
45 CDTX+SHAM or CDTX+SCI muscle at day 2 and 4.
46
47

48 (D) Distribution of CD31⁻ Sca1⁺ CD34⁺ PDGFR α ⁺ FAPs in CD45⁻ F4/80⁻ cells, in naive and
49
50 CDTX+SHAM and CDTX+SCI injured muscle.
51

52 Relative (E) mRNA, (F) osteo-suppressive miRNAs and (G) osteogenic miRNAs expression
53
54 levels measured by RT-qPCR from FAPs in naive, CDTX+SHAM and CDTX+SCI muscle at
55
56 day 2 and 4.
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Histograms represent mean \pm standard deviation (SD). Each dot represents independent biological samples from different mouse muscle. Statistical differences were computed using Two-way ANOVA with Šidák post hoc correction for multiple comparisons (*= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$).

Figure 4: Myogenic markers and miRNAs involved in muscle regeneration are downregulated by SCI in myogenic progenitors from injured muscle

(A) Distribution of Sca1⁻ CD31⁻ CD34^{low} α 7integrin⁺ MPs in CD45⁻ F4/80⁻ cells, in naive, CDTX+SHAM and CDTX+SCI injured muscle.

Relative (B) osteogenic markers mRNAs, (C) myogenic markers mRNAs, (D) osteo-suppressive/osteogenic miRNAs and (E) myomiRs expression levels measured by RT-qPCR from MPs in naive, CDTX+SHAM and CDTX+SCI muscle at days 2 and 4.

Histograms represent mean \pm standard deviation (SD). Each dot represents independent biological samples from different mouse muscle. Statistical differences were computed using Two-way ANOVA with Šidák post hoc correction for multiple comparisons (*= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$).

Figure 5: Conditioned medium from LPS stimulated-CD14⁺ macrophages (CM⁺) potentiates human FAPs osteogenic differentiation and increases osteo-chondrogenic markers and miRNAs expression

(A) Experimental design of human muscle progenitors isolation from NHOs surgical resection. Briefly, human muscles were collected around the ectopic ossification, after surgical removal, mechanically and enzymatically minced, cultured for 2 weeks, and adherent cells were sorted on PDGFR α ⁺ CD56⁻ for FAPs and PDGFR α ⁻ CD56⁺ for MPs from 7-AAD⁻ live single events.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

(B) Osteogenic differentiation assay of human FAPs cultured in osteogenic conditions (OB) with naive (CM⁻) or LPS stimulated conditioned medium (CM⁺) from macrophages, obtained through CD14⁺ isolation from human buffy coat, in a 1:10 ratio. Mineralization was observed using alizarin red staining and quantified at 405 nm after acid-SDS extraction. Each dot represents independent biological samples from different NHOs surgery.

(C) Alkaline phosphatase activity was assessed, 7 days after osteogenic induction with or without CM⁺ by monitoring the optical density at 405 nm after incubation with a commercial substrate at 37°C.

(D) OSX and RUNX2 protein expression levels were quantified by Western blot 7 days after osteogenic induction with or without CM⁺.

Relative RTqPCR (E) osteogenic mRNA and (F) miRNAs expression levels from FAPs control, OB, OB+CM⁺ at 1, 3, 7 and 10 days after osteogenic induction (*=p<0.05, **=p<0.01, ***=p<0.001 represent group effect compared to Ø condition ; #=p<0.05, ##=p<0.01, ###=p<0.001 represent group effect compared to OB condition).

Histograms represent mean ± standard deviation (SD). Each dot represents independent biological samples from different NHOs surgery. Statistical differences were calculated using Mann-Whitney for simple comparisons or Two-way ANOVA with Tukey post hoc correction for multiple comparisons (*=p<0,05, **=p<0,01, ***=p<0,001).

Figure 6: Synthetic miRNAs inhibitors and mimics transfections suppress both calcium mineralization and osteo-chondrogenic markers expression in human FAPs

(A) FAPs viability was assessed by quantifying DAPI intake intensity by dead or apoptotic cells in flow cytometry in five experimental groups: control, lipofectamine RNAimax vector, vector+control oligo, vector+miR-20a-5p inhibitor and vector+miR-214-3p mimic. Inhibitors

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

transfections were performed during 48h at 10 nM and mimics at 1 nM for both control oligos and specific oligos.

(B) Relative RTqPCR miRNAs expression levels in FAPs after control oligo or miR-20a-5p inhibitor and miR-214-3p mimic transfection.

(C) Osteogenic differentiation assays of transfected human FAPs cultured in osteogenic conditions (OB). Control inhibitor, miR-20a-5p inhibitor, miR-199a-5p inhibitors were used at 10 nM final and control mimic, miR-146a-5p mimic, miR-214-3p mimic at 1 nM final. Values were normalized to OB condition alone. Statistical differences were calculated using unpaired t test with Welch correction (*=p<0,05, **=p<0,01, ***=p<0,001).

(D) MTOR, SOX9 and RUNX2 protein expression levels from FAPs were quantified by Western blot 7 days after osteogenic induction of control oligo or miR-20a-5p inhibitor transfection (top panel). OSX, SOX9 and RUNX2 protein expression levels were quantified by Western blot 7 days after osteogenic induction of control oligo or miR-214-3p mimic transfected FAPs (bottom panel).

Histograms represent mean \pm standard deviation (SD). Each dot represents independent biological samples from different NHOs surgery. Unless stated otherwise, statistical differences were calculated using Mann-Whitney for simple comparisons or One-way ANOVA with Tukey post hoc correction for multiple comparisons (*=p<0.05)

Supplementary Figure 1:

(A) Transversal cryosections of PBS+SCI gastrocnemius muscle stained with Hematoxylin Phloxine Saffron (HPS) or Von Kossa (VK) counterstained with nuclear fast red at day 2, 4 and 7. (magnification 10X, scale bar = 100 μ m).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Laminin **(B)**, magnification 20X; scale bar = 100 μ m, and collagen III **(C)**, magnification 10X; scale bar = 100 μ m, immunostaining with DAPI co-staining on PBS+SHAM/PBS+SCI or CDTX+SHAM/CDTX+SCI gastrocnemius transversal cryosections 7 days after injury.

Supplementary Figure 2:

Reactome **(A)** and WikiPathways **(B)** database enrichment analysis of most up-regulated and down-regulated miRNAs

Supplementary Figure 3:

Osteogenic differentiation assays of transfected human FAPs cultured in osteogenic conditions (OB). Inhibitors transfections were performed during 48h prior to osteogenic induction at 10 nM and mimics at 1 nM for both control oligos and specific oligos.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

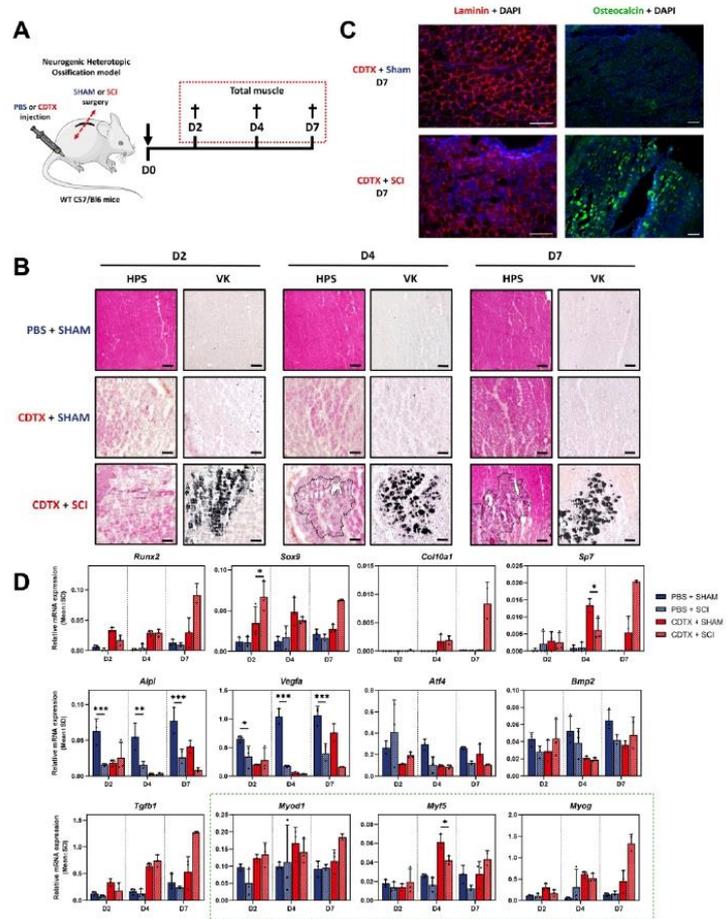


Figure 1: SCI induces mineralization and exacerbates osteo-chondrogenic markers expression in CDTX damaged muscle
 (A) NHOs mouse model combines muscle injury (CDTX) and central nervous system damage (SCI) to induce intramuscular ectopic bone formation. PBS and SHAM surgery are controls. Muscle were collected at 2, 4 and 7 days after induction from four experimental groups: PBS+SHAM, PBS+SCI, CDTX+SHAM, CDTX+SCI.
 (B) Transversal gastrocnemius cryosections of PBS+SHAM (top panel), CDTX+SHAM (middle panel) and CDTX+SCI (bottom panel) stained with Hematoxylin Phloxine Saffron (HPS) or Von Kossa (VK) counterstained with nuclear fast red at day 2, 4 and 7. Mineralization nodules (black dotted line) appear in dark purple with HPS staining or in black with VK staining (magnification 10X, scale bar = 100 μm).
 (C) Laminin (left panel, magnification 20X, scale bar = 100 μm) and osteocalcin (right panel, magnification 10X, scale bar = 100 μm) immunostaining with DAPI co-staining on CDTX+SHAM or CDTX+SCI gastrocnemius transversal cryosections 7 days after injury.
 (D) Relative mRNAs expression levels measured by RT-qPCR from whole muscle in PBS+SHAM, PBS+SCI, CDTX+SHAM, CDTX+SCI at days 2, 4 and 7. Myogenic markers are framed in green. Values are normalized

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

on 3 reference genes and histograms represent mean \pm standard deviation (SD). Each dot represents independent biological samples from different mouse muscle. Statistical differences were calculated using Two-way ANOVA with Tukey post hoc correction for multiple comparisons (*= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$).

216x283mm (300 x 300 DPI)

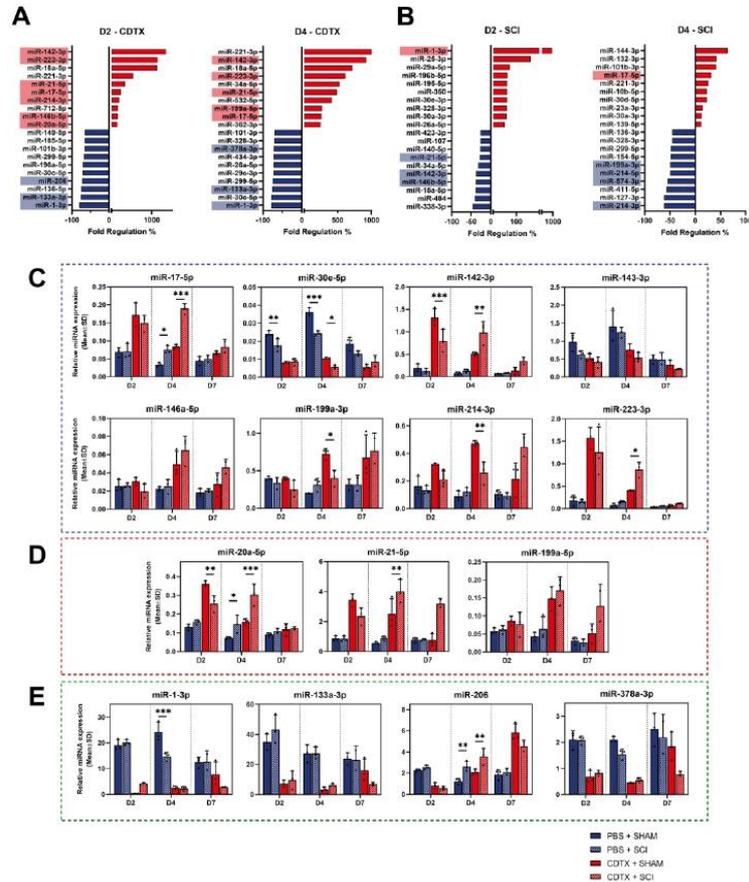


Figure 2: Muscle injury triggers osteogenic miRNAs expression while SCI impairs and delays osteo-suppressive miRNAs response after muscle damage

MiRnome analysis on whole muscle at day 2 and 4 presenting top 10 most overexpressed and underexpressed miRNAs from (A) CDTX+SHAM compared to PBS+SHAM (B) CDTX+SCI compared to CDTX+SHAM. MiRNAs involved in osteogenic, inflammatory and myogenic processes are highlighted in red (upregulated) or blue (downregulated). A threshold was established to exclude miRNAs expressed later than 32 Cp.

Relative miRNAs expression levels measured by RT-qPCR from whole muscle PBS+SHAM, PBS+SCI, CDTX+SHAM, CDTX+SCI at days 2, 4 and 7 for (C) osteo-suppressive miRNAs, (D) osteogenic miRNAs and (E) myomiRNAs.

Histograms represent mean \pm standard deviation (SD). Each dot represents independent biological samples from different mouse muscle. Statistical differences were calculated using Two-way ANOVA with Tukey post hoc correction for multiple comparisons (*= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$).

218x246mm (300 x 300 DPI)

<http://mc.manuscriptcentral.com/jpath>

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

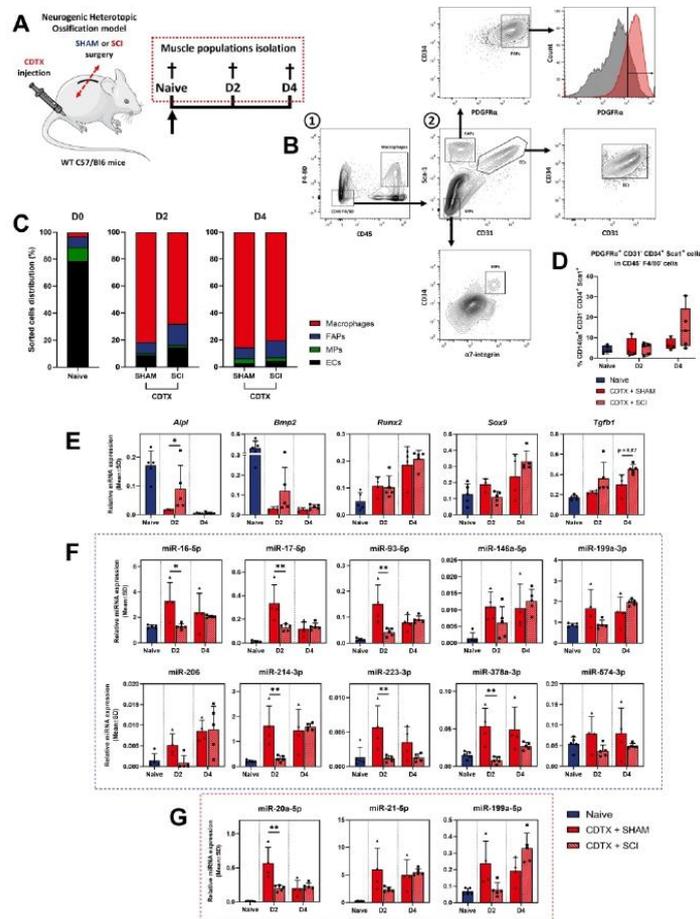


Figure 3: SCI upregulates osteogenic markers expression and impairs osteo-suppressive miRNAs expression in FAPs after muscle injury
 (A) Experimental design of NHOs mouse muscle cellular subpopulations isolation in naive muscle and at day 2 and 4 after CDTX+SHAM or CDTX+SCI.
 (B) Fibro-Adipogenic progenitors (FAPs), myogenic progenitors (MPs), macrophages and Endothelial Cells (EC) were sorted on the following strategy: macrophages were gated on CD45+ F4/80+ while non-hematopoietic lineage populations were all CD45- F4/80- as well as CD31- Sca1+ CD34+ PDGFRα+ for FAPs, Sca1- CD31- CD34low α7integrin+ for MPs and Sca1+ CD31+ CD34+ for ECs.
 (C) Muscle cell populations distribution on total sorted cells in naive muscle and CDTX+SHAM or CDTX+SCI muscle at day 2 and 4.
 (D) Distribution of CD31- Sca1+ CD34+ PDGFRα+ FAPs in CD45- F4/80- cells, in naive and CDTX+SHAM and CDTX+SCI injured muscle.
 Relative (E) mRNA, (F) osteo-suppressive miRNAs and (G) osteogenic miRNAs expression levels measured by RT-qPCR from FAPs in naive, CDTX+SHAM and CDTX+SCI muscle at day 2 and 4.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Histograms represent mean \pm standard deviation (SD). Each dot represents independent biological samples from different mouse muscle. Statistical differences were computed using Two-way ANOVA with Šidák post hoc correction for multiple comparisons (*=p<0.05, **=p<0.01, ***=p<0.001).

214x283mm (300 x 300 DPI)

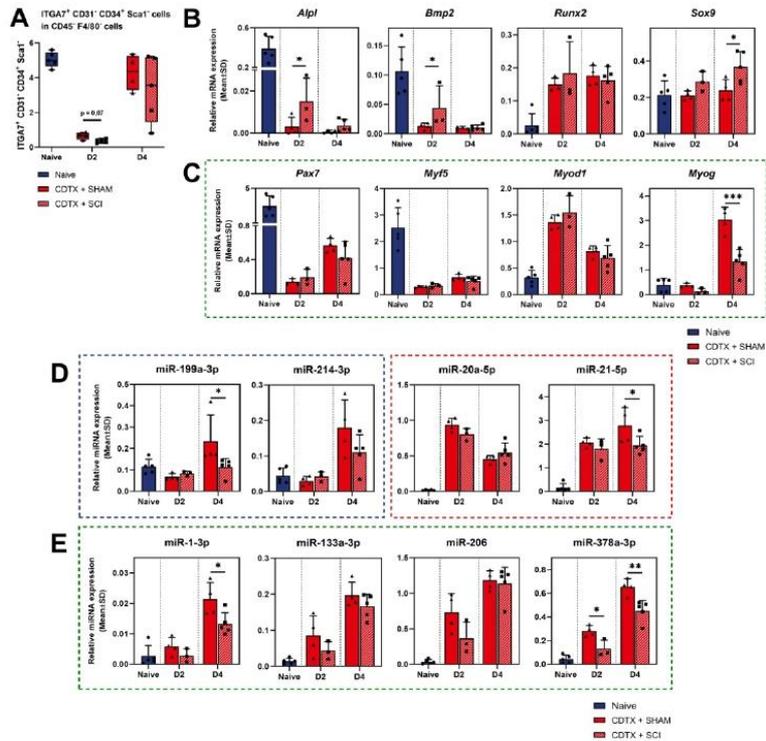


Figure 4: Myogenic markers and miRNAs involved in muscle regeneration are downregulated by SCI in myogenic progenitors from injured muscle (A) Distribution of Sca1- CD31- CD34low α 7integrin+ MPs in CD45- F4/80- cells, in naive, CDTX+SHAM and CDTX+SCI injured muscle. Relative (B) osteogenic markers mRNAs, (C) myogenic markers mRNAs, (D) osteo-suppressive/osteogenic miRNAs and (E) myomiRs expression levels measured by RT-qPCR from MPs in naive, CDTX+SHAM and CDTX+SCI muscle at days 2 and 4. Histograms represent mean \pm standard deviation (SD). Each dot represents independent biological samples from different mouse muscle. Statistical differences were computed using Two-way ANOVA with Sidak post hoc correction for multiple comparisons (*=p<0.05, **=p<0.01, ***=p<0.001).

215x207mm (300 x 300 DPI)

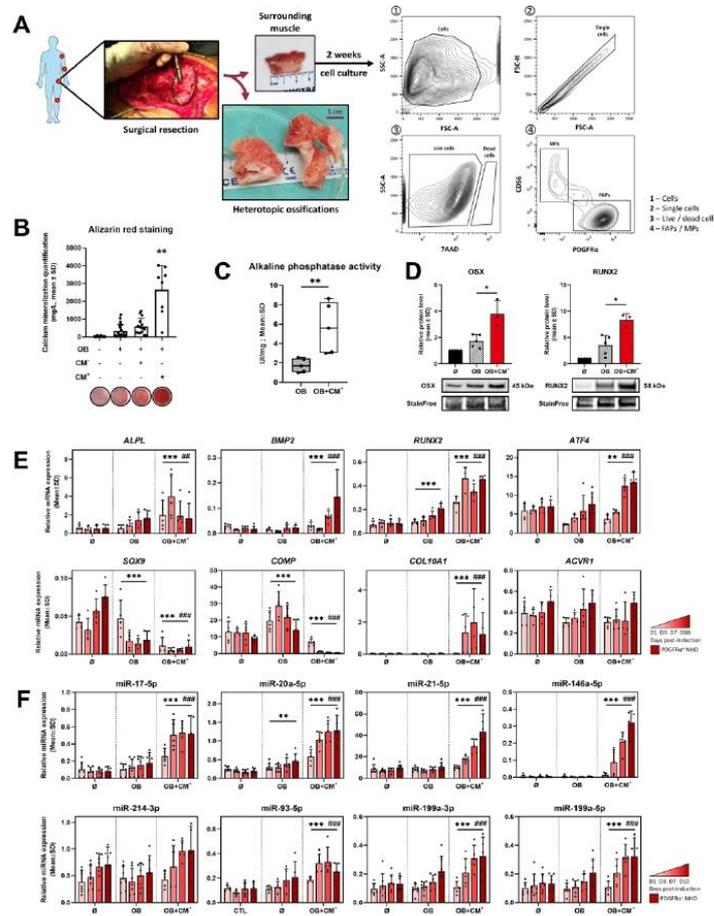


Figure 5: Conditioned medium from LPS stimulated-CD14+ macrophages (CM+) potentiates human FAPs osteogenic differentiation and increases osteo-chondrogenic markers and miRNAs expression (A) Experimental design of human muscle progenitors isolation from NHOs surgical resection. Briefly, human muscles were collected around the ectopic ossification, after surgical removal, mechanically and enzymatically minced, cultured for 2 weeks, and adherent cells were sorted on PDGFR α + CD56- for FAPs and PDGFR α - CD56+ for MPs from 7-AAD- live single events. (B) Osteogenic differentiation assay of human FAPs cultured in osteogenic conditions (OB) with naive (CM-) or LPS stimulated conditioned medium (CM+) from macrophages, obtained through CD14+ isolation from human buffy coat, in a 1:10 ratio. Mineralization was observed using alizarin red staining and quantified at 405 nm after acid-SDS extraction. Each dot represents independent biological samples from different NHOs surgery. (C) Alkaline phosphatase activity was assessed, 7 days after osteogenic induction with or without CM+ by monitoring the optical density at 405 nm after incubation with a commercial substrate at 37°C. (D) OSX and RUNX2 protein expression levels were quantified by Western blot 7 days after osteogenic

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

induction with or without CM+.
Relative RTqPCR (E) osteogenic mRNA and (F) miRNAs expression levels from FAPs control, OB, OB+CM+ at 1, 3, 7 and 10 days after osteogenic induction (*=p<0.05, **=p<0.01, ***=p<0.001 represent group effect compared to Ø condition ; #=p<0.05, ##=p<0.01, ###=p<0.001 represent group effect compared to OB condition).
Histograms represent mean ± standard deviation (SD). Each dot represents independent biological samples from different NHOs surgery. Statistical differences were calculated using Mann-Whitney for simple comparisons or Two-way ANOVA with Tukey post hoc correction for multiple comparisons (*=p<0,05, **=p<0,01, ***=p<0,001).

213x282mm (300 x 300 DPI)

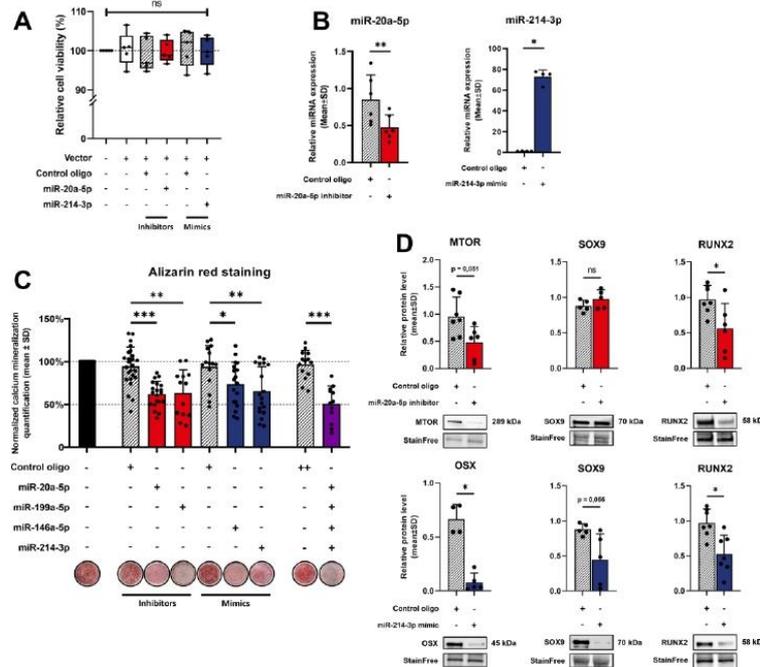


Figure 6: Synthetic miRNAs inhibitors and mimics transfections suppress both calcium mineralization and osteo-chondrogenic markers expression in human FAPs

(A) FAPs viability was assessed by quantifying DAPI intake intensity by dead or apoptotic cells in flow cytometry in five experimental groups: control, lipofectamine RNAimax vector, vector+control oligo, vector+miR-20a-5p inhibitor and vector+miR-214-3p mimic. Inhibitors transfections were performed during 48h at 10 nM and mimics at 1 nM for both control oligos and specific oligos.

(B) Relative RTqPCR miRNAs expression levels in FAPs after control oligo or miR-20a-5p inhibitor and miR-214-3p mimic transfection.

(C) Osteogenic differentiation assays of transfected human FAPs cultured in osteogenic conditions (OB). Control inhibitor, miR-20a-5p inhibitor, miR-199a-5p inhibitors were used at 10 nM final and control mimic, miR-146a-5p mimic, miR-214-3p mimic at 1 nM final. Values were normalized to OB condition alone. Statistical differences were calculated using unpaired t test with Welch correction (*= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$).

(D) MTOR, SOX9 and RUNX2 protein expression levels from FAPs were quantified by Western blot 7 days after osteogenic induction of control oligo or miR-20a-5p inhibitor transfection (top panel). OSX, SOX9 and RUNX2 protein expression levels were quantified by Western blot 7 days after osteogenic induction of control oligo or miR-214-3p mimic transfected FAPs (bottom panel).

Histograms represent mean \pm standard deviation (SD). Each dot represents independent biological samples from different NHOs surgery. Unless stated otherwise, statistical differences were calculated using Mann-Whitney for simple comparisons or One-way ANOVA with Tukey post hoc correction for multiple comparisons (*= $p < 0.05$)

222x202mm (300 x 300 DPI)

<http://mc.manuscriptcentral.com/jpath>

1.2.2 Article de revue : Les paraostéopathies neurogènes sont caractérisées par le développement d'une niche hématopoïétique intramusculaire fonctionnelle

Dans cette revue de la littérature, nous avons synthétisé le rôle et l'origine des acteurs cellulaires et moléculaires intervenant dans la genèse des POAN. Nous avons ainsi pu mettre en avant le caractère unique des POAN dans la néoformation d'une niche hématopoïétique fonctionnelle chez l'adulte.

Les interactions entre l'os et l'hématopoïèse sont impliquées dans diverses pathologies et processus physiologiques. La caractérisation des POAN a montré la présence d'une moelle hématopoïétique composée de cellules souches hématopoïétiques (CSH) en quiescence et maintenues par tous les acteurs d'un microenvironnement stromal physiologique [15]. De façon similaire à la moelle osseuse présente au sein des os longs et plats chez l'adulte, le microenvironnement créé par les POAN favorise le maintien, la prolifération et la différenciation des CSH de concert avec les CSM et les EC, via contacts focaux ou la sécrétion de facteurs de croissance, hormones et protéines de la MEC. Par ailleurs, ces processus impliquent la participation du système nerveux, des macrophages et de cytokines inflammatoires telles que l'OSM ou le TGF- β , instigatrices de la pathogenèse des POAN, soulignant ainsi l'intrication complexe entre les mécanismes neurologiques, inflammatoires et hématopoïétiques. En outre, la localisation intramusculaire des POAN suggère également un lien entre les populations de progéniteurs musculaires et les processus conduisant à la formation d'une niche hématopoïétique, tout particulièrement en absence de toute croissance chez l'adulte. Les similitudes entre les POAN et le développement osseux fœtal font de cette pathologie un nouveau modèle pour l'étude de l'établissement de l'hématopoïèse de la moelle osseuse chez l'adulte. Enfin, l'identification de facteurs spécifiques aux différents stades du développement de l'hématopoïèse au cours du développement fœtal pourrait permettre à l'avenir d'éclaircir les processus impliqués dans la pathogenèse des POAN.



Neurogenic Heterotopic Ossifications Recapitulate Hematopoietic Stem Cell Niche Development Within an Adult Osteogenic Muscle Environment

Dorothee Girard^{1*}, Frédéric Torossian², Estelle Oberlin², Kylie A. Alexander³, Jules Gueguen¹, Hsu-Wen Tseng³, François Genêt⁴, Jean-Jacques Lataillade¹, Marjorie Salga⁴, Jean-Pierre Levesque³, Marie-Caroline Le Bousse-Kerdilès² and Sébastien Banzet¹

OPEN ACCESS

Edited by:

Monzur Murshed,
McGill University, Canada

Reviewed by:

Chan Gao,
McGill University, Canada
Zohreh Khavandgar,
National Institute of Dental
and Craniofacial Research (NIDCR),
United States

*Correspondence:

Dorothee Girard
dorothee.girard@inserm.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Molecular Medicine,
a section of the journal
Frontiers in Cell and Developmental
Biology

Received: 29 September 2020

Accepted: 17 February 2021

Published: 05 March 2021

Citation:

Girard D, Torossian F, Oberlin E,
Alexander KA, Gueguen J,
Tseng H-W, Genêt F, Lataillade J-J,
Salga M, Levesque J-P,
Le Bousse-Kerdilès M-C and
Banzet S (2021) Neurogenic
Heterotopic Ossifications Recapitulate
Hematopoietic Stem Cell Niche
Development Within an Adult
Osteogenic Muscle Environment.
Front. Cell Dev. Biol. 9:611842.
doi: 10.3389/fcell.2021.611842

¹INSERM UMRS-MD 1197, Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA), Clamart, France, ²INSERM UMRS-MD 1197, Université Paris-Saclay, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France, ³Mater Research Institute—The University of Queensland, Woolloongabba, QLD, Australia, ⁴INSERM U1179, Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines (UVSQ), Versailles, France

Hematopoiesis and bone interact in various developmental and pathological processes. Neurogenic heterotopic ossifications (NHO) are the formation of ectopic hematopoietic bones in peri-articular muscles that develop following severe lesions of the central nervous system such as traumatic cerebral or spinal injuries or strokes. This review will focus on the hematopoietic facet of NHO. The characterization of NHO demonstrates the presence of hematopoietic marrow in which quiescent hematopoietic stem cells (HSC) are maintained by a functional stromal microenvironment, thus documenting that NHOs are neo-formed ectopic HSC niches. Similarly to adult bone marrow, the NHO permissive environment supports HSC maintenance, proliferation and differentiation through bidirectional signaling with mesenchymal stromal cells and endothelial cells, involving cell adhesion molecules, membrane-bound growth factors, hormones, and secreted matrix proteins. The participation of the nervous system, macrophages and inflammatory cytokines including oncostatin M and transforming growth factor (TGF)- β in this process, reveals how neural circuitry fine-tunes the inflammatory response to generate hematopoietic bones in injured muscles. The localization of NHOs in the peri-articular muscle environment also suggests a role of muscle mesenchymal cells and bone metabolism in development of hematopoiesis in adults. Little is known about the establishment of bone marrow niches and the regulation of HSC cycling during fetal development. Similarities between NHO and development of fetal bones make NHOs an interesting model to study the establishment of bone marrow hematopoiesis during development. Conversely, identification of stage-specific factors that specify HSC developmental state during fetal bone development will give more mechanistic insights into NHO.

Keywords: neurogenic heterotopic ossifications, ectopic hematopoietic niche, muscle environment, inflammation, macrophages

INTRODUCTION

Heterotopic ossification (HO) is an abnormal development of bone tissue within soft tissue. HO can be hereditary such as Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP) or acquired following traumatic injuries and burns (Meyers et al., 2019). Among acquired HO, neurogenic heterotopic ossifications (NHO) are pathological formations of ectopic bones in peri-articular muscles following severe central nervous system (CNS) lesions such as traumatic brain injuries (TBI), stroke, cerebral anoxia or spinal cord injuries (SCI) (Genêt et al., 2011). NHOs develop near or around the hip, knee, elbow, and shoulder causing decreased range of motion which can extend to complete joint ankylosis, severe pain, nerve and vessel compression as it grows (Brady et al., 2018; **Figure 1A**). Large NHOs hamper functional recovery after CNS lesion and interfere with the rehabilitation program delaying potential neurological recovery (van Kampen et al., 2011). NHO incidence ranges from 10 to 23% in TBI patients, 10–53% in SCI patients (Garland, 1988; Brady et al., 2018) and up to 65% following blast injuries (Potter et al., 2007; Forsberg et al., 2009). The only curative option is surgical excision, but surgery remains challenging, especially when NHO entraps the affected joint, as well as proximal vessels and nerves.

Despite identifying NHOs in World War I injured soldiers (Dejerine and Ceillier, 1918), their pathogenesis is still poorly understood. Since most of the previous studies in SCI/TBI patients were retrospective, only a clinically relevant animal model could provide insights into the early events of NHO pathogenesis. Until recently there was no animal model that included the CNS lesions (Brady et al., 2018). Most models of heterotopic ossification (HO) were based on the activation of bone morphogenetic proteins (BMPs) pathway or a constitutively active ACVR1 receptor mutations as found in FOP, an extremely rare genetic disease caused by activating point mutations of the *ACVR1* gene encoding a type I BMP receptor (Kan et al., 2004; Shore et al., 2006; Chakkalakal et al., 2012). The relevance of these models to NHO is questionable because NHOs develop in a broad range of ethnicities in subjects otherwise genetically normal. To fill this knowledge gap, we established the first mouse model of NHO (Genêt et al., 2015). As NHO prevalence is high in multi-traumatic combat casualties (Forsberg et al., 2009; Citak et al., 2012), our model combines a SCI with muscle damage induced by an intramuscular injection of cardiotoxin. NHO only develops in the injured muscle when SCI is associated to the muscle injury, suggesting that it requires a dual insult (Alexander et al., 2020).

In NHO located near the hip, one of the most striking features is the presence of richly vascularized mature trabecular bones which contain medullary cavities filled with hematopoietic cells (HCs) (Davis et al., 2013; Torossian et al., 2017; **Figure 1B**). The pathological formation of an ectopic bone containing a hematopoietic bone marrow tissue in the adult is of foremost interest and the underlying mechanisms are yet to be fully elucidated. This review focuses on how animal models and studies performed with patient-derived cells can help further understand two key events of the establishment of ectopic hematopoiesis in NHO: the occurrence of a heterotopic

ossification within skeletal muscle tissue, and the development of a functional hematopoiesis tissue within this heterotopic bone.

FIBRO-ADIPOGENIC PROGENITORS AND ALTERED MUSCLE ENVIRONMENT, TWO MAJOR PLAYERS IN THE PATHOGENESIS OF NHO

It is currently admitted that NHOs are the result of an endochondral ossification process although intramembranous ossification has also been suggested (Cipriano et al., 2009; Cholok et al., 2018). Foley et al. have highlighted the presence of chondrocytes and a cartilaginous matrix on NHO biopsies and pinpointed different stages of NHO development including lymphocytic infiltration, fibro-proliferation, neovascularization, cartilage formation, and endochondral bone formation (Foley et al., 2018). A similar thick cartilaginous matrix displaying chondrocytes adjacent to cancellous bone and marrow is described in NHO 3–4 months after initial injury and becomes thinner at a later stage of NHO development named the “maturation” stage (Wang et al., 2018). Our group and others have evidenced the presence of hematopoietic sites associated with chondrocytes, osteoblasts/osteocytes, and adipocytes in mature trabecular bone in human NHO biopsies (Davis et al., 2013; Torossian et al., 2017; **Figures 1C,D**). Thus, the progressive formation of a cartilage intermediate maturing into a mineralized bone matrix associated with a vascularization network offers a suitable environment for the recruitment and homing of circulating HCs (**Figure 1E**; Chan et al., 2009; Kollet et al., 2012).

Muscle Fibro-Adipogenic Progenitors: The Cells-of-Origin of NHO?

The development of heterotopic bones in muscles after severe CNS trauma raises interesting stem cell biology questions particularly regarding the cells-of-origin of NHO. Adult skeletal muscles contain two major types of progenitor cells participating in muscle regeneration. Myogenic satellite cells (SCs) are CD56 expressing stem cells located between the basal lamina and myofiber plasma membrane. To regenerate damaged myofibers, activated SCs proliferate, differentiate into myoblasts and fuse to form multinucleated myofibers with the support of macrophages, endothelial cells (ECs), fibroblasts and pericytes (see reviews: Collins et al., 2005; Bentzinger et al., 2013). On the other hand, fibro-adipogenic progenitors (FAPs) are interstitial mesenchymal stromal cells (MSCs) expressing platelet-derived growth factor receptor α (PDGFR α). FAPs provide growth factors and extracellular matrix to support SC proliferation and myogenic differentiation (see review: Joe et al., 2010; Wosczyzna and Rando, 2018).

The cellular origin of NHO is still under investigation but numerous arguments incriminate FAPs rather than SCs. Both human SCs and FAPs show a capacity of osteoblastic differentiation *in vitro*, however, only PDGFR α ⁺ FAPs maintained their osteogenic capacity in an *in vivo* ectopic bone model in immune-deficient mice (Oishi et al., 2013). In

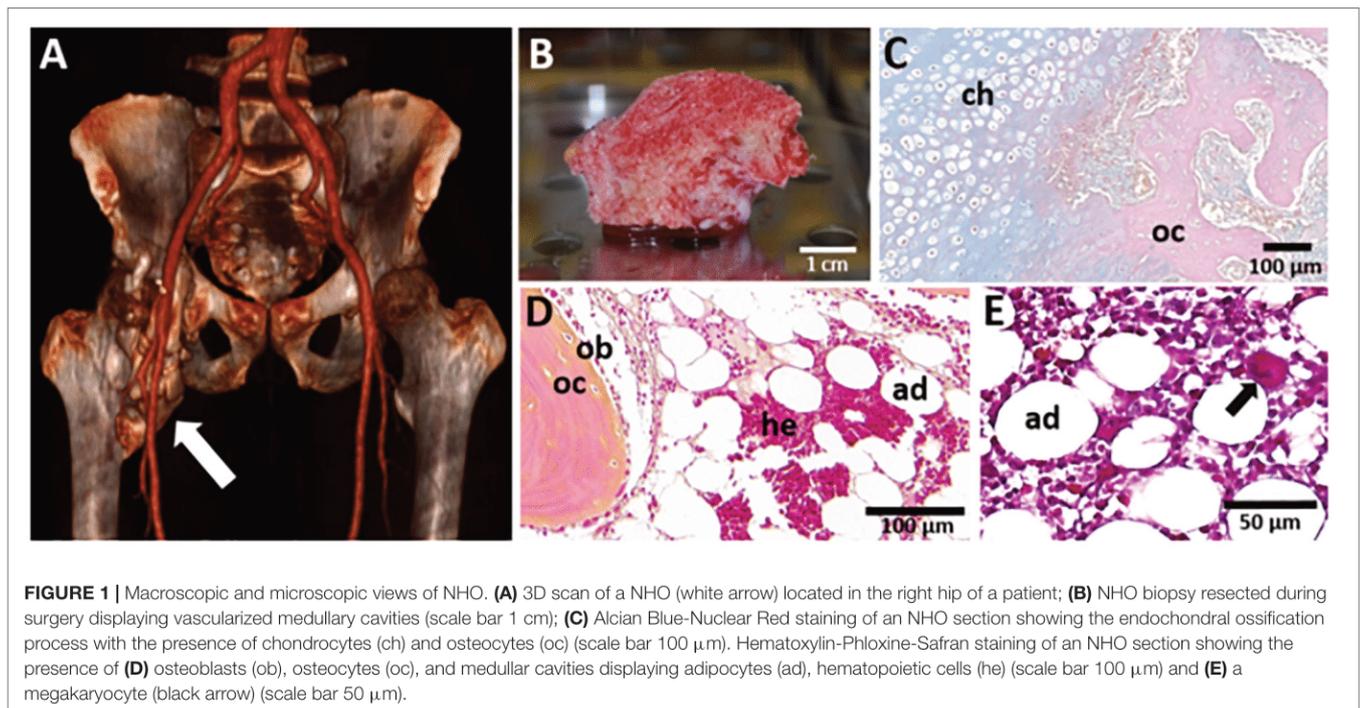


FIGURE 1 | Macroscopic and microscopic views of NHO. **(A)** 3D scan of a NHO (white arrow) located in the right hip of a patient; **(B)** NHO biopsy resected during surgery displaying vascularized medullary cavities (scale bar 1 cm); **(C)** Alcian Blue-Nuclear Red staining of an NHO section showing the endochondral ossification process with the presence of chondrocytes (ch) and osteocytes (oc) (scale bar 100 μ m). Hematoxylin-Phloxine-Safran staining of an NHO section showing the presence of **(D)** osteoblasts (ob), osteocytes (oc), and medullary cavities displaying adipocytes (ad), hematopoietic cells (he) (scale bar 100 μ m) and **(E)** a megakaryocyte (black arrow) (scale bar 50 μ m).

a burn injury/tenotomy mouse model, parabiosis experiments highlighted the involvement of circulating PDGFR α ⁺ FAPs in the development of burn-induced HO in tendons (Loder et al., 2018). Another study combining parabiosis and a BMP-2-induced HO mouse model reported an abnormal accumulation PDGFR α ⁺ FAPs associated with an *in vivo* osteogenic potential, although no circulating FAPs were detected (Eisner et al., 2020). In lineage-tracing experiments in which either SCs (via the endogenous *Pax7* gene promoter) or FAPs (via a *Prrx1* gene enhancer transgene) are specifically labeled, we find that following SCI, NHO are derived from *Prrx1* expressing FAPs, not from *Pax7* expressing SCs (Tseng et al., 2019).

The involvement of pericytes in HO remains debated (Matthews et al., 2016; Dey et al., 2017). Interestingly, a pericyte population expressing *Glast* was identified in a BMP-4-induced HO model with a subset co-expressing PDGFR α (Kan et al., 2013). Scleraxis (*Scx*)⁺ PDGFR α ⁺ tenocytes are also involved in HO development in tendons using burn/tenotomy and BMP-induced mouse models and represent another interesting lead (Agarwal et al., 2017; Giordani et al., 2019). However, this model of burn-induced calcifying tendinopathy may be different from intramuscular NHO.

Hypoxia and Inflammation as Drivers of NHO Development in Skeletal Muscles?

The molecular microenvironment of the muscle can dramatically affect the behavior and fate of SCs and FAPs (Malecova et al., 2018). A hypoxic microenvironment, mainly linked to inflammation and vascular damage, is an initiator and driver of ossification in acquired HO and FOP mouse models through the activation of Hypoxia Inducible Factor-1 α (Agarwal et al., 2016;

Wang et al., 2016). The local or systemic production of inflammatory mediators that stimulate the recruitment of MSCs, endothelial progenitors or other stem cells from the bone marrow and alter tissue repair have been proposed to provide a microenvironment/matrix supporting mineralization (Wang et al., 2004; Davis et al., 2013). Signaling molecules including BMPs and TGF- β could contribute in this altered microenvironment (Dey et al., 2017; Wang et al., 2018). Mononucleated phagocytes recruited in the injured muscle play a key role, as treatment with clodronate loaded liposomes, which deplete phagocytes *in vivo*, abolished NHO onset (Genêt et al., 2015). In contrast, polymorphonuclear (neutrophils) and polynucleated (osteoclasts) phagocytes are not necessary for NHO development (Genêt et al., 2015; Tseng et al., 2020). SCI exacerbates macrophage infiltration into injured muscles with increased and persistent expression of oncostatin M (OSM) (Torossian et al., 2017), a cytokine participating in both inflammation and hematopoiesis (Tanaka and Miyajima, 2003; Stawski and Trojanowska, 2019). The persistent OSM expression in injured muscles was associated with a constant activation of JAK1/2-STAT3 signaling pathway in muscles developing NHO (Alexander et al., 2019). Conversely, NHO development was attenuated in OSM receptor deficient mice (Torossian et al., 2017) or after inhibition of JAK1/2-STAT3 signaling with the small JAK1/2 tyrosine kinase inhibitor ruxolitinib (Alexander et al., 2019). Likewise, over secretion of TGF- β 1 by myeloid cells via CD47 in response to extended body burns has been shown to promote burn-induced HO development (Wang et al., 2018). The increased prevalence of NHO in SCI/TBI patients with infections or concomitant inflammation (Hendricks et al., 2007; Citak et al., 2012; Reznik et al., 2014) as well as the occurrence of peri-articular HO in mechanically ventilated and immobilized

severe cases of COVID-19 further support the crucial role of inflammation in this process (Meyer et al., 2020; de l'Escalopier et al., 2021; Stoirra et al., 2021).

Overall, these data provide a mechanistic link between persistent inflammation driving FAPs into an osteogenic fate and NHO development. Interestingly, histological sections of these ectopic bones reveal the presence of hematopoietic cells suggesting causality between abnormal FAP activation, inflammation and hematopoiesis within an osteogenic muscle microenvironment (Figure 2).

CNS Lesion and NHO Development

Both peripheral (denervation) and central (SCI) neurologic lesions have an effect on FAPs, inducing STAT3 activation, high IL-6 secretory activity and abnormal proliferation (Madaro et al., 2018). Furthermore, CNS lesions deregulate the neuro-endocrine system causing the abnormal systemic release of a number of mediators that may trigger NHO development such as substance P (SP) or TGF- β (Genêt et al., 2015). High CNS lesions can also cause autonomic dysreflexia (AD), a life-threatening complication caused by the loss of the central control of the post-ganglionic sympathetic flow below the SCI. In retrospective studies, AD has been associated with higher prevalence of NHO in SCI and TBI patients (Hendricks et al., 2007; van Kampen et al., 2011; Putz et al., 2014). AD causes a major physiological challenge with high norepinephrine release, extreme hypertension combined with bradycardia. Whether any of the systemic drivers of AD lead to NHO development remain unexplored (Alexander et al., 2020). Severe CNS trauma also profoundly changes muscle spasticity and physical environment. The resulting mechanical stress and downstream mechano-transduction signals could facilitate NHO development because of their known effect on MSC osteogenic fate (Frith et al., 2018; Sun et al., 2018). Evidence of an abnormal activation of mechano-transductive effectors Rho/ROCK and YAP1 has recently been reported in a FOP model (Stanley et al., 2019). More interestingly, Daud et al. (1993) have shown that delayed start of passive movements to paralyzed limbs in SCI patients correlates with increased NHO occurrence.

NHO, A FAVORABLE ENVIRONMENT FOR THE DEVELOPMENT OF HEMATOPOIETIC STEM CELL NICHES IN ADULTS

The presence of ectopic hematopoietic bones developing in muscles following CNS injuries is puzzling for the hematologist since, in adults, hematopoiesis is physiologically restricted to the BM of skeletal bones.

During fetal development, blood formation occurs in discrete anatomical extraembryonic and intraembryonic niches, generating different hematopoietic cell (HC) types (Dzierzak and Speck, 2008; Waas and Maillard, 2017). First HCs emerge in the yolk sac (YS) and generate primitive erythroblasts,

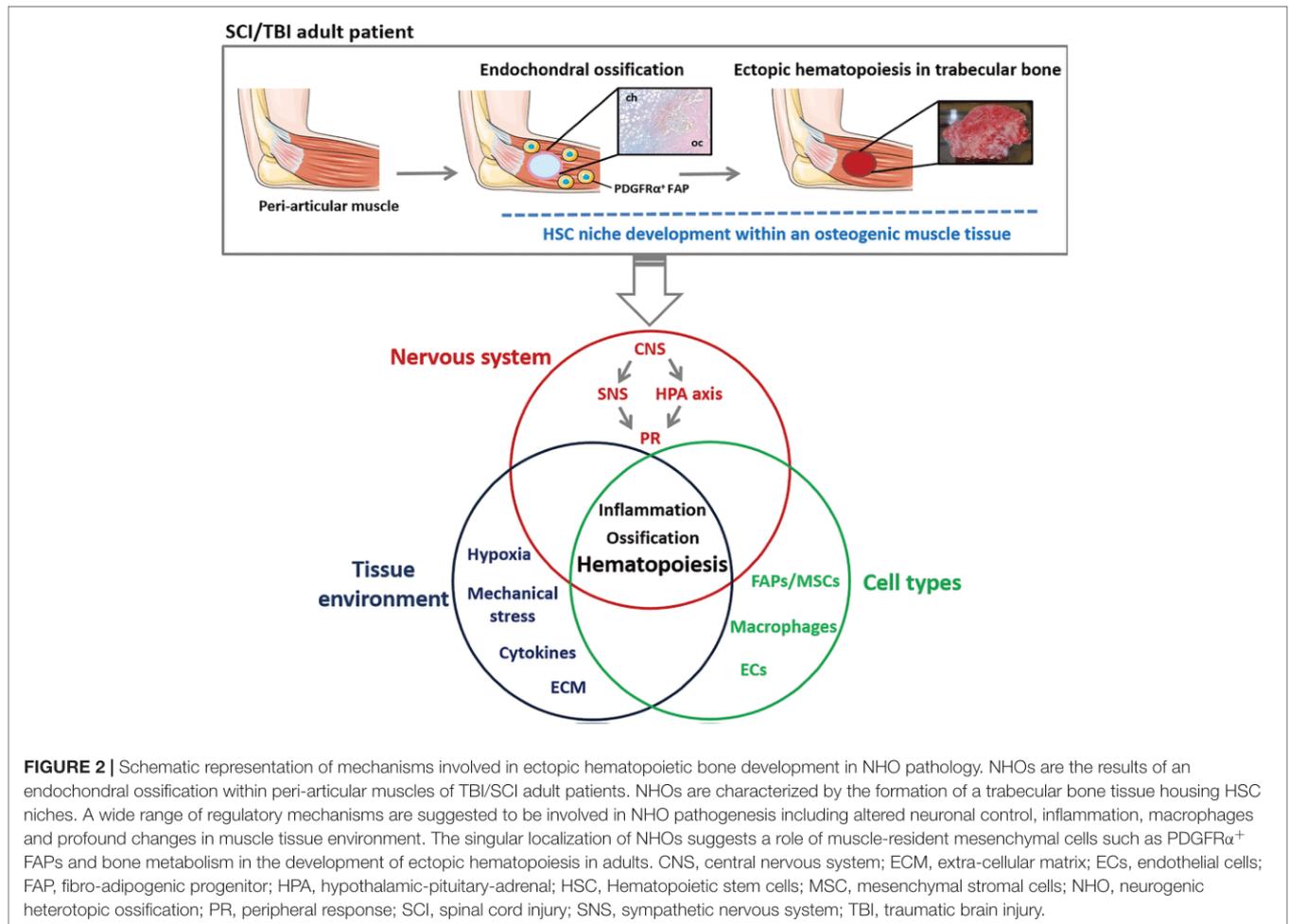
macrophages and megakaryocytes. A second wave of erythromyeloid progenitors also derived from the YS gives rise to definitive erythroid, megakaryocyte, myeloid, and multipotent progenitors initiating fetal liver (FL) hematopoiesis (Luckett, 1978; Silver and Palis, 1997). *Bona fide* definitive HSCs emerge by budding from specialized ECs, known as hemogenic endothelium, in the dorsal aorta, vitelline and umbilical arteries (Oberlin et al., 2002, 2010; Boisset et al., 2010). These definitive HSCs then migrate to the FL where they undergo significant proliferation (Rybtsov et al., 2016; Zhang et al., 2019) and finally reach the fetal bones and especially the BM, their life-long residence, where they become predominantly quiescent in adults (Bowie et al., 2007; Copley and Eaves, 2013). In adults, BM HSCs act as a reserve for the blood system, remaining dormant for months or years, and yet can rapidly proliferate when needed following inflammatory or cytotoxic/radiotoxic challenges (Wilson et al., 2008; Batsivari et al., 2020). Apart from some pathological situations, the BM will remain the only hematopoietic tissue in healthy adults.

HSC Niches and Their Main Players Along Development and in Adult BM

Schofield first used the term "niche" to describe a putative HSC-specific environment in the BM that "preserved the reconstituting ability of stem cells" (Schofield, 1978). Successive specialized niches were identified during development, from the emergence of functional HSCs in the dorsal aorta, amplification in the FL and homeostasis in the adult BM (Gao et al., 2018; Daniel et al., 2020). The formation of the BM niche during fetal development has not been fully investigated, and the impact of specific niche components on fetal BM HSC phenotype, proliferation and function has still to be deciphered. In the adult, the precise nature of BM HSC niches has long been debated (Morrison and Scadden, 2014). The presence of two anatomically different niches was initially suggested: the central and the endosteal niches. Such a distinction is more and more challenged since HSCs tend to be more frequent in perivascular areas of the BM, in close proximity to ECs and perivascular stromal cells (Kokkaliaris et al., 2020) that are particularly numerous in the endosteal region (Nombela-Arrieta et al., 2013).

Within these niches, HSCs are maintained quiescent by a complex molecular interplay between cells from mesenchymal origin, ECs, neuronal cells and HSC progenies, such as megakaryocytes and macrophages. Diffusible factors including inflammatory cytokines and extra-cellular matrix components perfect this molecular network, subtly controlling the fate of HSCs (Méndez-Ferrer et al., 2020).

Apart from stromal cells, macrophages are essential to HSC regulation within niches. They are the most abundant HCs in the dorsal aorta when the number of intra-aortic hematopoietic cluster peaks, and are suggested to promote definitive HSC formation from the dorsal aorta hemogenic endothelium through pro-inflammatory signaling cascades (Yokomizo and Dzierzak, 2010). Among these pro-inflammatory signals (Luis et al., 2016; Hayashi et al., 2019), tumor necrosis factor (TNF) (Espín-Palazón et al., 2014), interferons (IFN) (Sawamiphak et al., 2014), IL-1 (Orelia et al., 2009), and OSM



(Miyajima et al., 2000) play a major role in the regulation of embryonic and fetal hematopoiesis. Macrophages are also initiators of the endothelial-to-hematopoietic transition since hemogenic ECs that receive these cues, undergo endothelial-hematopoietic transition and form HSCs (Mariani et al., 2019). In adult hematopoiesis, macrophages exert several other functions in the BM niches. They participate in the retention of HSCs through their interactions with MSCs and possibly ECs and the modulation of the expression of proteins such as CXCL12 (Winkler et al., 2010), VCAM-1 and KIT ligand. Furthermore, supraphysiological expansion of the monocyte/macrophage compartment by prolonged administration of a stable recombinant form of macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) expand the HSC compartment in the BM (Kaur et al., 2021). Reciprocally, BM-resident macrophages are necessary to reconstitute HSC niches after lethal irradiation and support HSC engraftment (Kaur et al., 2017, 2018). The stromal expression of CXCL12 follows a circadian regulation that is under the control of sympathetic nerve fibers, connecting macrophages and the nervous system in the regulation of HSC trafficking (Katayama et al., 2006; Méndez-Ferrer et al., 2020). In the context of infections or inflammatory stresses, macrophages and ECs produce G-CSF that participates in the mobilization of HSCs from the BM into the circulation while

promoting myelopoiesis. G-CSF also contributes in suppressing osteoblast function by directly down-regulating CXCL12 expression in the endosteal niche or by indirect mechanisms including signals from the sympathetic nervous system (SNS) (Winkler et al., 2010; Christopher et al., 2011) (for review: Mitroulis et al., 2020).

Neuronal and Neuroendocrine Regulation of Bone and HSC Niche

In the context of NHO, it is noteworthy to integrate the role of the nervous system as an important regulator of bone remodeling and hematopoiesis homeostasis. Since the discovery of skeleton innervation by Calvo (1968), other groups including that of Paul Frenette have further explored from this pioneering observation and described the neuronal regulation of bone and BM (see for review: Maryanovich et al., 2018). In addition to a mineral constituent regulation, bone homeostasis is controlled by long-range signals such as leptin, glucocorticoids and parathyroid hormone produced by the adipose tissue, the adrenal glands, and the parathyroid glands, respectively, and by signals originating from the nervous system.

Besides its role in energy homeostasis, leptin plays a major role in neuroendocrine regulation and bone metabolism. The

expression of leptin receptor on adult MSCs, osteoblasts and chondrocytes, suggests direct effects on bone growth and metabolism. Leptin can also indirectly modulate bone formation through effectors downstream of the hypothalamus such as estrogen, cortisol, IGF-1 and parathyroid hormone, and through activation of local adrenergic signaling at the osteoblast level via $\beta 2$ adrenergic receptors (AR) (Upadhyay et al., 2015; Wang et al., 2020 for review). Leptin also inhibits the neuronal activity of serotonergic neurons and decrease brain-derived serotonin synthesis (see for review: Maryanovich et al., 2018; Karsenty, 2020). Sensory and sympathetic nerves also participate in bone homeostasis through neurotransmitters including nerve growth factor (NGF), calcitonin gene-related peptide (CGRP), SP, and semaphorin 3A and through norepinephrine/noradrenaline released by the SNS (Wang et al., 2020).

As reported above, HSCs are mainly located in perivascular areas of the adult BM, comprising both sinusoidal and arteriolar blood vessels. The arteriolar structures are highly innervated by SNS fibers. The neuroreticular complex formed by SNS nerves and perivascular MSCs has been reported to be a central regulator of HSC quiescence within BM niches (see for review: Maryanovich et al., 2018). Interestingly, a variable proportion of these perivascular stromal cells expressed neural-related markers such as LepR, NG2, and Nestin.

The close relationship between CNS, SNS, Parasympathetic Nervous System, bone metabolism and HSC migration, differentiation and self-renewal is illustrated by the important role of the circadian norepinephrine release by SNS nerves which triggers $\beta 3$ AR and $\beta 2$ AR expressed by BM mesenchymal cells and osteoblasts in both humans and mice (Golan et al., 2018, 2019). Cholinergic signaling in the BM via neurons from both the PNS and SNS in tandem with adrenergic signaling derived from the SNS is also reported to contribute to regulate the circadian regulation of CXCL12 expression in the BM (García-García et al., 2019; García-García and Méndez-Ferrer, 2020). Likewise, the CNS exerts long range regulation of HSCs. For instance, muscarinic type 1 acetylcholinergic receptors in the brain regulate HSC mobilizing response by stimulating the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and glucocorticoid secretion (Pierce et al., 2017). Similarly, afferent sensory nociceptive nerves in the BM have been found to regulate HSC expansion, differentiation and mobilization in concert with SNS nerves via CGRP release (Gao et al., 2020).

Beside its role in adult stem cell niche homeostasis, the neural system is also an early regulator of the embryonic niches when stem cells are specified. Apart from a direct innervation of the HSC niche, recent findings show different modes of neural control, including systemic delivery of CNS-derived hormones, locally by neural crest-derived MSCs, and intrinsically by HCs expressing neural receptors and neurotransmitters (Fitch et al., 2012; Damm and Clements, 2017). During development, hypoxia-induced neuronal synthesis of serotonin is a key process for embryonic HSC production in the aorta region. Neuronal serotonin activates the HPA axis and glucocorticoid receptor activity, which in turn, induces HSC production (Kwan et al., 2016). Although hypoxia was the only stress-inducing stimulus tested, it is conceivable that other common stresses that the embryo experiences such as temperature, metabolic, or oxidative

stress would also promote blood cell formation through the HPA axis. Such mechanisms were also described in adults, where muscarinic acetylcholine receptors in the brain regulate HPA axis and glucocorticoid release by the adrenal glands that impact HSC trafficking (Pierce et al., 2017).

NHO: An Osteogenic Muscle Tissue That Houses HSC Niches!

Addressing whether HOs form bona fide HSC niches is challenging since these ectopic bone tissues develop in inflamed muscles following severe neurological lesions. Few groups have reported the presence of marrow-like tissue in HOs. Histological descriptions are reported after abdominal surgery (Wang et al., 2004; Christofi et al., 2008), aortic valve graft (Lis et al., 2009; Singh and Fleshman, 2011) or cervical spine meniscoid (Farrell et al., 2017). Furthermore, clonogenic hematopoietic progenitors associated with histologically-defined stromal cells have been described in HOs from severe combat-injured orthopedic patients (Davis et al., 2013). However, the evidence for functional HSC niches comes from studies in SCI and TBI patients (Torossian et al., 2017). These studies identified phenotypic $CD34^+$ hematopoietic stem/progenitor cells in NHO marrows. Depending on patients, their level was equivalent or slightly lower than in the healthy BM. Some of those $CD34^+$ cells were quiescent, expressed a side-population phenotype (Goodell, 2005) and were capable of long-term human hematopoietic reconstitution when transplanted into immunodeficient mice, thus meeting the functional definition of HSCs. NHO marrow also contained functional $CD45^-CD34^-CD73^+CD90^+CD105^+$ MSCs able to differentiate in osteoblasts, adipocytes and chondrocytes and to support long-term human hematopoiesis in culture. More importantly, when seeded on hydroxyapatite scaffolds and implanted into nude mice, NHO-derived MSCs created a supportive osteogenic microenvironment for murine hematopoiesis (Torossian et al., 2017). In agreement with these results, their transcriptomic signature showed a molecular network required for HSC support. Intriguingly, this signature was associated with a neuronal imprinting, arguing in favor of the brain-bone-blood triad concept proposed by Lapidot (Lapidot and Kollet, 2010). ECs and their progenitors could also be isolated from NHO marrow according to their $CD45^-CD31^+CD144^+CD34^+$ phenotype. They were functional as demonstrated by colony formation on plastic, expansion in culture as a cobblestone monolayer, vascular network development in matrigel and overexpression of VCAM-1 and ICAM-1 after $TNF\alpha$ stimulation (Torossian et al., 2017).

By demonstrating that NHOs contain a marrow tissue in which HSCs can proliferate and differentiate within a suitable and functional osteogenic/mesenchymal and vascular microenvironment, these studies acknowledge that NHO ectopic bones house HSC niches. It is noteworthy that, in NHO patients, the altered neuronal control most likely contributes to the generation of hematopoietic bones comparable to the BM, in muscles. More importantly, the NHO paradigm emphasizes the role of muscle microenvironment and inflammation in their development (Figure 2).

Intriguingly, while the role of central, sympathetic and parasympathetic nervous systems in regulating hematopoiesis in the BM of skeletal bones is well described, it is not known whether the hematopoietic BM of NHOs is actually innervated, and if so, what roles these nerves would play in establishing, maintaining and regulating hematopoiesis in the NHO marrow.

Lessons From NHO for a Better Understanding of HSC Development

Independent studies of vertebrate hematopoietic development (Waas and Maillard, 2017; Dzierzak and Bigas, 2018) and NHO pathogenesis (Davis et al., 2013; Torossian et al., 2017) reveal that embryonic and adult NHO HSCs share similarities. Both develop in soft tissues within niches under the control of regulatory mechanisms including macrophages, inflammation, and the nervous system. However, significant changes in the composition of the HSC pool, as well as in their cell cycling properties and repopulating abilities are observed between the fetal hematopoietic tissues and the adult BM (Copley and Eaves, 2013; Mirshekar-Syahkal et al., 2014).

In *Osterix*-null (*Osx*^{-/-}) mice that lack osteoblasts and osteolineage cells, the vasculature within the nascent bones and bone marrow can sustain multilineage proliferative progenitors but not long-term HSCs. As a result, wild-type HSC transplanted in *Osx* embryos engraft the liver but not the nascent BM. Therefore, interactions with osteoblasts within fetal bone regulate HSC quiescence and homing ability (Coşkun et al., 2014). In the adult BM, the role of osteolineage cells is more questionable since the deletion of *Cxcl12* or *Kitl* gene from *Osx*⁺ osteoprogenitors has more effect on hematopoietic progenitors than on proper HSCs (Ding and Morrison, 2013). In contrast, both genes need to be expressed in ECs and in immature *Lep^r*⁺ MSCs (that form osteoprogenitors) for HSCs to be maintained (Greenbaum et al., 2013). These results emphasize the importance of osteolineage cells, and most likely other cells from mesenchymal origin, in establishing and sustaining HSC phenotype, cell cycling balance and function during development and adult life.

Understanding the development of hematopoiesis in an adult osteogenic muscle environment as observed in NHO could help gain further insights on the role of bone forming cells in this process. Identification of stage-specific factors that orientate HSC developmental state during fetal bone development must be harnessed to gain more mechanistic insights into NHO development. Similarly, understanding the cellular origin of NHO, the role of inflammation and muscle environment might contribute to a better understanding of the impact of specific niche components on fetal BM HSC properties.

CONCLUSION

In the recent few years, knowledge about NHO pathogenesis has been considerably improved as accredited by the rapidly increasing number of publications in the field. These progresses were mainly due to the development of more suitable animal models and to the availability of patient samples thanks to well organized cohorts. The current review focusing on

the hematopoietic features of NHO ossifications, attempts to recapitulate how a favorable environment for the development of bone with HSC niches can develop in adult muscles following central neurological lesions. It emphasizes the role of a persistent inflamed muscle environment driving FAPs to an osteogenic fate initiating the development of ossification followed by the establishment of a mature hematopoietic bone tissue.

However, there are still numerous questions in respect to the molecular mechanisms underlying this complex and multifactorial pathological process. Among those, the potential differences between normal endochondral ossification and neurogenic HO in terms of signaling events, cell type involvement and environment remains unanswered. Likewise, how an inflamed adult muscle environment becomes pro-osteogenic and thereafter hematopoietic, and what is the influence of altered nervous and neuroendocrine systems as well as hypoxia in this process? Does the neoformation of hematopoietic bones in muscles mimic what happens during development and can we learn from NHO for a better identification of stage-specific factors that specify HSC developmental state during fetal bone development? Is the impaired mobility of patients a trigger in the development of NHO and does an early and adequate mobilization of patients can avoid or at least reduce its evolution?

Gathering surgeons, clinicians, specialists in physical medicine/rehabilitation and researchers within a European/International consortium would be a provocative initiative for developing translational collaborative projects to better understand NHO pathogenesis and, armed with this knowledge, enable the identification of new targets to treat and if possible prevent NHO development. Moreover, such knowledge may also provide new insights for cell therapy needs and for improving treatment of blood and bone disorders.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

DG, FT, EO, KA, JG, H-WT, MS, J-PL, M-CL, and SB wrote the manuscript. DG, EO, M-CL, and SB prepared the figures. All authors revised the manuscript and approved the submitted version.

FUNDING

This research was funded by project grant N° 2014 94 0902 and BIOMEDEF SAN-1-0225 from the French defense procurement agency (DGA). KA and H-WT are funded by Ideas Grant 1181053 and J-PL Research Fellowship 1136130 from the National Health and Medical Research Council of Australia.

ACKNOWLEDGMENTS

We greatly thank Raphaël Amar, MD and Tristan Thiry, MD (AP-HP, Raymond-Poincaré Hospital, Garches) for providing the 3D scan photo. We also acknowledge the technical assistance of the “HistIM Facility” (Cochin Institute, Paris).

REFERENCES

- Agarwal, S., Loder, S. J., Cholok, D., Peterson, J., Li, J., Breuler, C., et al. (2017). Scleraxis-lineage cells contribute to ectopic bone formation in muscle and tendon. *Stem Cells Dayt. Ohio* 35, 705–710. doi: 10.1002/stem.2515
- Agarwal, S., Loder, S., Brownley, C., Cholok, D., Mangiavini, L., Li, J., et al. (2016). Inhibition of Hif1 α prevents both trauma-induced and genetic heterotopic ossification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E338–E347. doi: 10.1073/pnas.1515397113
- Alexander, K. A., Tseng, H.-W., Fleming, W., Jose, B., Salga, M., Kulina, I., et al. (2019). Inhibition of JAK1/2 tyrosine kinases reduces neurogenic heterotopic ossification after spinal cord injury. *Front. Immunol.* 10:377. doi: 10.3389/fimmu.2019.00377
- Alexander, K. A., Tseng, H.-W., Salga, M., Genêt, F., and Levesque, J.-P. (2020). When the nervous system turns skeletal muscles into bones: how to solve the conundrum of neurogenic heterotopic ossification. *Curr. Osteoporos. Rep.* 18, 666–676. doi: 10.1007/s11914-020-00636-w
- Batsivari, A., Haltalli, M. L. R., Passaro, D., Pospori, C., Lo Celso, C., and Bonnet, D. (2020). Dynamic responses of the hematopoietic stem cell niche to diverse stresses. *Nat. Cell Biol.* 22, 7–17. doi: 10.1038/s41556-019-0444-9
- Bentzinger, C. F., Wang, Y. X., Dumont, N. A., and Rudnicki, M. A. (2013). Cellular dynamics in the muscle satellite cell niche. *EMBO Rep.* 14, 1062–1072. doi: 10.1038/embor.2013.182
- Boisset, J.-C., van Cappellen, W., Andrieu-Soler, C., Galjart, N., Dzierzak, E., and Robin, C. (2010). In vivo imaging of hematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium. *Nature* 464, 116–120. doi: 10.1038/nature08764
- Bowie, M. B., Kent, D. G., Dykstra, B., McKnight, K. D., McCaffrey, L., Hoodless, P. A., et al. (2007). Identification of a new intrinsically timed developmental checkpoint that reprograms key hematopoietic stem cell properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 5878–5882. doi: 10.1073/pnas.0700460104
- Brady, R. D., Shultz, S. R., McDonald, S. J., and O'Brien, T. J. (2018). Neurological heterotopic ossification: current understanding and future directions. *Bone* 109, 35–42. doi: 10.1016/j.bone.2017.05.015
- Calvo, W. (1968). The innervation of the bone marrow in laboratory animals. *Am. J. Anat.* 123, 315–328. doi: 10.1002/aja.1001230206
- Chakkalakal, S. A., Zhang, D., Culbert, A. L., Convente, M. R., Caron, R. J., Wright, A. C., et al. (2012). An Acvr1 R206H knock-in mouse has fibrodysplasia ossificans progressiva. *J. Bone Miner. Res.* 27, 1746–1756.
- Chan, C. K. F., Chen, C.-C., Luppen, C. A., Kim, J.-B., DeBoer, A. T., Wei, K., et al. (2009). Endochondral ossification is required for hematopoietic stem-cell niche formation. *Nature* 457, 490–494. doi: 10.1038/nature07547
- Cholok, D., Chung, M. T., Ranganathan, K., Ucer, S., Day, D., Davis, T. A., et al. (2018). Heterotopic ossification and the elucidation of pathologic differentiation. *Bone* 109, 12–21. doi: 10.1016/j.bone.2017.09.019
- Christofi, T., Raptis, D. A., Kallis, A., and Ambasakoor, F. (2008). True trilineage haematopoiesis in excised heterotopic ossification from a laparotomy scar: report of a case and literature review. *Ann. R. Coll. Surg. Engl.* 90, W12–W14. doi: 10.1308/147870808X303056
- Christopher, M. J., Rao, M., Liu, F., Woloszynek, J. R., and Link, D. C. (2011). Expression of the G-CSF receptor in monocytic cells is sufficient to mediate hematopoietic progenitor mobilization by G-CSF in mice. *J. Exp. Med.* 208, 251–260. doi: 10.1084/jem.20101700
- Cipriano, C. A., Pill, S. G., and Keenan, M. A. (2009). Heterotopic ossification following traumatic brain injury and spinal cord injury. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* 17, 689–697. doi: 10.5435/00124635-200911000-00003
- Citak, M., Suero, E. M., Backhaus, M., Aach, M., Godry, H., Meindl, R., et al. (2012). Risk factors for heterotopic ossification in patients with spinal cord injury: a case-control study of 264 patients. *Spine* 37, 1953–1957. doi: 10.1097/BRS.0b013e31825ee81b
- Collins, C. A., Olsen, I., Zammit, P. S., Heslop, L., Petrie, A., Partridge, T. A., et al. (2005). Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell* 122, 289–301. doi: 10.1016/j.cell.2005.05.010
- Copley, M. R., and Eaves, C. J. (2013). Developmental changes in hematopoietic stem cell properties. *Exp. Mol. Med.* 45:e55. doi: 10.1038/emmm.2013.98
- Coşkun, S., Chao, H., Vasavada, H., Heydari, K., Gonzales, N., Zhou, X., et al. (2014). Development of the fetal bone marrow niche and regulation of hsc quiescence and homing ability by emerging osteolineage cells. *Cell Rep.* 9, 581–590. doi: 10.1016/j.celrep.2014.09.013
- Damm, E. W., and Clements, W. K. (2017). Pdgf signalling guides neural crest contribution to the hematopoietic stem cell specification niche. *Nat. Cell Biol.* 19, 457–467. doi: 10.1038/ncb3508
- Daniel, M. G., Rapp, K., Schaniel, C., and Moore, K. A. (2020). Induction of developmental hematopoiesis mediated by transcription factors and the hematopoietic microenvironment. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1466, 59–72. doi: 10.1111/nyas.14246
- Daud, O., Sett, P., Burr, R. G., and Silver, J. R. (1993). The relationship of heterotopic ossification to passive movements in paraplegic patients. *Disabil. Rehabil.* 15, 114–118. doi: 10.3109/09638289309166001
- Davis, T. A., Lazdun, Y., Potter, B. K., and Forsberg, J. A. (2013). Ectopic bone formation in severely combat-injured orthopedic patients – a hematopoietic niche. *Bone* 56, 119–126. doi: 10.1016/j.bone.2013.05.016
- de l'Escalopier, N., Mathieu, L., Duret, C., Banzet, S., Genêt, F., and Salga, M. (2021). Re: “high prevalence of heterotopic ossification in critically ill patients with severe COVID-19” by Stoira et al. *Clin. Microbiol. Infect.* doi: 10.1016/j.cmi.2020.12.038 Online ahead of print.
- Dejerine, A., and Ceillier, A. (1918). Paraosteoarthropathies des paraplégiques par lésion médullaire; Etude clinique et radiographique. *Ann. Méd.* 5:497.
- Dey, D., Wheatley, B. M., Cholok, D., Agarwal, S., Yu, P. B., Levi, B., et al. (2017). The traumatic bone: trauma-induced heterotopic ossification. *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.* 186, 95–111. doi: 10.1016/j.trsl.2017.06.004
- Ding, L., and Morrison, S. J. (2013). Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature* 495, 231–235. doi: 10.1038/nature11885
- Dzierzak, E., and Bigas, A. (2018). Blood development: hematopoietic stem cell dependence and independence. *Cell Stem Cell* 22, 639–651. doi: 10.1016/j.stem.2018.04.015
- Dzierzak, E., and Speck, N. A. (2008). Of lineage and legacy: the development of mammalian hematopoietic stem cells. *Nat. Immunol.* 9, 129–136. doi: 10.1038/ni1560
- Eisner, C., Cummings, M., Johnston, G., Tung, L. W., Groppa, E., Chang, C., et al. (2020). Murine tissue-resident PDGFR α fibro-adipogenic progenitors spontaneously acquire osteogenic phenotype in an altered inflammatory environment. *J. Bone Miner. Res.* 35, 1525–1534. doi: 10.1002/jbmr.4020
- Espin-Palazón, R., Stachura, D. L., Campbell, C. A., García-Moreno, D., Del Cid, N., Kim, A. D., et al. (2014). Proinflammatory signaling regulates hematopoietic stem cell emergence. *Cell* 159, 1070–1085. doi: 10.1016/j.cell.2014.10.031
- Farrell, S. F., Petcu, E. B., Cornwall, J., Rivett, D. A., and Osmotherly, P. G. (2017). An ectopic intramedullary hematopoietic niche in a cervical spine meniscoid: a case report. *Vasc. Cell* 9:3. doi: 10.24238/13221-9-1-173
- Fitch, S. R., Kimber, G. M., Wilson, N. K., Parker, A., Mirshekar-Syahkal, B., Göttgens, B., et al. (2012). Signaling from the sympathetic nervous system regulates hematopoietic stem cell emergence during embryogenesis. *Cell Stem Cell* 11, 554–566. doi: 10.1016/j.stem.2012.07.002
- Foley, K. L., Hebel, N., Keenan, M. A., and Pignolo, R. J. (2018). Histopathology of periarticular non-hereditary heterotopic ossification. *Bone* 109, 65–70. doi: 10.1016/j.bone.2017.12.006
- Forsberg, J. A., Pepek, J. M., Wagner, S., Wilson, K., Flint, J., Andersen, R. C., et al. (2009). Heterotopic ossification in high-energy wartime extremity injuries: prevalence and risk factors. *J. Bone Joint Surg. Am.* 91, 1084–1091. doi: 10.2106/JBJS.H.00792
- Frith, J. E., Kusuma, G. D., Carthew, J., Li, F., Cloonan, N., Gomez, G. A., et al. (2018). Mechanically-sensitive miRNAs bias human mesenchymal stem cell fate via mTOR signalling. *Nat. Commun.* 9:257. doi: 10.1038/s41467-017-02486-0
- Gao, X., Xu, C., Asada, N., and Frenette, P. S. (2018). The hematopoietic stem cell niche: from embryo to adult. *Dev. Camb. Engl.* 145:dev139691. doi: 10.1242/dev.139691
- Gao, X., Zhang, D., Xu, C., Li, H., Caron, K. M., and Frenette, P. S. (2020). Nociceptive nerves regulate hematopoietic stem cell mobilization. *Nature* 589, 591–596. doi: 10.1038/s41586-020-03057-y
- García-García, A., and Méndez-Ferrer, S. (2020). The autonomic nervous system pulls the strings to coordinate circadian HSC functions. *Front. Immunol.* 11:956. doi: 10.3389/fimmu.2020.00956
- García-García, A., Korn, C., García-Fernández, M., Domingues, O., Villadiego, J., Martín-Pérez, D., et al. (2019). Dual cholinergic signals regulate daily migration

- of hematopoietic stem cells and leukocytes. *Blood* 133, 224–236. doi: 10.1182/blood-2018-08-867648
- Garland, D. E. (1988). Clinical observations on fractures and heterotopic ossification in the spinal cord and traumatic brain injured populations. *Clin. Orthop.* 233, 86–101. doi: 10.1097/00003086-198808000-00011
- Genêt, F., Jourdan, C., Schnitzler, A., Lautridou, C., Guillemot, D., Judet, T., et al. (2011). Troublesome heterotopic ossification after central nervous system damage: a survey of 570 surgeries. *PLoS One* 6:e16632. doi: 10.1371/journal.pone.0016632
- Genêt, F., Kulina, I., Vaquette, C., Torossian, F., Millard, S., Pettit, A. R., et al. (2015). Neurological heterotopic ossification following spinal cord injury is triggered by macrophage-mediated inflammation in muscle. *J. Pathol.* 236, 229–240. doi: 10.1002/path.4519
- Giordani, L., He, G. J., Negroni, E., Sakai, H., Law, J. Y. C., Siu, M. M., et al. (2019). High-dimensional single-cell cartography reveals novel skeletal muscle-resident cell populations. *Mol. Cell* 74, 609–621.e6. doi: 10.1016/j.molcel.2019.02.026
- Golan, K., Kollet, O., Markus, R. P., and Lapidot, T. (2019). Daily light and darkness onset and circadian rhythms metabolically synchronize hematopoietic stem cell differentiation and maintenance: the role of bone marrow norepinephrine, tumor necrosis factor, and melatonin cycles. *Exp. Hematol.* 78, 1–10. doi: 10.1016/j.exphem.2019.08.008
- Golan, K., Kumari, A., Kollet, O., Khatib-Massalha, E., Subramaniam, M. D., Ferreira, Z. S., et al. (2018). Daily onset of light and darkness differentially controls hematopoietic stem cell differentiation and maintenance. *Cell Stem Cell* 23, 572–585.e7. doi: 10.1016/j.stem.2018.08.002
- Goodell, M. A. (2005). Stem cell identification and sorting using the Hoechst 33342 side population (SP). *Curr. Protoc. Cytom.* 9:Unit9.18. doi: 10.1002/0471142956.cy0918s33
- Greenbaum, A., Hsu, Y.-M. S., Day, R. B., Schuettelpelz, L. G., Christopher, M. J., Borgerding, J. N., et al. (2013). CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature* 495, 227–230. doi: 10.1038/nature11926
- Hayashi, Y., Sezaki, M., and Takizawa, H. (2019). Development of the hematopoietic system: role of inflammatory factors. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 8:e341. doi: 10.1002/wdev.341
- Hendricks, H. T., Geurts, A. C. H., van Ginneken, B. C., Heeren, A. J., and Vos, P. E. (2007). Brain injury severity and autonomic dysregulation accurately predict heterotopic ossification in patients with traumatic brain injury. *Clin. Rehabil.* 21, 545–553. doi: 10.1177/0269215507075260
- Joe, A. W. B., Yi, L., Natarajan, A., Le Grand, F., So, L., Wang, J., et al. (2010). Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat. Cell Biol.* 12, 153–163. doi: 10.1038/ncb2015
- Kan, L., Hu, M., Gomes, W. A., and Kessler, J. A. (2004). Transgenic mice overexpressing BMP4 develop a fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP)-like phenotype. *Am. J. Pathol.* 165, 1107–1115. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63372-X
- Kan, L., Peng, C.-Y., McGuire, T. L., and Kessler, J. A. (2013). Glial-expressing progenitor cells contribute to heterotopic ossification. *Bone* 53, 194–203. doi: 10.1016/j.bone.2012.12.008
- Karsenty, G. (2020). The central regulation of bone mass: genetic evidence and molecular bases. *Handb. Exp. Pharmacol.* 262, 309–323. doi: 10.1007/164_2020_378
- Katayama, Y., Battista, M., Kao, W.-M., Hidalgo, A., Peired, A. J., Thomas, S. A., et al. (2006). Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell* 124, 407–421. doi: 10.1016/j.cell.2005.10.041
- Kaur, S., Raggatt, L. J., Batoon, L., Hume, D. A., Levesque, J.-P., and Pettit, A. R. (2017). Role of bone marrow macrophages in controlling homeostasis and repair in bone and bone marrow niches. *Semin. Cell Dev. Biol.* 61, 12–21. doi: 10.1016/j.semdb.2016.08.009
- Kaur, S., Raggatt, L. J., Millard, S. M., Wu, A. C., Batoon, L., Jacobsen, R. N., et al. (2018). Self-repopulating recipient bone marrow resident macrophages promote long-term hematopoietic stem cell engraftment. *Blood* 132, 735–749. doi: 10.1182/blood-2018-01-829663
- Kaur, S., Sehgal, A., Wu, A. C., Millard, S. M., Batoon, L., Sandrock, C. J., et al. (2021). Stable colony-stimulating factor 1 fusion protein treatment increases hematopoietic stem cell pool and enhances their mobilisation in mice. *J. Hematol. Oncol. J. Hematol. Oncol.* 14:3. doi: 10.1186/s13045-020-00997-w
- Kokkalis, K., Kunz, L., Cabezas-Wallscheid, N., Christodoulou, C., Renders, S., Camargo, F., et al. (2020). Adult blood stem cell localization reflects the abundance of reported bone marrow niche cell types and their combinations. *Blood* 136, 2296–2307. doi: 10.1182/blood.2020006574
- Kollet, O., Canaani, J., Kalinkovich, A., and Lapidot, T. (2012). Regulatory cross talks of bone cells, hematopoietic stem cells and the nervous system maintain hematopoiesis. *Inflamm. Allergy Drug Targets* 11, 170–180. doi: 10.2174/187152812800392760
- Kwan, W., Cortes, M., Frost, I., Esain, V., Theodore, L. N., Liu, S. Y., et al. (2016). The central nervous system regulates embryonic hspc production via stress-responsive glucocorticoid receptor signaling. *Cell Stem Cell* 19, 370–382. doi: 10.1016/j.stem.2016.06.004
- Lapidot, T., and Kollet, O. (2010). The brain-bone-blood triad: traffic lights for stem-cell homing and mobilization. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 2010, 1–6. doi: 10.1182/asheducation-2010.1.1
- Lis, G. J., Litwin, J. A., Kapelak, B., Furgal-Borzych, A., Gajda, M., Cichocki, T., et al. (2009). Development of mature lamellar bone with a hematopoietic compartment in an aortic valve homograft. *J. Heart Valve Dis.* 18, 578–580.
- Loder, S. J., Agarwal, S., Chung, M. T., Cholok, D., Hwang, C., Visser, N., et al. (2018). Characterizing the circulating cell populations in traumatic heterotopic ossification. *Am. J. Pathol.* 188, 2464–2473.
- Luckett, W. P. (1978). Origin and differentiation of the yolk sac and extraembryonic mesoderm in presomite human and rhesus monkey embryos. *Am. J. Anat.* 152, 59–97.
- Luis, T. C., Tremblay, C. S., Manz, M. G., North, T. E., King, K. Y., and Challen, G. A. (2016). Inflammatory signals in HSPC development and homeostasis: too much of a good thing? *Exp. Hematol.* 44, 908–912.
- Madaro, L., Passafaro, M., Sala, D., Etxaniz, U., Lugarini, F., Proietti, D., et al. (2018). Denervation-activated STAT3-IL-6 signalling in fibro-adipogenic progenitors promotes myofibres atrophy and fibrosis. *Nat. Cell Biol.* 20, 917–927.
- Malecova, B., Gatto, S., Etxaniz, U., Passafaro, M., Cortez, A., Nicoletti, C., et al. (2018). Dynamics of cellular states of fibro-adipogenic progenitors during myogenesis and muscular dystrophy. *Nat. Commun.* 9:3670.
- Mariani, S. A., Li, Z., Rice, S., Krieg, C., Fraggogianni, S., Robinson, M., et al. (2019). Pro-inflammatory aorta-associated macrophages are involved in embryonic development of hematopoietic stem cells. *Immunity* 50, 1439–1452.e5.
- Maryanovich, M., Takeishi, S., and Frenette, P. S. (2018). Neural regulation of bone and bone marrow. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 8:a031344.
- Matthews, B. G., Torreggiani, E., Roeder, E., Matic, I., Grcevic, D., and Kalajzic, I. (2016). Osteogenic potential of alpha smooth muscle actin expressing muscle resident progenitor cells. *Bone* 84, 69–77.
- Méndez-Ferrer, S., Bonnet, D., Steensma, D. P., Hasserjian, R. P., Ghibrial, I. M., Gribben, J. G., et al. (2020). Bone marrow niches in haematological malignancies. *Nat. Rev. Cancer* 20, 285–298.
- Meyer, C., Haustrate, M.-A., Nisolle, J. F., and Deltombe, T. (2020). Heterotopic ossification in COVID-19: a series of 4 cases. *Ann. Phys. Rehabil. Med.* 63, 565–567.
- Meyers, C., Lisiecki, J., Miller, S., Levin, A., Fayad, L., Ding, C., et al. (2019). Heterotopic ossification: a comprehensive review. *JBMR Plus* 3:e10172.
- Mirshekar-Syahkal, B., Fitch, S. R., and Ottersbach, K. (2014). Concise review: from greenhouse to garden: the changing soil of the hematopoietic stem cell microenvironment during development. *Stem Cells Dayt. Ohio* 32, 1691–1700.
- Mitroulis, I., Kalafati, L., Bornhäuser, M., Hajishengallis, G., and Chavakis, T. (2020). Regulation of the bone marrow niche by inflammation. *Front. Immunol.* 11:1540.
- Miyajima, A., Kinoshita, T., Tanaka, M., Kamiya, A., Mukoyama, Y., and Hara, T. (2000). Role of oncostatin M in hematopoiesis and liver development. *Cytokine Growth. Factor. Rev.* 11, 177–183.
- Morrison, S. J., and Scadden, D. T. (2014). The bone marrow niche for hematopoietic stem cells. *Nature* 505, 327–334.
- Nombela-Arrieta, C., Pivarnik, G., Winkel, B., Canty, K. J., Harley, B., Mahoney, J. E., et al. (2013). Quantitative imaging of haematopoietic stem and progenitor cell localization and hypoxic status in the bone marrow microenvironment. *Nat. Cell Biol.* 15, 533–543.

- Oberlin, E., El Hafny, B., Petit-Cocault, L., and Souyri, M. (2010). Definitive human and mouse hematopoiesis originates from the embryonic endothelium: a new class of HSCs based on VE-cadherin expression. *Int. J. Dev. Biol.* 54, 1165–1173.
- Oberlin, E., Tavian, M., Blazsek, I., and Péault, B. (2002). Blood-forming potential of vascular endothelium in the human embryo. *Dev. Camb. Engl.* 129, 4147–4157.
- Oishi, T., Uezumi, A., Kanaji, A., Yamamoto, N., Yamaguchi, A., Yamada, H., et al. (2013). Osteogenic differentiation capacity of human skeletal muscle-derived progenitor cells. *PLoS One* 8:e56641.
- Orelis, C., Peeters, M., Haak, E., van der Horn, K., and Dzierzak, E. (2009). Interleukin-1 regulates hematopoietic progenitor and stem cells in the midgestation mouse fetal liver. *Haematologica* 94, 462–469.
- Pierce, H., Zhang, D., Magnon, C., Lucas, D., Christin, J. R., Huggins, M., et al. (2017). Cholinergic Signals from the CNS regulate G-CSF-Mediated HSC mobilization from bone marrow via a glucocorticoid signaling relay. *Cell Stem Cell* 20, 648–658.e4.
- Potter, B. K., Burns, T. C., Lacap, A. P., Granville, R. R., and Gajewski, D. A. (2007). Heterotopic ossification following traumatic and combat-related amputations. Prevalence, risk factors, and preliminary results of excision. *J. Bone Joint Surg. Am.* 89, 476–486.
- Putz, C., Helbig, L., Gerner, H. J., Zimmermann-Stenzel, M., and Akbar, M. (2014). Autonomic dysreflexia: a possible trigger for the development of heterotopic ossifications after traumatic spinal cord injury: a clinical longitudinal study. *Eur. J. Trauma Emerg. Surg.* 40, 721–726.
- Reznik, J. E., Biros, E., Marshall, R., Jelbart, M., Milanese, S., Gordon, S., et al. (2014). Prevalence and risk-factors of neurogenic heterotopic ossification in traumatic spinal cord and traumatic brain injured patients admitted to specialised units in Australia. *J. Musculoskelet. Neuronal. Interact.* 14, 19–28.
- Rybtsov, S., Ivanovs, A., Zhao, S., and Medvinsky, A. (2016). Concealed expansion of immature precursors underpins acute burst of adult HSC activity in foetal liver. *Dev. Camb. Engl.* 143, 1284–1289.
- Sawamiphak, S., Kontarakis, Z., and Stainier, D. Y. R. (2014). Interferon gamma signaling positively regulates hematopoietic stem cell emergence. *Dev. Cell* 31, 640–653.
- Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4, 7–25.
- Shore, E. M., Xu, M., Feldman, G. J., Fenstermacher, D. A., Cho, T.-J., Choi, I. H., et al. (2006). A recurrent mutation in the BMP type I receptor ACVR1 causes inherited and sporadic fibrodysplasia ossificans progressiva. *Nat. Genet.* 38, 525–527.
- Silver, L., and Palis, J. (1997). Initiation of murine embryonic erythropoiesis: a spatial analysis. *Blood* 89, 1154–1164. doi: 10.1182/blood.V89.4.1154
- Singh, N. K., and Fleshman, R. (2011). Extramedullary hematopoiesis on the aortic valve. *Tex. Heart Inst. J.* 38, 210–211.
- Stanley, A., Heo, S.-J., Mauck, R. L., Mourkioti, F., and Shore, E. M. (2019). Elevated BMP and mechanical signaling through YAP1/RhoA poises FOP mesenchymal progenitors for osteogenesis. *J. Bone Miner. Res.* 34, 1894–1909. doi: 10.1002/jbmr.3760
- Stawski, L., and Trojanowska, M. (2019). Oncostatin M and its role in fibrosis. *Connect. Tissue Res.* 60, 40–49. doi: 10.1080/03008207.2018.1500558
- Stoira, E., Elzi, L., Puligheddu, C., Garibaldi, R., Voinea, C., and Chiesa, A. F. (2021). High prevalence of heterotopic ossification in critically ill patients with severe COVID-19. *Clin. Microbiol. Infect.* Online ahead of print.
- Sun, M., Chi, G., Xu, J., Tan, Y., Xu, J., Lv, S., et al. (2018). Extracellular matrix stiffness controls osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells mediated by integrin $\alpha 5$. *Stem Cell Res. Ther.* 9:52. doi: 10.1186/s13287-018-0798-0
- Tanaka, M., and Miyajima, A. (2003). Oncostatin M, a multifunctional cytokine. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 149, 39–52. doi: 10.1007/s10254-003-0013-1
- Torossian, F., Guerton, B., Anginot, A., Alexander, K. A., Desterke, C., Soave, S., et al. (2017). Macrophage-derived oncostatin M contributes to human and mouse neurogenic heterotopic ossifications. *JCI Insight* 2:e96034. doi: 10.1172/jci.insight.96034
- Tseng, H.-W., Kulina, I., Salga, M., Fleming, W., Vaquette, C., Genêt, F., et al. (2020). Neurogenic heterotopic ossifications develop independently of granulocyte colony-stimulating factor and neutrophils. *J. Bone Miner. Res.* 35, 2242–2251. doi: 10.1002/jbmr.4118
- Tseng, H.-W., Millard, S., Alexander, K., Fleming, W., Kulina, I., Nowlan, B., et al. (2019). Neurogenic heterotopic ossifications are derived from fibroadipogenic progenitors in the skeletal muscle not from satellite cells. *Exp. Hematol.* 76:S89. doi: 10.1016/j.exphem.2019.06.449
- Upadhyay, J., Farr, O. M., and Mantzoros, C. S. (2015). The role of leptin in regulating bone metabolism. *Metabolism* 64, 105–113. doi: 10.1016/j.metabol.2014.10.021
- van Kampen, P. J., Martina, J. D., Vos, P. E., Hoedemaekers, C. W. E., and Hendricks, H. T. (2011). Potential risk factors for developing heterotopic ossification in patients with severe traumatic brain injury. *J. Head Trauma Rehabil.* 26, 384–391. doi: 10.1097/HTR.0b013e3181f78a59
- Waas, B., and Maillard, I. (2017). Fetal hematopoietic stem cells are making waves. *Stem Cell Investig.* 4:25. doi: 10.21037/sci.2017.03.06
- Wang, D., Shurafa, M. S., Acharya, R., Strand, V. F., and Linden, M. D. (2004). Chronic abdominal pain caused by heterotopic ossification with functioning bone marrow: a case report and review of the literature. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 128, 321–323. doi: 10.5858/2004-128-321-CAPCBH
- Wang, H., Lindborg, C., Lounev, V., Kim, J.-H., McCarrick-Walmsley, R., Xu, M., et al. (2016). Cellular hypoxia promotes heterotopic ossification by amplifying BMP signaling. *J. Bone Miner. Res.* 31, 1652–1665. doi: 10.1002/jbmr.2848
- Wang, X., Li, F., Xie, L., Crane, J., Zhen, G., Mishina, Y., et al. (2018). Inhibition of overactive TGF- β attenuates progression of heterotopic ossification in mice. *Nat. Commun.* 9:551. doi: 10.1038/s41467-018-02988-5
- Wang, X.-D., Li, S.-Y., Zhang, S.-J., Gupta, A., Zhang, C.-P., and Wang, L. (2020). The neural system regulates bone homeostasis via mesenchymal stem cells: a translational approach. *Theranostics* 10, 4839–4850. doi: 10.7150/thno.43771
- Wilson, A., Laurenti, E., Oser, G., van der Wath, R. C., Blanco-Bose, W., Jaworski, M., et al. (2008). Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell* 135, 1118–1129. doi: 10.1016/j.cell.2008.10.048
- Winkler, I. G., Sims, N. A., Pettit, A. R., Barbier, V., Nowlan, B., Helwani, F., et al. (2010). Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. *Blood* 116, 4815–4828. doi: 10.1182/blood-2009-11-253534
- Wosczyzna, M. N., and Rando, T. A. (2018). A muscle stem cell support group: coordinated cellular responses in muscle regeneration. *Dev. Cell* 46, 135–143. doi: 10.1016/j.devcel.2018.06.018
- Yokomizo, T., and Dzierzak, E. (2010). Three-dimensional cartography of hematopoietic clusters in the vasculature of whole mouse embryos. *Dev. Camb. Engl.* 137, 3651–3661. doi: 10.1242/dev.051094
- Zhang, Y., Clay, D., Mitjavila-Garcia, M. T., Alama, A., Mennesson, B., and Berseneff, H. (2019). VE-Cadherin and ACE co-expression marks highly proliferative hematopoietic stem cells in human embryonic liver. *Stem Cells Dev.* 28, 165–185. doi: 10.1089/scd.2018.0154

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Girard, Torossian, Oberlin, Alexander, Gueguen, Tseng, Genêt, Lataillade, Salga, Levesque, Le Bousse-Kerdilès and Benzet. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

1.2.3 Article annexe 1 : Implication et évaluation des caractéristiques et propriétés ostéogéniques des FAPs et MPs dans le développement des POAN

Le muscle comprend deux populations importantes de progéniteurs, les MPs et les FAPs, toutes deux capables de différenciation ostéogénique. Depuis la mise en évidence de l'implication des FAPs dans le développement d'ossifications ectopiques d'origine exogène [95], l'origine cellulaire du pendant neurogène de la pathologie est restée en suspens. De multiples études exploitant des traçages de lignées dans la pathogenèse de la FOP ont suggéré l'absence de participation des progéniteurs endothéliaux et des MPs [124,448].

Nous avons cherché à identifier les cellules responsables de la formation des POAN à l'aide du modèle animal POAN et des progéniteurs musculaires isolés du de patients. Ce travail a fait l'objet d'une publication commune dans *Bone Research* avec l'équipe australienne du Pr. Jean-Pierre Lévesque du Mater Research Institute [96].

Nos collaborateurs ont induit la formation de POAN dans deux souches murines exprimant la protéine fluorescente ZsGreen sous le contrôle du promoteur *Pax7* ou *Prrx1*, respectivement spécifiques des cellules satellites et des progéniteurs mésenchymateux. Ils ont pu observer la contribution des FAPs *Prrx1*⁺ et l'absence de cellules satellites *Pax7*⁺ aux sites développant des POAN à 2 et 4 semaines post-induction.

Nous avons ensuite montré que les FAPs et les MPs isolés du muscle de patients POAN présentaient un phénotype caractéristique des cellules stromales mésenchymateuses (CD31⁻CD45⁻CD73⁺CD90⁺CD105⁺) [101], mais que seuls les MPs exprimaient des facteurs de transcription myogéniques. Ces dernières disposaient aussi d'un moindre potentiel de différenciation ostéogénique *in vitro* comparé aux FAPs. Enfin, en utilisant un modèle de niche ectopique, via l'insertion sous cutanée chez des souris immunodéficientes d'un biomatériau d'hydroxyapatite, avec des FAPs ou MPs et du plasma, nous avons montré que les FAPs possédaient un potentiel ostéogénique très supérieur à celui des MPs.



ARTICLE OPEN

Spinal cord injury reprograms muscle fibroadipogenic progenitors to form heterotopic bones within muscles

Hsu-Wen Tseng¹, Dorothée Girard², Kylie A. Alexander¹, Susan M. Millard¹, Frédéric Torossian³, Adrienne Anginot³, Whitney Fleming¹, Jules Gueguen², Marie-Emmanuelle Goriot², Denis Clay⁴, Beulah Jose¹, Bianca Nowlan¹, Allison R. Pettit¹, Marjorie Salga^{5,6}, François Genêt^{5,6}, Marie-Caroline Le Bousse-Kerdilès³, Sébastien Banzet²✉ and Jean-Pierre Lévesque¹✉

The cells of origin of neurogenic heterotopic ossifications (NHOs), which develop frequently in the periarticular muscles following spinal cord injuries (SCIs) and traumatic brain injuries, remain unclear because skeletal muscle harbors two progenitor cell populations: satellite cells (SCs), which are myogenic, and fibroadipogenic progenitors (FAPs), which are mesenchymal. Lineage-tracing experiments using the Cre recombinase/LoxP system were performed in two mouse strains with the fluorescent protein ZsGreen specifically expressed in either SCs or FAPs in skeletal muscles under the control of the *Pax7* or *Prrx1* gene promoter, respectively. These experiments demonstrate that following muscle injury, SCI causes the upregulation of PDGFR α expression on FAPs but not SCs and the failure of SCs to regenerate myofibers in the injured muscle, with reduced apoptosis and continued proliferation of muscle resident FAPs enabling their osteogenic differentiation into NHOs. No cells expressing ZsGreen under the *Prrx1* promoter were detected in the blood after injury, suggesting that the cells of origin of NHOs are locally derived from the injured muscle. We validated these findings using human NHO biopsies. PDGFR α ⁺ mesenchymal cells isolated from the muscle surrounding NHO biopsies could develop ectopic human bones when transplanted into immunocompromised mice, whereas CD56⁺ myogenic cells had a much lower potential. Therefore, NHO is a pathology of the injured muscle in which SCI reprograms FAPs to undergo uncontrolled proliferation and differentiation into osteoblasts.

Bone Research (2022)10:22

; <https://doi.org/10.1038/s41413-022-00188-y>

INTRODUCTION

Neurogenic heterotopic ossifications (NHOs) are pathological heterotopic bones that develop in peri-articular muscles^{1,2} following severe lesions of the central nervous system (CNS), such as spinal cord injuries (SCIs), traumatic brain injuries, strokes and cerebral anoxia. NHOs are frequent, with an incidence of 10%–23% in patients with traumatic brain injury and 10%–53% in patients with SCIs, increasing to 68% in victims of severe combat blast injuries involving the spine.^{3–8} NHOs develop most frequently at the hip, elbow, knee and shoulder.^{2,9} Because of their large size, NHOs are highly incapacitating, causing substantial pain and a gradual reduction in the range of motion of affected limbs, often progressing to complete ankylosis.^{2,9} This process exacerbates functional disabilities by increasing the difficulty in sitting, eating and dressing.¹⁰ NHO growth can also cause nerve and blood vessel compression, further increasing patient morbidity.^{11,12} Although this pathology has been known for just over 100 years, treatment is currently limited to surgical resection after NHOs have matured,^{2,10,13,14} a procedure that is challenging, particularly when ossifications entrap the whole joint and adjacent large blood vessels and nerves. The development of improved treatments for NHOs has been slow, and trials of pharmacological interventions have continued to show limited

effectiveness,^{15,16} reflecting the current limited knowledge on the etiology, pathogenesis and pathobiology of NHOs. Indeed, the initial causal mechanisms that trigger NHOs are unique to this pathology, as they involve severe CNS trauma^{17,18} rather than other forms of trauma, such as body burns, or activating mutations of osteogenic genes, such as bone morphogenetic protein type I receptor *ACVR1*, in fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP).¹⁷ Therefore, it is essential to uncover the mechanisms of NHO pathogenesis to identify potential therapeutic targets and treatments that will reduce NHO development and remove the need for very invasive and delicate surgical resections.¹⁷

Our group previously reported the first mouse model of NHOs in which NHOs spontaneously develop when an SCI is combined with muscle injury without additional nonphysiological manipulations, such as the overexpression of bone morphogenetic protein (BMP) transgenes or the insertion of hyperactive mutants of BMP receptors.¹⁹ Our model revealed that SCI causes a further exacerbation of the inflammatory response in injured muscles with exaggerated Ly6C^{bright} inflammatory monocyte/macrophage infiltration and persistent accumulation of the inflammatory cytokine oncostatin M (OSM), leading to persistent activation of JAK1/2 tyrosine kinases and signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3), which in turn promote NHOs instead of muscle repair.^{19–21}

¹Mater Research Institute—The University of Queensland, Woolloongabba, QLD, Australia; ²Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA), INSERM UMRS-MD, 1197 Clamart, France; ³INSERM UMRS-MD 1197, Université de Paris-Saclay, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France; ⁴INSERM UMS-44, Université de Paris-Saclay, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France; ⁵UPOH (Unité Péri Opératoire du Handicap, Perioperative Disability Unit), Physical and Rehabilitation Medicine department, Raymond-Poincaré Hospital, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris (AP-HP), Garches, France and ⁶Université de Versailles Saint Quentin en Yvelines, UFR Simone Veil - Santé, END:ICAP INSERM U1179, Montigny le Bretonneux, France

Correspondence: Sébastien Banzet (sebastien.banzet@inserm.fr) or Jean-Pierre Lévesque (jean-pierre.levesque@mater.uq.edu.au)

These authors contributed equally: Hsu-Wen Tseng, Dorothée Girard, Kylie A. Alexander

Received: 26 June 2020 Revised: 21 November 2021 Accepted: 6 December 2021

Published online: 25 February 2022

How injured skeletal muscles generate heterotopic bones instead of regenerating functional myofibers following severe lesions of the CNS remains a fascinating stem cell biology question and may reveal novel therapeutic strategies to treat NHOs.^{17,18} Adult skeletal muscles contain two populations of stem/progenitor cells: (1) satellite cells (SCs), residing within the myofiber under the myofiber basal lamina, which regenerate myoblasts and myocytes following injury and are as such true muscle stem cells,^{22–24} and (2) fibroadipogenic progenitors (FAPs) residing in the interstitial space between myofibers.²⁵ Unlike SCs, FAPs are of mesenchymal origin and do not regenerate myoblasts.²⁵ Muscle repair following injury is a highly orchestrated process that involves the coordinated recruitment of both SCs and FAPs as well as macrophages. Upon muscle injury, FAPs proliferate transiently for the first 3 days in mice and then undergo apoptosis under the effect of tumor necrosis factor (TNF) released by infiltrating C-C chemokine receptor-2 (CCR2)⁺ inflammatory monocytes/macrophages, which also clear apoptotic FAPs.^{26,27} Both FAPs and macrophages are essential to orchestrate and complete appropriate myogenic repair from SCs, and the critical function of FAPs is thought to involve the secretion of appropriate growth factors and extracellular matrix, which enable SC proliferation, myogenic differentiation and myofiber assembly.^{25,28,29} As both muscle SCs and FAPs have osteogenic potential in vitro,^{19,21} the question of the cells of origin of NHOs has not been resolved.

Lineage-tracing experiments using the Cre-loxP system have been undertaken to identify which progenitors contribute to the inheritable genetic form of heterotopic ossification called fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). Unlike NHOs, which are frequent after severe CNS injury, FOP is an extremely rare disorder caused by a gain-of-function missense single nucleotide mutation in the bone morphogenetic protein (BMP) type I receptor gene *ACVR1*,³⁰ resulting in a switch in ligand preference with aberrant activation of BMP signaling by activin-A instead of BMPs.³¹ Most lineage tracing experiments to identify the “cells of origin” of heterotopic ossifications were performed in mouse models of FOP expressing either a Cre recombinase-inducible *ACVR1*^{R206H} mutant that causes FOP in humans or a BMP transgene or with the insertion of a BMP-containing implant. In these mouse models of FOP, a variety of gene promoters have been used to drive Cre recombinase expression. Based on Cre recombinase driven by the *Pax7* (Paired Box 7) or *Cdh5* (Cadherin 5) gene promoters, which are specific to SCs and endothelial cells, respectively, it was concluded that neither SCs nor endothelial cells were the cells of origin of heterotopic ossifications in FOP.³² However, most of the gene promoters used in similar studies (e.g., *Glast/Slc1a3*, *Scx*, *Mx1*, *Tie2*, *CD133/Prom1* gene promoters)^{32–34} did not result in exclusive expression in mesenchymal progenitor cells, and the conclusion that FOP heterotopic ossifications were derived from mesenchymal cells was inferred by elimination of other possible cell candidates. In a mouse model of FOP with overexpression of a BMP4 transgene, it was recently shown that *Gli1*-expressing cells were integrated in HOs.³⁴ However, BMP4 is a very strong osteogenic protein, and the relationship of the level of artificially high BMP4 expression by means of a transgene to SCI-induced NHOs remains to be demonstrated.^{17,19} Recently, a Cre mouse model with the *Pdgfra* gene promoter was used to demonstrate that HOs induced by BMP-2-supplemented Matrigel³⁵ or by overexpressing the FOP-causing *ACVR1*^{R206H} mutant³⁶ originated from mesenchymal cells expressing platelet-derived growth factor receptor- α (PDGFR α). However, while relevant models of FOP, artificial expression of osteogenic *ACVR1*^{R206H} or *ACVR1*^{Q207D} mutants or artificial overexpression of a BMP transgene or implantation of BMP-containing scaffolds utilized in these studies above are of little biological and clinical relevance to acquired NHOs developing after severe CNS injuries because NHOs occur with high prevalence in genetically normal patients of a broad range of ethnicities. In a mouse model of traumatic HOs

induced by body burn and tenotomy and a model of FOP generated by induced Cre recombinase activation of the *ACVR1*^{Q207D} activating mutation, it was found that both burn-induced HOs in the tendon and subcutaneous FOP-induced HOs were derived from *Prrx1* gene-expressing mesenchymal progenitors.³⁷ However, these HO models do not involve severe CNS trauma, which defines and triggers NHOs.^{17,19} Furthermore, while FOP flare-ups develop in many different types of tissues associated with muscles (e.g., skeletal muscles, tendons, ligaments, fascia, and aponeuroses),³⁸ possibly due to the dominant effect of activating mutations of *ACVR1*, NHOs are mostly intramuscular in otherwise genetically normal patients.¹ Therefore, which progenitor cells within skeletal muscles are the “cells of origin” for NHO development after SCI remains to be established. To do so, we crossed a Cre-inducible fluorescent Zoanthus green (ZsGreen) reporter mouse strain with either a strain with *Pax7-CreERT2*-enabled specific expression in SCs³⁹ or the *Prrx1-Cre* strain, which specifically expresses the Cre recombinase transgene in mesenchymal stem/progenitor cells under the control of the *Prrx1* gene enhancer.⁴⁰ Finally, we sorted CD56⁺ myogenic progenitors and PDGFR α -expressing mesenchymal progenitors from human skeletal muscle surrounding NHOs after surgical excision and studied their osteogenic differentiation in vitro and in vivo in an ectopic bone model in immunodeficient mice.

RESULTS

ZsGreen⁺ cells identify SCs and FAPs in the muscles of *Pax7-CreERT2* and *Prrx1-Cre* mice

To determine whether NHOs are derived from muscle SCs and FAPs, we first assessed the specificity and efficiency of ZsGreen reporter expression in the *Pax7-CreERT2*; *Rosa26-LoxP-STOP-LoxP-ZsGreen* mice (abbreviated as *Pax7*^{ZsG} thereafter) and the *Prrx1-Cre*; *Rosa26-LoxP-STOP-LoxP-ZsGreen* mice (abbreviated as *Prrx1*^{ZsG}) (Fig. 1a). CreERT2 was activated by daily gavage with tamoxifen for 4 days, after which mice were left to rest for an additional 2 weeks. The right hind limb hamstring muscle was then injected with cardiotoxin (CDTX) to cause muscle injury and initiate muscle regeneration. Fourteen days post-injury, muscles were harvested and dissociated for analyses of single muscle cell suspensions by flow cytometry (Fig. 1b). Within the CD45⁻ and hematopoietic lineage (Lin: Ter119, CD3 ϵ , CD45R, CD11b, Gr1)-negative nonhematopoietic cell gate, endothelial cells were identified as CD31⁺ and stem cell antigen-1 (Sca1)-positive, SCs were identified as CD31⁻ CD34⁺ Sca1⁻ integrin α 7 (ITGA7)⁺ PDGFR α ⁻ and FAPs were identified as CD31⁻ CD34⁺ Sca1⁺ ITGA7⁻ PDGFR α ⁺ (Fig. S1), in accordance with previous literature.^{23,25,41} The frequencies of SCs (CD31⁻ CD34⁺ Sca1⁻ ITGA7⁺ PDGFR α ⁻), FAPs (CD31⁻ CD34⁺ Sca1⁺ ITGA7⁻ PDGFR α ⁺) and endothelial cells (CD31⁺ Sca1⁺) were similar between the CDTX-injured and noninjured muscles in both the *Pax7*^{ZsG} and *Prrx1*^{ZsG} strains 14 days post-injury (Table S1).

We subsequently gated ZsGreen⁺ cells within the hamstring muscles of these mice (Fig. 1c). In the vehicle-injected muscles of the *Pax7*^{ZsG} mice, all ZsGreen⁺ cells had the typical SC phenotype (CD45⁻ Lin⁻ CD31⁻ CD34⁺ Sca1⁻ ITGA7⁺ PDGFR α ⁻) with no ZsGreen⁺ cells in the endothelial gate and very few in the FAP gate (Fig. 1d - PBS). In the CDTX-injured muscle, the distribution of ZsGreen⁺ cells was similar but with the emergence of CD45⁻ Lin⁻ CD34⁻ Sca1⁻ ITGA7⁺ PDGFR α ⁻ cells derived from ZsGreen⁺ SCs (Fig. 1d—CDTX). These cells are likely differentiating myoblasts.

Conversely, in the vehicle-injected contralateral muscle of the *Prrx1*^{ZsG} mice, most ZsGreen⁺ cells had the typical FAP phenotype with no ZsGreen⁺ cells in the endothelial gate and very few in the typical SC gate (Fig. 1e PBS). The phenotypes of ZsGreen⁺ cells were the same in the CDTX-injured muscle of the *Prrx1*^{ZsG} mice (Fig. 1e—CDTX).

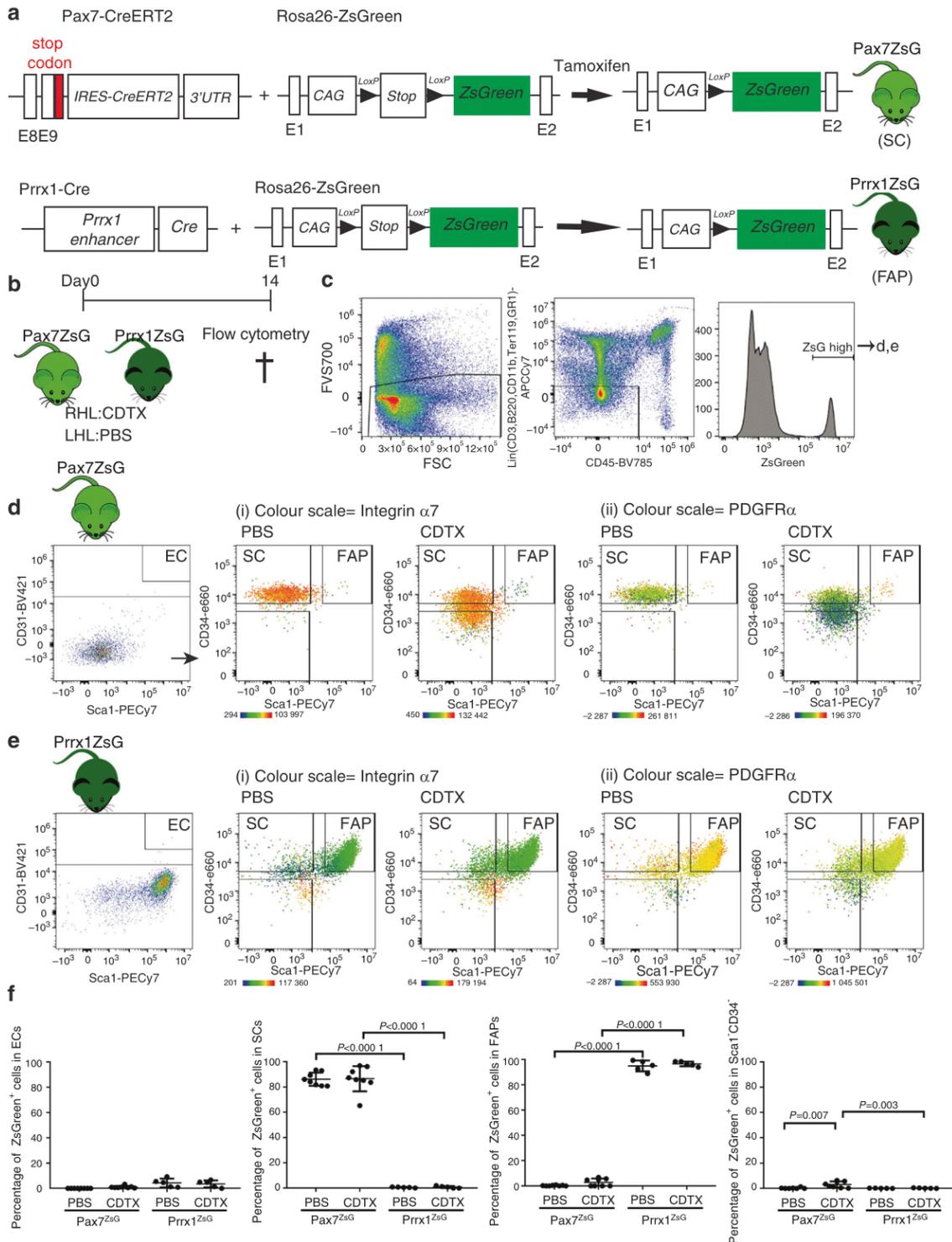


Fig. 1 ZsGreen labels SCs and FAPs in skeletal muscles of the Pax7^{ZsG} and Prrx1^{ZsG} mice, respectively. **a** Schematic representation of tamoxifen-inducible Cre-dependent ZsGreen reporter induction. **b** Pax7^{ZsG} ($n = 4/\text{group}$) and Prrx1^{ZsG} ($n = 3/\text{group}$) mice were injected with CDTX in the hamstring muscle of the right hind limb (RHL) and PBS in the hamstring muscle of the left hind limb (LHL). Muscle cells were isolated 14 days after injection and subsequently stained for surface cell markers. **c** After gating on forward/side scatters and FVS700 dead cell exclusion, ZsGreen-high cells were gated on Lin⁻ CD45⁻ nonhematopoietic population in both **(d)** Pax7^{ZsG} and **(e)** Prrx1^{ZsG} mice and further subgrouped into CD31⁺Sca1⁺(EC), CD31⁻Sca1⁻CD34⁺(SCs), CD31⁻Sca1⁺CD34⁺(FAPs), and Sca1⁻CD34⁺ populations. The color indicates the expression level of **(i)** integrin α 7 and **(ii)** PDGFR α . Yellow-orange: high expression. Green: low expression. **f** Frequencies of ZsGreen⁺ cells in Sca1⁺CD31⁺ ECs, CD31⁻Sca1⁻CD34⁺ ITGA7⁺ PDGFR α ⁻ SCs and CD31⁻Sca1⁺CD34⁺ ITGA7⁻ PDGFR α ⁺ FAP populations from muscles of the Pax7^{ZsG} and Prrx1^{ZsG} mice following the gating strategy in Fig. S1. Each dot represents a separate mouse, and bars are the mean \pm SD. The results of 8 mice per group were from 3 independent experiments performed over a period of 2 years with different flow cytometers. Significance was analyzed by one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test

In addition to the high specificity of these lineage tracing strategies, the recombination efficiency was also very high, with over 90% of SCs and FAPs labeled in the muscle of the *Pax7^{ZsG}* and *Prrx1^{ZsG}* strains, respectively (Fig. 1f). Importantly, Cre-mediated recombination in the *Pax7^{ZsG}* and *Prrx1^{ZsG}* mice did not affect subsequent NHO development compared to that in the C57BL/6 mice, as measured by microcomputerized tomography (μ CT) or hematoxylin-eosin staining, which clearly showed the presence of necrotic and fibrotic muscle together with inflammatory infiltrate and sporadic bony nodules 28 days after injury in both strains, as we previously reported in C57BL/6 mice^{13,20,21,42} (Fig. S2). Altogether, these experiments confirmed that ZsGreen was specifically expressed in the targeted muscle cell populations in both the *Pax7^{ZsG}* and *Prrx1^{ZsG}* strains without altering NHO development, thus illustrating their suitability for lineage tracing of SCs and FAPs in vivo.

NHOs are not derived from *Pax7*-expressing SCs

ZsGreen expression was then examined on frozen longitudinal sections of uninjured muscle, repaired muscle and NHOs from the *Pax7^{ZsG}* mice (Fig. 2a). In noninjured muscles from the *Pax7^{ZsG}* mice, ZsGreen was expressed in a discrete population of small cells distributed along myofibers typical of SCs (Fig. 2b). Some myofibers were also ZsGreen⁺, likely reflecting their natural turnover from ZsGreen⁺ SCs over a period of 4 weeks after tamoxifen induction. Fourteen days after CDTX-induced muscle injury, in the absence of SCI, all myofibers were ZsGreen⁺, as anticipated, illustrating muscle regeneration from ZsGreen⁺ SCs (Fig. 2c).

In the cohort of mice that underwent spinal cord transection (SCI) and CDTX-mediated muscle injury, frozen sections were stained with specific anti-collagen I [Fig. 2d(i-ii)] and anti-osteocalcin antibodies [Fig. 2d(iii-iv)]. An example of a nonimmune IgG negative control for anti-collagen I and anti-osteocalcin antibodies is shown in Fig. 2d(v). Immunohistofluorescence (IHF) confirmed ZsGreen⁺ cells within areas of regenerating muscle that contained neofomed ZsGreen⁺ myofibers. Most importantly, ZsGreen⁺ cells were largely absent among areas of fibrotic muscle and NHO nodules. ZsGreen⁺ cells were not intercalated among the collagen I⁺ bone matrix or osteocalcin⁺ osteoblasts on NHO nodules. Quantification of NHOs through four different *Pax7^{ZsG}* mice showed that none of the 44 osteocalcin⁺ NHOs contained ZsGreen⁺ cells (Fig. 2e). This finding demonstrates that NHOs following SCI are not derived from ZsGreen⁺ SCs.

NHOs are derived from *Prrx1*-expressing FAPs

ZsGreen expression was also examined on frozen longitudinal sections of uninjured muscle, repaired muscle and NHOs from the *Prrx1^{ZsG}* mice (Fig. 3a). In the uninjured muscle, reticulated ZsGreen⁺ cells were scattered in the interstitium along myofibers (Fig. 3b), a typical distribution and morphology of FAPs.²⁵ Importantly, in the regenerating CDTX-injured muscle (without SCI), ZsGreen⁺ cells were distributed similarly, and most importantly, they did not contribute to neofomation of myofibers (Fig. 3c), in concordance with the literature.²⁵

The *Prrx1^{ZsG}* mice that underwent SCI and CDTX-mediated muscle injury also developed NHOs (similar to *Pax7^{ZsG}* mice that underwent the same treatment) (Fig. S2). However, in sharp contrast to those of the *Pax7^{ZsG}* mice, all fibrotic areas in the SCI + CDTX-injured muscles of the *Prrx1^{ZsG}* mice were intensely labeled by ZsGreen, particularly around collagen I⁺ and osteocalcin⁺ NHO nodules [Fig. 3d(ii-x)]. We counted 30 osteocalcin⁺ NHOs from three *Prrx1^{ZsG}* mice, and all of them were intercalated with ZsGreen⁺ cells (Fig. 2e). At higher magnification, differentiating osteocalcin⁺ osteoblasts (red) were also ZsGreen⁺ [Fig. 3d(vii-x) circles], suggesting that NHOs are derived from *Prrx1*-expressing mesenchymal progenitor cells rather than SCs. To confirm that NHOs are formed from *Prrx1*-expressing FAPs and not by *Pax7*-expressing SCs,

we performed Fisher's exact test on all NHO nodules manually counted on tissue sections from 4 *Pax7^{ZsG}* mice and 3 *Prrx1^{ZsG}* mice (Fig. 2e). The absence/presence of ZsGreen in NHO nodules from these 2 strains was significantly different ($P < 10^{-4}$). An additional Fisher's exact test detected ZsGreen fluorescence in NHOs of 3 mice of the 3 *Prrx1^{ZsG}* mice containing NHOs, whereas ZsGreen was absent from all NHOs in the 4 *Pax7^{ZsG}* mice, which demonstrated that ZsGreen was differentially distributed in the NHOs from the two strains ($P = 0.0286$). Together, these results show that NHOs are derived from *Prrx1*-expressing mesenchymal progenitor cells but not from SCs.

Mesenchymal *Prrx1*⁺ cells do not circulate in blood after SCI

Parabiosis models have been previously used to track circulating cells that contribute to heterotopic ossifications (HOs). A ubiquitous green fluorescent protein (GFP) reporter mouse was joined with a wild-type mouse, with the wild-type mouse receiving Achilles tendon tenectomy and dorsal burn injury to induce HO formation. Circulating GFP⁺ cells from the GFP-expressing parabiont contributed to HO development in the wild-type parabiont 28 days after tenectomy and burn injury.⁴³ However, a more recent parabiosis study suggests otherwise: HO induced by inserting BMP2-supplemented Matrigel matrix did not contain cells derived from PDGFR α ⁺ FOPs recruited from the other parabiont via the shared circulation, suggesting that the cells of origin of BMP2-induced HOs are not recruited via the circulation.³⁵

To clarify the dichotomy of these two previous publications, we first investigated whether SCI activates the expression of osteogenic BMPs and BMP signaling in injured muscles. SCI did not increase the expression of *Bmp2*, *Bmp4* or *Bmp7* RNA in paraplegic hindlimb muscles (Fig. S3a). In contrast, either SCI or muscle injuries decreased the expression of osteogenic BMPs. We also investigated the effect of daily treatment with LDN-193189, a potent inhibitor of BMP type I receptor serine kinases that has been shown to be effective at inhibiting HO development in the mouse FOP model driven by the *ACVR1^{Q207D}* missense mutation⁴⁴ and in the burn-induced rat model of ossifying tendinopathy.⁴⁵ While LDN-193189 significantly inhibited mineralization of mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (BM-MSCs) cultured in osteogenic conditions (Fig. S3b), treatment of mice with LDN-193189 either in the first two weeks of the injury or during the maturation phase of NHOs between weeks 2 and 3 post-injury had no effect on NHO development (Fig. S3c-d). As BMPs are known to induce endochondral ossification, we stained sections of CDTX-injured muscles at days 7, 14 and 21 following SCI with safranin O to span the time course of NHO development in mice (Fig. S4). Although occasional mast cells brightly stained by safranin O could be detected in the developing NHO, there was no evidence of cartilage matrix in any NHO examined at any time point ($n =$ mice per time point). Therefore, unlike the *ACVR1^{Q207D}* FOP model and the burn-induced ossifying tendinopathy model, the BMP signaling inhibitor LDN-193189 was unable to reduce NHO development after SCI, suggesting that NHO development following SCI is not as BMP-dependent as the two other processes of HO development and does not involve endochondral ossification.

We next investigated whether *Prrx1*⁺ mesenchymal cells at the origin of NHOs could be derived from the circulation. As parabiosis experiments are forbidden for ethical reasons in Australia, we investigated whether ZsGreen⁺ cells were detectable in the circulation of *Prrx1^{ZsG}* mice 1, 2, 3 and 7 days following SCI and CDTX-mediated muscle injury (Fig. 4b, c). Flow cytometry of blood nucleated cells showed that there was a ZsGreen^{low} population that mostly included CD45⁺ CD11b⁺ F4/80⁺ monocytes and CD45⁺ CD11b⁺ F4/80⁻ populations (Fig. 4c), but the intensity of ZsGreen fluorescence in these phagocytes was two full log₁₀ units lower than the ZsGreen fluorescence intensity of FAPs in the

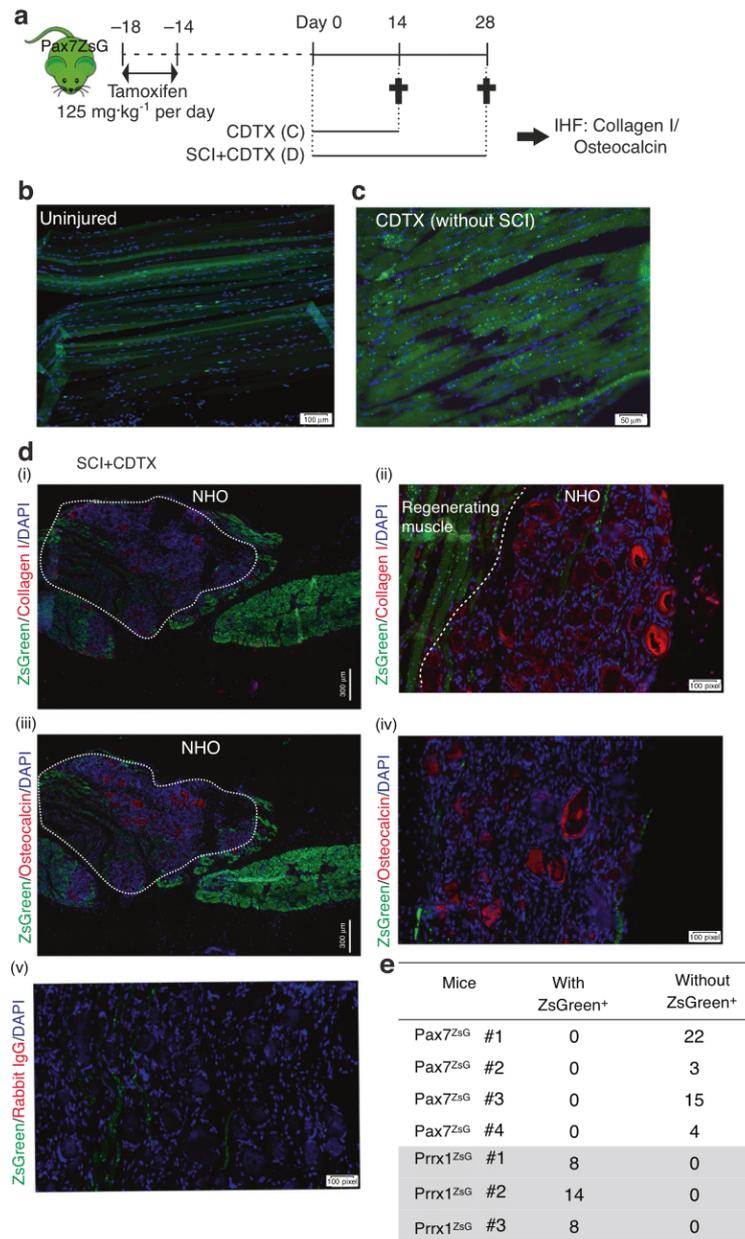


Fig. 2 NHOs are not derived from *Pax7* expressing SCs. **a** ZsGreen expression in *Pax7*^{ZsG} mice was induced by tamoxifen treatment for 4 days. Two weeks after tamoxifen treatment, the mice received an intramuscular injection of CDTX with or without SCI. Muscle samples were harvested 14 or 28 days post-injury. Representative IHF images illustrating the distribution of ZsGreen⁺ SC-derived cells in **(b)** uninjured muscle and **(c)** regenerated injured muscle 14 days post-CDTX injection in the *Pax7*^{ZsG} mice without SCI ($n = 3$ mice/group). Scale bars: **(b)** 100 μ m, **(c)** 50 μ m. **d** Representative images from the *Pax7*^{ZsG} mice with SCI and CDTX-mediated muscle injury 28 days post-surgery. **i** IHF staining illustrating that ZsGreen⁺ cells are present among areas of regenerating muscle and largely absent from areas of NHO development. White dashed lines indicate the boundary between regenerating muscle and fibrotic area containing NHOs stained red **(i–ii)** for collagen I and **(iii–iv)** osteocalcin. Nuclei were stained by DAPI staining (blue). A negative control was performed using rabbit isotype IgG **(iv)**. Scale bars: **(d)** **(i, iii)** 300 μ m, **(ii, iv, v)** 50 μ m. **e** Number of osteocalcin⁺ NHOs intercalated with ZsGreen⁺ cells or without ZsGreen⁺ cells in both *Pax7*^{ZsG} ($n = 4$ mice, total 44 osteocalcin⁺ NHOs counted) and *Prrx1*^{ZsG} mice ($n = 3$ mice, total 30 osteocalcin⁺ NHO counted). Statistical differences were determined using Fisher's exact test ($P < 10^{-4}$)

muscle (Fig. 4d). Therefore, it is likely that the low ZsGreen fluorescence of blood monocytes and granulocytes is due to phagocytosis of ZsGreen (possibly packaged in extracellular vesicles^{46,47}) produced by *Prrx1*-expressing mesenchymal progenitor cells and their progenies. Importantly, despite analyzing over 10^6 blood leukocytes per mouse, we could not detect any circulating CD45⁺ Lin⁻ CD31⁻ Sca1⁺ mesenchymal progenitor cells or cells with ZsGreen fluorescence intensity as high as FAPs in the muscle of the *Prrx1*^{ZsG} mice (Fig. 4b, d). As another potential

source of "mobilized" mesenchymal cells is the bone marrow, we transplanted 90 000 stromal cells enriched from the bone marrow of the *Prrx1*^{ZsG} mice by magnetic activated cell depletion of CD45⁺ leukocytes and Ter119⁺ erythroid cells using the EasySep mouse stromal cell enrichment kit (Stem Cell Technologies). Following this enrichment step, 11.7% of these bone marrow stromal cells were ZsG^{bright} with the classic CD45⁻ Lin⁻ CD31⁻ Sca1⁺ mesenchymal progenitor cell phenotype. These cells were transplanted i.v. into three C57BL/6 recipients 24 h post-SCI and

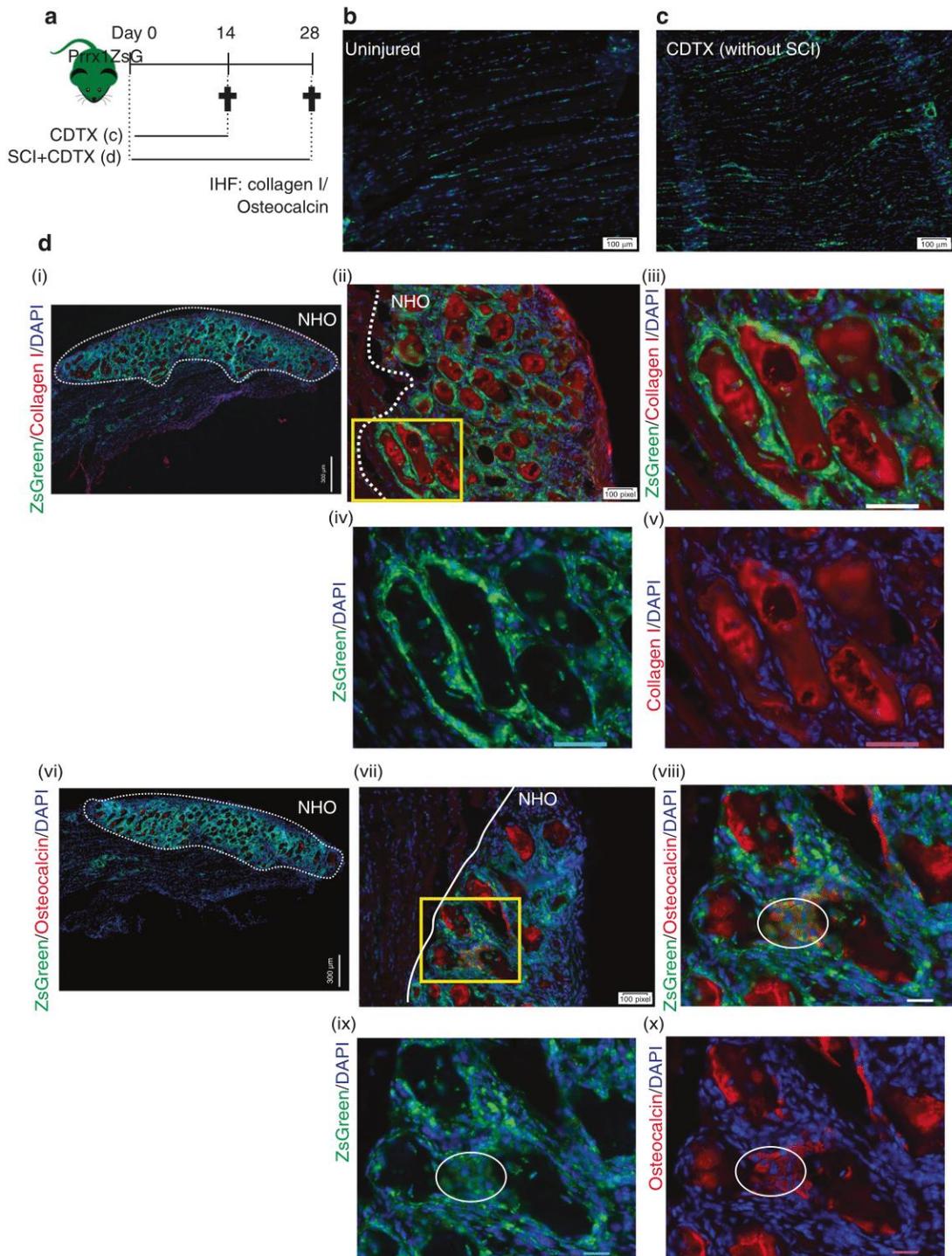


Fig. 3 NHOs are derived from *Prrx1* expressing FAPs. **a** *Prrx1*^{ZsG} mice received an intramuscular injection of CDTX with or without SCI, and muscle samples were harvested at the indicated time points and processed for IHF. Representative images illustrating the distribution of ZsGreen⁺ FAP-derived cells in **(b)** uninjured muscle and **(c)** regenerated injured muscle 14 days post-CDTX injection in the *Prrx1*^{ZsG} mice without SCI ($n = 3$ mice/group). **d** Representative images from the *Prrx1*^{ZsG} mice with SCI and CDTX-mediated muscle injury 28 days post-surgery: IHF illustrating the colocalization of ZsGreen⁺ FAP-derived cells with **(i–v)** collagen I⁺ matrix (red) or **(vi–x)** osteocalcin⁺ osteoblasts (red). **(iii–v)** are enlarged images of the yellow box in **(ii)**, whereas **(viii–x)** are enlarged images of the yellow box in **(vii)**. The white dashed line indicates the boundary between regenerating muscle and the fibrotic area containing NHOs. Nuclei stained in DAPI (blue). White circles indicate osteocalcin⁺ osteoblasts that also express ZsGreen. Scale bars: **(b, c)** 100 μm ; **(d)** (i) 300 μm (ii, vii) 100 μm (iii–v, viii–x) 50 μm

CDTX muscle injury of the recipients. Muscles were analyzed by histofluorescence 21 days later, and none of the CDTX-injured muscles contained any ZsGreen-positive cells (result not shown). Therefore, while we cannot completely exclude the possibility that some of the *Prrx1*-expressing ZsGreen⁺ cells associated with

NHOs following SCI may come from the circulation, these would be extremely rare compared to the abundance of *Prrx1*-expressing ZsGreen⁺ FAPs already present in the muscle prior to injury. Therefore, NHOs are most likely derived from muscle-resident FAPs.

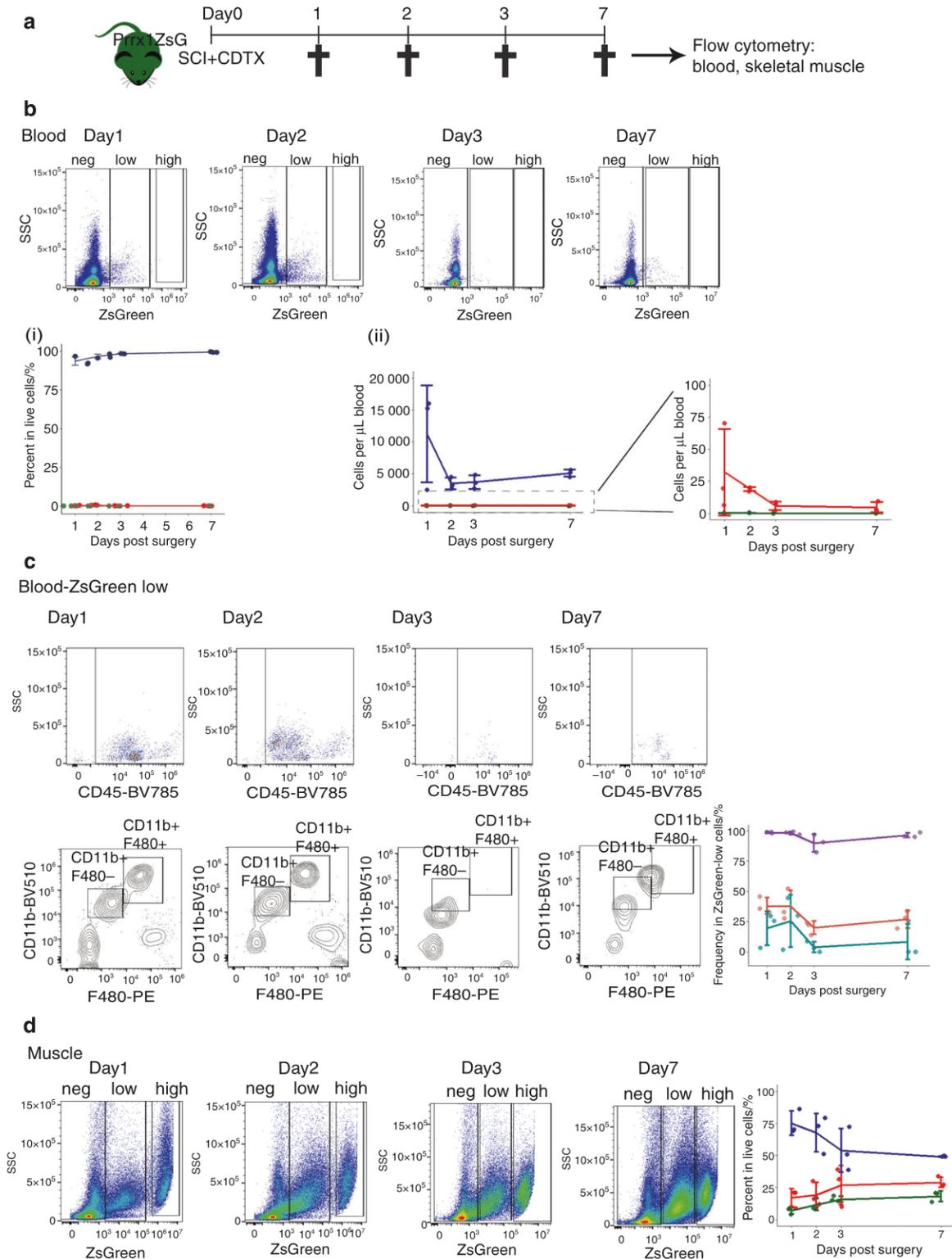


Fig. 4 Absence of ZsGreen^{high} mesenchymal cells in the circulation of the *Prrx1*^{ZsG} mice after SCI and muscle injury. **a** *Prrx1*^{ZsG} mice received SCI and an intramuscular injection of CDTX. Peripheral blood and skeletal muscles were collected at 1, 2, 3, and 7 days post-surgery and analyzed by flow cytometry ($n = 3$ mice/group). **b** FVS700⁻ live cells from peripheral blood were gated based on the intensity of ZsGreen fluorescence into ZsGreen negative (blue lines), low (red lines) and high groups (green lines). The frequency of these three populations is represented as **(i)** the frequency of live cells in blood and **(ii)** the number of cells per μ L blood. **c** The ZsGreen-low cells were further gated for expression of CD45, CD11b and F480. The frequency of CD45⁺ leukocytes (purple line), CD45⁺ CD11b⁺ F4/80⁺ monocytes (red line) and CD45⁺ CD11b⁺ F4/80⁻ granulocytes (blue line) among circulating ZsG^{low} cells was plotted. **d** Live cells from injured muscle from the same *Prrx1*^{ZsG} mice were used as a reference for ZsGreen fluorescence intensity, confirming the presence of numerous ZsGreen^{high} cells in muscle. ZsGreen negative (blue lines), low (red lines) and high (green lines). Each dot represents a separate mouse. Bars represent the mean \pm SD. There was no significant difference between the time points as determined by one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test

Spinal cord injury causes upregulated PDGFR α expression on FAPs regardless of muscle injury

To better understand the effect of SCI on muscle FAPs, we followed PDGFR α expression on muscle cells. Surprisingly, PDGFR α expression was significantly upregulated on CD45⁻ Lin⁻ CD31⁻ Sca1⁺ CD34⁺ FAPs at 7 and 14 days after SCI in both the CDTX-injured and contralateral noninjured muscles (Fig. S5a–c). However, no expression of PDGFR α was noted on CD45⁻ Lin⁻ CD31⁻ Sca1⁻ CD34⁺ SCs in any of the experimental conditions tested (Fig. S5d). Although it remains to be determined whether this upregulation of PDGFR α expression has a functional role in driving NHO development, this finding suggests that SCI can alter or reprogram FAP function, as shown by PDGFR α expression.

Spinal cord injury leads to reduced apoptosis and persistent proliferation of FAPs following muscle injury

Sequential induction of FAP proliferation followed by apoptosis is crucial for effective muscle repair, as either increased proliferation or decreased apoptosis can result in overexpansion of FAPs in the regenerating muscle, resulting in fibrosis.²⁷ To examine whether the dynamics of FAP proliferation and apoptosis are perturbed during NHO formation, we first compared by flow cytometry the frequencies of apoptotic cells within FAP and SC populations three days post-injuries, a time point at which FAP apoptosis peaks in the regenerating muscle²⁷ (Fig. 5a). We stained muscle cell suspensions with annexin V (AnnV) to detect the early stage of apoptosis together with nonmembrane permeable DNA dye 7-amino-actinomycin D (7AAD) to identify live cells (AnnV⁻ 7AAD⁻), apoptotic cells (AnnV⁺ 7AAD⁻) and postapoptotic dead cells (AnnV⁺ 7AAD⁺). Within the Lin⁻ CD45⁻ CD31⁻ Sca1⁺ CD34⁺ ITGA7⁻ FAP population, muscle injury alone (sham + CDTX) led to a 17% reduction in live FAPs and a 3.2-fold increase in apoptotic FAP frequency compared to that of naïve muscle, as previously reported²⁷ [Fig. 5a(i)]. However, in mice that had undergone SCI together with muscle injury, the frequencies of live and apoptotic FAPs were reversed and similar to those found in naïve mice. With respect to the Lin⁻ CD45⁻ CD31⁻ Sca1⁻ CD34⁺ ITGA7⁺ SC population, CDTX injury led to an 81% reduction in live SCs and a 2.6–2.7-fold increase in dead SCs regardless of the presence or absence of SCI [Fig. 5a(ii)].

We next measured muscle progenitor proliferation by in vivo 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation 14 days post surgeries. To ensure sufficient incorporation of BrdU into newly synthesized DNA during cell proliferation, we treated the mice with BrdU two days prior to tissue harvest. The percentage of proliferative BrdU⁺ FAPs was 4.08-fold higher in the SCI + CDTX group than in the sham + CDTX group [Fig. 5b(i)], while there was no significant difference in the proliferation of SCs [Fig. 5b(ii)]. These results confirm that SCI deregulates the coordinated proliferation and apoptosis of FAPs in injured muscles.

Human PDGFR α ⁺ cells from muscles surrounding NHOs support both in vitro and in vivo bone formation

To validate the involvement of muscle-resident mesenchymal cells in human NHO pathology, we collected surgical residues of NHOs after resection surgery in twelve patients with SCI, TBI and stroke. Cells were isolated from the muscle tissue surrounding the resected NHOs using mechanical dissociation and enzymatic digestion and expanded in culture. PDGFR α ⁺ and CD56⁺ cells were then isolated by fluorescence-activated cell sorting (Fig. 6a). The PDGFR α ⁺ population displayed a classical mesenchymal phenotype: CD31⁻ CD45⁻ CD73⁺ CD90⁺ CD105⁺ [Fig. 6b(i)]. Interestingly, PDGFR α ⁺ cells showed heterogeneous expression of CD34, a common marker of hematopoietic and angiogenic progenitor cells [from 2% to 46.1%; Fig. 6b(ii)]. As previously described,⁴⁸ CD56⁺ cells were

CD73⁺ CD90⁺ CD105⁺ [Fig. 6b(ii)] and expressed the myogenic regulatory transcription factors *MYF5* and *MYOD1* [Fig. 6b(iii)], whereas sorted PDGFR α ⁺ cells did not.

In vitro osteogenic differentiation assays showed that PDGFR α ⁺ cells exhibited a higher osteoblastic differentiation capacity than CD56⁺ cells (Fig. 6c), and osteogenic differentiation was enhanced by the addition of 100 ng·mL⁻¹ recombinant human OSM (Fig. 6c), a key inflammatory mediator of NHO formation, as we previously reported.²¹

We then investigated whether cells sorted from muscles surrounding human NHO were able to support in vivo heterotopic bone formation in immunodeficient mice. PDGFR α ⁺ and CD56⁺ cells were independently seeded into plasma-clotted hydroxyapatite/calcium phosphate scaffolds and implanted subcutaneously into the backs of nude mice (Fig. 7a). Unseeded plasma-clotted scaffolds were used as a negative control, and BM-derived mesenchymal stromal cell (BM-MSC)-seeded plasma-clotted scaffolds were used as positive controls. Fifteen weeks after implantation, scaffolds were collected for histological analysis. As expected, no bone tissue was observed in the control plasma group [Fig. S6a(i)], while all BM-MSC-seeded implants exhibited bone matrix and hematopoietic foci, as detected by hematoxylin, eosin and safranin staining (HES) [Fig. S6a(ii)]. Six of 11 implants (54.5%) with NHO muscle PDGFR α ⁺ cells showed mature bone matrix containing osteocytes together with a hematopoietic marrow, demonstrating the formation of ectopic bone with functional hematopoietic BM [Fig. 7b, c(i)], as evidenced by the presence of numerous mature megakaryocytes (Fig. S6b). In contrast, only 12.5% of scaffolds seeded with CD56⁺ cells contained bone matrix deposition alone, and 12.5% showed both bone matrix development and hematopoietic colonization [Fig. 7b, c(i)], suggesting a much higher osteogenic potential of PDGFR α ⁺ mesenchymal cells derived from human muscle surrounding NHOs. To analyze the origin of bone-forming cells in these implants, we investigated the expression of human-specific lamin A/C by immunohistochemistry. Figure 7c(ii) highlights that very few human cells were observed within CD56⁺ cell seeded scaffolds, whereas PDGFR α ⁺ cell seeded implants exhibited numerous human lamin A/C⁺ osteocytes within the bone matrix [Fig. 7c(ii)], demonstrating that human PDGFR α ⁺ cells actively participate in the formation of heterotopic bone. Of note, no human cells were detected within hematopoietic foci, confirming that hematopoietic cells that colonized these heterotopic bone formations were of murine origin (Fig. S6b). Finally, PDGFR α ⁺ cell implants exhibited numerous osterix⁺ osteoblasts; most of them were located near hydroxyapatite particles and within the bone matrix (Fig. 7d). Thus, mesenchymal PDGFR α ⁺ cells isolated from muscles surrounding human NHOs have a substantially higher capacity to support mature hemogenic bone formation than myogenic CD56⁺ cells. These data are concordant with the hypothesis that muscle-resident PDGFR α ⁺ cells are key actors in the onset of NHOs in both humans and mice.

DISCUSSION

Although NHOs develop mostly in peri-articular muscles in humans,^{1,2} their cellular origin remains unclear. Using *Pax7*^{ZsG} mice that specifically trace muscle SCs and their myogenic progenies, we clearly demonstrate that NHOs developing after SCI in injured muscles in mice are not derived from muscle SCs. We also reveal that NHOs only develop in areas of the injured muscle where SCs fail to regenerate myofibers, with NHOs only found in areas where ZsGreen-labeled SC-derived myocytes or myofibers are completely absent. Likewise, CD56⁺ muscle progenitors sorted from the muscles surrounding NHOs from SCI patients do not effectively generate ectopic bones when transplanted into permissive immunodeficient mice.

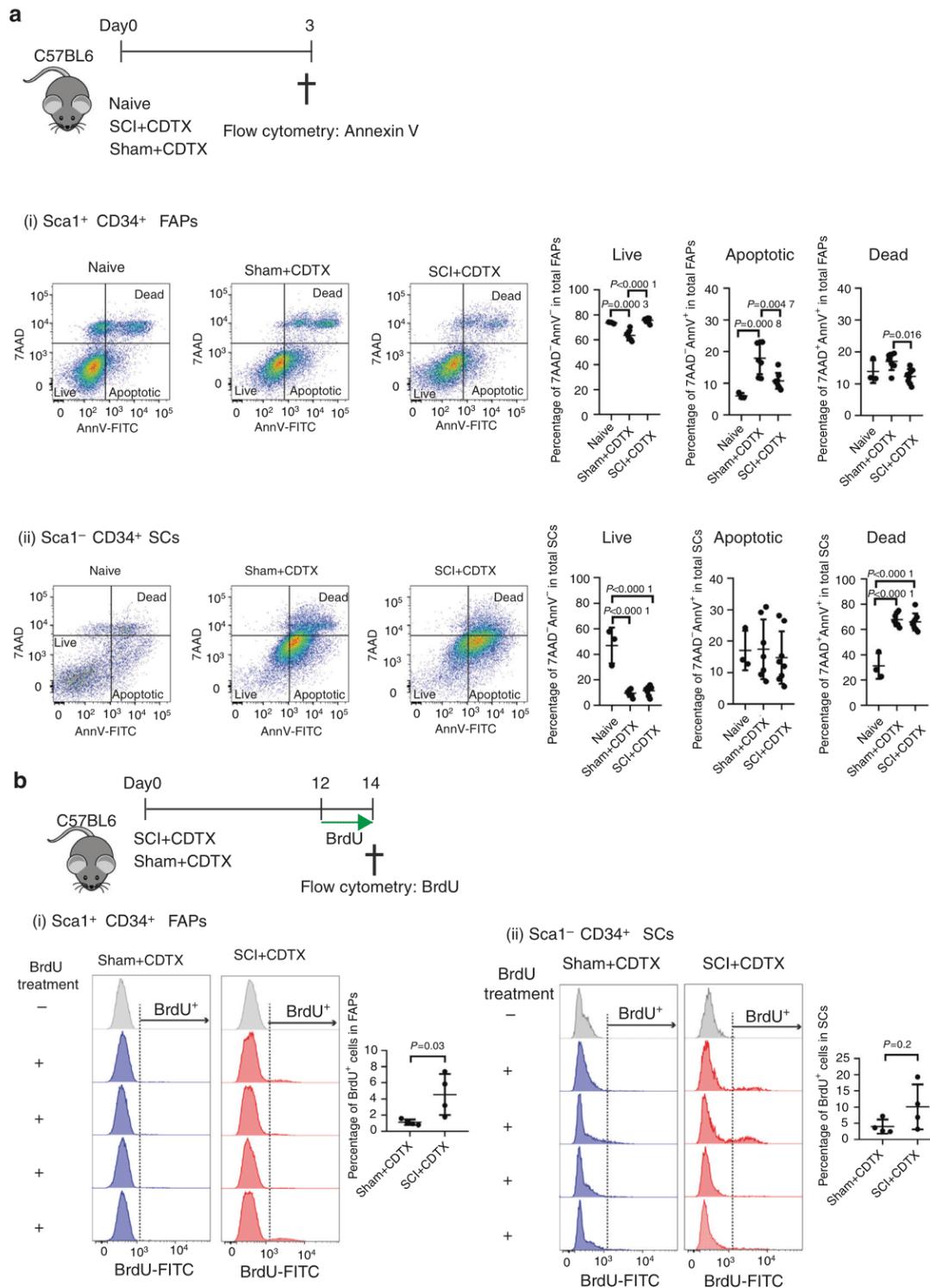


Fig. 5 SCI leads to decreased apoptosis and persistent proliferation of FAPs in injured muscles. **a** Naïve C57BL/6 mice underwent SCI or sham surgery plus intramuscular injection of CDTX. Muscle cells were isolated 3 days later. Apoptotic cells were subsequently analyzed by Annexin V (AnnV) and 7-amino-actinomycin D (7AAD) staining by flow cytometry. (i) CD45⁻ Lin⁻ CD31⁻ Sca1⁺ CD34⁺ ITGA7⁻ FAPs and (ii) CD45⁻ Lin⁻ CD31⁻ Sca1⁻ CD34⁺ ITGA7⁻ SCs were gated. AnnV and 7AAD staining further distinguished cells as live (7AAD⁻AnnV⁻), apoptotic (7AAD⁻AnnV⁺) and postapoptotic dead (7AAD⁺AnnV⁺) in both FAP and SC populations. The percentages of live, apoptotic and dead cells in the total FAP or SC populations are presented as the mean \pm SD ($n = 3, 7,$ and 8 in naïve, sham+CDTX, and SCI + CDTX, respectively). Each dot represents a separate mouse. Significance was calculated by one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test. **b** C57BL/6 mice underwent SCI or sham surgery plus intramuscular injection of CDTX. Mice were given drinking water containing BrdU together with BrdU i.p. injection (twice daily) from day 12 to 14. One SCI + CDTX and 1 sham+CDTX mouse were not treated with BrdU and used as a negative control for anti-BrdU staining. On day 14, muscle cells were isolated, and BrdU staining was analyzed in CD45⁻ Lin⁻ CD31⁻ Sca1⁺ CD34⁺ ITGA7⁻ FAPs and CD45⁻ Lin⁻ CD31⁻ Sca1⁻ CD34⁺ ITGA7⁻ SCs by flow cytometry. The percentage of BrdU⁺ cells in the total FAP or SC population is presented as the mean \pm SD. Each dot represents a separate mouse. Significance was calculated by a two-sided Mann-Whitney test

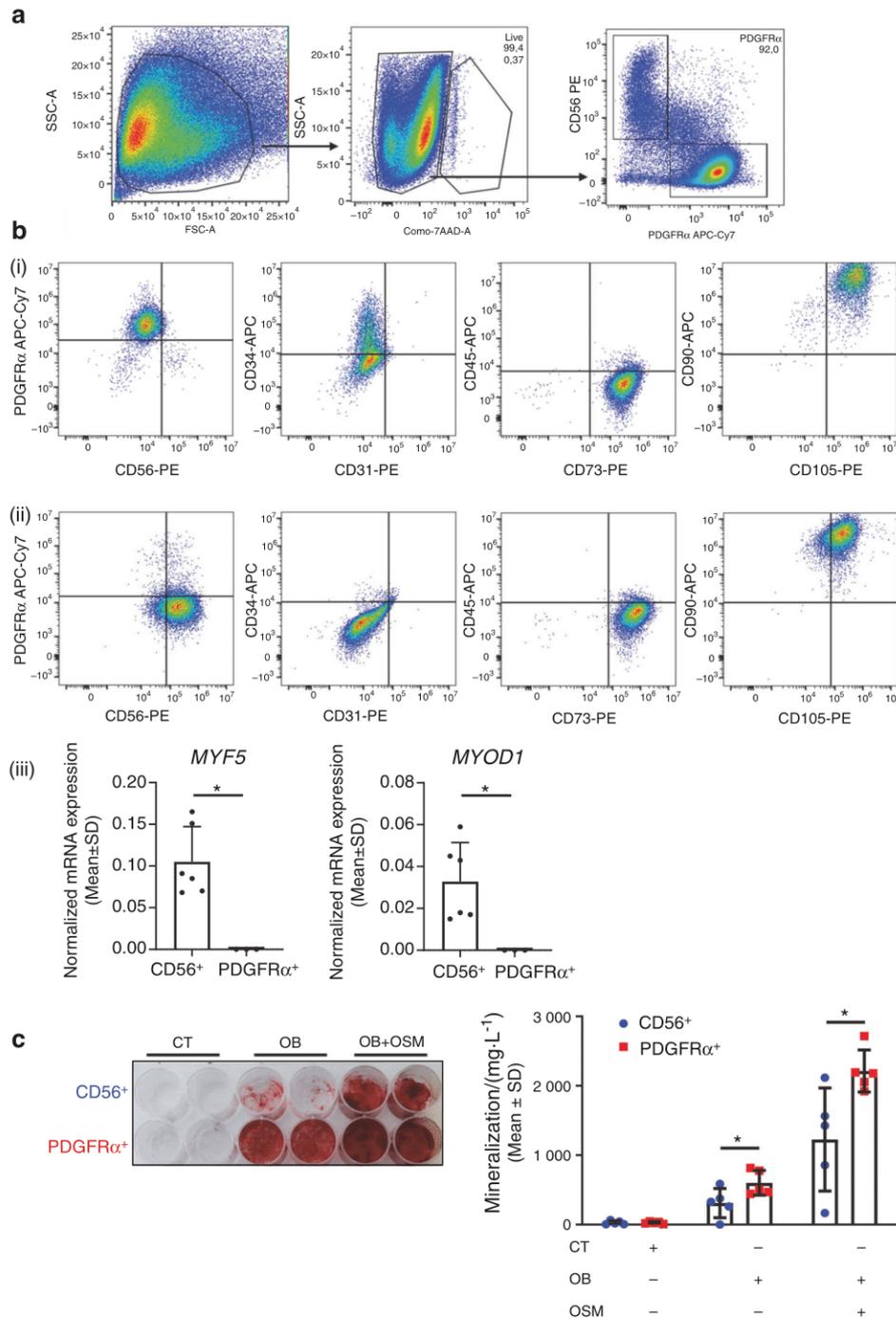


Fig. 6 Human PDGFR α^+ cells isolated from muscles surrounding NHOs support in vitro bone formation. **a** Flow cytometry gating strategy of PDGFR α^+ and CD56⁺ cell subpopulations isolated from muscle surrounding NHOs. **b** Representative surface marker characterization by flow cytometry: CD56, PDGFR α , CD31, CD34, CD45, CD73, CD90, and CD105, (i) CD56⁺ population, (ii) PDGFR α^+ population, (iii) Normalized mRNA expression of *MYF5* and *MYOD1* by qRT-PCR expressed as the mean \pm SD (CD56⁺ $n = 6$; PDGFR α^+ $n = 3$). **c** In vitro osteoblastic differentiation assay seeded with CD56⁺ or PDGFR α^+ cells isolated from muscles surrounding human NHOs. (i) All cells were cultured in control medium (CT) or osteogenic medium alone (OB) or were supplemented with human OSM (100 ng·mL⁻¹) (OB + OSM) for 14 days followed by Alizarin Red S staining. (ii) Quantification of calcium mineralization expressed as the mean \pm SD ($n = 5$). * $P < 0.05$, two-sided nonparametric Mann-Whitney U test

Therefore, although NHOs almost always develop in muscles, they are not the product of muscle SC transdifferentiation. In contrast, we found focal accumulation and osteoblastic differentiation of the *Prrx1*-expressing PDGFR α^+ mesenchymal progenitor cells among areas of NHO development in the *Prrx1*^{ZsG} mice. This finding suggests that SCI perturbs normal or early

proliferation followed by apoptosis of FAPs in the injured muscle with continued proliferation and absence of apoptosis of FAPs. High magnification of NHO sections in the *Prrx1*^{ZsG} mice also revealed that osteocalcin⁺ osteoblasts and osteogenic progenitors contained in the developing NHOs were labeled by ZsGreen and thus derived from the *Prrx1*-expressing mesenchymal

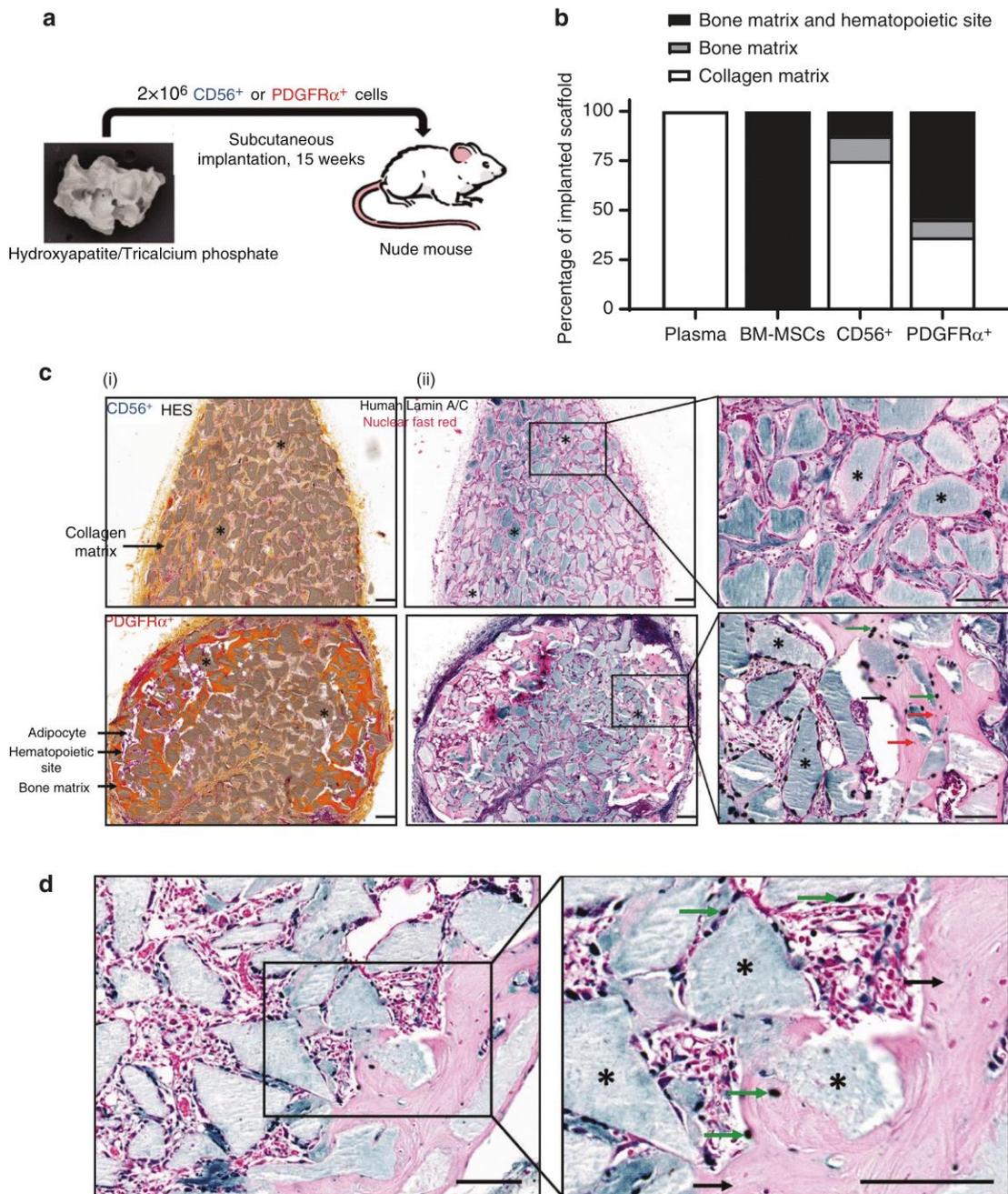


Fig. 7 Human PDGFR α ⁺ cells isolated from muscles surrounding NHO support in vivo bone formation. **a** Schematic representation of the in vivo osteogenic assay. Hydroxyapatite/calcium phosphate plasma scaffolds were seeded either with 2×10^6 CD56⁺ cells, 2×10^6 PDGFR α ⁺ cells sorted from muscles surrounding NHOs, 2×10^6 human BM-MSCs or without cells ("plasma" negative control) and subcutaneously implanted in the backs of nude mice for 15 weeks. **b** Percentage of scaffolds containing either collagen matrix alone, bone matrix alone, or bone matrix associated with hematopoietic colonization. Human plasma ($n = 4$ donors), BM-MSCs ($n = 6$ donors), CD56⁺ cells ($n = 8$; 4 donors, 2 implants/donor) and PDGFR α ⁺ cells ($n = 11$; 6 donors, 2 implants/donor for 5 donors and 1 implant for one donor). **c**(i) Representative images of hematoxylin-eosin-safranin (HES) staining of CD56⁺ and PDGFR α ⁺ cell-seeded implant sections. Nuclei are stained purple, cell cytoplasm is stained pink, and collagen fibers are stained orange. *: hydroxyapatite. Magnification 10X; scale bar = 100 μ m. **c**(ii) Specific human Lamin A/C staining of representative CD56⁺ and PDGFR α ⁺ cell-seeded implant sections. *: hydroxyapatite scaffold; black arrows: bone matrix; green arrow: human osteocytes; red arrows: mouse osteocytes. Magnification $\times 10$ and $\times 20$; scale bar = 100 μ m. **d** Osterix/SP7 staining of a representative PDGFR α ⁺ cell-seeded implant section. *: hydroxyapatite scaffold; black arrows: bone matrix; green arrows: osterix⁺ osteoblasts. Magnification $\times 20$ and $\times 40$; scale bar = 100 μ m

progenitor cells that shared the same antigenic profile as muscle FAPs. Likewise, over half of PDGFR α ⁺ mesenchymal progenitors sorted from the muscles surrounding NHOs from SCI patients effectively formed ectopic bones when transplanted into permissive immunodeficient mice. One of 8 preparations of CD56⁺ muscle progenitor cells from these NHO biopsies could

form ectopic bones with hematopoietic marrow when implanted in mice. Although it remains unclear whether this was caused by contaminating mesenchymal cells in the sorted population, our results suggest that in both mice and humans, NHOs are derived from mesenchymal progenitor cells and not from myogenic progenitor cells such as SCs.

The *Pax7Cre*^{ERT2} model we employed has been used by many groups to specifically target and trace SCs in muscles following injury,^{39,49,50} which validates our use of *Pax7*^{ZsG} in our study. While there is no marker that is exclusively restricted to muscle FAPs, it is well known that *Prrx1Cre* (often called Prx1-Cre) targets and labels mesenchymal stromal cells in the developing limb buds as well their progenies in adults.⁴⁰ *Prrx1Cre* mice have been successfully used to target mesenchymal progenitor cells in adult bone marrow⁵¹ and mesenchymal progenitor cell-derived chondroprogenitors, osteoprogenitors in bones, ligaments, tendons⁵² and adipocytes,⁵³ all of which are of mesenchymal origin.⁵⁴ Therefore, the mesenchymal specificity of the *Prrx1Cre* strain is well established. Herein, we show that in skeletal muscle, *Prrx1Cre* exclusively labels mesenchymal cells with the typical FAP phenotype (expressing CD34, Sca-1 and PDGFR α antigens at the cell surface but not ITGA7, which is specific to SCs in the muscle²⁵) both before and after muscle injury. Furthermore, these cells are reticulated and scattered along myofibers and do not form myofibers in the regenerating muscle, consistent with the known function of FAPs in coordinating muscle repair rather than forming new myocytes.^{25–29} Therefore, although *Prrx1Cre* targets many other mesenchymal cells in various tissues of the body, it exclusively labels FAPs in the noninjured skeletal muscle. From these considerations, we conclude that our lineage-tracing models establish that the cells of origin that form NHOs following SCI are mesenchymal progenitor cells, not muscle satellite cells.

Other studies using models of FOP,^{32,34} calcific tendinitis and HO subsequent to tenectomy⁴³ suggest that circulating mesenchymal progenitors contribute to HO formation. Therefore, we explored whether *Prrx1*-expressing cells circulate following SCI or muscle injury using *Prrx1*^{ZsG} mice. As parabiosis experiments are banned in Australia for ethical reasons, we instead tracked these cells by flow cytometry of the peripheral blood. No cells expressing high levels of ZsGreen or with a FAP phenotype were detected in the blood of the *Prrx1*^{ZsG} mice at multiple timepoints following SCI and muscle injury, whereas these ZsGreen^{high} cells were very abundant in both naive and injured muscles. Therefore, considering the high abundance of *Prrx1*-expressing FAPs in the muscle itself and their extreme rarity in the blood, it is very unlikely that NHOs following SCI are derived from circulating mesenchymal cells. Although our SCI-induced NHO model does not involve BMP signaling and endochondral ossification, our result is consistent with a report showing that in a model of HO induced by implantation of BMP-2 Matrigel, HOs are not derived from circulating mesenchymal progenitors but from local FAPs.³⁵

As lineage tracing experiments are not possible in humans, we attempted to validate our results from mice with NHO biopsies resected from patients with SCI and traumatic brain injury. We isolated progenitor cell populations from skeletal muscle residues surrounding these resected NHOs. Because of the small amount of muscle tissue on the surgical residues, adherent cells were amplified before and after sorting, possibly resulting in slight phenotypic changes. We sorted CD56⁺ cells known as myogenic progenitor cells.⁴⁸ Although they expressed CD90, CD105 and CD73 in culture, they were negative for PDGFR α and expressed the key myogenic regulatory transcription factors *MYF5* and *MYOD1*. Conversely, PDGFR α ⁺ cells had the classical mesenchymal cell phenotype, were CD56⁻ and did not express the myogenic regulatory factors *MYF5* or *MYOD1*. Therefore, human muscle CD56⁺ and PDGFR α ⁺ populations correspond to *Pax7*- and *Prrx1*-expressing SCs and FAPs in mice. In our in vitro osteogenic assay, PDGFR α ⁺ cells always had a higher osteogenic potential than CD56⁺ muscle progenitors, especially in the presence of the proinflammatory cytokine OSM. PDGFR α ⁺ cells were also more efficient in developing ectopic bones with human-derived osteocytes and osteoblasts and hematopoietic marrow when subcutaneously implanted in a conductive

biomaterial in immunodeficient mice. Our findings are consistent with a previous report that showed that although both populations displayed osteogenic potential in vitro, PDGFR α ⁺ cells had a far superior ability to form ectopic bones when transplanted on a supportive scaffold into immunodeficient mice, as previously reported.⁵⁵ Taken together, these results strongly support the mesenchymal and nonmyogenic origin of NHOs in patients with SCI.

Together, our lineage-tracing experiments suggest that NHO development subsequent to SCI is a pathology of the injured muscle, where muscle regeneration is deregulated with failure of muscle SCs to regenerate myocytes. We found that after SCI, fewer FAPs underwent apoptosis at day 3 following muscle injury, while FAPs continued to proliferate and incorporate BrdU even at days 12–14 post-injury. This finding suggests that subsequent to SCI, extensive and uncontrolled FAP survival, proliferation, and differentiation results in the formation of extensive fibrotic areas in which osteogenic differentiation leads to heterotopic bone formation rather than muscle repair. This finding suggests that severe CNS trauma, such as SCI, can reprogram FAPs in injured muscle, whereby the apoptotic process that occurs in proliferative FAPs to reduce their numbers back to baseline levels after muscle injury^{26,27,29} is impaired in the context of SCI. As a consequence, proliferating FAPs fail to undergo apoptosis and continue to accumulate in the injured muscle, which becomes fibrotic, followed by osteogenic differentiation of these FAPs into osteoblast-like cells, leading to the development of heterotopic bone tissue within injured muscles. From this perspective, we showed that SCI causes the selective upregulation of PDGFR α expression at the surface of muscle FAPs independent of the muscle injury itself, with no such effect on SCs. This finding is consistent with the observation that sciatic nerve transection also upregulates PDGFR α expression in denervated hindlimb muscle,²⁸ resulting in FAP accumulation and muscle fibrosis.^{28,56,57} While heterotopic ossifications were not reported in these CDTX-injured denervated hindlimbs,^{56,57} we have shown that in the presence of an SCI, denervation further increases NHO volumes.⁵⁸ Therefore, our data suggest that SCI reprograms FAPs in skeletal muscles, resulting in increased PDGFR α expression, reduced apoptosis and persistent proliferation in injured muscles. As PDGF and its receptors are prime survival and proliferative signals in mesenchymal cells, this may contribute to NHO development. This conclusion will need to be further confirmed in future work, and it will be of interest to identify which factors (neural or systemic) cause upregulation of PDGFR α expression on FAPs in response to SCI.

In conclusion, our lineage tracing experiments in mice and xenotransplantation of human muscle cells associated with NHOs reveal that NHO is a pathology of the injured muscle in which SCI reprograms FAPs in the damaged muscle with fibrotic hyperproliferation and osteogenic differentiation instead of apoptosis. Importantly, there was no transdifferentiation of muscle satellite cells. These findings clarify the question of the cells of origin of NHOs, demonstrating for the first time that severe CNS traumas can reprogram FAPs in skeletal muscles. This new knowledge may provide new therapeutic opportunities to reduce NHO development in victims of severe CNS traumas.

MATERIALS AND METHODS

Animal ethics and sources

All experimental procedures in mice were approved by the Health Sciences Animal Ethics Committee of The University of Queensland and followed the Australian Code of Practice for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes. In vivo osteogenic assays in nude mice were approved by the French Institutional Animal Care and Use Committee CAPSUD/N°26 under ethics approval #9516/2017040715214163. C57BL/6 mice were obtained from the Animal Resource Center (Perth, Australia).

Lineage tracing animal models

B6.Cg-*Pax7*^{tm1(Cre/ERT2)Gaka/J}, B6.Cg-Tg(*Prrx1-cre*)1Cjt/J and B6.Cg-Gt(*ROSA*)26Sor^{tm6(CAG-ZsGreen1)Hze/J} mice were purchased from the Jackson Laboratory. The B6.Cg-Gt(*ROSA*)26Sor^{tm6(CAG-ZsGreen1)Hze/J} reporter strain (or *ROSA26-LoxP-STOP-loxP-ZsGreen*) has a CAG promoter-driven floxed STOP codon cassette ZsGreen cassette knocked into the *ROSA26* gene trap locus; therefore, ZsGreen is only expressed once recombined by Cre recombinase. To specifically trace SCs, we selected B6.Cg-*Pax7*^{tm1(Cre/ERT2)Gaka/J} (in brief *Pax7-CreERT2*) mice in which Cre recombinase is fused with a mutant estrogen receptor (CreERT2) fusion protein sequence that makes it tamoxifen-inducible and knocked-in together with an intraribosomal entry site downstream of the stop codon of the *Pax7* gene, which is specifically expressed in SCs.³⁹ *Pax7*^{ZsG} mice were generated by crossing *Pax7-CreERT2* with *ROSA26-LoxP-STOP-loxP-ZsGreen* mice (Fig. 1a). The primers and PCR conditions for genotyping are detailed in Table S2. CreERT2 nuclear translocation and subsequent ZsGreen expression by excision of the floxed STOP cassette in *Pax7*^{ZsG} mice was induced by daily oral gavage with tamoxifen 125 mg·kg⁻¹ for 4 days followed by a 2-week rest prior to surgery or CDTX intramuscular injection. To trace FAPs, we selected B6.Cg-Tg(*Prrx1-cre*)1Cjt/J transgenic mice (in brief *Prrx1-Cre*), in which Cre recombinase expression is controlled by the *Prrx1* promoter/enhancer specifically expressed in mesenchymal stem and progenitor cells. *Prrx1*^{ZsG} mice were generated by crossing *Prrx1-Cre* males with *ROSA26-LoxP-STOP-loxP-ZsGreen* female mice. The genotype of *Prrx1-ZsGreen* mice was confirmed by PCR as recommended by the Jackson Laboratory.

Mouse model of SCI-induced NHOs

For induced NHO formation, 5- to 8-week-old female mice underwent spinal cord transection surgery (SCI) at T11-13 or control sham surgery (surgical incisions were only created on skin and muscle without damaging the spinal cord) followed by an intramuscular injection (i.m.) of 0.32 mg·kg⁻¹ purified *Naja pallida* CDTX (Latoxan, France) or an equal volume of sterile phosphate buffered saline (PBS).²⁰ Mice were euthanized by CO₂ asphyxiation at the indicated time points. Hamstring muscle samples were processed for flow cytometry or histological analysis as stated below.

Flow cytometry

Single cells from hamstring muscles were isolated using a skeletal muscle dissociation kit (Miltenyi Biotec) and GentleMACS Dissociator tissue homogenizer (Miltenyi Biotec, Macquarie Park, Australia) as previously described.²⁰ Blood samples were collected by terminal cardiac puncture 1, 2, 3 and 7 days post-surgery in heparinized tubes under anesthesia (2%–3% isoflurane). Red blood cells were lysed in 150 mmol·L⁻¹ NH₄Cl, 10 mmol·L⁻¹ NaHCO₃, and 1 mmol·L⁻¹ EDTA, pH = 7.4 buffer, with mixing, and the remaining cells were washed again in PBS containing 10% newborn calf serum (NCS) and 2 mmol·L⁻¹ EDTA prior to staining.

For characterization of ZsGreen⁺ SC-derived cells and ZsGreen⁺ FAP-derived cells, single cell suspensions were stained with monoclonal antibodies for surface markers: biotinylated anti-lineage (CD3ε, CD11b, B220, Gr1, Ter119) and streptavidin-APCCy7, CD45-BV785, CD31-BV421, CD34-e660, anti-Sca1-PECy7, anti-PDGFRα-BB700, anti-ITGA7-PE and Fixable Viability Stain 700 (FVS700). For PDGFRα expression analysis in C57BL/6 mice, cells were stained for the surface markers with anti-Ter119-FITC, CD45-BV785, CD31-BV421, CD34-e660, anti-Sca1-PECy7, anti-PDGFRα-PE and FVS700. For mesenchymal stem cell mobilization, cells were stained with anti-lineage (CD3, B220, Ter119)-PerCpCy5.5, CD45-BV785, CD11b-BV510, F4/80-PE, CD31-BV421, CD34-e660, and Sca1-PECy7 (antibodies detailed in Table S3). Flow cytometry analysis was performed using a CytoFlex flow cytometer equipped with 405 nm, 488 nm, 561 nm and 640 nm solid-state lasers (Beckman Coulter) or alternatively with a CyAn flow cytometer equipped with 405 nm, 488 nm and 640 nm solid-state lasers. Data analysis was performed

using FlowJo v10.6.1 software following compensation with single color controls.

MicroCT analyses

NHO volumes were measured in vivo in the Inveon PET-CT multimodality system (Siemens Medical Solutions, Inc.). Mice were anesthetized with a 2% isoflurane oxygen mixture. The parameters used were as follows: 360° rotation, 180 projections, 80 kV voltage, 500 μA current, and effective pixel size 36 μm. After 3D image reconstruction, NHO volume was quantified in the Inveon Research Workplace (Siemens Medical Solutions, Inc.) as previously described.^{20,42}

Histological analyses of mouse muscles

Dissected muscle was fixed in 4% paraformaldehyde for 24 h followed by decalcification in 14% EDTA for 4 days. The solution was replaced with 10%, 20% and 30% sucrose/PBS every 24 h. Muscles were mounted in optimum cutting temperature compound (OCT), frozen in isopentane in liquid nitrogen and stored at -80 °C. Muscle samples were sectioned at 8 μm using a Leica Cryostat CM1950. Every 8th section was stained with hematoxylin & eosin and examined for the presence of heterotopic ossification (HO). Slides consecutive to those with confirmed HO were subsequently subjected to immunofluorescence staining. After antigen retrieval with mild Proteinase K digestion (50 μg·mL⁻¹ Proteinase K (Ambion) for 2 min), the sections were incubated for 10 min in PBS-Triton 0.5% and subsequently blocked for 1 h with 10% FBS/10% NGS in 0.1% Tween 20 Tris-HCl buffered saline (TBS-Tween 0.1%). The sections were incubated with primary antibodies (collagen type I (US Biological C7510-13), osteocalcin (EnzoLife Sciences ALX-210-333) or rabbit IgG control (Thermo Fisher 31235) diluted to 1 μg·mL⁻¹ in TBS-Tween 0.1% for 1 h at room temperature. The sections were washed with TBS-Tween 0.1%, incubated with biotin-labeled goat-anti-rabbit IgG secondary antibody (Vector Labs) for 20 min, washed and incubated with Alexa Fluor 647-labeled streptavidin (Thermo Fisher) for 20 min. After counterstaining with 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) at 0.5 μg·mL⁻¹ in TBS-Tween 0.1%, the sections were mounted with ProLong™ Gold Antifade Mountant mounting medium (Thermo Fisher). Images of histological stains were captured at 20X magnification using an Olympus VS120 Slide scanner Microscope. Fluorescent images were captured on a Perkin Elmer Vectra III Spectral Scanner Microscope and spectrally unmixed using InForm software (Perkin Elmer) or an Olympus BX63 Upright Epifluorescence microscope. The number of osteocalcin⁺ NHO nodules was counted in both *Pax7*^{ZsG} (n = 4) and *Prrx1*^{ZsG} (n = 3) mice. Two sections from the same mice (>120 μm apart) were stained, quantified and recorded in relation to the presence or absence of ZsGreen⁺ cells.

Inhibition of BMP-2 signaling by LDN-193189 in vitro

Bone marrow mesenchymal cells²¹ were seeded in a 96-well plate (1.5×10³ cells per well) and maintained in αMEM + 20% FCS + 1% PSG until reaching confluence. The medium was then replaced with osteogenic medium [αMEM + 20% FCS + 1% PSG containing β-glycerophosphate (10 mmol·L⁻¹), phospho-ascorbic acid (200 μmol·L⁻¹), CaCl₂ (2 mmol·L⁻¹) and dexamethasone (0.2 μmol·L⁻¹)] and recombinant human BMP-2 (100 ng·mL⁻¹) with additional LDN-193189 at 10, 100, 1 000 nmol·L⁻¹ or an equivalent volume of dimethyl sulfoxide vehicle. The medium was refreshed every 3 days. Mineralization on day 7 was quantified using Alizarin Red staining.²¹ In brief, cells were washed with PBS and fixed in 4% paraformaldehyde for 30 min. After removal of the fixative, the cells were air-dried overnight, stained with 1% Alizarin Red S solution at RT on a shaker for 5-10 min, washed with PBS and air-dried overnight. Staining was dissolved in 10% cetylpyridinium chloride (CPC) containing sodium phosphate (10 mmol·L⁻¹) pH 7.0 at RT on a shaker for 15 min and transferred to a new 96-well plate to measure absorbance at 562 nm using a Thermo Fisher Multiskan reader.

Mouse muscle RNA extraction and qRT-PCR

Female C57BL/6 mice underwent SCI or sham surgery followed by i. m. injections of CDTX or PBS. Four days after surgery, hamstring muscle samples were harvested and snap frozen in liquid nitrogen. Frozen muscle was homogenized in TRIzol with an IKA T10 basic homogenizer on ice for 30 seconds 3 times with 10 second intervals followed by incubation at RT for 30 min. Tissue debris was removed after centrifugation at 12 000 × g, and the supernatant was transferred to fresh tubes and mixed with a 1/5 volume of chloroform. After centrifugation at 12 000 × g and 4 °C for 15 min, the aqueous phase was transferred to a fresh tube, and RNA was precipitated by isopropanol, washed in 75% ethanol, air-dried and dissolved in RNase/DNase-free water. RNA was quantified using a Nanodrop system (Thermo Scientific). cDNA was synthesized using a SeniFast cDNA synthesis kit following the manufacturer's instructions. mRNA expression was analyzed using a single-step reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) TaqMan system. The reaction was prepared following the instructions of TaqMan™ fast PCR Master Mix and *Bmp2*, *Bmp4*, *Bmp7* and *Rps20* assays (Table S4). Reactions were read using an Applied Biosystems Viia7 Real-time PCR system. Ct values were normalized by the expression of the housekeeping gene *Rps20* and are presented as ratios to that of housekeeping genes.

In vivo LDN-193189 treatments

C57BL/6 mice underwent SCI and CDTX intramuscular injection as indicated above on day 0. Mice were treated with vehicle (6% DMSO in PBS) or LDN-193189 (30 mg·kg⁻¹) via intraperitoneal (i.p.) injection twice daily from days 0-14 or days 14-21, which is effective in reducing HO volumes in a mouse model of FOP driven by the *ACVR1^{O207D}* missense mutation.⁴⁴ Animals were randomly allocated to the vehicle or treatment groups after surgery (while the animals were still under anesthesia) but prior to treatment commencements. Therefore, grouping was not affected by recovery from surgery.

In vivo FAP apoptosis measurement

Mice underwent SCI or sham surgeries and CDTX injection and, samples were harvested 3 days post-surgery. Muscle cells were isolated as described above followed by surface marker staining: biotinylated anti-lineage (CD3ε, CD5, B220, CD11b, Gr1, Ter119), CD45-BV785, CD31-BV421, CD34-e660, Sca1-PECy7 and anti-ITGA7-PE antibodies followed by streptavidin (SAV)-BUV395. After surface marker staining, the cells were washed in 1X PBS and then binding buffer (10 mmol·L⁻¹ HEPES pH=7.4, 150 mmol·L⁻¹ NaCl, 5 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 5 mmol·L⁻¹ KCl, 1.8 mmol·L⁻¹ CaCl₂). Next, the cells were stained with Annexin V-FITC (1/50 dilution) in annexin binding buffer at RT for 20 min. After excess Annexin V was washed away, the cells were resuspended in Annexin binding buffer, and a 1/5 volume of 7AAD was added to the kit. Flow cytometry analysis was performed using a BD LSR Fortessa X20 cytometer equipped with 355 nm, 405 nm, 488 nm, 561 nm and 640 nm solid-state lasers.

In vivo FAP proliferation measurement by BrdU incorporation

For measurement of in vivo FAP proliferation during NHO development, mice underwent SCI or sham surgeries and CDTX injection. Two days prior to tissue harvest at day 14 post-surgery, the mice were given drinking water containing 0.5 mg·mL⁻¹ BrdU (Sigma-Aldrich cat# B5002) together with twice daily i.p. injection of BrdU for the last 2 days before tissue sampling. One mouse from the SCI + CDTX group and one mouse from the sham+CDTX group were not treated with BrdU and used as a negative control for BrdU staining.

Muscle cells were isolated as described above followed by surface marker staining: anti-lineage (CD3ε, CD5, B220, CD11b, Gr1, Ter119)-Pacific blue, CD45-BV785, CD31-PE, CD34-e660, and anti-Sca1-PECy7. The cells were then fixed and permeabilized using a BrdU flow kit (BD Pharmingen, cat# 559619) following the manufacturer's instructions. The fixed cells were then treated with DNase I (13 μg

per 1–2 × 10⁶ cells) in DNase reaction buffer (10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 0.5 mmol·L⁻¹ CaCl₂, 2.5 mmol·L⁻¹ MgCl₂ in PBS, pH 7.4) at 37 °C for 1 h. BrdU incorporation in DNA was labeled with anti-BrdU-FITC monoclonal antibody in buffer containing 10 μg·mL⁻¹ blocking mouse IgG at RT for 1 h. The cells were then washed and analyzed by flow analysis using a BD LSR Fortessa X20 cytometer.

Isolation of human BM-MSCs, PDGFRα⁺ and CD56⁺ cells

All NHO and muscle samples were obtained with the informed consent of the patients and approval from the People's Protection Committee (CPP approval n°09025) and from the National Commission for Informatics and Liberties (CNIL approval n° Eyo1066211J). NHO biopsies were taken from the hips of 12 patients whose characteristics are provided in Table 1.

Muscle surrounding NHOs was collected from NHO surgical waste following their excision from patients with brain injuries, spinal cord injuries or strokes. NHO resection surgeries were performed at Raymond Poincaré Hospital (Garches, France). Muscle fragments were minced using a scalpel and small scissors, placed in a 50 mL Falcon tube and incubated in 1.5 mg·mL⁻¹ pronase (#10165921001 Sigma-Aldrich) in α-MEM for 45 min in a 37 °C water bath. After the addition of α-MEM supplemented with 15% FCS and 1% antibiotics, the cell suspension was filtered through a 100 μm cell strainer followed by a 40 μm cell strainer (BD Falcon). Isolated muscle progenitor cells (MPCs) were maintained in α-MEM supplemented with 15% FCS, 1% antibiotics and 10 ng·mL⁻¹ basic fibroblast growth factor (bFGF) (R&D Systems). Human MPCs were trypsinized and incubated for 30 min with biotinylated anti-human PDGFRα (R&D system) and CD56-PE (clone B159, BD Pharmingen) monoclonal antibodies in PBS with 2% FCS and 2 mmol·L⁻¹ EDTA. The cells were washed and incubated for 30 min with streptavidin-APC/Cy7 and the viability dye 7-AAD (Sony). The cells were washed and filtered through a 30 μm cell strainer (Sysmex) and sorted using a FACSaria III SORP sorter (BD Biosciences). PDGFRα⁺ and CD56⁺ cells were seeded at 3 000 per cm² in α-MEM supplemented with 20% FCS, 1% antibiotics and 10 ng·mL⁻¹ bFGF (R&D Systems).

BM-MSCs were isolated by plastic adhesion and expanded to 70%–80% confluence in α-MEM supplemented with 10% FCS and 1% antibiotics. Cells were subsequently seeded at 4 000 per cm².

Flow cytometry phenotyping of human PDGFRα⁺ and CD56⁺ cells PDGFRα⁺ and CD56⁺ cell suspensions (passages 4 and 5) were stained with monoclonal antibodies against the surface markers CD31-PE, CD34-APC, CD45-APC, CD73-PE, CD90-APC, and CD105-PE (Table S3). Flow cytometry analysis was performed using a

Table 1. Patient information

Patient #	Sex	Age/year	Trauma	NHO location
1	M	33	SCI	Hip
2	F	28	TBI	
3	M	35	TBI	
4	M	26	SCI	
5	M	35	TBI	
6	M	52	TBI	
7	M	65	SCI	
8	F	72	Stroke	
9	F	47	Stroke	
10	M	48	TBI	
11	F	63	TBI	
12	F	71	TBI	

M male, F female, SCI spinal cord injury, TBI traumatic brain injury

CytoFlex flow cytometer (Beckman Coulter). Data analysis was performed using FlowJo v10.6.1 software following compensation with single color controls.

qRT-PCR of human PDGFR α ⁺ and CD56⁺ cells
PDGFR α ⁺ and CD56⁺ cells (passages 3 to 5) were lysed in QIAzol (Qiagen) followed by chloroform/isopropanol total RNA extraction. Reverse transcription was performed using a Reverse Transcriptase Core Kit (Eurogentec). qRT-PCR was performed on a LightCycler 480 instrument (Roche) using a QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit and QuantiTect Primers (Qiagen). Three housekeeping gene mRNAs (*GAPDH*, *PPIA*, *HPRT*) were selected based on their expression stability using geNorm analysis. *MYF5* and *MYOD1* quantification was performed as the geometric mean of the quantifications obtained with each reference RNA.

In vitro osteogenic differentiation and quantification of mineralization of human cells

PDGFR α ⁺ and CD56⁺ cells were seeded in 24-well plates at 3 000 per cm² in α -MEM supplemented with 10% FCS and 1% antibiotics. Once the cells adhered to the wells, the medium was replaced by α -MEM supplemented with 10% FCS, 1% antibiotics and 0.052 μ g·mL⁻¹ dexamethasone, 12.8 μ g·mL⁻¹ ascorbic acid, and 2.15 mg·mL⁻¹ β -glycerophosphate (Sigma-Aldrich) to induce osteogenic differentiation. Human recombinant OSM was added at 100 ng·mL⁻¹ (Miltenyi Biotec). The cells were cultured for 14 days at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere, and the medium was changed twice a week. Quantification of mineralization was performed using Alizarin Red S staining. The cells were washed with PBS, fixed in 70% ethanol, quickly washed with distilled water and incubated for 5 min in 20 g·L⁻¹ Alizarin Red S, pH = 4.2 (Sigma-Aldrich). The cells were washed with distilled water and dried. Alizarin Red S dye was extracted with 0.5 mol·L⁻¹ hydrochloric acid and 5% SDS and quantified by spectrophotometry at 405 nm.

In vivo osteogenic assays with human cells

Subconfluent human BM-MSCs and PDGFR α ⁺ and CD56⁺ cells (2–3 amplification passages) were collected for subcutaneous implantation into the flanks of 10-week-old male nude mice (Janvier Labs). Implants were prepared by mixing 2 \times 10⁶ cells with sterile 80–200 μ m particles (60% hydroxyapatite/40% β -tricalcium phosphate) (Graftys) and 100 μ L of human plasma in a 1 mL syringe as described.⁵⁹ Control “plasma implants” did not contain cells. Ten microliters of 2% CaCl₂ in water was added to induce coagulation. Fifteen weeks after implantation, animals were euthanized, scaffolds were collected and fixed in 4% paraformaldehyde overnight at 4 °C. The following day, scaffolds were washed with PBS and decalcified in 20% EDTA pH = 8 solution for 48 h. Implants were washed with PBS and dehydrated with a graded series of ethanol solutions prior to paraffin embedding (Thermo Scientific).

Implant histology and immunohistochemistry

Paraffin sections (4 μ m) were dried, deparaffinized, and stained with hematoxylin eosin safranin (HES) (Dako). For immunohistochemical staining, 4 μ m paraffin sections were incubated with antigen retrieval citrate-based solution pH = 9 (Vector Laboratories) at 95 °C for 15 min. The sections were incubated in Bloxall blocking solution (Vector Laboratories) for 10 min to inactivate endogenous peroxidase. FC receptor blocking reagent (Innovex Biosciences) was then added for 45 min. All sections were incubated in PBS-10% FCS for 30 min with either anti-lamin A/C antibody (dilution 1/200, clone EPR4100, Abcam) or anti-osterix/SP7 antibody (dilution 1/100, Abcam) diluted in PBS-5% FCS-1.5% BSA overnight incubation at 4 °C. The sections were washed with PBS-0.1% Triton and incubated in ImPRESS Reagent anti-rabbit IgG (Vector Laboratories) for 30 min. Then, the sections were washed with PBS-Triton 0.1% and incubated in HistoGreen substrate solution (Linaris) for 1 min. Counter coloration was performed using Fast Nuclear Red (Vector

Laboratories). All sections were analyzed using a Panoramic Midi II slide scanner and Case Viewer software (3D HISTECH, Ltd.).

Statistics

Statistical differences were calculated using the Mann-Whitney test or one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test with Prism v7 or 8 software (GraphPad software, La Jolla, CA).⁵¹ The data visualization in Fig. 4 was also performed using the Rstudio v1.1456, tidyverse and ggplot2 packages.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partly supported by Project Grant 1101620 and Ideas Grant 1181053 from the National Health and Medical Research Council of Australia (NHMRC) and by award W81XWH-15-1-0606 from the Congressionally Approved Spinal Cord Injury Research Program of the US Department of Defense and by funds from the Mater Foundation. JPL is supported by Research Fellowship 1136130 from the NHMRC. This work was also partly funded by project grant 1101620 from the French Government Defense Procurement and Technology Agency (DGA – Direction Générale de l'Armement). The Translational Research Institute is partly funded by the Federal Government of Australia. The authors greatly acknowledge Sabrina Soaves, Bastien Rival and Muriel Nivet for technical assistance. The authors would like to thank the “Cochin HistIM Facility” for technical assistance of (Paris, France). They also highly acknowledge Prof. Philippe Denormandie and Dr. Laure Gatin (Service de Chirurgie Orthopédique, Hôpital Raymond Poincaré, Garches, France) and Guillaume Genêt for providing and coordinating access to NHO and muscle surgical residues. The authors also acknowledge the scientific and technical assistance at the Translational Research Institute: The University of Queensland biological resources TRI facility, histology facility, flow cytometry facility, microscopy facility and the preclinical imaging facility, which is supported by Therapeutic Innovation Australia (TIA). TIA is supported by the Australian Government through the National Collaborative Research Infrastructure Strategy (NCRIS) program.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.-P.L., S.B., and M.C.L.B.K. conceived, designed and supervised the study. H.W.T., D.G., S.M., K.A., F.T., A.A., W.F., J.G., M.E.G., D.C., B.N., M.S., and B.J. conducted the experiments, analyzed the data and interpreted the results. A.P., M.S., and F.G. contributed to scientific discussion, interpretation and experimental design. H.W.T., D.G., S.M., K.A., and W.F. prepared the figures for publication. H.W.T., D.G., M.C.L.B.K., S.B., and J.P.L. prepared the manuscript.

ADDITIONAL INFORMATION

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41413-022-00188-y>.

Competing interests: The authors declare no competing interests.

REFERENCES

- Ohlmeier, M. et al. Muscle localization of heterotopic ossification following spinal cord injury. *Spine J.* **17**, 1519–1522 (2017).
- Genet, F. et al. Troublesome heterotopic ossification after central nervous system damage: a survey of 570 surgeries. *PLoS One* **6**, e16632 (2011).
- Wittenberg, R. H., Peschke, U. & Botel, U. Heterotopic ossification after spinal cord injury. Epidemiology and risk factors. *J. Bone Joint Surg. Br.* **74**, 215–218 (1992).
- Reznik, J. E. et al. Prevalence and risk-factors of neurogenic heterotopic ossification in traumatic spinal cord and traumatic brain injured patients admitted to specialised units in Australia. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* **14**, 19–28 (2014).
- van Kuijk, A. A., Geurts, A. C. & van Kuppevelt, H. J. Neurogenic heterotopic ossification in spinal cord injury. *Spinal Cord.* **40**, 313–326 (2002).
- Forsberg, J. A. et al. Heterotopic ossification in high-energy wartime extremity injuries: prevalence and risk factors. *J. Bone Joint Surg. Am.* **91**, 1084–1091 (2009).
- Sakellariou, V. I., Grigoriou, E., Mavrogenis, A. F., Soucacos, P. N. & Papagelopoulos, P. J. Heterotopic ossification following traumatic brain injury and spinal cord injury: insight into the etiology and pathophysiology. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* **12**, 230–240 (2012).
- Citak, M. et al. Risk factors for heterotopic ossification in patients with spinal cord injury: a case-control study of 264 patients. *Spine* **37**, 1953–1957 (2012).
- de l'Escalopier, N., Salga, M., Gatin, L., Genêt, F. & Denormandie, P. Resection of heterotopic ossification around the hip after trauma. *EFORT Open Rev.* **4**, 263–268 (2019).

10. Vanden Bossche, L. & Vanderstraeten, G. Heterotopic ossification: a review. *J. Rehabil. Med.* **37**, 129–136 (2005).
11. Bradleigh, L. H. et al. Deep venous thrombosis associated with heterotopic ossification. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* **73**, 293–294 (1992).
12. Salga, M. et al. Sciatic nerve compression by neurogenic heterotopic ossification: use of CT to determine surgical indications. *Skelet. Radio.* **44**, 233–240 (2015).
13. Genet, F. et al. Impact of the operative delay and the degree of neurologic sequelae on recurrence of excised heterotopic ossification in patients with traumatic brain injury. *J. Head. Trauma Rehabil.* **27**, 443–448 (2012).
14. Genet, F. et al. Impact of late surgical intervention on heterotopic ossification of the hip after traumatic neurological injury. *J. Bone Joint Surg. Br.* **91**, 1493–1498 (2009).
15. Haran, M., Bhuta, T. & Lee, B. Pharmacological interventions for treating acute heterotopic ossification. *Cochrane Database Syst. Rev.* **18**, CD003321 (2004).
16. Teasell, R. W. et al. A systematic review of the therapeutic interventions for heterotopic ossification after spinal cord injury. *Spinal cord.* **48**, 512–521 (2010).
17. Alexander, K. A., Tseng, H.-W., Salga, M., Genet, F. & Levesque, J.-P. When the nervous system turns skeletal muscles into bones: How to solve the conundrum of neurogenic heterotopic ossification. *Curr. Osteoporos. Rep.* **18**, 666–676 (2020).
18. Debaud, C. et al. Local and systemic factors drive ectopic osteogenesis in regenerating muscles of spinal-cord-injured mice in a lesion-level-dependent manner. *J. Neurotrauma* **38**, 2162–2175 (2021).
19. Genet, F. et al. Neurological heterotopic ossification following spinal cord injury is triggered by macrophage-mediated inflammation in muscle. *J. Pathol.* **236**, 229–240 (2015).
20. Alexander, K. A. et al. Inhibition of JAK1/2 Tyrosine Kinases Reduces Neurogenic Heterotopic Ossification After Spinal Cord Injury. *Front. Immunol.* **10**, 377 (2019).
21. Torossian, F. et al. Macrophage-derived oncostatin M contributes to human and mouse neurogenic heterotopic ossifications. *JCI insight* **2**, e96034 (2017).
22. Günther, S. et al. Myf5-positive satellite cells contribute to Pax7-dependent long-term maintenance of adult muscle stem cells. *Cell Stem Cell* **13**, 590–601 (2013).
23. Montarras, D. et al. Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration. *Science* **309**, 2064–2067 (2005).
24. Sambasivan, R. et al. Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration. *Development* **138**, 3647–3656 (2011).
25. Joe, A. W. et al. Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat. Cell Biol.* **12**, 153–163 (2010).
26. Wosczyzna, M. N. et al. Mesenchymal stromal cells are required for regeneration and homeostatic maintenance of skeletal muscle. *Cell Rep.* **27**, 2029–2035.e2025 (2019).
27. Lemos, D. R. et al. Nilotinib reduces muscle fibrosis in chronic muscle injury by promoting TNF-mediated apoptosis of fibro/adipogenic progenitors. *Nat. Med.* **21**, 786–794 (2015).
28. Rebollo, D. L. et al. Denervation-induced skeletal muscle fibrosis is mediated by CTGF/CCN2 independently of TGF-beta. *Matrix Biol.* **82**, 20–37 (2019).
29. Contreras, O. et al. The cross-talk between TGF-beta and PDGFRalpha signaling pathways regulates stromal fibro/adipogenic progenitors' fate. *J. Cell Sci.* **132**, jcs232157 (2019).
30. Shore, E. M. et al. A recurrent mutation in the BMP type I receptor ACVR1 causes inherited and sporadic fibrodysplasia ossificans progressiva. *Nat. Genet.* **38**, 525–527 (2006).
31. Hatsell, S. J. et al. ACVR1^{R206H} receptor mutation causes fibrodysplasia ossificans progressiva by imparting responsiveness to activin A. *Sci. Transl. Med.* **7**, 303ra137 (2015).
32. Dey, D. et al. Two tissue-resident progenitor lineages drive distinct phenotypes of heterotopic ossification. *Sci. Transl. Med.* **8**, 366ra163 (2016).
33. Kan, L., Peng, C.-Y., McGuire, T. L. & Kessler, J. A. Glast-expressing progenitor cells contribute to heterotopic ossification. *Bone* **53**, 194–203 (2013).
34. Kan, C. et al. Gli1-labeled adult mesenchymal stem/progenitor cells and hedgehog signaling contribute to endochondral heterotopic ossification. *Bone* **109**, 71–79 (2018).
35. Eisner, C. et al. Murine tissue-resident PDGFRalpha+ fibro-adipogenic progenitors spontaneously acquire osteogenic phenotype in an altered inflammatory environment. *J. Bone Miner. Res.* **35**, 1525–1534 (2020).
36. Lees-Shepard, J. B. et al. Activin-dependent signaling in fibro/adipogenic progenitors causes fibrodysplasia ossificans progressiva. *Nat. Commun.* **9**, 471 (2018).
37. Agarwal, S. et al. Inhibition of Hif1a prevents both trauma-induced and genetic heterotopic ossification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **113**, E338–E347 (2016).
38. Pignolo, R., Shore, E. & Kaplan, F. Fibrodysplasia Ossificans Progressiva: Clinical and Genetic Aspects. *Orphanet J. Rare Dis.* **6**, 80 (2011).
39. Murphy, M. M., Lawson, J. A., Mathew, S. J., Hutcheson, D. A. & Kardon, G. Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration. *Development* **138**, 3625–3637 (2011).
40. Logan, M. et al. Expression of Cre recombinase in the developing mouse limb bud driven by a Prxl enhancer. *Genesis* **33**, 77–80 (2002).
41. Mitchell, K. J. et al. Identification and characterization of a non-satellite cell muscle resident progenitor during postnatal development. *Nat. Cell Biol.* **12**, 257–266 (2010).
42. Tseng, H.-W. et al. Neurogenic heterotopic ossifications develop independently of granulocyte colony-stimulating factor and neutrophils. *J. Bone Miner. Res.* **35**, 2242–2251 (2020).
43. Loder, S. L. et al. Characterizing the circulating cell populations in traumatic heterotopic ossification. *Am. J. Pathol.* **188**, 2464–2473 (2018).
44. Yu, P. B. et al. BMP type I receptor inhibition reduces heterotopic ossification. *Nat. Med.* **14**, 1363–1369 (2008).
45. Strong, A. L. et al. Bone morphogenetic protein ligand trap ALK3-Fc attenuates osteogenesis and heterotopic ossification in blast-related lower extremity trauma. *Stem Cells Dev.* **30**, 91–105 (2020).
46. Goloviznina, N. A. et al. Mesenchymal Stromal Cell-derived Extracellular Vesicles Promote Myeloid-biased Multipotent Hematopoietic Progenitor Expansion via Toll-Like Receptor Engagement. *J. Biol. Chem.* **291**, 24607–24617 (2016).
47. Grenier-Pleau, I. & Abraham, S. A. Extracellular vesicles tell all: how vesicle-mediated cellular communication shapes hematopoietic stem cell biology with increasing age. *Exp. Hematol.* **101–102**, 7–15 (2021).
48. Lecourt, S. et al. Characterization of distinct mesenchymal-like cell populations from human skeletal muscle in situ and in vitro. *Exp. Cell Res.* **316**, 2513–2526 (2010).
49. Naldaiz-Gastesi, N. et al. Identification and characterization of the dermal panniculus carnosus muscle stem cells. *Stem Cell Rep.* **7**, 411–424 (2016).
50. Fujimaki, S. et al. Notch1 and Notch2 coordinately regulate stem cell function in the quiescent and activated states of muscle satellite cells. *Stem Cells* **36**, 278–285 (2018).
51. Greenbaum, A. et al. CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature* **495**, 227–230 (2013).
52. Mangiavini, L. et al. Fibrosis and hypoxia-inducible factor-1alpha-dependent tumors of the soft tissue on loss of von hippel-lindau in mesenchymal progenitors. *Am. J. Pathol.* **185**, 3090–3101 (2015).
53. Krueger, K. C. et al. Characterization of Cre recombinase activity for in vivo targeting of adipocyte precursor cells. *Stem Cell Rep.* **3**, 1147–1158 (2014).
54. Calo, E. et al. Rb regulates fate choice and lineage commitment in vivo. *Nature* **466**, 1110–1114 (2010).
55. Oishi, T. et al. Osteogenic differentiation capacity of human skeletal muscle-derived progenitor cells. *PLoS One* **8**, e56641 (2013).
56. Couteaux, R., Mira, J.-C. & d'Albis, A. Regeneration of muscles after cardiotoxin injury I. Cytological aspects. *Biol. Cell* **62**, 171–182 (1988).
57. d'Albis, A., Couteaux, R., Janmot, C., Roulet, A. & Mira, J.-C. Regeneration after cardiotoxin injury of innervated and denervated slow and fast muscles of mammals. *Eur. J. Biochem.* **174**, 103–110 (1988).
58. Debaud, C. et al. Peripheral denervation participates in heterotopic ossification in a spinal cord injury model. *PLoS One* **12**, e0182454 (2017).
59. Bouvet-Gerbetta, S. et al. Adaptive immune response inhibits ectopic mature bone formation induced by BMSCs/BCP/plasma composite in immunocompetent mice. *Tissue Eng. Part A* **20**, 2950–2962 (2014).



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022

1.2.4 Article annexe 2 : Rôle de l'IL-1 dans le développement des POAN

Le rôle des macrophages et de l'inflammation est central dans le développement des POAN [15,32,141]. Dans l'optique d'identifier de nouvelles cibles et acteurs moléculaires, nous avons investigué le rôle de la SCI sur les médiateurs de la réponse inflammatoire dans le modèle murin de POAN. Ces travaux, réalisés en collaboration avec l'équipe du Pr. Jean-Pierre Lévesque au Mater Research Institute, ont fait l'objet d'une publication commune dans *Journal of Bone and Mineral Research* [16].

En émettant l'hypothèse que la réponse inflammatoire était altérée en intensité et dans le temps, ces derniers ont réalisé un criblage des différentes signalisations clés impliquées dans les processus inflammatoires. IL-1, OSM, IL-6, TNF α et CSF-1 étaient surexprimés dans les muscles développant des POAN. Toutefois, seule l'inhibition fonctionnelle de la signalisation de l'IL-1, via l'utilisation d'anticorps bloquants anti-IL-1 α/β et de souris KO, permettait d'inhiber la taille des POAN développés.

Nous avons ensuite confirmé ces résultats sur les FAPs de patients POAN. L'utilisation de milieux conditionnés de macrophages (CM⁺) permettait d'induire la différenciation ostéogénique tandis que l'inhibition de l'IL-1 α et β contenue dans ces milieux par anticorps neutralisants ou blocage du récepteur IL-1R par un antagoniste compétitif (IL-1RA), permettait de réduire le potentiel ostéogénique des FAPs et l'expression de RUNX2. Enfin, des analyses en IHC ont permis de révéler la colocalisation entre l'expression de la cytokine et les macrophages résidents du tissu sur des biopsies de d'ostéomes de patients POAN.

Cette étude a mis en évidence le rôle majeur de l'IL-1 dans la pathogenèse des POAN soulignant une nouvelle fois le rôle prépondérant de l'inflammation dans la pathogenèse et ouvrant la voie vers un ciblage prophylactique de cette cytokine afin de palier à l'utilisation aspécifique d'AINS.

Interleukin-1 Is Overexpressed in Injured Muscles Following Spinal Cord Injury and Promotes Neurogenic Heterotopic Ossification

Hsu-Wen Tseng,^{1†} Irina Kulina,^{1†} Dorothée Girard,^{2,3†} Jules Gueguen,^{2,3} Cedryck Vaquette,^{4,5} Marjorie Salga,^{1,6,7} Whitney Fleming,¹ Beulah Jose,¹ Susan M Millard,¹ Allison R Pettit,¹  Kate Schroder,⁸ Gethin Thomas,⁹ Lawrie Wheeler,⁹ François Genêt,^{6,7} Sébastien Banzet,^{2,3} Kylie A Alexander,¹  and Jean-Pierre Lévesque¹ 

¹Mater Research Institute – The University of Queensland, Woolloongabba, Australia

²Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA), Clamart, France

³INSERM UMR-MD 1197, Université de Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette, France

⁴School of Dentistry, The University of Queensland, Herston, Australia

⁵Regenerative Medicine, Institute of Health and Biomedical Innovation, Queensland University of Technology, Kelvin Grove, Australia

⁶Unité Péri Opératoire du Handicap (UPOH), PMR Department, Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines University (UVSQ); UFR Simone Veil – Santé, END: ICAP, INSERM U1179, Hôpital Raymond-Poincaré, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris (AP-HP), Garches, France

⁷Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines (UVSQ); UFR Simone Veil – Santé, END: ICAP, INSERM U1179, Montigny-le-Bretonneux, France

⁸Institute for Molecular Bioscience, University of Queensland, Saint Lucia, Australia

⁹The University of Queensland Diamantina Institute, Translational Research Institute, Woolloongabba, Australia

ABSTRACT

Neurogenic heterotopic ossifications (NHOs) form in periarticular muscles after severe spinal cord (SCI) and traumatic brain injuries. The pathogenesis of NHO is poorly understood with no effective preventive treatment. The only curative treatment remains surgical resection of pathological NHOs. In a mouse model of SCI-induced NHO that involves a transection of the spinal cord combined with a muscle injury, a differential gene expression analysis revealed that genes involved in inflammation such as interleukin-1 β (IL-1 β) were overexpressed in muscles developing NHO. Using mice knocked-out for the gene encoding IL-1 receptor (IL1R1) and neutralizing antibodies for IL-1 α and IL-1 β , we show that IL-1 signaling contributes to NHO development after SCI in mice. Interestingly, other proteins involved in inflammation that were also overexpressed in muscles developing NHO, such as colony-stimulating factor-1, tumor necrosis factor, or C-C chemokine ligand-2, did not promote NHO development. Finally, using NHO biopsies from SCI and TBI patients, we show that IL-1 β is expressed by CD68⁺ macrophages. IL-1 α and IL-1 β produced by activated human monocytes promote calcium mineralization and RUNX2 expression in fibro-adipogenic progenitors isolated from muscles surrounding NHOs. Altogether, these data suggest that interleukin-1 promotes NHO development in both humans and mice. © 2021 American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR).

KEY WORDS: OSTEOIMMUNOLOGY; CYTOKINES; DISEASES AND DISORDERS OF/RELATED TO BONE (OTHER)

Introduction

Neurogenic heterotopic ossifications (NHOs) are pathological bone formations in soft tissues after central nervous system (CNS) injuries such as traumatic brain injuries (TBI), spinal cord injuries (SCI), strokes, and cerebral anoxia. About 10% to

23% patients with TBI and 10% to 53% with SCI develop NHO, and the prevalence increases to 68% in victims suffering from severe combat blast injuries.⁽¹⁻³⁾ NHOs develop in periarticular muscles and can lead to partial or complete ankylosis of affected joints, compression of blood vessels and nerves and, hence, consequently compromises life quality of patients.⁽⁴⁾ Because our

Received in original form February 2, 2021; revised form November 14, 2021; accepted November 17, 2021.

Address correspondence to: Jean-Pierre Lévesque, PhD, and Kylie Alexander, PhD, Stem Cell Biology Group, Mater Research Institute – The University of Queensland, Translational Research Institute, 37 Kent Street, Woolloongabba, QLD 4102, Australia. E-mail: jp.levésque@mater.uq.edu.au (J-PL); kylie.alexander@mater.uq.edu.au (KA).

Sébastien Banzet, PhD, MD, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, INSERM UMR-MD 1197, Centre de Transfusion Sanguine des Armées, 1 Rue du Lieutenant Raoul Batany, 92140 Clamart, France. E-mail: sebastien.banzet@inserm.fr

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

[†]H-WT, IK, and DG contributed equally to this work.

Journal of Bone and Mineral Research, Vol. 37, No. 3, March 2022, pp 531–546.

DOI: 10.1002/jbmr.4482

© 2021 American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR).

understanding of NHO pathogenesis is limited, the only effective curative treatment for NHO is surgical excision; however, even after surgical resection, NHO reoccur in 6% to 7% of patients.⁽⁵⁾ Preventive treatments such as radiation therapy and bisphosphonates have been proposed but may negatively impact other complications associated with SCI, such as wound and bone fracture healing.⁽⁶⁾ The only preventive treatments that show some efficacy at reducing the incidence and size of NHO in retrospective studies are non-steroid anti-inflammatory drugs (NSAIDs) such as indomethacin and celecoxib.⁽⁷⁾

To better understand the cellular and molecular mechanisms driving NHO and discover potential therapeutic targets, we established the first SCI-induced NHO mouse model in which NHO development requires a combination of SCI and muscle injury without the artifice of genetic manipulation.⁽⁸⁾ In this mouse model, NHO development is induced by the combination of spinal cord transection between T₁₁ and T₁₃ combined with a muscle injury induced by injection of cardiotoxin.⁽⁸⁾ In this model, NHOs are featured by mineralized calcium deposition detected by micro-computed tomography (μ CT) from day 4 post-SCI and muscle injury. NHO volumes peak around day 7 to 14. As NHOs gradually mature, osterix-positive osteoblasts lining the NHOs lay down collagen I and osteocalcin-containing bone matrix and form small heterotopic bone nodules that are remodeled by multinucleated osteoclasts.⁽⁸⁾

There are striking differences between normal muscle repair and NHO development. In the absence of SCI, muscle repair is completed within 3 weeks by satellite cells, which are myogenic stem cells that differentiate into myoblasts and fuse into myocytes to replace damaged myofibers. Effective muscle repair begins with acute inflammation in response to injury. CC chemokine ligand 2 (CCL2), also called macrophage chemoattractant protein 1 (MCP-1), and its receptor CC chemokine receptor 2 (CCR2), known to mediate monocyte recruitment in various inflammatory conditions, recruit inflammatory monocytes to the site of muscle injury.⁽⁹⁻¹²⁾ Inhibition of macrophage infiltration by depleting intramuscular CD11b⁺ myeloid cells or deletion of CCL2 or CCR2 encoding genes significantly reduces infiltration of monocyte/macrophages and subsequently delays clearance of necrotic muscle and muscle regeneration.^(9,10,12,13) Recruited monocytes and muscle-resident macrophages produce cytokines that enhance myogenesis such as interleukin-6 (IL6), insulin-like growth factor 1 (IGF1), and interleukin-1 β (IL1- β).^(9,14) Another muscle-resident progenitor population, called fibro-adipogenic progenitors (FAPs), expands rapidly after muscle injury and provides a supportive environment for satellite cell expansion and myogenic differentiation.⁽¹⁵⁾ However, unlike satellite cells, dividing FAPs undergo apoptosis in a tumor necrosis factor (TNF)-dependent manner between 4 and 7 days after injury and are eliminated by macrophages to prevent scar tissue formation and fibrosis.⁽¹⁶⁾ Therefore, muscle resident and infiltrating macrophages are pivotal to orchestrate several steps of muscle regeneration.

Interestingly, we and others have demonstrated that macrophages are also essential in HO formation in various mouse models.^(8,17,18) In our SCI-NHO model, we discovered abnormally increased inflammatory monocyte/macrophage infiltration in injured muscle 4 days after SCI and muscle injury.⁽¹⁹⁾ Depletion of macrophages significantly reduced the size of NHO, establishing the critical roles of macrophages in NHO.⁽⁸⁾ We showed that in the context of a SCI, macrophages infiltrating the injured muscle secrete abnormally high levels of oncostatin M (OSM), which promotes NHO development.⁽²⁰⁾ OSM exerts its effect in part by

binding to a specific cell surface receptor made of GP130 complexed with the OSM receptor α chain (OSMR), which signals via JAK1 and JAK2 tyrosine kinases, which in turn tyrosine phosphorylate and activate the transcription factor STAT3 by promoting its translocation from the cytoplasm to the nucleus. JAK-STAT3 signaling is persistently activated at abnormally high levels in muscles developing NHO after SCI.⁽¹⁹⁾ Deletion of the *Osmr* gene or blocking OSM receptor downstream signaling with the selective JAK1-2 tyrosine kinase inhibitor ruxolitinib significantly reduces NHO formation,^(19,21) demonstrating the important role of OSM/OSMR/JAK1-2 signaling in NHO development.

Because numerous macrophage-mediated inflammatory responses can promote muscle repair or fibrosis or ossification, our working hypothesis was that CNS injury skews these inflammatory responses toward fibrosis and ossification rather than muscle repair.⁽²²⁾ To better understand which inflammatory pathways are activated after a SCI and how these promote NHO instead of muscle repair, we undertook gene expression profiling of muscles in the early phase after muscle injury. Gene set enrichment analysis (GSEA) showed that inflammatory responses, IL6-JAK-STAT3 and TNF-NF κ B signaling gene sets, were significantly enriched in muscles developing NHO with enhanced expression of OSM, colony-stimulating factor (CSF)-1, TNF, CCL2, and IL-1 β . Functional studies with selective inhibitors, neutralizing antibodies, and knockout mice revealed that among these pro-inflammatory cytokines, only OSM and IL-1 signaling positively contributed to NHO development after SCI. Finally, expression of IL-1 β was confirmed in the muscular tissue surrounding NHO from patients with SCI or TBI, and in vitro osteogenic assays of human FAPs isolated from muscles surrounding NHOs confirmed that both IL-1 α and IL-1 β produced by activated human monocytes promote calcium mineralization and *RUNX2* expression.

Materials and Methods

Animals

All experimental procedures were approved by the Health Sciences Animal Ethics Committee of The University of Queensland (# MRI-UQ/TRI/050/17) and followed the Australian Code of Practice for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes. C57BL/6 mice were purchased from the Australia Resources Centre. B6.129S-*Tnfrsf1a*^{tm1lmx} *Tnfrsf1b*^{tm1lmx}/J (abbreviated as *Tnfrsf1a/1b*^{-/-}), B6.129S4-*Ccr2*^{tm1lfc}/J (abbreviated as *Ccr2*^{-/-}), B6.129S7-*Il1r1*^{tm1m}/J (*Il1r1*^{-/-}) mice were purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). *Il1a*^{tm1Yim} (*Il1a*^{-/-}) and *Il1b*^{tm1Yim} (*Il1b*^{-/-}) were kindly provided by Prof Yoichiro Iwakura⁽²³⁾ and backcrossed into C57BL/6 background over 10 times. Experimental mice were maintained in a specific pathogen-free animal facility 12-hour light/dark cycle with free access to standard chow pellets and water. Animals were randomly allocated to treatment groups and different genotypes were co-housed in the same cages. Mice were identified with ear notches.

NHO mouse model

For microarray analysis, 6-week-old female C57BL/6 mice underwent either spinal cord transection injury (SCI) at level T₁₁ to T₁₃ or sham surgeries followed by intramuscular (i.m.) injection of cardiotoxin (CDTX) purified from the venom of *Naja mosseimbica* snake (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at 0.32 mg/kg or saline

into the hamstring muscle as previously described.⁽⁸⁾ Combinations of surgery and i.m. injections in each group (4 mice per group) were (i) SCI + CDTX, (ii) SCI + saline, (iii) Sham+CDTX, and (iv) Sham+saline. Two days post-injury, mice were euthanized by cervical dislocation and hamstring muscles were immediately harvested to extract total RNA for gene expression microarray analyses.

Samples for quantitative real-time reversed transcribed polymerase chain reaction (qRT-PCR) validation were collected from another cohort of mice 2 and 4 days post-injuries following identical surgical procedures with the following minor modifications⁽¹⁹⁾: (i) purified CDTX from *Naja pallida* venom was from Latoxan (Portes-lès-Valence, France; catalog #L8102) due to discontinuation of *N. mosseimbica* CDTX production by Sigma-Aldrich, and (ii) saline was replaced by PBS, which does not cause muscle injury. All muscle samples were snap-frozen and stored at -80°C until RNA extraction.

For in vivo analysis of gene deletion and drug effects on NHO formation, mice underwent SCI surgery with an injection of CDTX from *Naja pallida* as described above.

RNA extraction

Whole muscle samples were homogenized in 4 mL of Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) with TissueRuptorII (Qiagen, Hilden, Germany) or IKA T10 basic homogenizer on ice for 30 seconds for 3 times with 10-second intervals followed by incubation at room temperature (RT) for 30 minutes. Tissue debris were removed by centrifugation at 12,000g and supernatants were mixed with 1/5 volume of chloroform. After centrifugation at 12,000g, 4°C for 15 minutes, aqueous phases containing RNA were transferred to fresh tubes for RNA precipitation with isopropanol. The RNA pellets were further washed in 75% ethanol, air-dried, and dissolved in RNase/DNase free water.

Gene expression microarray analysis

RNA samples for microarray analysis were cleaned up using the RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen) and the quantity and quality was verified using a Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA). Total RNA samples were amplified and purified using the Ambion Illumina RNA amplification kit (Ambion, Austin, TX, USA) to yield biotinylated cRNA following the Illumina protocol, and further hybridized to MouseRef-8 v. 2.0 Gene Expression BeadChips and read on an iScan System using the iScan control software version 3.5.31 (Illumina). Microarray data were analyzed by Illumina Genomestudio software (v. 2011.1), Gene Expression module (v. 1.9.0) using normalization algorithms with background subtraction followed by Illumina custom differential analysis algorithms. Normalized data are accessible on NCBI database with the assigned GEO accession number GSE165062. Genes with signal intensity higher than background (detection p value <0.01) in at least one sample were included for further analyses. Principal component analysis (PCA) was performed using R studio (v. 1.1.456) prcomp function, while a heat map was generated using complexHeatmap packages.⁽²⁴⁾

Gene set enrichment analysis (GSEA)

Gene set enrichment analysis (GSEA software v. 4.0.3) was performed using microarray signal intensity.^(25,26) In the present study, we selected the Hallmark gene set in the MSigDB molecular signature database v. 7.0. The Hallmark gene sets were

generated by a computational methodology based on identifying overlaps between gene sets in other MSigDB collections including 50 well-defined biological processes that summarize and represent specific well-defined biological states or processes and display coherent expression.⁽²⁷⁾

qRT-PCR validation

For qRT-PCR validation, cDNA were synthesized from RNA samples using iScript cDNA kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) per manufacturer's instructions. mRNA expression was quantified using single-step qRT-PCR Taqman system. Reactions were prepared following instruction of TaqMan Universal PCR Master Mix using mouse *Il1b*, *Tnf*, *Osm*, *Ccl2*, *Csf1*, *Il1a*, and ribosomal protein *S20* (*Rps20*) (Supplemental Table S1). Ct values were normalized by the expression of the housekeeping gene *Rps20*. The amplifications were performed using Applied Biosystems Viiia7 real-time PCR system.

Micro-computed tomography (μCT) analyses

NHO volumes were measured in live mice in the Inveon PET-CT multimodality system (Siemens Medical Solutions Inc., Malvern, PA, USA) with the following parameters: 360° rotation, 180 projections, 80 kV voltage, 500 μA current, and effective pixel size 36 μm . Mice were anesthetized with 2% isoflurane oxygen mixture during imaging. After 3D image reconstruction, NHO volume was quantified in the Inveon Research Workplace (Siemens Medical Solutions Inc.) as previously described.⁽¹⁹⁾ To calculate NHO volumes, the region of interest (ROI) was drawn around the injured muscle containing calcification (excluding any normal skeletons). The quantification was not performed with any blinding, but after defining the ROI, the calcified regions were defined by setting the threshold Hounsfield units (HU) to 450 HU; therefore, only radiodensity >450 HU was quantified as NHO. NHO development in *Ccr2*^{-/-} mice was repeated in three separate experiments. Due to instrument upgrade between experiments, the NHO formation in the first two experiments (wild type [WT] $n = 10$; *Ccr2*^{-/-} $n = 10$) were measured in μCT scanner ($\mu\text{CT}40$, SCANCO Medical AG, Brüttisellen, Switzerland) at a resolution of 30 μm and three-dimensional (3D) images of the lower parts of the mouse bodies were reconstructed from the scans using the μCT system software package. Quantitative assessments of bone volumes in the muscular mass by a subtraction technique of orthotopic mouse skeleton (hip, femur, tibia, fibula) were measured to detect and quantify NHO. The remaining *Ccr2*^{-/-} and wild-type mice (WT $n = 5$; *Ccr2*^{-/-} $n = 3$) were measured in the Inveon PET-CT scanner. All other mice were analyzed in the Inveon PET-CT scanner.

In vivo treatment with GW2580 and anti-IL1 α /anti-IL1 β neutralizing antibodies

C57BL/6 mice were administered with GW2580 (Biorbyt, Cambridge, UK, catalog# orb61037) at 80 mg/kg in 0.5% hydroxypropyl methylcellulose in water, twice daily oral gavage⁽²⁸⁾ or vehicle from day 0 to day 10 post-surgery. To confirm the effects of GW2580 on myeloid cell development, bone marrow (BM) and blood samples were analyzed by flow cytometry.

C57BL/6 mice were also injected intraperitoneally with 200 μg daily of neutralizing Armenian hamster anti-mouse IL-1 α (Bio X Cell, Lebanon, NH, USA, catalogue #BE0243, clone ALF-16) together with 200 μg neutralizing Armenian hamster anti-mouse IL-1 β (clone B122) monoclonal antibodies or 200 μg control

Armenian hamster IgG monoclonal antibody (Bio X Cell, catalogue #BE0091, clone PIP) from day 0 to day 7 post-surgery.

Phenotypic characterization of mouse leukocytes by flow cytometry

Muscle leukocytes were isolated from hamstring muscles 4 days post-surgery using a skeletal muscle dissociation kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, catalogue #130-098-305) and GentleMACS Dissociator tissue homogenizer (Miltenyi Biotec) as previously described.⁽¹⁹⁾ To characterize inflammatory infiltrating injured muscle in C57BL/6 and *Ccr2*^{-/-} mice, leukocytes were stained with the following cell surface markers: anti-lineage (B220, Ter119, CD3e)-FITC, anti-Ly6C-Pacific blue, anti-F4/80-APC, anti-LY6G-PECy7, CD48-APC-CY7, CD11b-BV510, CD45-BV785, and anti-CCR2-PE (Supplemental Table S2). Stained cells were analyzed with a CytoFlex flow cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) equipped with 405 nm, 488 nm, 561 nm, and 635 nm lasers.

To confirm the effect of GW2580 on myelopoiesis, separate cohorts of mice were injected subcutaneously with either saline control or 1 mg/kg/d long-lived porcine CSF-1-IgG Fc fusion protein that cross-reacts with mouse as previously described.⁽²⁹⁾ These two cohorts were both subdivided into two groups and gavaged with either vehicle control or 80 mg/kg GW2580 twice daily. Mice were treated for 2 consecutive days and femoral bone marrow (BM) harvested the next morning. BM from one femur was flushed with 1 mL PBS containing 2% newborn calf serum (NCS) in a 1 mL syringe mounted with a 25G needle and washed in PBS/2% NCS before staining. BM cells were subsequently stained with CD11b-BV605, anti-F4/80-AF647, anti-Ly6G-PECy7, CD115-PE, anti-Ly6C-Pacific Blue, and CD48-PerCPy5.5 monoclonal antibodies (Supplemental Table S2). Cells were analyzed using a CyAn flow cytometer (Beckman Coulter) equipped with 405 nm, 488 nm, and 635 nm lasers. All FCS data files were exported without compensation and analyzed on FlowJo v. 10.7.1 software following compensation with single color controls.

Human ethics statement and samples collection

Blood, NHO, and muscle samples were obtained with the informed consent of the patients and under the approval of an independent ethics committee (CPP approval no. 09025, study BANKHO). Blood samples from healthy donors (HD) and NHO patients were collected on citrate solution from Percy Hospital (Clamart, France) and Raymond Poincaré Hospital (Garches, France). NHOs and muscle surrounding NHOs were collected from surgical waste after their excision from patients with brain injuries (TBI) or spinal cord injuries (SCI) at Raymond Poincaré Hospital.

Human CD68 and IL-1 β immunohistochemistry

Human NHO biopsies were fixed in 4% formaldehyde, demineralized in 10% nitric acid, and embedded in paraffin. Sections (4 μ m) were deparaffined in xylene and rehydrated. For IHC staining, sections were permeabilized 15 minutes at room temperature (RT) in PBS-0.1% Triton X-100 followed by a 15-minute treatment at 95°C in a pH = 6.0 antigen retrieval citrate-based solution (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), then cooled down for 15 minutes. Sections were then incubated in Bloxall blocking solution (Vector Laboratories) for 10 minutes at RT to inactivate endogenous peroxidase followed by a 30-minute incubation in PBS-goat serum 10% for 30 minutes at RT. Anti-human CD68 (mouse monoclonal IgG3, clone PG-M1, Dako

[Glostrup, Denmark], dilution 1/100) and anti-human IL-1 β (rabbit polyclonal antibody, NB600-633, Novus Biologicals [Littleton, CO, USA], dilution 1/200) primary antibodies were diluted in PBS containing 5% goat serum and 1.5% bovine serum albumin (BSA) and incubated overnight at 4°C. Mouse IgG3 isotype (MAB007, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and rabbit polyclonal isotype (ab37415, Abcam, Cambridge, MA, USA) were used as controls. After washing in PBS-Triton 0.1%, ready-to-use ImpRESS FLEX REAGENT goat anti-rabbit IgG and goat anti-mouse IgG (Vector Laboratories) were incubated for 30 minutes at RT. After washing in PBS-Triton 0.1%, FLEX DAB substrate solution (Vector Laboratories) was added on sections for 5 minutes at RT. Counter coloration was performed using hematoxylin. All sections were analyzed using a Panoramic Midi II slide scanner and Case Viewer software (3D HISTECH Ltd., Budapest, Hungary).

Human plasma IL-1 β quantification by ELISA

Blood samples were centrifuged at 820 g for 10 minutes at 4°C and plasma fractions were stored at -80°C. IL-1 β plasma level was evaluated using Human IL-1 β ELISA Kit (DLB50, R&D Systems) according to the manufacturer's procedure.

Isolation of PDGFR α ⁺CD56⁻ fibro-adipoprogenitors (FAPs) from human muscles in surgically resected NHO

Muscle fragments associated with NHO biopsies were minced using scalpel and small scissors, placed in a 50 mL Falcon tube, and incubated in 1.5 mg/mL pronase (catalogue #10165921001, Sigma-Aldrich) in α -minimal essential medium (α -MEM), 45 minutes in a 37°C water bath. After addition of α -MEM supplemented with 15% FBS and 1% P/S antibiotics, the cell suspension was filtered through a 100 μ m cell strainer followed by a 40 μ m cell strainer (BD Falcon). Isolated muscle progenitor cells (MPCs) were maintained 10 days in α -MEM supplemented with 15% FBS, 1% penicillin/streptomycin (P/S) antibiotics, and 10 ng/mL basic fibroblast growth factor (bFGF) (R&D Systems). Human MPCs were trypsinized and incubated 30 minutes with biotinylated anti-human PDGFR α (BAF322, R&D Systems) goat polyclonal antibody and CD56-PE (clone B159, BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) monoclonal antibody in PBS 2% fetal bovine serum (FBS), 2 mM EDTA or with control isotypes IgG1 PE (A07796, Beckman Coulter), and biotinylated goat IgG (BAF108, R&D Systems). Cells were washed and incubated 30 minutes with Streptavidin-APC/Cy7 and the viability dye 7-aminoactinomycin D (7-AAD) (Sony). Cells were washed and filtered through a 30 μ m cell strainer (Sysmex, Kobe, Japan) and sorted using a FACSAria III SORP sorter (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). PDGFR α ⁺CD56⁻ FAPs were seeded at 3000 cells per cm² in α -MEM supplemented with 10% FBS and 1% P/S antibiotics.

Human CD14⁺ monocytes isolation and preparation of conditioned medium (CM)

Human CD14⁺ blood monocytes were isolated from whole blood donation buffy coat from the Centre de Transfusion Sanguine des Armées (Clamart, France) or NHO bone marrow. PBMC and NHO-bone marrow mononuclear cells were recovered from using Ficoll gradient (Pancoll, Pan-Biotech, Aidenbach, Germany). CD14⁺ monocytes were then isolated after magnetic separation using CD14 microbeads (130-050-201, Miltenyi Biotec). CD14⁺ cells were seeded at 1.25 \times 10⁶ cells per cm² and stimulated with 100 ng/mL lipopolysaccharide (LPS) (L6529,

Sigma-Aldrich) or without LPS for 72 hours. Conditioned media with (CM⁺) or without (CM⁻) LPS stimulation were collected and centrifuged 5 minutes at 500g. Pooled CM⁺ were used in a 1 to 10 ratio in cell culture medium during osteogenic differentiation assays. Due to a limited number of CD14⁺ monocytes retrieved from NHO bone marrows, only CM⁺ derived from CD14⁺ blood monocytes were used. IL-1 β and IL-1 α concentrations in conditioned media were evaluated using Human IL1- β and IL-1 α ELISA assays (DY201 and DY200, R&D Systems) according to the manufacturer's instructions.

In vitro osteogenic differentiation assay and mineralization quantification

Human PDGFR α ⁺ CD56⁻ FAPs were seeded at 3000 cells per cm² in α -MEM 10% FBS with standard P/S. After 3 days, culture medium was replaced by control medium (α -MEM 10% FBS 1% P/S antibiotics) or osteogenic medium (α -MEM 10% FBS 1% P/S antibiotics), 0.052 mg/mL dexamethasone, 12.8 μ g/mL ascorbic acid, and 2.15 mg/mL β -glycerophosphate (D-1159, A-8960, G-9422, Sigma-Aldrich) for 13 days. Human recombinant IL-1 α , IL-1 β , and Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1RA) were purchased from PeproTech (Rocky Hill, NJ, USA; 200-01A, 200-01B, and 200-01RA). FAPs were incubated 2 hours with IL-1RA before conditioned medium (CM) addition. Neutralizing mouse anti-human IL-1 α and human IL-1 β monoclonal IgG1 antibodies and mouse IgG1 isotype control (mabg-hil1a, mabg-hil1b, mabg1-ctrlm) were purchased from InvivoGen and used at the indicated concentration with a 2-hour pre-incubation in CM⁺ before addition to FAPs. At the end of the differentiation process, cells were washed in PBS, fixed in 70% ethanol, washed in water, and stained in 20 g/L Alizarin red S (A5533, Sigma-Aldrich). Excess stain was removed during three washing steps. Alizarin red S dye was extracted with 0.5 N hydrochloric acid and 5% sodium dodecyl sulfate (SDS) and quantified by spectrophotometry at 405 nm.

Western blot

Cultured human PDGFR α ⁺CD56⁻ FAPs were washed in PBS before incubation in cell lysis buffer composed of PBS, 1% NP-40, 1% Triton X-100, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.5% deoxycholic acid, and protease inhibitors (11697498001, Roche, Mannheim, Germany). Cells were then scrapped, incubated 20 minutes on ice, and supernatant was collected after centrifugation (13,000g, 15 minutes at 4°C). Protein concentrations were quantified using Pierce BCA protein assay kit following the manufacturer's instructions (23252, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Twenty micrograms of protein were loaded for separation in 10% acrylamide SDS-PAGE gels (161-0182, Bio-Rad) before transfer on PVDF membrane (Trans-Blot Turbo, Bio-Rad). After saturation in 5% non-fat dry milk, membranes were incubated with specific RUNX2 antibody (dilution 1/1000, ab192256, Abcam) overnight at 4°C. Then, they were probed with HRP secondary antibody (dilution 1/200,000, ab205718, Abcam) 2 hours at RT. After enhanced chemoluminescence incubation (170-5061, Bio-Rad), imaging and densitometric analysis were performed on a ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad) using ImageLab for StainFree normalization.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using non-parametric two-sided Mann-Whitney test for two comparisons or repeated

measures Friedman test with Dunn's correction or ANOVA with Tukey's post hoc test for multiple comparisons depending on normality of data distribution as specified in figures.

Results

SCI exacerbates inflammation in injured muscles as determined by expression microarray analyses

We first performed differential gene expression microarray analyses in mouse muscles 2 days after SCI and muscle injury to identify potential triggers of NHO development in response to SCI. To this end, a gene expression microarray analysis was performed using total RNA according to the following four treatment groups: (i) SCI + CDTX: SCI surgery plus intramuscular (i.m.) CDTX injection, the only condition in which NHOs form in the injured muscle; (ii) SCI + Saline: SCI surgery plus i.m. injection of saline; (iii) Sham + CDTX: Sham surgery plus i.m. injection of CDTX; or (iv) Sham + Saline: Sham surgery plus i.m. injection of saline. Normalized data are accessible on NCBI database with the assigned GEO accession number GSE165062.

We noticed that one SCI + CDTX sample showed similar gene expression signatures to that of the Sham + CDTX group (not shown). Incomplete spinal cord transection can occur during surgery; however, it takes more than 2 days to observe motor recovery. Therefore, we were unable to confirm if the spinal cord transection injury was complete or not in this particular mouse by day 2. As a result, this sample was excluded from further analysis.

Principal component analysis (PCA) of the remaining samples demonstrated that the dominant principal component 1 (PC1) segregated samples according to CDTX-mediated muscle injury, while PC2 segregated samples according to SCI (Fig. 1A). As a result, all muscle samples specifically clustered according to treatment groups.

Expression heat map confirmed that the combination of SCI plus CDTX muscle injury regulates unique sets of genes in the injured muscle that can be distinguished from genes activated in response to the SCI or CDTX injury alone (Fig. 1B).

GSEA were subsequently performed to identify which pathways and genes may be important in triggering NHO development by comparing differentially expressed gene sets between pairs of treatment groups using MSigDB Hallmark gene set collection.⁽²⁵⁻²⁷⁾ We performed the following comparisons:

Comparison 1: SCI + CDTX group versus the other three experimental groups (other) (Fig. 2A).

Comparison 2: SCI + CDTX group versus Sham + CDTX group (Fig. 2B).

Comparison 3: SCI + saline group versus Sham + Saline group (Fig. 2C).

Comparison 4: SCI + CDTX group versus SCI + Saline group (Fig. 2D).

Comparison 5: Sham + CDTX group versus Sham + Saline group (Fig. 2E).

Analysis of normalized enrichment scores (NES) with significant false discovery rates (FDR $q < 0.05$) revealed that seven of the eight top gene sets enriched in the SCI + CDTX group developing NHO relative to the three other treatment groups that do not develop NHO (Fig. 2A) were gene sets related to inflammation such as "IL6-JAK-STAT3", "allograft rejection", "TNFA signaling via NFkB", "inflammatory response", "complement", "coagulation" and "interferon gamma response" further demonstrating that SCI exacerbates the inflammatory responses in injured muscles as early as day 2 post-injury. Conversely, the three gene sets that were most

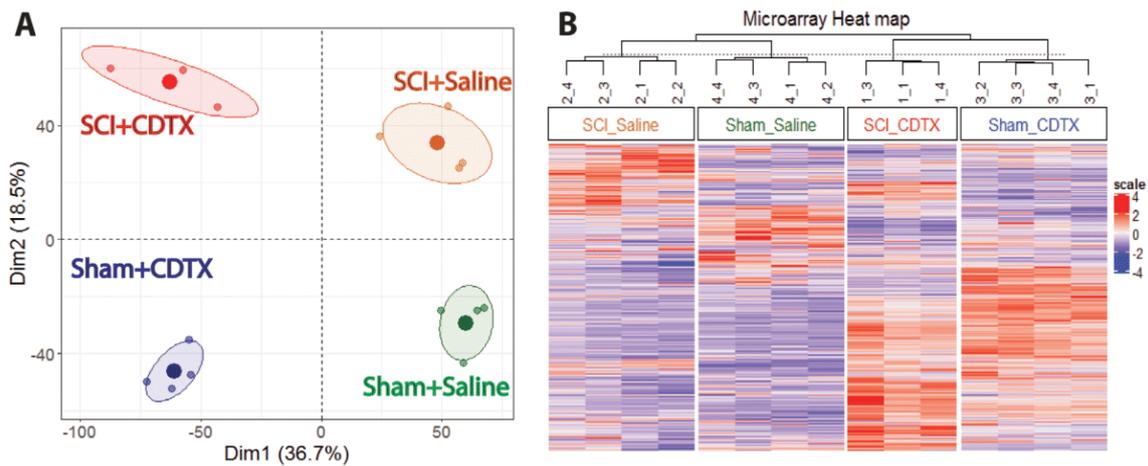


Fig 1. Spinal cord injury (SCI) causes expression of different sets of genes in injured skeletal muscles. RNA was isolated from injured hamstring muscles 2 days post-injury from four experimental groups: (i) SCI + CDTX (red): SCI plus intramuscular (i.m.) CDTX injection, the only condition in which NHOs form in the injured muscle; (ii) SCI + saline (orange): SCI surgery plus i.m. injection of saline; (iii) Sham + CDTX (blue): Sham surgery plus i.m. injection of CDTX; or (iv) Sham + saline (green): Sham surgery plus i.m. saline injection of saline. (A) Principal component analysis (PCA) analysis. Each dot represents an individual mouse. (B) Clustering analysis with dendrogram and heat map of differentially expressed genes in the four groups.

significantly reduced in the SCI + CDTX group were “oxidative phosphorylation”, “myogenesis” and “fatty acid metabolism” suggesting that muscle repair and muscle energy usage are reduced subsequent to a SCI. Enriched gene sets in both comparisons 2 and 3 were more likely to be the consequence of the SCI. Enriched gene sets in both comparisons 4 and 5 revealed gene sets enriched as a consequence of the CDTX-induced muscle injury. Remarkably, “IL6-JAK-STAT3 signaling” and “TNFA signaling via NF- κ B” Hallmark gene sets were enriched in all possible pairwise comparisons, including in the comparison SCI + CDTX versus all other three groups (Fig. 2, black arrows). The broader “inflammatory response” gene set was enriched in all comparisons that included at least one group with CDTX muscular injury. Heat maps of these three gene sets also showed distinct expression patterns between SCI + CDTX and the other three groups (Fig. 3). For initial validation, we confirmed that the *Osm* gene (encoding oncostatin M) in the “inflammatory response” gene set (which we have previously shown to be overexpressed in muscles after SCI + CDTX injury and playing a major role in SCI-NHO development⁽²⁰⁾) was overexpressed in the SCI + CDTX group in the microarray analysis. We next selected candidate genes that were found upregulated in the SCI + CDTX group and known to play important roles in macrophage-mediated inflammatory responses such as *Csf1*, *Tnf*, *Il1b*, and *Ccl2*. Comparison 2 between the SCI + CDTX group and Sham + CDTX group confirmed that “TNF/NF- κ B signaling” and “IL6/JAK/STAT3” gene sets were significantly enriched in the SCI + CDTX group. The “inflammatory response” gene set was also enriched ($p = 0.043$), but the false discovery rate was 0.2 (Supplemental Fig. S1). Nevertheless, *Csf1*, *Tnf*, *Il1b*, *Ccl2*, and *Osm* mRNA were still among the leading-edge subsets (Supplemental Fig. S1C).

Next, we validated these gene targets in another cohort of mice by quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR) (Fig. 4). CDTX injection increased the expression of *Csf1*, *Tnf*, *IL1b*, and *Ccl2* 2 days post-procedures regardless of SCI, whereas *Il1b* expression was significantly higher in SCI + CDTX compared with

Sham + CDTX similar to *Osm*.⁽²⁰⁾ To further test the functional roles of CSF-1, TNF, CCL2, and IL-1 β signaling pathways in SCI-NHO development in vivo, the four signaling pathways were blocked by pharmacological inhibitors, neutralizing antibodies, or using gene knockout mouse models.

CSF-1 receptor, TNF, and CCR2 signaling do not promote NHO development

We first inhibited CSF-1 receptor signaling by administering GW2580, an orally bioavailable small inhibitor of CSF-1 receptor (CSF1R) tyrosine kinase.^(28,30) We first assessed the effect of GW2580 at inhibiting medullary monopoiesis stimulation induced by administration of a long-lived recombinant pig CSF-1-IgG Fc (pCSF1-Fc) fusion protein in vivo⁽²⁹⁾ (Supplemental Fig. S2). Flow cytometry analyses of BM cells showed that GW2580 abrogated increases in the numbers of CD11b⁺ F480⁺ Ly6G⁻ monocytes/macrophages in response to pCSF-1-Fc treatment, and within this population, GW2580 was particularly effective at reducing the numbers of Ly6C^{bright} CSF1R⁺ and Ly6C⁺ CSF1R^{low} monocytes, whereas these treatments had no effect on the number of CD11b⁺ Ly6G⁺ granulocytes or CSF1R⁻ monocytes. Next, mice were administered daily GW2580 or vehicle from the day of SCI surgery and i.m. injection of CDTX (day 0) until day 10 and NHO volume were measured on day 10 by μ CT ex vivo. Unexpectedly, GW2580 treatment significantly increased NHO volumes 1.6-fold after SCI (Fig. 5A). Thus CSF-1 is not a cytokine that promotes NHO development in the inflamed muscle after SCI.

Next, to disrupt the TNF signaling pathway, we used mice with germinal deletion of the two genes encoding the two TNF receptors (*Tnfrsf1a/1b*^{-/-} mice). Unexpectedly, NHO volume were twofold higher in *Tnfrsf1a/1b*^{-/-} double KO mice compared with C57BL/6 wild-type mice (Fig. 5B). Therefore, similar to CSF-1, TNF signaling does not trigger NHO development after SCI but rather dampens it.

We have previously reported that infiltration of Ly6C^{hi} inflammatory monocyte/macrophages in the CDTX-injured muscles is

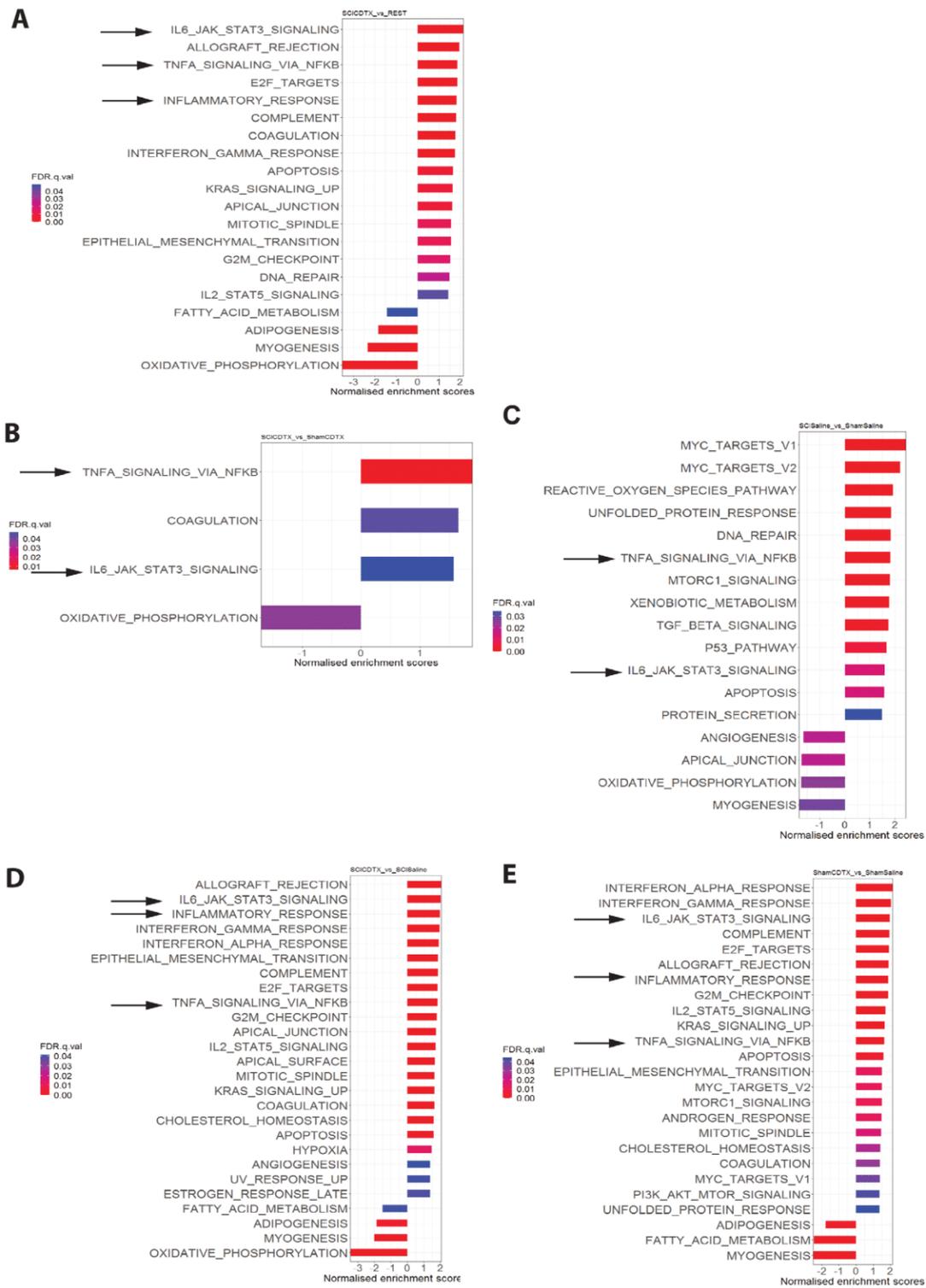
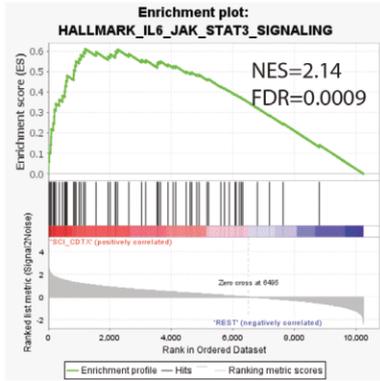


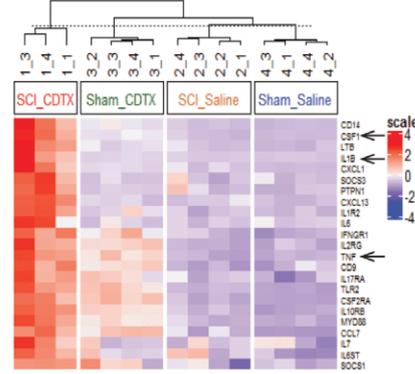
Figure 2

Fig 2. Gene set enrichment analyses of muscles from mice with spinal cord injury (SCI) and/or muscle injury. Gene set enrichment analysis was performed to investigate genes enriched in injured muscles from the following experimental groups: (A) SCI + CDTX group, which is the only developing NHO versus the other three experimental groups; (B) SCI + CDTX group versus Sham + CDTX group; (C) SCI + saline group versus Sham + saline group; (D) SCI + CDTX group versus SCI + saline group; (E) Sham + CDTX group versus sham + saline group. Gene sets with false discovery rate (FDR) below 0.05 are shown in the figures. Normalized enrichment scores (NES) were presented in x-axes and FDR are represented on a color scale from high (blue) to low (red). Black arrows highlight the “inflammatory response,” “IL6-JAK-STAT3 signaling,” and “TNF signaling via NFkB” gene sets across the different comparisons.

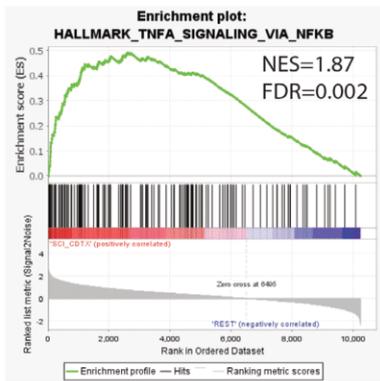
A



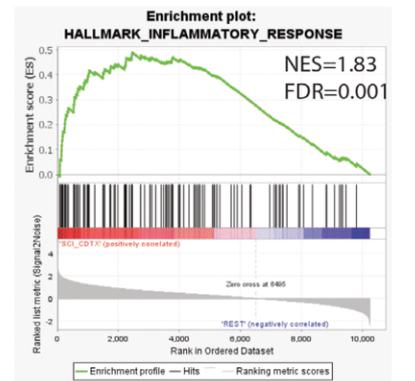
HALLMARK_IL6_JAK_STAT3_SIGNALING_LES



B



C



HALLMARK_TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB_LES

HALLMARK_INFLAMMATORY_RESPONSE_LES

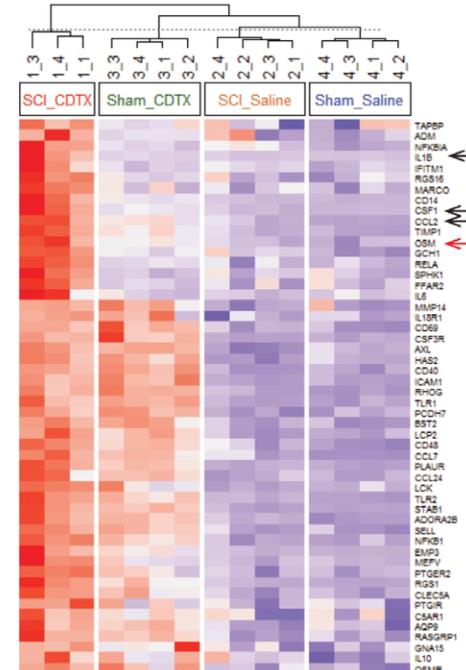
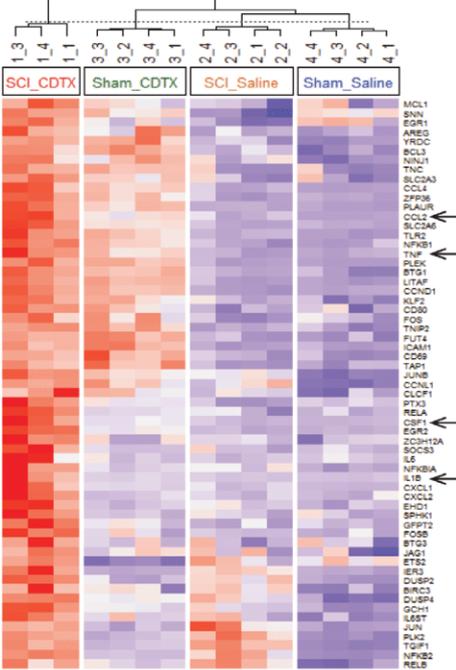


Figure 3

Fig 3. Heat maps of differentially expressed gene sets from injured muscles from mice that develop neurogenic heterotopic ossifications (NHO) after spinal cord injury (SCI) and muscle injury. Enrichment score plots for (A) “IL6-JAK-STAT3 signaling,” (B) “TNF signaling via NFκB,” and (C) “inflammatory response signaling” gene sets comparing injured muscles from the SCI + CDTX group, which develops NHO, to the other three experimental groups that do not develop NHO. Heat maps of leading-edge subsets for each of these gene sets are shown. Genes studied in subsequent experiments are indicated by black arrows. *Osm* previously published by Torossian and colleagues⁽²⁰⁾ is indicated by a red arrow.

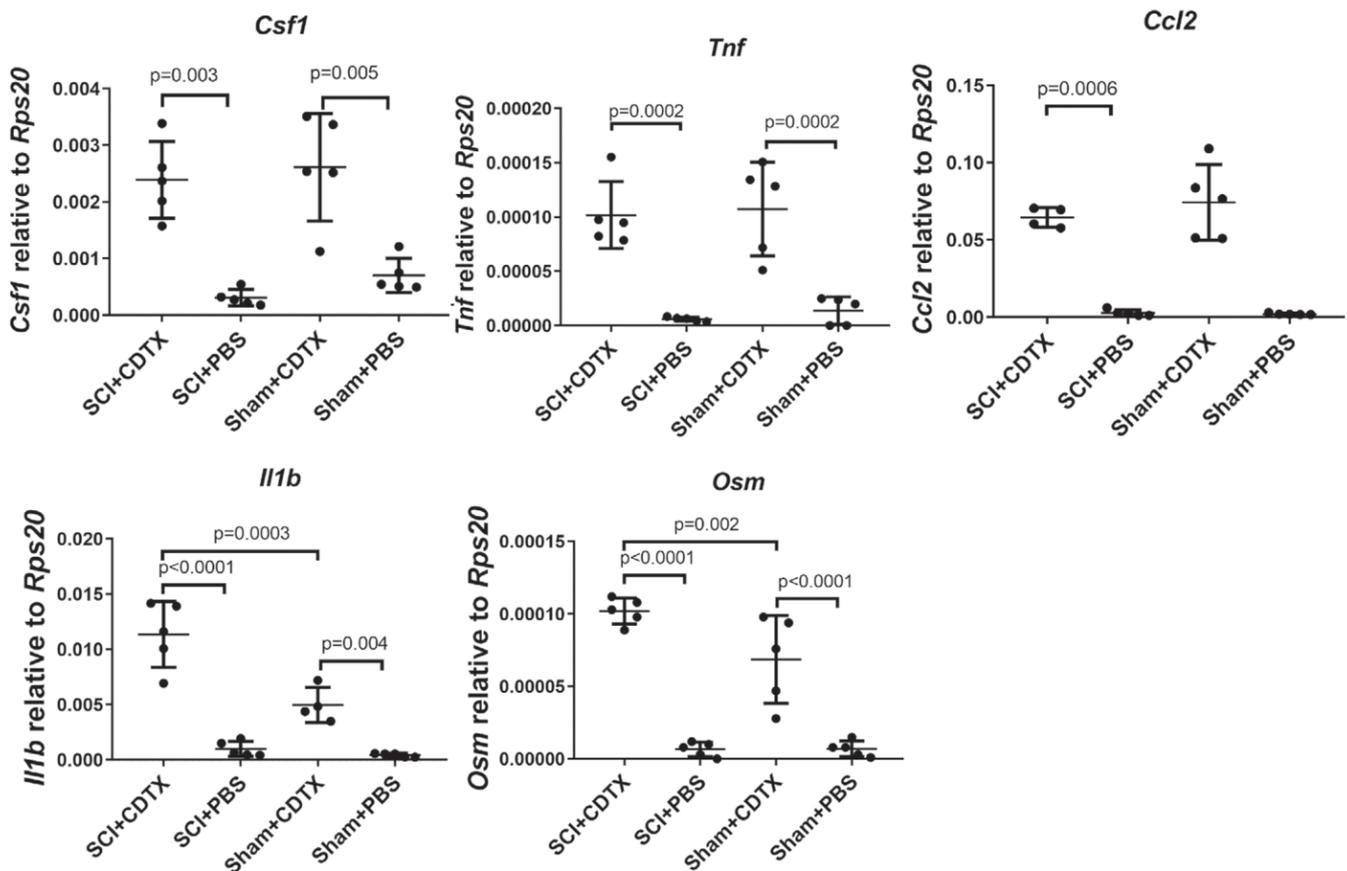


Fig 4. Validation of differentially expressed in injured muscles by qRT-PCR. *Csf1*, *Tnf*, *Ccl2*, *Osm*, and *Il1b* mRNA expression in injured muscles from mice that underwent either SCI + CDTX muscle injury, SCI + PBS, Sham + CDTX, or Sham + PBS. Muscles and total RNA were isolated 2 days post-surgery. Specified mRNAs were quantified relative to *Rps20* housekeeping gene. Each dot represents a separate mouse and bars are means \pm SD ($n = 4-5$ /group). Statistical differences were calculated by ANOVA with Tukey's multiple comparison test.

significantly higher in mice with SCI compared with injured muscles from mice without SCI.⁽¹⁹⁾ Furthermore, *in vivo* depletion of macrophages with clodronate-loaded liposomes reduced NHO formation dramatically.⁽⁸⁾ As CCL2/CCR2-mediated macrophage chemotaxis and recruitment largely contribute to inflammatory monocyte/macrophage infiltration in injured muscles,^(9,16) we further investigated whether defective CCR2-mediated signaling reduced NHO formation. Both CCR2-deficient (*Ccr2*^{-/-}) and C57BL/6 wild-type mice underwent SCI surgery and i.m. CDTX injection and muscle leukocyte infiltrates were analyzed 4 days post-surgery. CCR2 deficiency led to a significant reduction in the infiltration of overall F4/80⁺ monocytes/macrophages as well as the Ly6C^{hi} subset. This was compensated in part by an increased recruitment of CD11b⁺ F4/80⁻ Ly6G⁺ neutrophils (Supplemental Fig. S3). Surprisingly, however, NHO volumes were significantly increased 1.6-fold in *Ccr2*^{-/-} mice (Fig. 5C) despite reduced infiltration of inflammatory macrophages.

IL-1-mediated signaling contributes to SCI-NHO development in mice

Because IL-1 comprises two distinct but functionally redundant proteins, namely IL-1 α and IL-1 β encoded by two distinct genes, which both bind to their common IL-1 receptor IL1R1,^(31,32) we tested the involvement of IL-1-mediated signaling in *Il1r1*^{-/-} mice defective

for IL1R1. *Il1r1*^{-/-} mice exhibited a significant 32.2% reduction in NHO volume compared with wild-type C57BL/6 control mice, indicating IL-1 signaling plays some role in NHO development (Fig. 6A). However, when we conducted this experiment in mice defective for either IL-1 α (*Il1a*^{-/-} mice) or IL-1 β (*Il1b*^{-/-} mice), deficiency of neither IL-1 β nor IL-1 α alone affected NHO volumes (Supplemental Fig. S4). Interestingly, by qRT-PCR, we found that *Il1b* and *Il1a* mRNA expression changed over time. On day 2 post-injury, *Il1b* expression was significantly higher in SCI + CDTX compared with Sham + CDTX groups, whereas it was significantly decreased from day 2 to day 4 (Figs. 4 and 6B). On the other hand, *Il1a* expression was significantly increased from day 2 to day 4 in SCI + CDTX muscles (Fig. 6B). These results suggest different kinetics of induction of IL-1 α and IL-1 β in the injured muscle after SCI with potential functional redundancy. Therefore, we measured the effects of daily injections of combined neutralizing anti-mouse IL-1 α and anti-mouse IL-1 β monoclonal antibodies on NHO volumes. Antibody-mediated neutralization of both IL-1 α and IL-1 β caused a trend toward reduced NHO volumes, although this did not reach statistical significance (Fig. 6C).

IL-1 β protein is expressed in human NHO biopsies and increases NHO-derived FAP mineralization *in vitro*

To assess relevance to the human pathology, we studied IL-1 β protein expression in human NHO biopsies taken from

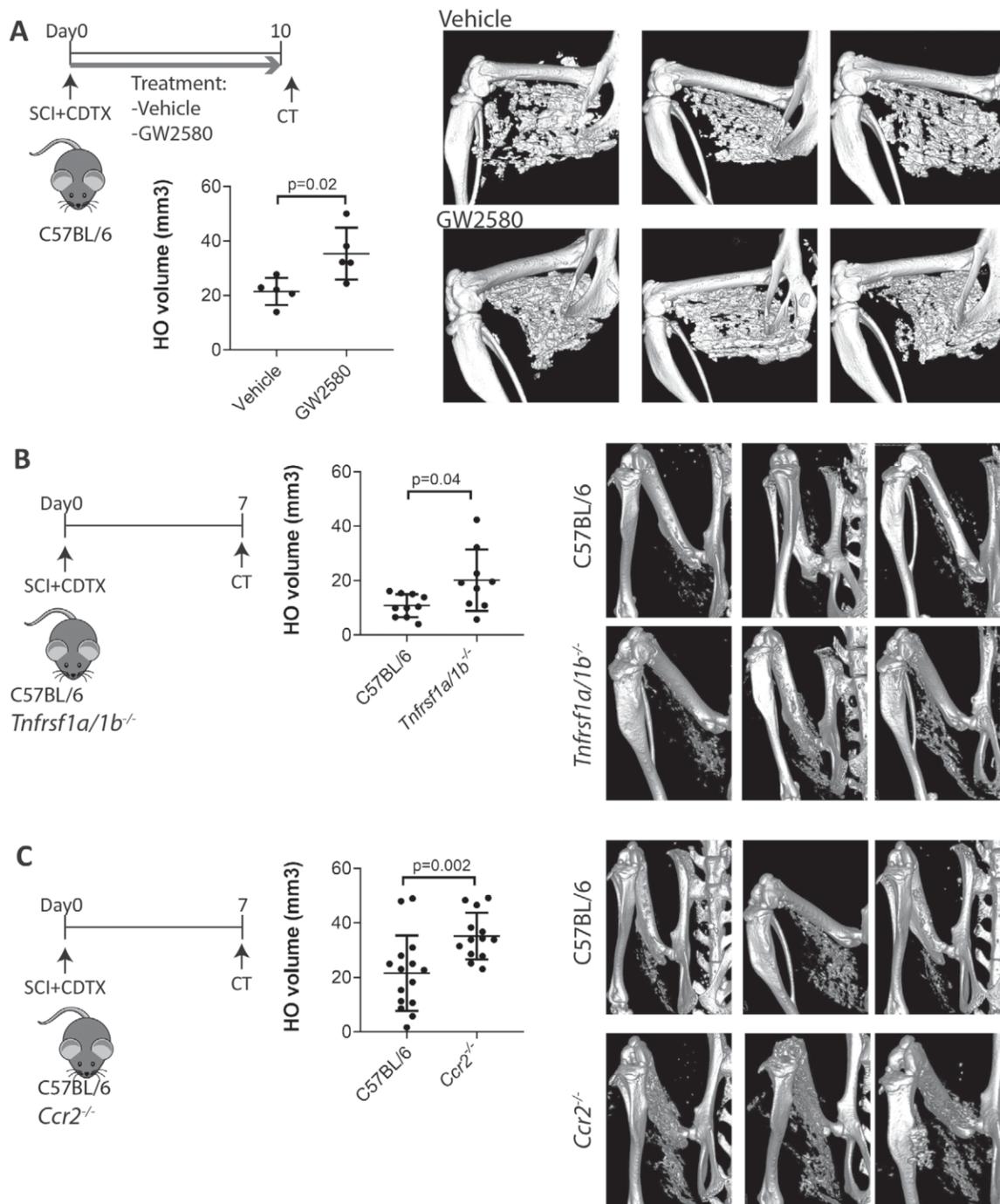


Fig 5. Blocking CSF1, TNF, or CCR2 receptor signaling exacerbates neurogenic heterotopic ossification (NHO) formation after spinal cord injury (SCI) in mice. (A) C57BL/6 mice underwent SCI surgery and CDTX i.m. injection. Mice were then treated with vehicle or GW2580 (80 mg/kg) twice daily from day 0 to 10. NHO formation was measured ex vivo by μ CT on day 10 ($n = 5$ mice/group). (B) *Tnfrsf1a/1b*^{-/-} double knockout and C57BL/6 mice ($n = 10$ /group from two separate experiments) and (C) *Ccr2*^{-/-} and C57BL/6 mice ($n = 14$ – 15 mice/group from three separate experiments) underwent SCI surgery and CDTX i.m. injection. NHO formation was measured in μ CT on day 7. Representative μ CT 3D reconstitution images from each group and quantifications of NHO volumes for each mouse are shown. Each dot represents a separate mouse, and bars are means \pm SD. The p values were calculated using two-sided Mann–Whitney test.

13 patients by immunohistochemistry. Five patients had NHO after SCI and 8 after TBI. There was a clear presence of CD68⁺ macrophages and multinucleated osteoclasts within NHO

(Fig. 7A and Supplemental Fig. S5) as we previously described.^(8,20) We noted the accumulation of IL-1 β ⁺ cells adjacent to the compact bone of NHOs and also distributed among

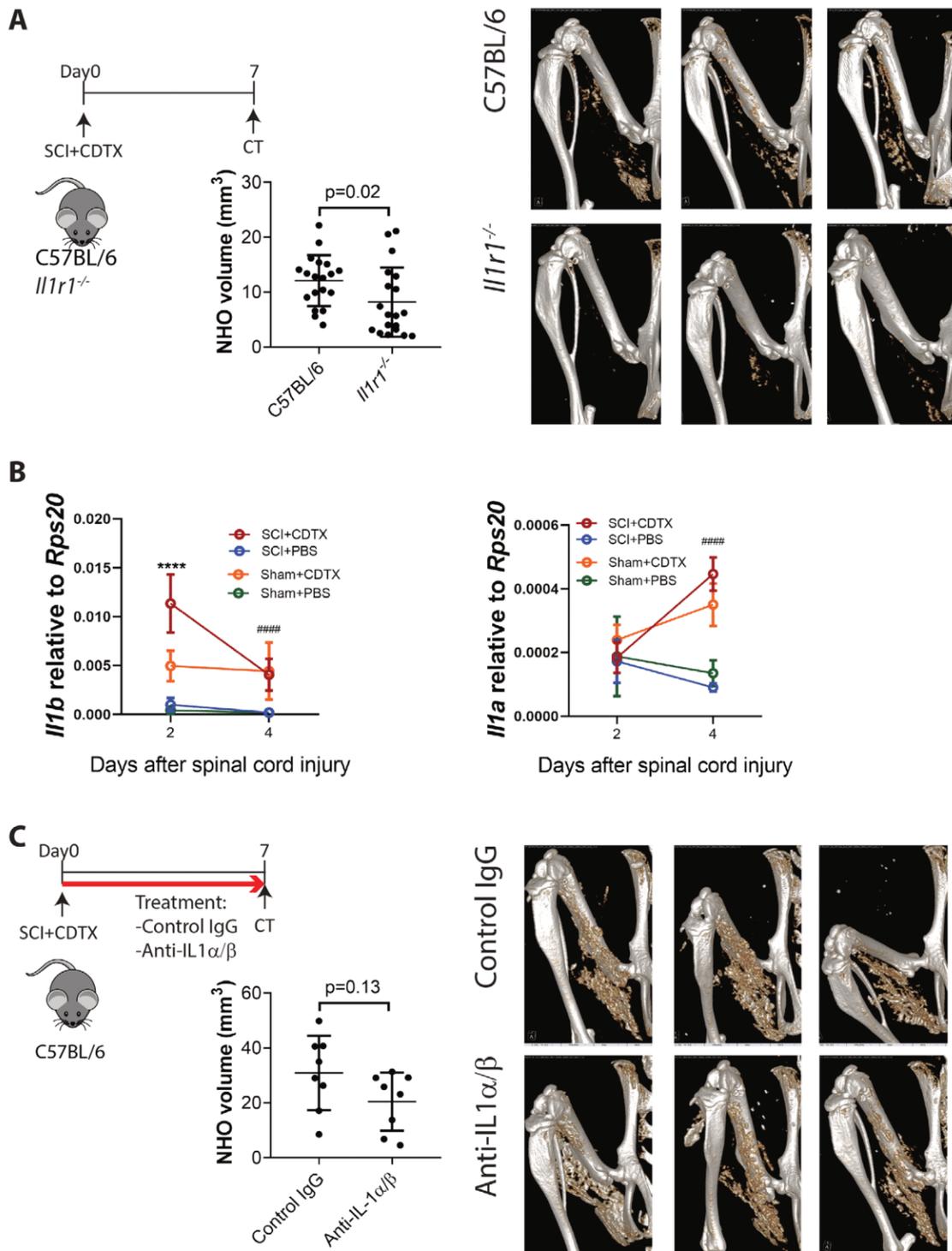


Fig 6. IL1 receptor deficiency reduces neurogenic heterotopic ossification (NHO) formation after spinal cord injury (SCI) in mice. (A) *Il1r1^{-/-}* and C57BL/6 mice underwent SCI surgery and i.m. injection of CDTX. NHO volumes were quantified by μ CT 7 days post-injury. (B) qRT-PCR quantification of *Il1b* and *Il1a* mRNA in whole muscle from mice that underwent either SCI + CDTX, SCI + PBS, Sham + CDTX, or Sham + PBS on day 2 and day 4 post-injury. The mRNA samples on day 2 are the same as in Fig. 4. Expression of *Il1b* and *Il1a* were normalized to *Rps20* housekeeping gene. Data are presented as means \pm SD ($n = 4-5$ /group). Statistical differences were calculated by two-way ANOVA with Sidak's multiple comparison test. **** $p < 0.0001$ SCI + CDTX versus Sham + CDTX on day 2. #### $p < 0.0001$ SCI + CDTX day 2 versus day 4. (C) C57BL/6 mice underwent SCI surgery plus i.m. injection of CDTX and injected daily with a combination of anti-mouse IL1 α and anti-mouse IL1 β neutralizing Armenian hamster monoclonal antibodies or control Armenian hamster IgG. NHO volumes were quantified by μ CT 7 days post-injury. Each dot represents a separate mouse, and bars are means \pm SD. The p values were calculated using two-sided Mann-Whitney test. μ CT scans of NHO formation are shown with representative images from each group.

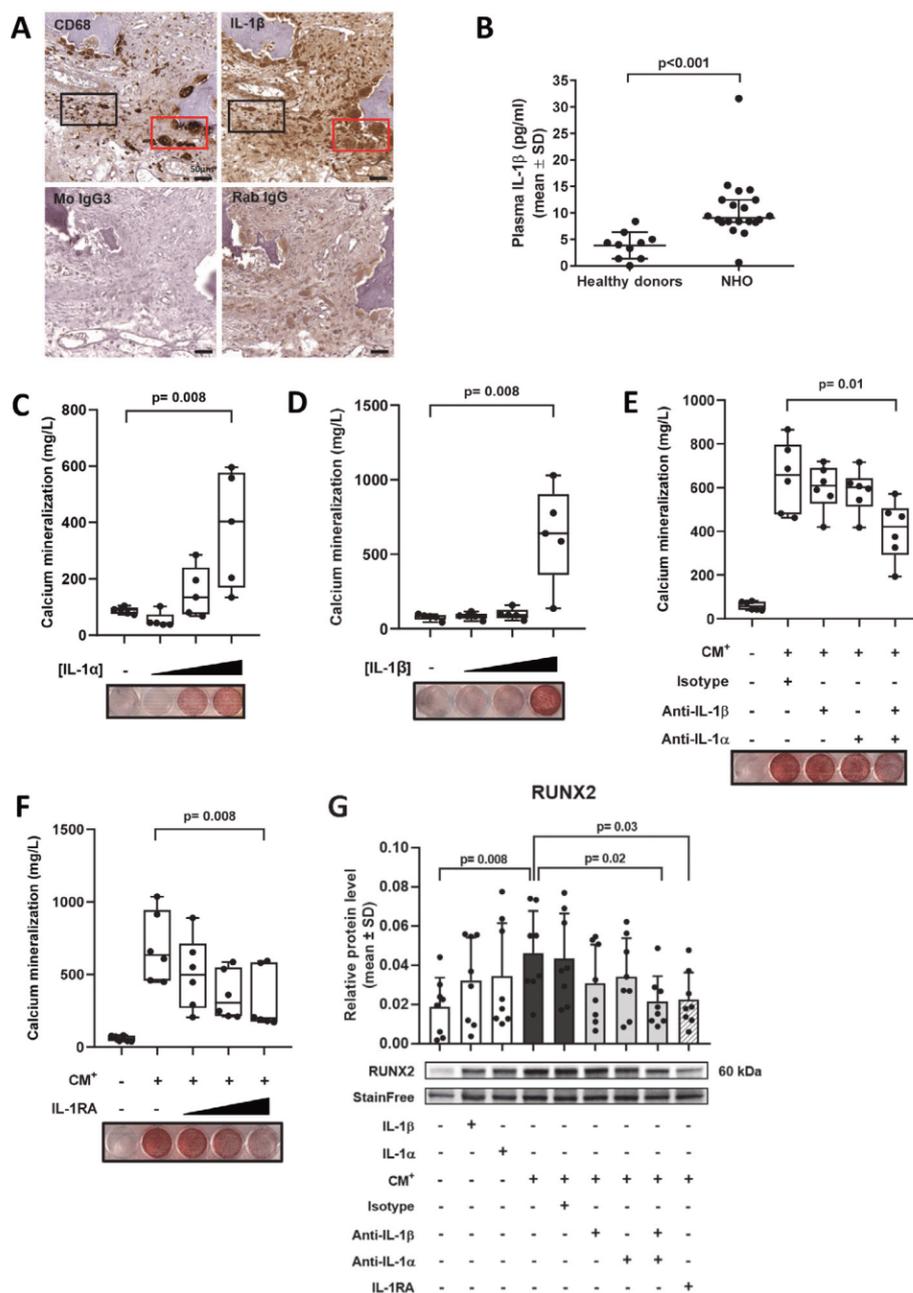


Fig 7. IL-1 β is expressed in human neurogenic heterotopic ossification (NHO) biopsies and stimulates calcium mineralization of NHO-derived fibroadipogenic progenitors (FAPs) in vitro. (A) Representative immunohistochemistry staining of serial sections of a human NHO biopsy (spinal cord injury [SCI] patient) demonstrating the colocalization of the macrophage marker CD68 (top panel left) and IL-1 β protein expression (top panel right). The black rectangle shows IL-1 β expressing CD68⁺ macrophages in the fibrotic tissue surrounding NHO, whereas the red rectangle shows IL-1 β expressing multinucleated CD68⁺ osteoclasts. Mouse IgG3 (bottom left panel) and rabbit IgG (bottom right panel) confirm the specificity of CD68 and IL-1 β antibodies. 20 \times magnification and scale bar = 50 μ m. (B) IL-1 β concentration in plasma of healthy volunteers and NHO patients. Each dot represents a different individual. Bars are means \pm SD. Statistical difference was calculated using two-sided non-parametric Mann–Whitney test. (C) Dose-response of recombinant human IL-1 α (0.01; 1 and 100 ng/mL) and (D) IL-1 β (0.01; 0.5 and 10 ng/mL) on calcium mineralization of PDGFR α ⁺ CD56⁻ FAPs derived from 5 different NHO biopsies/patients cultured in osteogenic medium. (E) Osteogenic differentiation assay of FAPs cultured with LPS-stimulated CD14⁺ blood monocyte-conditioned medium (CM⁺) and incubated with anti-IL-1 α , anti-IL-1 β neutralizing antibodies, or isotype control (100 ng/mL). (F) Osteogenic differentiation assay of FAPs derived from 6 different biopsies/patients cultured with CM⁺ and incubated with 10, 100, or 500 ng/mL of recombinant human IL-1RA. In C–E, each dot represents a result from a different NHO biopsy/patient. Boxes extend from the 25th to 75th percentiles; middle line and whiskers represent median and minimum and maximum value, respectively. Statistical differences were analyzed using non-parametric repeated measure Friedman test with Dunn’s correction for multiple comparisons. (G) RUNX2 protein expression level of FAPs evaluated by Western blot after 7 days of osteogenic differentiation with IL-1 β (10 ng/mL), IL-1 α (100 ng/mL), NHOmac CM⁺, control isotype antibody, anti-IL-1 α , and anti-IL-1 β antibody (100 ng/mL) or IL-1RA (500 ng/mL). Statistical differences were analyzed using non-parametric repeated measure Friedman test with Dunn’s correction for multiple comparisons.

the inflamed fibrotic tissue surrounding NHOs (Fig. 7A and Supplemental Fig. S5). The distribution of these IL-1 β -producing cells overlapped with that of CD68, suggesting that for the most part, IL-1 β is expressed by CD68⁺ cells. Interestingly, for four biopsies, we observed the presence of large IL-1 β ⁺ multinucleated cells lining the mineralized bone of NHO nodules consistent with the morphology and location of osteoclasts (Fig. 7A and Supplemental Fig. S5). Although we were unable to perform TRAP staining on these NHO biopsies decalcified with nitric acid, these results suggest that IL-1 β is likely secreted by CD68⁺ macrophages and osteoclasts in these NHO biopsies. This is consistent with the known expression profile of *IL1B* mRNA expression in myeloid cells in the BioGPS database (<http://biogps.org/#goto=genereport&id=3553>) and the Human Protein Atlas database (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000125538-IL1B/celltype>) and IL-1 β immunoreactivity of osteoclasts on sections of growth plate, fracture callus, osteomyelitis, and Paget's disease.⁽³³⁾ We also confirmed that patients with NHOs had significantly elevated plasma IL-1 β concentration compared with healthy donors (Fig. 7B), suggesting that IL-1 β may play a role in NHO development.

To further investigate the involvement IL-1 on NHO pathology, we collected surgical residues of muscle tissue surrounding NHO after resection surgery. Muscle progenitor cells were expanded in vitro and PDGFR α ⁺ CD56⁻ FAPs were isolated by FACS (Supplemental Fig. S6). Osteogenic differentiation assays showed that FAPs exhibited higher calcium mineralization activity when cultured with increasing doses of either recombinant IL-1 α (Fig. 7C) or IL-1 β (Fig. 7D), suggesting that IL-1 stimulates FAP osteoblastic differentiation. The addition of anti-IL-1 β neutralizing antibody significantly inhibited FAP calcium mineralization activity when cultured with IL-1 β (Supplemental Fig. S7A). Considering the pivotal role of macrophages in NHO formation, we isolated CD14⁺ blood monocytes from healthy donors and NHO-bone marrow-derived CD14⁺ monocytes. CD14⁺ cells were cultured with or without LPS to generate CM⁻ and LPS-stimulated CM⁺ conditioned media. CM⁺ displayed significantly higher IL-1 α and IL-1 β concentrations compared with CM⁻ (Supplemental Fig. S7B, C) and, as expected, pooled CM⁺ stimulated FAPs calcium mineralization activity in osteogenic differentiation assays (Fig. 7E, F). When added individually, anti-IL-1 α and anti-IL-1 β neutralizing antibodies did not significantly reduce calcium mineralization of CM⁺-stimulated FAPs; however, the combination of both antibodies significantly reduced FAP mineralization activity associated with significant decrease in RUNX2 protein expression (Fig. 7E, G), suggesting a synergistic effect of IL-1 α and IL-1 β . This was further confirmed by the dose-dependent inhibitory effect of IL-1RA, the endogenous protein antagonist of IL1R1 common receptor for IL-1 α and IL-1 β , on FAP mineralization associated with reduced RUNX2 protein expression (Fig. 7F, G). Overall, these results confirm the involvement of IL-1 as an inflammatory mediator of NHO formation in the human pathology.

Discussion

Using non-supervised unbiased GSEA of whole muscle RNA in mice, we demonstrate herein that superimposition of a SCI to a muscle injury exacerbates the local inflammatory response to muscle injury and most particularly expression of genes associated with IL6 cytokine family/JAK/STAT3 signaling and TNF signaling via NF- κ B. The proinflammatory effect of the SCI is rapid

as we measured gene expression 2 days after SCI and/or muscle injury. This is consistent with our previous studies showing that SCI causes persistent and abnormally high expression of the IL6 family cytokine OSM, together with persistently high levels of active tyrosine phosphorylated STAT3 via JAK1/2 tyrosine kinase activation in the injured muscle.⁽¹⁹⁾ In addition to OSM that we have already shown to promote NHO in response to SCI,⁽²⁰⁾ we also found that SCI increased the expression of other inflammatory cytokines in injured muscles, including TNF, CSF-1, and IL-1 β , as well as inflammatory chemokines such as CCL2, CXCL1, or CXCL13 (Fig. 3). As we have previously shown that macrophages play a key role in NHO development,⁽⁸⁾ we focused on TNF, CSF-1, and CCL2, which are well known to regulate macrophage polarization and recruitment,⁽³⁴⁻³⁷⁾ as well as IL-1 β , which is specifically produced by phagocytes after activation of inflammasomes and mediates inflammatory responses in many tissues.⁽³⁸⁾ Using mice lacking the cognate cytokine receptors for TNF, CCL2, and IL-1, neutralizing antibodies (IL-1), or small receptor antagonists (CSF-1), we found that of these four potential mediators, only IL-1 promoted NHO development after SCI. Germinal deletion of the *Il1r1* gene that encodes the common receptor for IL-1 α and IL-1 β significantly reduced NHO volumes after SCI, although this decrease was not as pronounced as observed in *Osmr*^{-/-} mice lacking the OSM receptor.⁽²⁰⁾ Active IL-1 β release by macrophages is a two-step process, first requiring activation of NF- κ B-dependent transcription of the *Il1b* gene followed by inflammasome-dependent activation of non-active IL-1 β pro-peptide by caspase-1-mediated proteolytic cleavage. In contrast, the IL-1 α pro-peptide is biologically active and preformed intracellularly in many cell types, particularly endothelial cells and fibroblasts, and its activity can be further enhanced by calpain and several caspases upon cell death.⁽³⁹⁾ Therefore, although IL-1 β needs two distinct signals to be produced in active form by macrophages, preformed IL-1 α is a "preloaded gun" that is released upon death of many cell types.^(38,39) Although we could not detect enhanced IL-1 α transcription in our gene expression microarray analysis at day 2 post-injury, *Il1a* was upregulated later at day 4, and it is likely that muscle destruction caused by CDTX injection would release IL-1 α . To assess the respective role of IL-1 α and IL-1 β in NHO pathogenesis, we used mice targeted deletion of either the *Il1a* gene or *Il1b* gene. Deletion of either IL-1 gene alone did not alter NHO development, suggesting that both IL-1 proteins act in concert to promote NHO development. This is further suggested by reduced NHO development in mice treated simultaneously with two neutralizing antibodies specific for IL-1 α and IL-1 β , although this decrease did not reach significance ($p = 0.13$, Fig. 6B).

To validate our results in the human pathology, we show that IL-1 β protein is present in the NHO itself and the non-ossified and peripheral part of the NHO, particularly by CD68⁺ macrophages. It indicates that IL-1 β is produced locally by activated macrophages and could contribute to the development of NHO. Furthermore, IL-1 β protein concentration was doubled in the plasma of SCI patients developing NHO compared with healthy subjects. Polynucleated osteoclasts were also identified for several NHO biopsies, suggesting active bone remodeling. Functionally, we find that purified recombinant IL-1 α and IL-1 β both potentially promote calcium deposition and mineralization of human FAPs purified from the muscles surrounding patient NHOs. Furthermore, we had previously shown that LPS-stimulated monocyte-conditioned medium (CM⁺) promotes human FAP osteogenic differentiation and calcium

mineralization in part via OSM secretion.⁽²⁰⁾ Herein, we show that IL-1 α and IL-1 β , which are both secreted by human monocytes in response to LPS, both contribute to the pro-osteogenic effect of CM⁺ on human FAPs. Similar to our results suggesting that antibody neutralization of both IL-1 α and IL-1 β is necessary to reduce NHO development in mice in vivo, neutralization of both IL-1 α and IL-1 β was necessary to reduce the pro-osteogenic effect of CM⁺ on human FAPs in vitro, an effect recapitulated by addition of recombinant IL-1RA, the physiological endogenous antagonist of the IL-1 receptor. As we have shown that muscle FAPs are the cells of origin of NHO in both humans and mice (Tseng and colleagues, data not shown), this suggests that both IL-1 α and IL-1 β are potential mediators of NHO development in patients.

In respect to the other inflammatory cytokines and chemokines that we found to be highly expressed in muscles developing NHOs in mice, namely TNF, CCL2, and CSF-1, we unexpectedly found that they did not promote but instead dampened NHO development after SCI. In respect to TNF and CCL2, both have been shown to play a major role in normal muscle repair by promoting apoptosis of FAPs proliferating in the first few days in injured skeletal muscles and are therefore essential to prevent muscle fibrosis.⁽¹⁶⁾ As FAPs are the cells of origin of NHO in both humans and mice (Tseng and colleagues, data not shown), we speculate that *Ccr2*^{-/-} and *Tnfrsf1a/1b*^{-/-} mice may have reduced apoptosis and prolonged proliferation of FAPs,⁽¹⁶⁾ which could be responsible for increased muscle fibrosis and NHO volumes. The enhancing effect of CSF1R tyrosine kinase inhibitor GW2580 on NHO development was also surprising because CSF1R signaling is necessary to maintain many tissue-resident macrophages and osteoclasts but dispensable to monocyte production in the bone marrow,^(40,41) although extra-physiological treatment with stable CSF-1 protein considerably enhances monopoiesis.^(29,41) As macrophages are necessary to the development of SCI-induced NHO⁽⁸⁾ as well as genetically driven HO development in fibrodysplasia ossificans progressiva,^(17,42) we anticipated that inhibition of CSF1R signaling would reduce NHO formation. The opposite effect that we observed on NHO formation in vivo may be due to the complex function of CSF-1 on macrophage biology. CSF-1 is not only necessary to the maintenance of many types of tissue-resident macrophages, but it also induces and modulates macrophage pro-inflammatory or anti-inflammatory polarization in a context-dependent manner.^(36,43) Our results herein suggest that CSF-1 polarizes macrophages in an inflammatory manner in injured muscles in the context of a SCI similar to the effect of GW2580 treatment or CSF-1-deficiency, which both inhibit functional recovery and increase tubulointerstitial fibrosis in a mouse model of acute kidney injury.^(44,45)

Although our mouse model of SCI-NHO recapitulates many features of NHO observed in patients with SCI,⁽⁸⁾ a limitation of our mouse model is that it does not recapitulate the endochondral phase observed within NHO from patients. Indeed, safranin-O staining showed a clear chondrogenic phase with different stages of cartilage and chondroblast maturation in NHO biopsies resected from patients with SCI, suggesting some endochondral bone formation. However, we could not detect any chondrogenic phase in the NHO nodules forming in the injured muscles in mice that underwent SCI (Supplemental Fig. S8), suggesting intramembranous bone formation. Despite this limitation, functional in vivo experiments in mice, immunohistology, and functional in vitro experiments with biopsies from patients

suggest a commonality of triggering mechanisms involving exacerbated inflammation in muscles developing NHO⁽⁸⁾ with a role of OSM⁽²⁰⁾ and IL-1 reported herein.

In conclusion, we report herein that SCI exacerbates the transcription of several inflammatory cytokines and chemokines such as IL-1 β , IL-1 α , TNF, CSF-1, and CCL2 in injured muscles. We established that TNF, CSF-1, and CCL2 had a dampening effect on NHO development. In sharp contrast, IL-1 signaling promoted NHO development in injured muscles in our mouse model of SCI-induced NHO. The expression of IL-1 β in NHO biopsies from SCI and TBI patients and the osteogenic effect of IL-1 α and IL-1 β secreted by activated monocytes was confirmed in cultures of FAPs isolated from the muscles surrounding NHO biopsies from SCI and TBI patients. These results are consistent with the observation that 80% of infants with the extremely rare genetic deficiency of IL-1 receptor antagonist (DIRA) syndrome, in which IL-1 activity cannot be inhibited by endogenous IL-1RA, develop periarticular HO.⁽⁴⁶⁾ Considering that both OSM⁽²⁰⁾ and IL-1 (herein) promote NHO development after SCI, prophylactic combinations of drugs antagonizing IL-1 signaling (such as anakinra or IL-1RA) and JAK1/2 tyrosine kinases (such as ruxolitinib) activated by the OSM receptor⁽¹⁹⁾ may be studied in more detail to assess their potential synergism in inhibiting NHO development. How SCI causes this peculiar exacerbation of inflammation in injured muscles that leads to NHO formation remains incompletely understood. In our SCI-NHO mouse model, transection of the spinal cord between T₁₁ and T₁₃ leads to a significant increase of epinephrine blood plasma concentration 24 hours post-surgery, and we have shown chemical sympathectomy or inhibition of β 1/2-adrenergic receptors with propranolol significantly reduced NHO formation, suggesting that sympathetic adrenergic signaling plays an important role in NHO pathogenesis.⁽⁴⁷⁾ By the same token, the increased adrenergic signaling subsequent to an SCI may exacerbate the inflammatory response in injured muscle. In support of this, binding of epinephrine to macrophages via β 2 adrenergic receptors has been shown to modulate inflammatory responses by, for instance, upregulating OSM and IL-1 β expression in macrophages and microglial cells.⁽⁴⁸⁻⁵⁰⁾ A similar mechanism may occur via systemic release of epinephrine from adrenal glands in response to low level SCI.⁽⁴⁷⁾

Disclosures

KS is a co-inventor on patent applications for NLRP3 inhibitors, which have been licensed to Inflazome Ltd, a company headquartered in Dublin, Ireland. Inflazome is developing drugs that target the NLRP3 inflammasome to address unmet clinical needs in inflammatory disease. KS served on the Scientific Advisory Board of Inflazome in 2016–2017 and serves as a consultant to Quench Bio, USA, and Novartis, Switzerland. All other authors have no conflicts of interest to declare.

Acknowledgments

The authors thank Prof David Hume for kindly donating recombinant pig CSF-1-Fc.⁽²⁹⁾ This research was funded in parts by Project Grant 1101620 (JPL, ARP and FG) and Ideas Grant 1181053 (JPL, KAA, HWT, FG, SB) from the National Health and Medical Research Council of Australia (NHMRC), the Congressionally Approved Spinal Cord Injury Research Program of the US Department of Defense award W81XWH-15-1-0606 (JPL and FG), The

University of Queensland Early Career Researcher Grant UQECR1834805 (KA), and by funds from the Mater Foundation. JPL was supported by Research Fellowships 1044091 and 1136130 and KS by Research Fellowship 1141131 from the NHMRC. IK was supported by an international student scholarship from The University of Queensland. MS was supported by a student scholarship from the French Society of Physical and Rehabilitation Medicine. The authors also greatly acknowledge the help and advice of Dr Adam Ewing and Dr Kim Summers (Mater Research Institute) and the technical assistance of Marie-Emmanuelle Goriot, Bastien Rival (IRBA, INSERM UMRS-MD-1197, Clamart), Denis Clay (INSERM UMS-44 Université de Paris-Saclay, Villejuif), and Guillaume Genêt (Raymond Poincaré Hospital, Garches). The authors also acknowledge the technical assistance of “Cochin HistIM Facility” (Paris). The authors also acknowledge the scientific and technical assistance at the Translational Research Institute: The University of Queensland biological resources TRI facility, histology facility, flow cytometry facility, microscopy facility, and the preclinical imaging facility, which is supported by Therapeutic Innovation Australia (TIA). TIA is supported by the Australian Government through the National Collaborative Research Infrastructure Strategy (NCRIS) program. Authors' roles: HWT, KAA, IK, DG, JG, CV, MS, WF, BJ, SMM, GT, LW, and CV performed the experiments. HWT, KAA, IK, DG, SB, and JPL conceived the experiments and the work. KS provided essential reagents and expertise in IL1 mouse models. HWT, KAA, DG, SB, and JPL wrote the manuscript. HWT, KAA, DG, FG, KS, SB, and JPL edited the manuscript. HWT, KAA, ARP, FG, SB, and JPL obtained funding.

PEER REVIEW

The peer review history for this article is available at <https://publons.com/publon/10.1002/jbmr.4482>.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Normalized gene expression microarray data are accessible on NCBI database with the GEO accession number GSE165062. All other data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

References

- van Kuijk AA, Geurts AC, van Kuppevelt HJ. Neurogenic heterotopic ossification in spinal cord injury. *Spinal Cord*. 2002;40(7):313-326.
- Forsberg JA, Pepek JM, Wagner S, et al. Heterotopic ossification in high-energy wartime extremity injuries: prevalence and risk factors. *J Bone Joint Surg Am*. 2009;91(5):1084-1091.
- Sakellariou VI, Grigoriou E, Mavrogenis AF, Soucacos PN, Papagelopoulos PJ. Heterotopic ossification following traumatic brain injury and spinal cord injury: insight into the etiology and pathophysiology. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2012;12(4):230-240.
- Arduini M, Mancini F, Farsetti P, Piperno A, Ippolito E. A new classification of peri-articular heterotopic ossification of the hip associated with neurological injury: 3D CT scan assessment and intra-operative findings. *Bone Joint J*. 2015;97-b(7):899-904.
- Genêt F, Ruet A, Almangour W, et al. Beliefs relating to recurrence of heterotopic ossification following excision in patients with spinal cord injury: a review. *Spinal Cord*. 2015;53(5):340-344.
- Ranganathan K, Loder S, Agarwal S, et al. Heterotopic ossification: basic-science principles and clinical correlates. *J Bone Joint Surg Am*. 2015;97(13):1101-1111.
- Zakrasek EC, Yurkiewicz SM, Dirlikov B, Pence BT, Crew JD. Use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs to prevent heterotopic ossification after spinal cord injury: a retrospective chart review. *Spinal Cord*. 2019;57(3):214-220.
- Genêt F, Kulina I, Vaquette C, et al. Neurological heterotopic ossification following spinal cord injury is triggered by macrophage-mediated inflammation in muscle. *J Pathol*. 2015;236(2):229-240.
- Lu H, Huang D, Saederup N, et al. Macrophages recruited via CCR2 produce insulin-like growth factor-1 to repair acute skeletal muscle injury. *FASEB J*. 2011;25(1):358-369.
- Willenborg S, Lucas T, van Loo G, et al. CCR2 recruits an inflammatory macrophage subpopulation critical for angiogenesis in tissue repair. *Blood*. 2012;120(3):613-625.
- Qian BZ, Li J, Zhang H, et al. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature*. 2011;472(7355):222-227.
- Lu H, Huang D, Ransohoff RM, Zhou L. Acute skeletal muscle injury: CCL2 expression by both monocytes and injured muscle is required for repair. *FASEB J*. 2011;25(10):3344-3355.
- Arnold L, Henry A, Poron F, et al. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med*. 2007;204(5):1057-1069.
- Zhao W, Lu H, Wang X, Ransohoff RM, Zhou L. CX3CR1 deficiency delays acute skeletal muscle injury repair by impairing macrophage functions. *FASEB J*. 2016;30(1):380-393.
- Hardy D, Besnard A, Latil M, et al. Comparative study of injury models for studying muscle regeneration in mice. *PLoS One*. 2016;11(1):e0147198.
- Lemos DR, Babaeijandaghi F, Low M, et al. Nilotinib reduces muscle fibrosis in chronic muscle injury by promoting TNF-mediated apoptosis of fibro/adipogenic progenitors. *Nat Med*. 2015;21(7):786-794.
- Convente MR, Chakkalakal SA, Yang E, et al. Depletion of mast cells and macrophages impairs heterotopic ossification in an *Acrv1* (R206H) mouse model of fibrodysplasia ossificans progressiva. *J Bone Miner Res*. 2018;33(2):269-282.
- Sorkin M, Huber AK, Hwang C, et al. Regulation of heterotopic ossification by monocytes in a mouse model of aberrant wound healing. *Nat Commun*. 2020;11(1):722.
- Alexander KA, Tseng H-W, Fleming W, et al. Inhibition of JAK1/2 tyrosine kinases reduces neurogenic heterotopic ossification after spinal cord injury. *Front Immunol*. 2019;10:377.
- Torossian F, Guerton B, Anginot A, et al. Macrophage-derived oncostatin M contributes to human and mouse neurogenic heterotopic ossifications. *JCI Insight*. 2017;2(21):e96034.
- Center TFCROS. The transcriptional network that controls growth arrest and differentiation in a human myeloid leukemia cell line. *Nat Genet*. 2009;41(5):553-562.
- Alexander KA, Tseng HW, Salga M, Genet F, Levesque JP. When the nervous system turns skeletal muscles into bones: how to solve the conundrum of neurogenic heterotopic ossification. *Curr Osteoporos Rep*. 2020;18(6):666-676.
- Horai R, Asano M, Sudo K, et al. Production of mice deficient in genes for interleukin (IL)-1alpha, IL-1beta, IL-1alpha/beta, and IL-1 receptor antagonist shows that IL-1beta is crucial in turpentine-induced fever development and glucocorticoid secretion. *J Exp Med*. 1998;187(9):1463-1475.
- Gu Z, Eils R, Schlesner M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics*. 2016;32(18):2847-2849.
- Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, et al. PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately down-regulated in human diabetes. *Nat Genet*. 2003;34(3):267-273.
- Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(43):15545-15550.
- Liberzon A, Birger C, Thorvaldsdóttir H, et al. The molecular signatures database (MSigDB) hallmark gene set collection. *Cell Syst*. 2015;1(6):417-425.

28. Conway JG, McDonald B, Parham J, et al. Inhibition of colony-stimulating-factor-1 signaling in vivo with the orally bioavailable cFMS kinase inhibitor GW2580. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(44):16078-16083.
29. Gow DJ, Sauter KA, Pridans C, et al. Characterisation of a novel fc conjugate of macrophage colony-stimulating factor. *Mol Ther*. 2014;22(9):1580-1592.
30. Karaman MW, Herrgard S, Treiber DK, et al. A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat Biotech*. 2008;26(1):127-132.
31. Dinarello CA. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *Int Rev Immunol*. 1998;16(5-6):457-499.
32. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*. 2013;39(6):1003-1018.
33. O'Keefe RJ, Teot LA, Singh D, et al. Osteoclasts constitutively express regulators of bone resorption: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Lab Invest*. 1997;76(4):457-465.
34. Pyonteck SM, Akkari L, Schuhmacher AJ, et al. CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nat Med*. 2013;19(10):1264-1272.
35. Gschwandtner M, Derler R, Midwood KS. More than just attractive: how CCL2 influences myeloid cell behavior beyond chemotaxis. *Front Immunol*. 2019;10:2759.
36. Braza MS, Conde P, Garcia M, et al. Neutrophil derived CSF1 induces macrophage polarization and promotes transplantation tolerance. *Am J Transplant*. 2018;18(5):1247-1255.
37. Winston BW, Lange-Carter CA, Gardner AM, Johnson GL, Riches DW. Tumor necrosis factor alpha rapidly activates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade in a MAPK kinase kinase-dependent, c-Raf-1-independent fashion in mouse macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92(5):1614-1618.
38. Dinarello CA, Simon A, van der Meer JW. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2012;11(8):633-652.
39. Chan AH, Schroder K. Inflammasome signaling and regulation of interleukin-1 family cytokines. *J Exp Med*. 2020;217(1):e20190314.
40. MacDonald KPA, Palmer JS, Cronau S, et al. An antibody against the colony-stimulating factor 1 receptor depletes the resident subset of monocytes and tissue- and tumor-associated macrophages but does not inhibit inflammation. *Blood*. 2010;116(19):3955-3963.
41. Sauter KA, Pridans C, Sehgal A, et al. Pleiotropic effects of extended blockade of CSF1R signaling in adult mice. *J Leukoc Biol*. 2014;96(2):265-274.
42. Levesque J-P, Sims NA, Pettit AR, et al. Macrophages driving heterotopic ossification: convergence of genetically-driven and trauma-driven mechanisms. *J Bone Miner Res*. 2018;33(2):365-366.
43. Rovida E, Sbarba PD. Colony-stimulating factor-1 receptor in the polarization of macrophages: a target for turning bad to good ones? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;6(6):379-388.
44. Zhang MZ, Yao B, Yang S, et al. CSF-1 signaling mediates recovery from acute kidney injury. *J Clin Invest*. 2012;122(12):4519-4532.
45. Wang Y, Chang J, Yao B, et al. Proximal tubule-derived colony stimulating factor-1 mediates polarization of renal macrophages and dendritic cells, and recovery in acute kidney injury. *Kidney Int*. 2015;88(6):1274-1282.
46. Aksentjevich I, Masters SL, Ferguson PJ, et al. An autoinflammatory disease with deficiency of the interleukin-1-receptor antagonist. *N Engl J Med*. 2009;360(23):2426-2437.
47. Debaud C, Tseng HW, Chedik M, et al. Local and systemic factors drive ectopic osteogenesis in regenerating muscles of spinal cord-injured mice in a lesion level-dependent manner. *J Neurotrauma*. 2021;38(15):2162-2175.
48. Grailer JJ, Haggadone MD, Sarma JV, Zetoune FS, Ward PA. Induction of M2 regulatory macrophages through the β 2-adrenergic receptor with protection during endotoxemia and acute lung injury. *J Innate Immun*. 2014;6(5):607-618.
49. Verhoeckx KC, Doornbos RP, Witkamp RF, van der Greef J, Rodenburg RJ. Beta-adrenergic receptor agonists induce the release of granulocyte chemotactic protein-2, oncostatin M, and vascular endothelial growth factor from macrophages. *Int Immunopharmacol*. 2006;6(1):1-7.
50. Tozaki-Saitoh H, Sasaki I, Yamashita T, et al. Involvement of exchange protein directly activated by cAMP and tumor progression locus 2 in IL-1 β production in microglial cells following activation of β -adrenergic receptors. *J Pharmacol Sci*. 2020;143(3):133-140.

1.3 Références

- 1 Dejerine A, Ceillier A. Paraosteoarthropathies des Paraplégiques par Lésion Médullaire; Etude Clinique et Radiographique. In *Ann Med*, 1918.
- 2 Vanden Bossche L, Vanderstraeten G. Heterotopic ossification: a review. *J Rehabil Med* 2005; **37**: 129-136
- 3 Owens BD, Kragh JF, Wenke JC, *et al.* Combat wounds in operation Iraqi Freedom and operation Enduring Freedom. *J Trauma* 2008; **64**: 295-299
- 4 Genêt F, Jourdan C, Schnitzler A, *et al.* Troublesome Heterotopic Ossification after Central Nervous System Damage: A Survey of 570 Surgeries. Feany M, ed. *PLoS ONE* 2011; **6**: e16632
- 5 Ranganathan K, Loder S, Agarwal S, *et al.* Heterotopic Ossification: Basic-Science Principles and Clinical Correlates. *J Bone Joint Surg Am* 2015; **97**: 1101-1111
- 6 Meyers C, Lisiecki J, Miller S, *et al.* Heterotopic Ossification: A Comprehensive Review: HETEROTOPIC OSSIFICATION. *JBMR Plus* 2019; **3**: e10172
- 7 van Kuijk AA, Geurts ACH, van Kuppevelt HJM. Neurogenic heterotopic ossification in spinal cord injury. *Spinal Cord* 2002; **40**: 313-326
- 8 Peterson JR, Okagbare PI, De La Rosa S, *et al.* Early detection of burn induced heterotopic ossification using transcutaneous Raman spectroscopy. *Bone* 2013; **54**: 28-34
- 9 Sakellariou VI, Grigoriou E, Mavrogenis AF, *et al.* Heterotopic ossification following traumatic brain injury and spinal cord injury: insight into the etiology and pathophysiology. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2012; **12**: 230-240
- 10 Wong KR, Mychasiuk R, O'Brien TJ, *et al.* Neurological heterotopic ossification: novel mechanisms, prognostic biomarkers and prophylactic therapies. *Bone Res* 2020; **8**: 42
- 11 Gautschi OP, Cadosch D, Frey SP, *et al.* Serum-mediated osteogenic effect in traumatic brain-injured patients. *ANZ Journal of Surgery* 2009; **79**: 449-455
- 12 Gautschi OP, Toffoli AM, Joesbury KA, *et al.* Osteoinductive effect of cerebrospinal fluid from brain-injured patients. *J Neurotrauma* 2007; **24**: 154-162
- 13 Cadosch D, Toffoli AM, Gautschi OP, *et al.* Serum after traumatic brain injury increases proliferation and supports expression of osteoblast markers in muscle cells. *J Bone Joint Surg Am* 2010; **92**: 645-653

- 14 Suehiro E, Fujisawa H, Akimura T, *et al.* Increased matrix metalloproteinase-9 in blood in association with activation of interleukin-6 after traumatic brain injury: influence of hypothermic therapy. *J Neurotrauma* 2004; **21**: 1706-1711
- 15 Torossian F, Guerton B, Anginot A, *et al.* Macrophage-derived oncostatin M contributes to human and mouse neurogenic heterotopic ossifications. *JCI Insight* 2017; **2**
- 16 Tseng H-W, Kulina I, Girard D, *et al.* Interleukin-1 Is Overexpressed in Injured Muscles Following Spinal Cord Injury and Promotes Neurogenic Heterotopic Ossification. *J Bone Miner Res* 2022; **37**: 531-546
- 17 Cipriano CA, Pill SG, Keenan MA. Heterotopic ossification following traumatic brain injury and spinal cord injury. *J Am Acad Orthop Surg* 2009; **17**: 689-697
- 18 Girard D, Torossian F, Oberlin E, *et al.* Neurogenic Heterotopic Ossifications Recapitulate Hematopoietic Stem Cell Niche Development Within an Adult Osteogenic Muscle Environment. *Front Cell Dev Biol* 2021; **9**
- 19 Davis TA, Lazdun Y, Potter BK, *et al.* Ectopic bone formation in severely combat-injured orthopedic patients — A hematopoietic niche. *Bone* 2013; **56**: 119-126
- 20 Brady RD, Shultz SR, McDonald SJ, *et al.* Neurological heterotopic ossification: Current understanding and future directions. *Bone* 2018; **109**: 35-42
- 21 Wang X, Li F, Xie L, *et al.* Inhibition of overactive TGF- β attenuates progression of heterotopic ossification in mice. *Nat Commun* 2018; **9**: 551
- 22 Chen G, Deng C, Li Y-P. TGF- β and BMP Signaling in Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *International Journal of Biological Sciences* 2012; **8**: 272-288
- 23 Hatsell SJ, Idone V, Wolken DMA, *et al.* ACVR1R206H receptor mutation causes fibrodysplasia ossificans progressiva by imparting responsiveness to activin A. *Sci Transl Med* 2015; **7**: 303ra137
- 24 Saleh M, Commandeur J, Bocciardi R, *et al.* Fibrodysplasia ossificans progressiva with minor unilateral hallux anomaly in a sporadic case from Northern Tanzania with the common ACVR1c.617G>A mutation. *Pan Afr Med J* 2015; **22**: 299
- 25 Potter BK, Burns TC, Lacap AP, *et al.* Heterotopic ossification following traumatic and combat-related amputations. Prevalence, risk factors, and preliminary results of excision. *J Bone Joint Surg Am* 2007; **89**: 476-486

- 26 Brooker AF, Bowerman JW, Robinson RA, *et al.* Ectopic ossification following total hip replacement. Incidence and a method of classification. *J Bone Joint Surg Am* 1973; **55**: 1629-1632
- 27 Hoyt BW, Pavey GJ, Potter BK, *et al.* Heterotopic ossification and lessons learned from fifteen years at war: A review of therapy, novel research, and future directions for military and civilian orthopaedic trauma. *Bone* 2018; **109**: 3-11
- 28 Forsberg JA, Pepek JM, Wagner S, *et al.* Heterotopic ossification in high-energy wartime extremity injuries: prevalence and risk factors. *J Bone Joint Surg Am* 2009; **91**: 1084-1091
- 29 Meyer C, Haustrate M-A, Nisolle JF, *et al.* Heterotopic ossification in COVID-19: a series of 4 cases. *Ann Phys Rehabil Med* October 2020
- 30 de l'Escalopier N, Mathieu L, Duret C, *et al.* Re: 'High prevalence of heterotopic ossification in critically ill patients with severe COVID-19' by Stoira *et al.* *Clin Microbiol Infect* 2021; **27**: 1051-1052
- 31 Potter MBK, Forsberg LJA, Davis TA, *et al.* Heterotopic Ossification Following Combat-Related Trauma: *The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume* 2010; **92**: 74-89
- 32 Genêt F, Kulina I, Vaquette C, *et al.* Neurological heterotopic ossification following spinal cord injury is triggered by macrophage-mediated inflammation in muscle: Macrophages drive heterotopic ossification after spinal cord injury. *The Journal of Pathology* 2015; **236**: 229-240
- 33 Garland DE. Clinical observations on fractures and heterotopic ossification in the spinal cord and traumatic brain injured populations. *Clin Orthop Relat Res* 1988: 86-101
- 34 Flin C, Curalucci H, Duvocelle A, *et al.* [Heterotopic ossification and brain injury]. *Ann Readapt Med Phys* 2002; **45**: 517-520
- 35 Daniels CM, Pavey GJ, Arthur J, *et al.* Has the Proportion of Combat-Related Amputations That Develop Heterotopic Ossification Increased? *J Orthop Trauma* 2018; **32**: 283-287
- 36 Gennarelli TA. Heterotopic ossification. *Brain Inj* 1988; **2**: 175-178
- 37 Hendricks HT, Geurts ACH, van Ginneken BC, *et al.* Brain injury severity and autonomic dysregulation accurately predict heterotopic ossification in patients with traumatic brain injury. *Clin Rehabil* 2007; **21**: 545-553

- 38 Rawat N, Chugh S, Zachariah K, *et al.* Incidence and characteristics of heterotopic ossification after spinal cord injury: a single institution study in India. *Spinal Cord Ser Cases* 2019; **5**: 72
- 39 Newman RJ, Stone MH, Mukherjee SK. Accelerated fracture union in association with severe head injury. *Injury* 1987; **18**: 241-246
- 40 Frost RB, Farrer TJ, Primosch M, *et al.* Prevalence of Traumatic Brain Injury in the General Adult Population: A Meta-Analysis. *NED* 2013; **40**: 154-159
- 41 Wittenberg RH, Peschke U, Bötzel U. Heterotopic ossification after spinal cord injury. Epidemiology and risk factors. *J Bone Joint Surg Br* 1992; **74**: 215-218
- 42 Chen H, Hu B, Lv X, *et al.* Prostaglandin E2 mediates sensory nerve regulation of bone homeostasis. *Nat Commun* 2019; **10**: 181
- 43 Banovac K, Williams JM, Patrick LD, *et al.* Prevention of heterotopic ossification after spinal cord injury with indomethacin. *Spinal Cord* 2001; **39**: 370-374
- 44 Zakrasek EC, Yurkiewicz SM, Dirlikov B, *et al.* Use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs to prevent heterotopic ossification after spinal cord injury: a retrospective chart review. *Spinal Cord* 2019; **57**: 214-220
- 45 Garland DE, Alday B, Venos KG, *et al.* Diphosphonate treatment for heterotopic ossification in spinal cord injury patients. *Clin Orthop Relat Res* 1983: 197-200
- 46 Banovac K. The effect of etidronate on late development of heterotopic ossification after spinal cord injury. *J Spinal Cord Med* 2000; **23**: 40-44
- 47 Kennel KA, Drake MT. Adverse Effects of Bisphosphonates: Implications for Osteoporosis Management. *Mayo Clin Proc* 2009; **84**: 632-638
- 48 Sumitani Y, Uchibe K, Yoshida K, *et al.* Inhibitory effect of retinoic acid receptor agonists on in vitro chondrogenic differentiation. *Anat Sci Int* 2020; **95**: 202-208
- 49 Lees-Shepard JB, Nicholas S-AE, Stoessel SJ, *et al.* Palovarotene reduces heterotopic ossification in juvenile FOP mice but exhibits pronounced skeletal toxicity. *Elife* 2018; **7**: e40814
- 50 Pacifici M, Shore EM. Comment on 'Palovarotene reduces heterotopic ossification in juvenile FOP mice but exhibits pronounced skeletal toxicity'. Rosen CJ, McCarthy MI, eds. *eLife* 2019; **8**: e43173
- 51 Sautter-Bihl ML, Liebermeister E, Nanassy A. Radiotherapy as a local treatment option for heterotopic ossifications in patients with spinal cord injury. *Spinal Cord* 2000; **38**: 33-36

- 52 Sautter-Bihl ML, Hültenschmidt B, Liebermeister E, *et al.* Fractionated and single-dose radiotherapy for heterotopic bone formation in patients with spinal cord injury. A phase-I/II study. *Strahlenther Onkol* 2001; **177**: 200-205
- 53 Cipriano C, Pill SG, Rosenstock J, *et al.* Radiation therapy for preventing recurrence of neurogenic heterotopic ossification. *Orthopedics* 2009; **32**: orthosupersite.com/view.asp?rID=42854
- 54 Daud O, Sett P, Burr RG, *et al.* The relationship of heterotopic ossification to passive movements in paraplegic patients. *Disability and Rehabilitation* 1993; **15**: 114-118
- 55 Fuller DA, Mark A, Keenan MAE. Excision of heterotopic ossification from the knee: a functional outcome study. *Clin Orthop Relat Res* 2005; **438**: 197-203
- 56 de l'Escalopier N, Salga M, Gatin L, *et al.* Resection of heterotopic ossification around the hip after trauma. *EFORT Open Rev* 2019; **4**: 263-268
- 57 Garland DE. Surgical approaches for resection of heterotopic ossification in traumatic brain-injured adults. *Clin Orthop Relat Res* 1991: 59-70
- 58 Garland DE. A clinical perspective on common forms of acquired heterotopic ossification. *Clin Orthop Relat Res* 1991: 13-29
- 59 Garland DE, Hanscom DA, Keenan MA, *et al.* Resection of heterotopic ossification in the adult with head trauma. *J Bone Joint Surg Am* 1985; **67**: 1261-1269
- 60 Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, *et al.* Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; **40**: 46-62
- 61 Green JD, Tollemar V, Dougherty M, *et al.* Multifaceted signaling regulators of chondrogenesis: Implications in cartilage regeneration and tissue engineering. *Genes & Diseases* 2015; **2**: 307-327
- 62 Long F, Ornitz DM. Development of the Endochondral Skeleton. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; **5**: a008334
- 63 Fu R, Liu C, Yan Y, *et al.* Bone defect reconstruction via endochondral ossification: A developmental engineering strategy. *J Tissue Eng* 2021; **12**: 20417314211004212
- 64 Berendsen AD, Olsen BR. Bone development. *Bone* 2015; **80**: 14-18
- 65 Shore EM, Kaplan FS. Inherited human diseases of heterotopic bone formation. *Nat Rev Rheumatol* 2010; **6**: 518-527

- 66 Lees-Shepard JB, Goldhamer DJ. Stem Cells and Heterotopic Ossification: Lessons from Animal Models. *Bone* 2018; **109**: 178-186
- 67 Clever JL, Sakai Y, Wang RA, *et al.* Inefficient skeletal muscle repair in inhibitor of differentiation knockout mice suggests a crucial role for BMP signaling during adult muscle regeneration. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; **298**: C1087-1099
- 68 Chakkalakal SA, Zhang D, Culbert AL, *et al.* An Acvr1 R206H knock-in mouse has fibrodysplasia ossificans progressiva. *J Bone Miner Res* 2012; **27**: 1746-1756
- 69 Rumi MN, Deol GS, Singapuri KP, *et al.* The origin of osteoprogenitor cells responsible for heterotopic ossification following hip surgery: an animal model in the rabbit. *J Orthop Res* 2005; **23**: 34-40
- 70 Peterson JR, Agarwal S, Brownley RC, *et al.* Direct Mouse Trauma/Burn Model of Heterotopic Ossification. *J Vis Exp* 2015: 52880
- 71 McClure J. The effect of diphosphonates on heterotopic ossification in regenerating Achilles tendon of the mouse. *J Pathol* 1983; **139**: 419-430
- 72 Brady RD, Zhao MZ, Wong KR, *et al.* A novel rat model of heterotopic ossification after polytrauma with traumatic brain injury. *Bone* 2020; **133**: 115263
- 73 Biga LM, Dawson S, Harwell A, *et al.* Anatomy & Physiology. OpenStax/Oregon State University; 2019.
- 74 Montarras D, L'honoré A, Buckingham M. Lying low but ready for action: the quiescent muscle satellite cell. *The FEBS Journal* 2013; **280**: 4036-4050
- 75 Laumonier T, Menetrey J. Muscle injuries and strategies for improving their repair. *J EXP ORTOP* 2016; **3**: 15
- 76 Wosczyzna MN, Rando TA. A Muscle Stem Cell Support Group: Coordinated Cellular Responses in Muscle Regeneration. *Developmental Cell* 2018; **46**: 135-143
- 77 Collins BC, Kardon G. It takes all kinds: heterogeneity among satellite cells and fibro-adipogenic progenitors during skeletal muscle regeneration. *Development* 2021; **148**
- 78 Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, *et al.* Pax7 Is Required for the Specification of Myogenic Satellite Cells. *Cell* 2000; **102**: 777-786
- 79 Olguin HC, Pisconti A. Marking the tempo for myogenesis: Pax7 and the regulation of muscle stem cell fate decisions. *J Cell Mol Med* 2012; **16**: 1013-1025

- 80 Brzeszczyńska J, Brzeszczyński F, Hamilton DF, *et al.* Role of microRNA in muscle regeneration and diseases related to muscle dysfunction in atrophy, cachexia, osteoporosis, and osteoarthritis. *Bone & Joint Research* 2020; **9**: 798-807
- 81 Wozniak AC, Anderson JE. Nitric oxide-dependence of satellite stem cell activation and quiescence on normal skeletal muscle fibers. *Dev Dyn* 2007; **236**: 240-250
- 82 Chargé SBP, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 2004; **84**: 209-238
- 83 Olguin HC, Yang Z, Tapscott SJ, *et al.* Reciprocal inhibition between Pax7 and muscle regulatory factors modulates myogenic cell fate determination. *J Cell Biol* 2007; **177**: 769-779
- 84 Shinin V, Gayraud-Morel B, Gomès D, *et al.* Asymmetric division and cosegregation of template DNA strands in adult muscle satellite cells. *Nat Cell Biol* 2006; **8**: 677-687
- 85 Abou-Khalil R, Yang F, Lieu S, *et al.* Role of muscle stem cells during skeletal regeneration. *Stem Cells* 2015; **33**: 1501-1511
- 86 Mann CJ, Perdiguero E, Kharraz Y, *et al.* Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. *Skeletal Muscle* 2011; **1**: 21
- 87 Davies OG, Liu Y, Player DJ, *et al.* Defining the Balance between Regeneration and Pathological Ossification in Skeletal Muscle Following Traumatic Injury. *Frontiers in Physiology* 2017; **8**
- 88 Brack AS, Conboy MJ, Roy S, *et al.* Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis. *Science* 2007; **317**: 807-810
- 89 Conboy IM, Conboy MJ, Wagers AJ, *et al.* Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature* 2005; **433**: 760-764
- 90 Cencetti F, Bernacchioni C, Nincheri P, *et al.* Transforming growth factor-beta1 induces transdifferentiation of myoblasts into myofibroblasts via up-regulation of sphingosine kinase-1/S1P3 axis. *Mol Biol Cell* 2010; **21**: 1111-1124
- 91 Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N, *et al.* Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat Cell Biol* 2010; **12**: 143-152
- 92 Hashimoto N, Kiyono T, Wada MR, *et al.* Osteogenic properties of human myogenic progenitor cells. *Mech Dev* 2008; **125**: 257-269

- 93 Wu X, Rathbone CR. Satellite cell functional alterations following cutaneous burn in rats include an increase in their osteogenic potential. *J Surg Res* 2013; **184**: e9-16
- 94 Lounev VY, Ramachandran R, Wosczyzna MN, *et al.* Identification of progenitor cells that contribute to heterotopic skeletogenesis. *J Bone Joint Surg Am* 2009; **91**: 652-663
- 95 Wosczyzna MN, Biswas AA, Cogswell CA, *et al.* Multipotent progenitors resident in the skeletal muscle interstitium exhibit robust BMP-dependent osteogenic activity and mediate heterotopic ossification. *J Bone Miner Res* 2012; **27**: 1004-1017
- 96 Tseng H-W, Girard D, Alexander KA, *et al.* Spinal cord injury reprograms muscle fibroadipogenic progenitors to form heterotopic bones within muscles. *Bone Res* 2022; **10**: 1-16
- 97 Wosczyzna MN, Konishi CT, Perez Carbajal EE, *et al.* Mesenchymal Stromal Cells Are Required for Regeneration and Homeostatic Maintenance of Skeletal Muscle. *Cell Rep* 2019; **27**: 2029-2035.e5
- 98 Molina T, Fabre P, Dumont NA. Fibro-adipogenic progenitors in skeletal muscle homeostasis, regeneration and diseases. *Open Biol* 2021; **11**: 210110
- 99 Joe AWB, Yi L, Natarajan A, *et al.* Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat Cell Biol* 2010; **12**: 153-163
- 100 Pretheeban T, Lemos DR, Paylor B, *et al.* Role of stem/progenitor cells in reparative disorders. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2012; **5**: 20
- 101 Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; **8**: 315-317
- 102 Horwitz EM, Andreef M, Frassoni F. Mesenchymal Stromal Cells. *Curr Opin Hematol* 2006; **13**: 419-425
- 103 Bernardo ME, Fibbe WE. Mesenchymal Stromal Cells: Sensors and Switchers of Inflammation. *Cell Stem Cell* 2013; **13**: 392-402
- 104 Leinroth AP, Mirando AJ, Rouse D, *et al.* Identification of distinct non-myogenic skeletal-muscle-resident mesenchymal cell populations. *Cell Reports* 2022; **39**
- 105 Heredia JE, Mukundan L, Chen FM, *et al.* Type 2 innate signals stimulate fibro/adipogenic progenitors to facilitate muscle regeneration. *Cell* 2013; **153**: 376-388

- 106 Biferali B, Proietti D, Mozzetta C, *et al.* Fibro–Adipogenic Progenitors Cross-Talk in Skeletal Muscle: The Social Network. *Front Physiol* 2019; **10**
- 107 Lemos DR, Babaeijandaghi F, Low M, *et al.* Nilotinib reduces muscle fibrosis in chronic muscle injury by promoting TNF-mediated apoptosis of fibro/adipogenic progenitors. *Nat Med* 2015; **21**: 786-794
- 108 Bentzinger CF, Wang YX, Dumont NA, *et al.* Cellular dynamics in the muscle satellite cell niche. *EMBO Rep* 2013; **14**: 1062-1072
- 109 Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nat Rev Rheumatol* 2015; **11**: 45-54
- 110 Schroeder TM, Jensen ED, Westendorf JJ. Runx2: a master organizer of gene transcription in developing and maturing osteoblasts. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2005; **75**: 213-225
- 111 Lefebvre V, Dvir-Ginzberg M. SOX9 and the many facets of its regulation in the chondrocyte lineage. *Connect Tissue Res* 2017; **58**: 2-14
- 112 Marsell R, Einhorn TA. THE BIOLOGY OF FRACTURE HEALING. *Injury* 2011; **42**: 551-555
- 113 Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965; **150**: 893-899
- 114 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; **284**: 143-147
- 115 Colnot C. Skeletal cell fate decisions within periosteum and bone marrow during bone regeneration. *J Bone Miner Res* 2009; **24**: 274-282
- 116 Julien A, Kanagalingam A, Martínez-Sarrà E, *et al.* Direct contribution of skeletal muscle mesenchymal progenitors to bone repair. *Nat Commun* 2021; **12**: 2860
- 117 Julien A, Perrin S, Martínez-Sarrà E, *et al.* Skeletal stem/progenitor cells in periosteum and skeletal muscle share a common molecular response to bone injury. *J of Bone & Mineral Res* June 2022: jbmr.4616
- 118 Uezumi A, Ito T, Morikawa D, *et al.* Fibrosis and adipogenesis originate from a common mesenchymal progenitor in skeletal muscle. *J Cell Sci* 2011; **124**: 3654-3664
- 119 Theret M, Rossi FMV, Contreras O. Evolving Roles of Muscle-Resident Fibro-Adipogenic Progenitors in Health, Regeneration, Neuromuscular Disorders, and Aging. *Front Physiol* 2021; **12**: 673404

- 120 Chalmers J, Gray DH, Rush J. Observations on the induction of bone in soft tissues. *The Journal of Bone and Joint Surgery British volume* 1975; **57-B**: 36-45
- 121 Agarwal S, Loder S, Brownley C, *et al.* Inhibition of Hif1 α prevents both trauma-induced and genetic heterotopic ossification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; **113**: E338-347
- 122 Agarwal S, Loder S, Cholok D, *et al.* Surgical Excision of Heterotopic Ossification Leads to Re-Emergence of Mesenchymal Stem Cell Populations Responsible for Recurrence: Recurrent Heterotopic Ossification. *STEM CELLS Translational Medicine* 2017; **6**: 799-806
- 123 Loder SJ, Agarwal S, Chung MT, *et al.* Characterizing the Circulating Cell Populations in Traumatic Heterotopic Ossification. *The American Journal of Pathology* 2018; **188**: 2464-2473
- 124 Eisner C, Cummings M, Johnston G, *et al.* Murine Tissue-Resident PDGFR α + Fibro-Adipogenic Progenitors Spontaneously Acquire Osteogenic Phenotype in an Altered Inflammatory Environment. *J Bone Miner Res* April 2020
- 125 Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, *et al.* Tissue-resident macrophages. *Nature Immunology* 2013; **14**: 986-995
- 126 Novak ML, Weinheimer-Haus EM, Koh TJ. Macrophage Activation and Skeletal Muscle Healing Following Traumatic Injury. *J Pathol* 2014; **232**: 344-355
- 127 Arnold L, Henry A, Poron F, *et al.* Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med* 2007; **204**: 1057-1069
- 128 Saclier M, Yacoub-Youssef H, Mackey AL, *et al.* Differentially activated macrophages orchestrate myogenic precursor cell fate during human skeletal muscle regeneration. *Stem Cells* 2013; **31**: 384-396
- 129 Urciuolo A, Quarta M, Morbidoni V, *et al.* Collagen VI regulates satellite cell self-renewal and muscle regeneration. *Nat Commun* 2013; **4**: 1964
- 130 Segawa M, Fukada S, Yamamoto Y, *et al.* Suppression of macrophage functions impairs skeletal muscle regeneration with severe fibrosis. *Exp Cell Res* 2008; **314**: 3232-3244
- 131 Ruffell D, Mourkioti F, Gambardella A, *et al.* A CREB-C/EBP β cascade induces M2 macrophage-specific gene expression and promotes muscle injury repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009; **106**: 17475-17480
- 132 Muñoz-Cánoves P, Serrano AL. Macrophages decide between regeneration and fibrosis in muscle. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 2015; **26**: 449-450

- 133 Vi L, Baht GS, Whetstone H, *et al.* Macrophages promote osteoblastic differentiation in-vivo: implications in fracture repair and bone homeostasis. *J Bone Miner Res* 2015; **30**: 1090-1102
- 134 Wan Z, Shin L-Y, Wang Y-F, *et al.* Role of skeletal macrophages in fracture repair: A systematic review. *Biomedical Reports* 2020; **13**: 1-1
- 135 Zhang Y, Böse T, Unger RE, *et al.* Macrophage type modulates osteogenic differentiation of adipose tissue MSCs. *Cell Tissue Res* 2017; **369**: 273-286
- 136 Löffler J, Sass FA, Filter S, *et al.* Compromised Bone Healing in Aged Rats Is Associated With Impaired M2 Macrophage Function. *Frontiers in Immunology* 2019; **10**
- 137 Niu Y, Wang Z, Shi Y, *et al.* Modulating macrophage activities to promote endogenous bone regeneration: Biological mechanisms and engineering approaches. *Bioactive Materials* 2021; **6**: 244-261
- 138 Schlundt C, El Khassawna T, Serra A, *et al.* Macrophages in bone fracture healing: Their essential role in endochondral ossification. *Bone* 2018; **106**: 78-89
- 139 Genêt F, Vaquette C, Kulina I, *et al.* Macrophages are critical mediators of heterotopic ossification following spinal cord injuries. *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine* 2014; **57**: e229
- 140 Alexander KA, Tseng H-W, Fleming W, *et al.* Inhibition of JAK1/2 Tyrosine Kinases Reduces Neurogenic Heterotopic Ossification After Spinal Cord Injury. *Frontiers in Immunology* 2019; **10**
- 141 Sorkin M, Huber AK, Hwang C, *et al.* Regulation of heterotopic ossification by monocytes in a mouse model of aberrant wound healing. *Nat Commun* 2020; **11**: 722
- 142 Evans KN, Forsberg JA, Potter BK, *et al.* Inflammatory cytokine and chemokine expression is associated with heterotopic ossification in high-energy penetrating war injuries. *J Orthop Trauma* 2012; **26**: e204-213
- 143 Huang Y, Wang X, Zhou D, *et al.* Macrophages in heterotopic ossification: from mechanisms to therapy. *npj Regen Med* 2021; **6**: 1-12
- 144 Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008; **8**: 958-969
- 145 Italiani P, Boraschi D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Frontiers in Immunology* 2014; **5**

- 146 Dube PR, Birnbaumer L, Vazquez G. Evidence for constitutive bone morphogenetic protein-2 secretion by M1 macrophages: Constitutive auto/paracrine osteogenic signaling by BMP-2 in M1 macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; **491**: 154-158
- 147 Kan L, Lounev VY, Pignolo RJ, *et al.* Substance P signaling mediates BMP-dependent heterotopic ossification. *J Cell Biochem* 2011; **112**: 2759-2772
- 148 Yao Y, Xu X-H, Jin L. Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy. *Frontiers in Immunology* 2019; **10**
- 149 Villalta SA, Nguyen HX, Deng B, *et al.* Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 2009; **18**: 482-496
- 150 Olmsted-Davis E, Gannon FH, Ozen M, *et al.* Hypoxic adipocytes pattern early heterotopic bone formation. *Am J Pathol* 2007; **170**: 620-632
- 151 Braga TT, Agudelo JSH, Camara NOS. Macrophages During the Fibrotic Process: M2 as Friend and Foe. *Front Immunol* 2015; **6**: 602
- 152 Tu B, Li J, Sun Z, *et al.* Macrophage-Derived TGF- β and VEGF Promote the Progression of Trauma-Induced Heterotopic Ossification. *Inflammation* August 2022
- 153 Olmsted-Davis E, Mejia J, Salisbury E, *et al.* A Population of M2 Macrophages Associated With Bone Formation. *Frontiers in Immunology* 2021; **12**
- 154 He X, Xu C. Immune checkpoint signaling and cancer immunotherapy. *Cell Res* 2020; **30**: 660-669
- 155 Kan C, Yang J, Na D, *et al.* Inhibition of immune checkpoints prevents injury-induced heterotopic ossification. *Bone Research* 2019; **7**: 1-8
- 156 Alexander KA, Tseng H-W, Kulina I, *et al.* Lymphocytes Are Not Required for Neurogenic Heterotopic Ossification Development after Spinal Cord Injury. *Neurotrauma Reports* 2022; **3**: 87-96
- 157 Kan L, Liu Y, McGuire TL, *et al.* Dysregulation of local stem/progenitor cells as a common cellular mechanism for heterotopic ossification. *Stem Cells* 2009; **27**: 150-156
- 158 Tseng H, Kulina I, Salga M, *et al.* Neurogenic heterotopic ossifications develop independently of granulocyte-colony stimulating factor and neutrophils. *J Bone Miner Res* June 2020: jbmr.4118
- 159 Yuan C, Ni L, Zhang C, *et al.* Vascular calcification: New insights into endothelial cells. *Microvascular Research* 2021; **134**: 104105

- 160 Amersfoort J, Eelen G, Carmeliet P. Immunomodulation by endothelial cells — partnering up with the immune system? *Nat Rev Immunol* March 2022: 1-13
- 161 Li Y, Wu T, Liu S. Identification and Distinction of Tenocytes and Tendon-Derived Stem Cells. *Front Cell Dev Biol* 2021; **9**: 629515
- 162 Agarwal S, Loder SJ, Cholok D, *et al.* Scleraxis-Lineage Cells Contribute to Ectopic Bone Formation in Muscle and Tendon. *Stem Cells* 2017; **35**: 705-710
- 163 Kan L, Peng C-Y, McGuire TL, *et al.* Glast-expressing progenitor cells contribute to heterotopic ossification. *Bone* 2013; **53**: 194-203
- 164 Matthews BG, Torreggiani E, Roeder E, *et al.* Osteogenic potential of alpha smooth muscle actin expressing muscle resident progenitor cells. *Bone* 2016; **84**: 69-77
- 165 Madaro L, Passafaro M, Sala D, *et al.* Denervation-activated STAT3–IL-6 signalling in fibro-adipogenic progenitors promotes myofibres atrophy and fibrosis. *Nat Cell Biol* 2018; **20**: 917-927
- 166 Ashe MC, Craven C, Eng JJ, *et al.* Prevention and Treatment of Bone Loss after a Spinal Cord Injury: A Systematic Review. *Top Spinal Cord Inj Rehabil* 2007; **13**: 123-145
- 167 Sun X, Jones ZB, Chen X-M, *et al.* Multiple organ dysfunction and systemic inflammation after spinal cord injury: a complex relationship. *J Neuroinflammation* 2016; **13**: 260
- 168 Hellenbrand DJ, Quinn CM, Piper ZJ, *et al.* Inflammation after spinal cord injury: a review of the critical timeline of signaling cues and cellular infiltration. *Journal of Neuroinflammation* 2021; **18**: 284
- 169 Alexander KA, Tseng H-W, Salga M, *et al.* When the Nervous System Turns Skeletal Muscles into Bones: How to Solve the Conundrum of Neurogenic Heterotopic Ossification. *Curr Osteoporos Rep* October 2020
- 170 Debaud C, Tseng H-W, Chedik M, *et al.* Local and systemic factors drive ectopic osteogenesis in regenerating muscles of spinal cord-injured mice in a lesion level-dependent manner. *J Neurotrauma* April 2021
- 171 Balança B, Desmurs L, Grelier J, *et al.* DAMPs and RAGE Pathophysiology at the Acute Phase of Brain Injury: An Overview. *Int J Mol Sci* 2021; **22**: 2439
- 172 Xu W, Yue S, Wang P, *et al.* Systemic inflammation in traumatic brain injury predicts poor cognitive function. *Immun Inflamm Dis* 2021; **10**: e577

- 173 Cadosch D, Gautschi OP, Thyer M, *et al.* Humoral factors enhance fracture-healing and callus formation in patients with traumatic brain injury. *J Bone Joint Surg Am* 2009; **91**: 282-288
- 174 Brady RD, Shultz SR, Sun M, *et al.* Experimental Traumatic Brain Injury Induces Bone Loss in Rats. *J Neurotrauma* 2016; **33**: 2154-2160
- 175 Clark RP, Schuenke M, Keeton SM, *et al.* Effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on muscle in mouse models of human growth disorders. *Horm Res* 2006; **66 Suppl 1**: 26-34
- 176 Xia W, Xie J, Cai Z, *et al.* Damaged brain accelerates bone healing by releasing small extracellular vesicles that target osteoprogenitors. *Nat Commun* 2021; **12**: 6043
- 177 Li L, Jiang Y, Lin H, *et al.* Muscle injury promotes heterotopic ossification by stimulating local bone morphogenetic protein-7 production. *J Orthop Translat* 2019; **18**: 142-153
- 178 Retting KN, Song B, Yoon BS, *et al.* BMP canonical Smad signaling through Smad1 and Smad5 is required for endochondral bone formation. *Development* 2009; **136**: 1093-1104
- 179 Xie F, Zhang Z, Van Dam H, *et al.* Regulation of TGF- β Superfamily Signaling by SMAD Mono-Ubiquitination. *Cells* 2014; **3**: 981-993
- 180 Peterson JR, De La Rosa S, Eboda O, *et al.* Treatment of heterotopic ossification through remote ATP hydrolysis. *Sci Transl Med* 2014; **6**: 255ra132
- 181 Agarwal S, Loder SJ, Breuler C, *et al.* Strategic Targeting of Multiple BMP Receptors Prevents Trauma-Induced Heterotopic Ossification. *Molecular Therapy* 2017; **25**: 1974-1987
- 182 Kan C, Ding N, Yang J, *et al.* BMP-dependent, injury-induced stem cell niche as a mechanism of heterotopic ossification. *Stem Cell Research & Therapy* 2019; **10**: 14
- 183 Martínez VG, Rubio C, Martínez-Fernández M, *et al.* BMP4 Induces M2 Macrophage Polarization and Favors Tumor Progression in Bladder Cancer. *Clin Cancer Res* 2017; **23**: 7388-7399
- 184 Zou M-L, Chen Z-H, Teng Y-Y, *et al.* The Smad Dependent TGF- β and BMP Signaling Pathway in Bone Remodeling and Therapies. *Frontiers in Molecular Biosciences* 2021; **8**
- 185 Eltzschig HK, Carmeliet P. Hypoxia and Inflammation. *N Engl J Med* 2011; **364**: 656-665

- 186 Wang H, Lindborg C, Lounev V, *et al.* Cellular Hypoxia Promotes Heterotopic Ossification by Amplifying BMP Signaling. *J Bone Miner Res* 2016; **31**: 1652-1665
- 187 Provot S, Zinyk D, Gunes Y, *et al.* Hif-1 α regulates differentiation of limb bud mesenchyme and joint development. *J Cell Biol* 2007; **177**: 451-464
- 188 Maceckova M, Martiskova H, Koudelka A, *et al.* Bone marrow-derived macrophages exclusively expressed caveolin-2: The role of inflammatory activators and hypoxia. *Immunobiology* 2015; **220**: 1266-1274
- 189 Mukandala G, Tynan R, Lanigan S, *et al.* The Effects of Hypoxia and Inflammation on Synaptic Signaling in the CNS. *Brain Sci* 2016; **6**: 6
- 190 Stegen S, van Gastel N, Carmeliet G. Bringing new life to damaged bone: The importance of angiogenesis in bone repair and regeneration. *Bone* 2015; **70**: 19-27
- 191 Ashraf S, Walsh DA. Angiogenesis in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2008; **20**: 573-580
- 192 Hwang C, Marini S, Huber AK, *et al.* Mesenchymal VEGFA induces aberrant differentiation in heterotopic ossification. *Bone Res* 2019; **7**: 36
- 193 Kurz AZ, LeRoux E, Riediger M, *et al.* Heterotopic Ossification in Hip Arthroscopy: an Updated Review. *Curr Rev Musculoskelet Med* 2019; **12**: 147-155
- 194 Shimono K, Morrison TN, Tung W, *et al.* Inhibition of ectopic bone formation by a selective retinoic acid receptor alpha-agonist: a new therapy for heterotopic ossification? *J Orthop Res* 2010; **28**: 271-277
- 195 Elbasiouny SM, Moroz D, Bakr MM, *et al.* Management of Spasticity After Spinal Cord Injury: Current Techniques and Future Directions. *Neurorehabil Neural Repair* 2010; **24**: 23-33
- 196 Frith JE, Kusuma GD, Carthew J, *et al.* Mechanically-sensitive miRNAs bias human mesenchymal stem cell fate via mTOR signalling. *Nature Communications* 2018; **9**
- 197 Sun M, Chi G, Xu J, *et al.* Extracellular matrix stiffness controls osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells mediated by integrin $\alpha 5$. *Stem Cell Research & Therapy* 2018; **9**: 52
- 198 Stanley A, Heo S-J, Mauck RL, *et al.* Elevated BMP and Mechanical Signaling Through YAP1/RhoA Poises FOP Mesenchymal Progenitors for Osteogenesis. *J Bone Miner Res* 2019; **34**: 1894-1909

- 199 Salga M, Tseng H-W, Alexander KA, *et al.* Blocking neuromuscular junctions with botulinum toxin A injection enhances neurological heterotopic ossification development after spinal cord injury in mice. *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine* February 2019
- 200 Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; **75**: 843-854
- 201 Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; **136**: 215-233
- 202 Zhengxue W. Why a Single MiRNA Deletion Will Not Cause an Obvious Phenotype. The University of Manchester; 2019.
- 203 de Rie D, Abugessaisa I, Alam T, *et al.* An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse. *Nat Biotechnol* 2017; **35**: 872-878
- 204 Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, *et al.* An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; **294**: 858-862
- 205 van Rooij E, Kauppinen S. Development of microRNA therapeutics is coming of age. *EMBO Mol Med* 2014; **6**: 851-864
- 206 O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, *et al.* Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in Endocrinology* 2018; **9**
- 207 Vechetti IJ, Wen Y, Chaillou T, *et al.* Life-long reduction in myomiR expression does not adversely affect skeletal muscle morphology. *Sci Rep* 2019; **9**: 5483
- 208 Huntzinger E, Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature Reviews Genetics* 2011; **12**: 99-110
- 209 Baek D, Villén J, Shin C, *et al.* The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 2008; **455**: 64-71
- 210 Selbach M, Schwanhäusser B, Thierfelder N, *et al.* Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 2008; **455**: 58-63
- 211 Bhome R, Del Vecchio F, Lee G-H, *et al.* Exosomal microRNAs (exomiRs): Small molecules with a big role in cancer. *Cancer Lett* 2018; **420**: 228-235
- 212 Sohn W, Kim J, Kang SH, *et al.* Serum exosomal microRNAs as novel biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Exp Mol Med* 2015; **47**: e184

- 213 Chevillet JR, Kang Q, Ruf IK, *et al.* Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2014; **111**: 14888-14893
- 214 Albanese M, Chen Y-FA, Hüls C, *et al.* MicroRNAs are minor constituents of extracellular vesicles that are rarely delivered to target cells. *PLOS Genetics* 2021; **17**: e1009951
- 215 Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nature Reviews Drug Discovery* 2017; **16**: 203-222
- 216 Giza DE, Vasilescu C, Calin GA. Key principles of miRNA involvement in human diseases. *Discoveries (Craiova)* 2014; **2**: e34
- 217 Christopher AF, Kaur RP, Kaur G, *et al.* MicroRNA therapeutics: Discovering novel targets and developing specific therapy. *Perspect Clin Res* 2016; **7**: 68-74
- 218 Khan AA, Betel D, Miller ML, *et al.* Transfection of small RNAs globally perturbs gene regulation by endogenous microRNAs. *Nature Biotechnology* 2009; **27**: 549-555
- 219 Chakraborty C, Sharma AR, Sharma G, *et al.* Therapeutic advances of miRNAs: A preclinical and clinical update. *Journal of Advanced Research* 2021; **28**: 127-138
- 220 O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, *et al.* Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2010; **10**: 111-122
- 221 Iliopoulos D, Hirsch HA, Struhl K. An epigenetic switch involving NF- κ B, Lin28, let-7 microRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. *Cell* 2009; **139**: 693-706
- 222 Leung AKL, Sharp PA. MicroRNA Functions in Stress Responses. *Mol Cell* 2010; **40**: 205-215
- 223 McCarthy JJ. The MyomiR network in skeletal muscle plasticity. *Exerc Sport Sci Rev* 2011; **39**: 150-154
- 224 van Rooij E, Liu N, Olson EN. MicroRNAs flex their muscles. *Trends in Genetics* 2008; **24**: 159-166
- 225 Siracusa J, Koulmann N, Bourdon S, *et al.* Circulating miRNAs as Biomarkers of Acute Muscle Damage in Rats. *The American Journal of Pathology* 2016; **186**: 1313-1327

- 226 McCarthy JJ. MicroRNA-206: the skeletal muscle-specific myomiR. *Biochim Biophys Acta* 2008; **1779**: 682-691
- 227 van Rooij E, Quiat D, Johnson BA, *et al.* A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. *Dev Cell* 2009; **17**: 662-673
- 228 Fochi S, Giuriato G, De Simone T, *et al.* Regulation of microRNAs in Satellite Cell Renewal, Muscle Function, Sarcopenia and the Role of Exercise. *Int J Mol Sci* 2020; **21**: 6732
- 229 Coenen-Stass AML, Betts CA, Lee YF, *et al.* Selective release of muscle-specific, extracellular microRNAs during myogenic differentiation. *Hum Mol Genet* 2016; **25**: 3960-3974
- 230 Zhao Y, Ransom JF, Li A, *et al.* Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell* 2007; **129**: 303-317
- 231 Heidersbach A, Saxby C, Carver-Moore K, *et al.* microRNA-1 regulates sarcomere formation and suppresses smooth muscle gene expression in the mammalian heart. Buckingham M, ed. *eLife* 2013; **2**: e01323
- 232 Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, *et al.* Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 2005; **433**: 769-773
- 233 Harding RL, Velleman SG. MicroRNA regulation of myogenic satellite cell proliferation and differentiation. *Mol Cell Biochem* 2016; **412**: 181-195
- 234 Ju H, Yang Y, Sheng A, *et al.* MicroRNA-378 promotes myogenic differentiation by targeting BMP4. *Molecular Medicine Reports* 2016; **13**: 2194-2200
- 235 Nielsen S, Scheele C, Yfanti C, *et al.* Muscle specific microRNAs are regulated by endurance exercise in human skeletal muscle. *J Physiol* 2010; **588**: 4029-4037
- 236 Drummond MJ, McCarthy JJ, Fry CS, *et al.* Aging differentially affects human skeletal muscle microRNA expression at rest and after an anabolic stimulus of resistance exercise and essential amino acids. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; **295**: E1333-1340
- 237 McCarthy JJ, Esser KA, Peterson CA, *et al.* Evidence of MyomiR network regulation of beta-myosin heavy chain gene expression during skeletal muscle atrophy. *Physiol Genomics* 2009; **39**: 219-226
- 238 Oikawa S, Lee M, Akimoto T. Conditional Deletion of Dicer in Adult Mice Impairs Skeletal Muscle Regeneration. *Int J Mol Sci* 2019; **20**: 5686

- 239 Nakasa T, Ishikawa M, Shi M, *et al.* Acceleration of muscle regeneration by local injection of muscle-specific microRNAs in rat skeletal muscle injury model. *J Cell Mol Med* 2010; **14**: 2495-2505
- 240 Dey BK, Gagan J, Dutta A. miR-206 and -486 Induce Myoblast Differentiation by Downregulating Pax7. *Molecular and Cellular Biology* 2011; **31**: 203-214
- 241 Yin H, Pasut A, Soleimani VD, *et al.* MicroRNA-133 controls brown adipose determination in skeletal muscle satellite cells by targeting Prdm16. *Cell Metab* 2013; **17**: 210-224
- 242 Crist CG, Montarras D, Pallafacchina G, *et al.* Muscle stem cell behavior is modified by microRNA-27 regulation of Pax3 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**: 13383-13387
- 243 McFarlane C, Vajjala A, Arigela H, *et al.* Negative auto-regulation of myostatin expression is mediated by Smad3 and microRNA-27. *PLoS One* 2014; **9**: e87687
- 244 Saha B, Momen-Heravi F, Kodys K, *et al.* MicroRNA Cargo of Extracellular Vesicles from Alcohol-exposed Monocytes Signals Naive Monocytes to Differentiate into M2 Macrophages *. *Journal of Biological Chemistry* 2016; **291**: 149-159
- 245 Cheng N, Liu C, Li Y, *et al.* MicroRNA-223-3p promotes skeletal muscle regeneration by regulating inflammation in mice. *J Biol Chem* 2020; **295**: 10212-10223
- 246 Pottier N, Cauffiez C, Perrais M, *et al.* FibromiRs: translating molecular discoveries into new anti-fibrotic drugs. *Trends Pharmacol Sci* 2014; **35**: 119-126
- 247 Arrighi N, Moratal C, Savary G, *et al.* The FibromiR miR-214-3p Is Upregulated in Duchenne Muscular Dystrophy and Promotes Differentiation of Human Fibro-Adipogenic Muscle Progenitors. *Cells* 2021; **10**: 1832
- 248 Moro A, Discroll T, Boraas LC, *et al.* microRNA-dependent regulation of biomechanical genes establishes tissue stiffness homeostasis. *Nat Cell Biol* 2019; **21**: 348-358
- 249 Huber AK, Patel N, Pagani CA, *et al.* Immobilization after injury alters extracellular matrix and stem cell fate. *Journal of Clinical Investigation* 2020; **130**: 5444-5460
- 250 Gao Y, Patil S, Qian A. The Role of MicroRNAs in Bone Metabolism and Disease. *Int J Mol Sci* 2020; **21**
- 251 Hensley AP, McAlinden A. The role of microRNAs in bone development. *Bone* 2021; **143**: 115760

- 252 Hornstein E, Mansfield JH, Yekta S, *et al.* The microRNA miR-196 acts upstream of Hoxb8 and Shh in limb development. *Nature* 2005; **438**: 671-674
- 253 Wang T, Xu Z. miR-27 promotes osteoblast differentiation by modulating Wnt signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2010; **402**: 186-189
- 254 Kapinas K, Kessler C, Ricks T, *et al.* miR-29 modulates Wnt signaling in human osteoblasts through a positive feedback loop. *J Biol Chem* 2010; **285**: 25221-25231
- 255 Qi X-B, Jia B, Wang W, *et al.* Role of miR-199a-5p in osteoblast differentiation by targeting TET2. *Gene* 2020; **726**: 144193
- 256 Wu C, Tian B, Qu X, *et al.* MicroRNAs play a role in chondrogenesis and osteoarthritis (Review). *International Journal of Molecular Medicine* 2014; **34**: 13-23
- 257 Wang X, Guo B, Li Q, *et al.* miR-214 targets ATF4 to inhibit bone formation. *Nat Med* 2013; **19**: 93-100
- 258 Luo T, Yang X, Sun Y, *et al.* Effect of MicroRNA-20a on Osteogenic Differentiation of Human Adipose Tissue-Derived Stem Cells. *Cells Tissues Organs (Print)* February 2020: 1-10
- 259 Zhang Y, Xie R-L, Croce CM, *et al.* A program of microRNAs controls osteogenic lineage progression by targeting transcription factor Runx2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; **108**: 9863-9868
- 260 Zhang J, Fu W, He M, *et al.* MiRNA-20a promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by co-regulating BMP signaling. *RNA Biol* 2011; **8**: 829-838
- 261 Li Z, Hassan MQ, Volinia S, *et al.* A microRNA signature for a BMP2-induced osteoblast lineage commitment program. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**: 13906-13911
- 262 Kobayashi T, Lu J, Cobb BS, *et al.* Dicer-dependent pathways regulate chondrocyte proliferation and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**: 1949-1954
- 263 Lian JB, Stein GS, van Wijnen AJ, *et al.* MicroRNA control of bone formation and homeostasis. *Nat Rev Endocrinol* 2012; **8**: 212-227
- 264 Zhou L, Qiu M, Yang L, *et al.* MicroRNA-1-3p enhances osteoblast differentiation of MC3T3-E1 cells by interacting with hypoxia-inducible factor 1 α inhibitor (HIF1AN). *Mech Dev* May 2020: 103613

- 265 Li L, Jiang D. Hypoxia-responsive miRNA-21-5p inhibits Runx2 suppression by targeting SMAD7 in MC3T3-E1 cells. *J Cell Biochem* 2019; **120**: 16867-16875
- 266 Wang R, Zhang H, Ding W, *et al.* miR-143 promotes angiogenesis and osteoblast differentiation by targeting HDAC7. *Cell Death Dis* 2020; **11**: 179
- 267 Jia Y, Zhu Y, Qiu S, *et al.* Exosomes secreted by endothelial progenitor cells accelerate bone regeneration during distraction osteogenesis by stimulating angiogenesis. *Stem Cell Res Ther* 2019; **10**: 12
- 268 Groven RVM, van Koll J, Poeze M, *et al.* miRNAs Related to Different Processes of Fracture Healing: An Integrative Overview. *Frontiers in Surgery* 2021; **8**: 584
- 269 Razmara E, Bitaraf A, Yousefi H, *et al.* Non-Coding RNAs in Cartilage Development: An Updated Review. *International Journal of Molecular Sciences* 2019; **20**: 4475
- 270 Sun MM-G, Beier F. Chondrocyte hypertrophy in skeletal development, growth, and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2014; **102**: 74-82
- 271 Park S, Bello A, Arai Y, *et al.* Functional Duality of Chondrocyte Hypertrophy and Biomedical Application Trends in Osteoarthritis. *Pharmaceutics* 2021; **13**: 1139
- 272 Zhou X, von der Mark K, Henry S, *et al.* Chondrocytes transdifferentiate into osteoblasts in endochondral bone during development, postnatal growth and fracture healing in mice. *PLoS Genet* 2014; **10**: e1004820
- 273 Jing D, Hao J, Shen Y, *et al.* The role of microRNAs in bone remodeling. *Int J Oral Sci* 2015; **7**: 131-143
- 274 Cohen MM. Perspectives on RUNX genes: an update. *Am J Med Genet A* 2009; **149A**: 2629-2646
- 275 Murata K, Ito H, Yoshitomi H, *et al.* Inhibition of miR-92a enhances fracture healing via promoting angiogenesis in a model of stabilized fracture in young mice. *J Bone Miner Res* 2014; **29**: 316-326
- 276 Sun L, Li Z, Xue H, *et al.* MiR-26a promotes fracture healing of nonunion rats possibly by targeting SOSTDC1 and further activating Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Mol Cell Biochem* 2019; **460**: 165-173
- 277 Wang C, Zheng G-F, Xu X-F. MicroRNA-186 improves fracture healing through activating the bone morphogenetic protein signalling pathway by inhibiting SMAD6 in a mouse model of femoral fracture: An animal study. *Bone Joint Res* 2019; **8**: 550-562

- 278 Dong C-L, Liu H-Z, Zhang Z-C, *et al.* The influence of MicroRNA-150 in Osteoblast Matrix Mineralization. *J Cell Biochem* 2015; **116**: 2970-2979
- 279 Zheng H, Ramnarain D, Anderson BA, *et al.* MicroRNA-138 Inhibits Osteogenic Differentiation and Mineralization of Human Dedifferentiated Chondrocytes by Regulating RhoC and the Actin Cytoskeleton. *JBMR Plus* 2018; **3**: e10071
- 280 Butz H, Patócs A. MicroRNAs in endocrine tumors. *EJIFCC* 2019; **30**: 146-164
- 281 Wang K, Zhang S, Weber J, *et al.* Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 2010; **38**: 7248-7259
- 282 Rousseaud A, Moriceau S, Ramos-Brossier M, *et al.* Bone-brain crosstalk and potential associated diseases. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation* 2016; **28**: 69-83
- 283 Idelevich A, Baron R. Brain to bone: What is the contribution of the brain to skeletal homeostasis? *Bone* 2018; **115**: 31-42
- 284 Obri A, Khrimian L, Karsenty G, *et al.* Osteocalcin in the brain: from embryonic development to age-related decline in cognition. *Nat Rev Endocrinol* 2018; **14**: 174-182
- 285 Materozzi M, Merlotti D, Gennari L, *et al.* The Potential Role of miRNAs as New Biomarkers for Osteoporosis. *Int J Endocrinol* 2018; **2018**: 2342860
- 286 Nakamura A, Rampersaud YR, Nakamura S, *et al.* microRNA-181a-5p antisense oligonucleotides attenuate osteoarthritis in facet and knee joints. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2019; **78**: 111-121
- 287 Feng L, Yang Z, Li Y, *et al.* MicroRNA-378 contributes to osteoarthritis by regulating chondrocyte autophagy and bone marrow mesenchymal stem cell chondrogenesis. *Mol Ther Nucleic Acids* 2022; **28**: 328-341
- 288 Gabler J, Ruetze M, Kynast KL, *et al.* Stage-Specific miRs in Chondrocyte Maturation: Differentiation-Dependent and Hypertrophy-Related miR Clusters and the miR-181 Family. *Tissue Eng Part A* 2015; **21**: 2840-2851
- 289 Qin X, Zhu B, Jiang T, *et al.* miR-17-5p Regulates Heterotopic Ossification by Targeting ANKH in Ankylosing Spondylitis. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 2019; **18**: 696-707
- 290 Tu B, Liu S, Yu B, *et al.* miR-203 inhibits the traumatic heterotopic ossification by targeting Runx2. *Cell Death Dis* 2016; **7**: e2436-e2436

- 291 de Vasconcellos JF, Jackson WM, Dimtchev A, *et al.* A microRNA Signature for Impaired Wound-Healing and Ectopic Bone Formation in Humans. *J Bone Joint Surg Am* August 2020
- 292 Sun Y, Cai J, Yu S, *et al.* MiR-630 Inhibits Endothelial-Mesenchymal Transition by Targeting Slug in Traumatic Heterotopic Ossification. *Sci Rep* 2016; **6**: 22729
- 293 Taganov KD, Boldin MP, Chang K-J, *et al.* NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**: 12481-12486
- 294 O'Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, *et al.* MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**: 1604-1609
- 295 Hou J, Wang P, Lin L, *et al.* MicroRNA-146a feedback inhibits RIG-I-dependent Type I IFN production in macrophages by targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2. *J Immunol* 2009; **183**: 2150-2158
- 296 Ceppi M, Pereira PM, Dunand-Sauthier I, *et al.* MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009; **106**: 2735-2740
- 297 O'Connell RM, Kahn D, Gibson WSJ, *et al.* MicroRNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development. *Immunity* 2010; **33**: 607-619
- 298 Nahid MA, Pauley KM, Satoh M, *et al.* miR-146a Is Critical for Endotoxin-induced Tolerance: IMPLICATION IN INNATE IMMUNITY. *J Biol Chem* 2009; **284**: 34590-34599
- 299 Curtale G, Rubino M, Locati M. MicroRNAs as Molecular Switches in Macrophage Activation. *Frontiers in Immunology* 2019; **10**
- 300 Wang L, Zhang S, Wu H, *et al.* M2b macrophage polarization and its roles in diseases. *Journal of Leukocyte Biology* 2019; **106**: 345-358
- 301 Cai X, Yin Y, Li N, *et al.* Re-polarization of tumor-associated macrophages to pro-inflammatory M1 macrophages by microRNA-155. *J Mol Cell Biol* 2012; **4**: 341-343
- 302 Zhang Y, Zhang M, Li X, *et al.* Silencing MicroRNA-155 Attenuates Cardiac Injury and Dysfunction in Viral Myocarditis via Promotion of M2 Phenotype Polarization of Macrophages. *Sci Rep* 2016; **6**: 22613
- 303 Chaudhuri AA, So AY-L, Sinha N, *et al.* MicroRNA-125b potentiates macrophage activation. *J Immunol* 2011; **187**: 5062-5068

- 304 Ying H, Kang Y, Zhang H, *et al.* MiR-127 modulates macrophage polarization and promotes lung inflammation and injury by activating the JNK pathway. *J Immunol* 2015; **194**: 1239-1251
- 305 Li D, Duan M, Feng Y, *et al.* MiR-146a modulates macrophage polarization in systemic juvenile idiopathic arthritis by targeting INHBA. *Mol Immunol* 2016; **77**: 205-212
- 306 Peng L-Y, Li B-B, Deng K-B, *et al.* MicroRNA-214-3p facilitates M2 macrophage polarization by targeting GSK3B. *Kaohsiung J Med Sci* January 2022
- 307 Zhong Y, Yi C. MicroRNA-720 suppresses M2 macrophage polarization by targeting GATA3. *Biosci Rep* 2016; **36**: e00363
- 308 Hao M-X, Wang X, Jiao K-L. MicroRNA-17-5p mediates hypoxia-induced autophagy and inhibits apoptosis by targeting signal transducer and activator of transcription 3 in vascular smooth muscle cells. *Exp Ther Med* 2017; **13**: 935-941
- 309 Tang Y, Zong S, Zeng H, *et al.* MicroRNAs and angiogenesis: a new era for the management of colorectal cancer. *Cancer Cell International* 2021; **21**: 221
- 310 Cen X, Pan X, Zhang B, *et al.* miR-20a-5p contributes to osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells by regulating BAMBI and activating the phosphorylation of Smad5 and p38. *Stem Cell Res Ther* 2021; **12**: 421
- 311 Mogilyansky E, Rigoutsos I. The miR-17/92 cluster: a comprehensive update on its genomics, genetics, functions and increasingly important and numerous roles in health and disease. *Cell Death Differ* 2013; **20**: 1603-1614
- 312 Tavallae G, Rockel JS, Lively S, *et al.* MicroRNAs in Synovial Pathology Associated With Osteoarthritis. *Frontiers in Medicine* 2020; **7**
- 313 Fan W, Liang C, Ou M, *et al.* MicroRNA-146a Is a Wide-Reaching Neuroinflammatory Regulator and Potential Treatment Target in Neurological Diseases. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 2020; **13**
- 314 Zhan-qiang H, Hai-hua Q, Chi Z, *et al.* miR-146a aggravates cognitive impairment and Alzheimer disease-like pathology by triggering oxidative stress through MAPK signaling. *Neurología* March 2021
- 315 Johnson D, Cartagena CM, Tortella FC, *et al.* Acute and subacute microRNA dysregulation is associated with cytokine responses in the rodent model of penetrating ballistic-like brain injury. *J Trauma Acute Care Surg* 2017; **83**: S145-S149

- 316 He Y, Lv B, Huan Y, *et al.* Zhenbao pill protects against acute spinal cord injury via miR-146a-5p regulating the expression of GPR17. *Biosci Rep* 2018; **38**: BSR20171132
- 317 Wei J, Wang J, Zhou Y, *et al.* MicroRNA-146a Contributes to SCI Recovery via Regulating TRAF6 and IRAK1 Expression. *BioMed Research International*: 9 DOI:10.1155/2016/4013487.
- 318 Latroche C, Weiss-Gayet M, Gitiaux C, *et al.* Cell sorting of various cell types from mouse and human skeletal muscle. *Methods* 2018; **134-135**: 50-55
- 319 Guihard P, Danger Y, Brounais B, *et al.* Induction of Osteogenesis in Mesenchymal Stem Cells by Activated Monocytes/Macrophages Depends on Oncostatin M Signaling. *STEM CELLS* 2012; **30**: 762-772
- 320 Lee K, Majumdar MK, Buyaner D, *et al.* Human Mesenchymal Stem Cells Maintain Transgene Expression during Expansion and Differentiation. *Molecular Therapy* 2001; **3**: 857-866
- 321 Cao JJ, Singleton PA, Majumdar S, *et al.* Hyaluronan Increases RANKL Expression in Bone Marrow Stromal Cells Through CD44. *Journal of Bone and Mineral Research* 2005; **20**: 30-40
- 322 Witwer KW, Halushka MK. Toward the promise of microRNAs – Enhancing reproducibility and rigor in microRNA research. *RNA Biology* 2016; **13**: 1103-1116
- 323 Licursi V, Conte F, Fiscon G, *et al.* MIENTURNET: an interactive web tool for microRNA-target enrichment and network-based analysis. *BMC Bioinformatics* 2019; **20**: 545
- 324 Contreras O, Cruz-Soca M, Theret M, *et al.* Cross-talk between TGF- β and PDGFR α signaling pathways regulates the fate of stromal fibro-adipogenic progenitors. *J Cell Sci* 2019; **132**: jcs232157
- 325 Varga J, Rosenbloom J, Jimenez SA. Transforming growth factor beta (TGF beta) causes a persistent increase in steady-state amounts of type I and type III collagen and fibronectin mRNAs in normal human dermal fibroblasts. *Biochem J* 1987; **247**: 597-604
- 326 Contreras O, Rossi FMV, Theret M. Origins, potency, and heterogeneity of skeletal muscle fibro-adipogenic progenitors—time for new definitions. *Skeletal Muscle* 2021; **11**: 16
- 327 von der Mark K, von der Mark H. The role of three genetically distinct collagen types in endochondral ossification and calcification of cartilage. *J Bone Joint Surg Br* 1977; **59-B**: 458-464

- 328 Yang L, Tsang KY, Tang HC, *et al.* Hypertrophic chondrocytes can become osteoblasts and osteocytes in endochondral bone formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2014; **111**: 12097-12102
- 329 Lu Y, Qiao L, Lei G, *et al.* Col10a1 gene expression and chondrocyte hypertrophy during skeletal development and disease. *Front Biol* 2014; **9**: 195-204
- 330 Zheng Q, Zhou G, Morello R, *et al.* Type X collagen gene regulation by Runx2 contributes directly to its hypertrophic chondrocyte-specific expression in vivo. *J Cell Biol* 2003; **162**: 833-842
- 331 Li F, Lu Y, Ding M, *et al.* Runx2 contributes to murine Col10a1 gene regulation through direct interaction with its cis-enhancer. *J Bone Miner Res* 2011; **26**: 2899-2910
- 332 Muratori L, Gnani S, Fregnan F, *et al.* Evaluation of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Family Member Expression After Peripheral Nerve Regeneration and Denervation. *Anat Rec (Hoboken)* 2018; **301**: 1646-1656
- 333 Dictus-Vermeulen C, Gueuning C, Graff GL. Alkaline phosphatase activities in normal and denervated, slow and fast rat muscles. Bearing on the possible participation of the enzyme in the transmembrane transport of phosphate ions. *Arch Int Physiol Biochim* 1989; **97**: 13-23
- 334 Gris D, Hamilton EF, Weaver LC. The systemic inflammatory response after spinal cord injury damages lungs and kidneys. *Exp Neurol* 2008; **211**: 259-270
- 335 Wu M, Chen G, Li Y-P. TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Res* 2016; **4**: 16009
- 336 Feng X, Shen S, Cao P, *et al.* The role of oncostatin M regulates osteoblastic differentiation of dental pulp stem cells through STAT3 pathway. *Cytotechnology* 2016; **68**: 2699-2709
- 337 Sarközi R, Hauser C, Noppert S-J, *et al.* Oncostatin M is a novel inhibitor of TGF- β 1-induced extracellular matrix protein expression. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 2011; **301**: F1014-F1025
- 338 Huguier V, Giot J-P, Simonneau M, *et al.* Oncostatin M exerts a protective effect against excessive scarring by counteracting the inductive effect of TGF β 1 on fibrosis markers. *Sci Rep* 2019; **9**: 2113
- 339 Patel NK, Nunez JH, Sorkin M, *et al.* Macrophage TGF β signaling is critical for wound healing with heterotopic ossification after trauma. *JCI Insight* September 2022: e144925

- 340 Yamamoto M, Legendre NP, Biswas AA, *et al.* Loss of MyoD and Myf5 in Skeletal Muscle Stem Cells Results in Altered Myogenic Programming and Failed Regeneration. *Stem Cell Reports* 2018; **10**: 956-969
- 341 Schmidt M, Schüler SC, Hüttner SS, *et al.* Adult stem cells at work: regenerating skeletal muscle. *Cell Mol Life Sci* 2019; **76**: 2559-2570
- 342 von Maltzahn J, Jones AE, Parks RJ, *et al.* Pax7 is critical for the normal function of satellite cells in adult skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2013; **110**: 16474-16479
- 343 Yang X, Karsenty G. ATF4, the osteoblast accumulation of which is determined post-translationally, can induce osteoblast-specific gene expression in non-osteoblastic cells. *J Biol Chem* 2004; **279**: 47109-47114
- 344 Wu J-C, Sun J, Xu J-C, *et al.* Down-regulated microRNA-199a-3p enhances osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells by targeting Kdm3a in ovariectomized rats. *Biochemical Journal* 2021; **478**: 721-734
- 345 Oka S, Li X, Zhang F, *et al.* MicroRNA-21 facilitates osteoblast activity. *Biochem Biophys Rep* 2021; **25**: 100894
- 346 Chen J-F, Tao Y, Li J, *et al.* microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7. *J Cell Biol* 2010; **190**: 867-879
- 347 Hanna JA, Garcia MR, Go JC, *et al.* PAX7 is a required target for microRNA-206-induced differentiation of fusion-negative rhabdomyosarcoma. *Cell Death Dis* 2016; **7**: e2256
- 348 Krist B, Podkalicka P, Mucha O, *et al.* miR-378a influences vascularization in skeletal muscles. *Cardiovasc Res* 2020; **116**: 1386-1397
- 349 Comer BS, Camoretti-Mercado B, Kogut PC, *et al.* MicroRNA-146a and microRNA-146b expression and anti-inflammatory function in human airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2014; **307**: L727-734
- 350 Lin N, An Y. Blockade of 146b-5p promotes inflammation in atherosclerosis-associated foam cell formation by targeting TRAF6. *Exp Ther Med* 2017; **14**: 5087-5092
- 351 Pan Y, Wang D, Liu F. miR-146b suppresses LPS-induced M1 macrophage polarization via inhibiting the FGL2-activated NF- κ B/MAPK signaling pathway in inflammatory bowel disease. *Clinics (Sao Paulo)* 2022; **77**: 100069

- 352 Fukuoka M, Fujita H, Numao K, *et al.* MiR-199-3p enhances muscle regeneration and ameliorates aged muscle and muscular dystrophy. *Commun Biol* 2021; **4**: 1-12
- 353 Gaur T, Hussain S, Mudhasani R, *et al.* Dicer inactivation in osteoprogenitor cells compromises fetal survival and bone formation, while excision in differentiated osteoblasts increases bone mass in the adult mouse. *Developmental Biology* 2010; **340**: 10-21
- 354 Davis S, Propp S, Freier SM, *et al.* Potent inhibition of microRNA in vivo without degradation. *Nucleic Acids Res* 2009; **37**: 70-77
- 355 Giuliani G, Rosina M, Reggio A. Signaling pathways regulating the fate of fibro/adipogenic progenitors (FAPs) in skeletal muscle regeneration and disease. *FEBS J* June 2021
- 356 Malecova B, Gatto S, Etxaniz U, *et al.* Dynamics of cellular states of fibro-adipogenic progenitors during myogenesis and muscular dystrophy. *Nat Commun* 2018; **9**: 3670
- 357 Hernández-Hernández JM, Delgado-Olguín P, Aguillón-Huerta V, *et al.* Sox9 represses alpha-sarcoglycan gene expression in early myogenic differentiation. *J Mol Biol* 2009; **394**: 1-14
- 358 Liu Y, Feng L, Xu J, *et al.* MiR-378a suppresses tenogenic differentiation and tendon repair by targeting at TGF- β 2. *Stem Cell Research & Therapy* 2019; **10**: 108
- 359 Wei X, Li H, Zhang B, *et al.* miR-378a-3p promotes differentiation and inhibits proliferation of myoblasts by targeting HDAC4 in skeletal muscle development. *RNA Biol* 2016; **13**: 1300-1309
- 360 Chen J-F, Mandel EM, Thomson JM, *et al.* The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet* 2006; **38**: 228-233
- 361 Gu J, Lu Y, Li F, *et al.* Identification and characterization of the novel Col10a1 regulatory mechanism during chondrocyte hypertrophic differentiation. *Cell Death Dis* 2014; **5**: e1469-e1469
- 362 Song B, Estrada KD, Lyons KM. Smad Signaling in Skeletal Development and Regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009; **20**: 379-388
- 363 Zheng M, Tan J, Liu X, *et al.* miR-146a-5p targets Sirt1 to regulate bone mass. *Bone Rep* 2021; **14**: 101013
- 364 Roberto VP, Gavaia P, Nunes MJ, *et al.* Evidences for a New Role of miR-214 in Chondrogenesis. *Sci Rep* 2018; **8**: 3704

- 365 Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005; **105**: 1815-1822
- 366 Self-Fordham JB, Naqvi AR, Uttamani JR, *et al.* MicroRNA: Dynamic Regulators of Macrophage Polarization and Plasticity. *Frontiers in Immunology* 2017; **8**
- 367 Zhang Y, Zhang M, Zhong M, *et al.* Expression profiles of miRNAs in polarized macrophages. *International Journal of Molecular Medicine* 2013; **31**: 797-802
- 368 Orecchioni M, Ghosheh Y, Pramod AB, *et al.* Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages. *Front Immunol* 2019; **10**: 1084
- 369 Smith TD, Tse MJ, Read EL, *et al.* Regulation of macrophage polarization and plasticity by complex activation signals. *Integr Biol (Camb)* 2016; **8**: 946-955
- 370 Rószler T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators of Inflammation* 2015; **2015**: e816460
- 371 Murray PJ. Macrophage Polarization. *Annual Review of Physiology* 2017; **79**: 541-566
- 372 Xu L, Hilliard B, Carmody RJ, *et al.* Arginase and autoimmune inflammation in the central nervous system. *Immunology* 2003; **110**: 141-148
- 373 Xin Y, Liu Y, Liu D, *et al.* New Function of RUNX2 in Regulating Osteoclast Differentiation via the AKT/NFATc1/CTSK Axis. *Calcif Tissue Int* 2020; **106**: 553-566
- 374 Fontana L, Pelosi E, Greco P, *et al.* MicroRNAs 17-5p-20a-106a control monocytopoiesis through AML1 targeting and M-CSF receptor upregulation. *Nat Cell Biol* 2007; **9**: 775-787
- 375 Wang Z, Brandt S, Medeiros A, *et al.* MicroRNA 21 is a homeostatic regulator of macrophage polarization and prevents prostaglandin E2-mediated M2 generation. *PLoS One* 2015; **10**: e0115855
- 376 Quero L, Taden AN, Hanser E, *et al.* miR-221-3p Drives the Shift of M2-Macrophages to a Pro-Inflammatory Function by Suppressing JAK3/STAT3 Activation. *Frontiers in Immunology* 2020; **10**: 3087
- 377 Liang X, Xu Z, Yuan M, *et al.* MicroRNA-16 suppresses the activation of inflammatory macrophages in atherosclerosis by targeting PDCD4. *International Journal of Molecular Medicine* 2016; **37**: 967-975

- 378 Talari M, Kapadia B, Kain V, *et al.* MicroRNA-16 modulates macrophage polarization leading to improved insulin sensitivity in myoblasts. *Biochimie* 2015; **119**: 16-26
- 379 Zhu X, Liu H, Zhang Z, *et al.* MiR-103 protects from recurrent spontaneous abortion via inhibiting STAT1 mediated M1 macrophage polarization. *Int J Biol Sci* 2020; **16**: 2248-2264
- 380 Fordham JB, Naqvi AR, Nares S. Regulation of miR-24, miR-30b, and miR-142-3p during macrophage and dendritic cell differentiation potentiates innate immunity. *J Leukoc Biol* 2015; **98**: 195-207
- 381 Banerjee S, Cui H, Xie N, *et al.* miR-125a-5p regulates differential activation of macrophages and inflammation. *J Biol Chem* 2013; **288**: 35428-35436
- 382 Sturrock A, Mir-Kasimov M, Baker J, *et al.* Key Role of MicroRNA in the Regulation of Granulocyte Macrophage Colony-stimulating Factor Expression in Murine Alveolar Epithelial Cells during Oxidative Stress *. *Journal of Biological Chemistry* 2014; **289**: 4095-4105
- 383 Fulzele S, El-Sherbini A, Ahmad S, *et al.* MicroRNA-146b-3p Regulates Retinal Inflammation by Suppressing Adenosine Deaminase-2 in Diabetes. *BioMed Research International* 2015; **2015**: e846501
- 384 Huang C, Liu X-J, QunZhou null, *et al.* MiR-146a modulates macrophage polarization by inhibiting Notch1 pathway in RAW264.7 macrophages. *Int Immunopharmacol* 2016; **32**: 46-54
- 385 Liu M, Cao Y, Hu Y, *et al.* MiR-199a-3p Restrains Foaming and Inflammation by Regulating RUNX1 in Macrophages. *Mol Biotechnol* 2022; **64**: 1130-1142
- 386 Zaccagnini G, Greco S, Longo M, *et al.* Hypoxia-induced miR-210 modulates the inflammatory response and fibrosis upon acute ischemia. *Cell Death Dis* 2021; **12**: 1-14
- 387 Ferrao Blanco MN, Bastiaansen-Jenniskens YM, Chambers MG, *et al.* Effect of Inflammatory Signaling on Human Articular Chondrocyte Hypertrophy: Potential Involvement of Tissue Repair Macrophages. *Cartilage* 2021; **13**: 168S-174S
- 388 Fahy N, de Vries-van Melle ML, Lehmann J, *et al.* Human osteoarthritic synovium impacts chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells via macrophage polarisation state. *Osteoarthritis Cartilage* 2014; **22**: 1167-1175
- 389 Fernandes TL, Gomoll AH, Lattermann C, *et al.* Macrophage: A Potential Target on Cartilage Regeneration. *Front Immunol* 2020; **11**: 111

- 390 Paterson MR, Kriegel AJ. MiR-146a/b: a family with shared seeds and different roots. *Physiol Genomics* 2017; **49**: 243-252
- 391 Ye E-A, Steinle JJ. miR-146a Attenuates Inflammatory Pathways Mediated by TLR4/NF- κ B and TNF α to Protect Primary Human Retinal Microvascular Endothelial Cells Grown in High Glucose. *Mediators Inflamm* 2016; **2016**: 3958453
- 392 Yan F, Wufuer D, Ding J, et al. MicroRNA miR-146a-5p inhibits the inflammatory response and injury of airway epithelial cells via targeting TNF receptor-associated factor 6. *Bioengineered* 2021; **12**: 1916-1926
- 393 Oishi T, Uezumi A, Kanaji A, et al. Osteogenic Differentiation Capacity of Human Skeletal Muscle-Derived Progenitor Cells. Asakura A, ed. *PLoS ONE* 2013; **8**: e56641
- 394 Liu R, Birke O, Morse A, et al. Myogenic progenitors contribute to open but not closed fracture repair. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2011; **12**: 288
- 395 Schmidt K, Glaser G, Wernig A, et al. Sox8 Is a Specific Marker for Muscle Satellite Cells and Inhibits Myogenesis *. *Journal of Biological Chemistry* 2003; **278**: 29769-29775
- 396 Safa A, Bahroudi Z, Shoorei H, et al. miR-1: A comprehensive review of its role in normal development and diverse disorders. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2020; **132**: 110903
- 397 Wang J-G, Zhao X-G, Wang X-L, et al. Low expression of miR-1 promotes osteogenic repair of bone marrow mesenchymal stem cells by targeting TLR1. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2020; **24**: 3492-3500
- 398 Inose H, Ochi H, Kimura A, et al. A microRNA regulatory mechanism of osteoblast differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009; **106**: 20794-20799
- 399 Li M, Shen Y-J, Chai S, et al. miR-133a-3p inhibits the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells by regulating ankyrin repeat domain 44. *Gen Physiol Biophys* 2021; **40**: 329-339
- 400 Wang G, Wang F, Zhang L, et al. miR-133a silencing rescues glucocorticoid-induced bone loss by regulating the MAPK/ERK signaling pathway. *Stem Cell Research & Therapy* 2021; **12**: 215
- 401 Wang L, Yao X, Xiao L, et al. The effects of spinal cord injury on bone healing in patients with femoral fractures. *J Spinal Cord Med* 2014; **37**: 414-419
- 402 Yang L, Ge D, Cao X, et al. MiR-214 Attenuates Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells via Targeting FGFR1. *CPB* 2016; **38**: 809-820

- 403 Liu L, Sun T, Liu Z, *et al.* Traumatic Brain Injury Dysregulates MicroRNAs to Modulate Cell Signaling in Rat Hippocampus. *PLoS One* 2014; **9**: e103948
- 404 Pinchi E, Luigi C, Paola S, *et al.* MicroRNAs: The New Challenge for Traumatic Brain Injury Diagnosis. *Curr Neuropharmacol* 2020; **18**: 319-331
- 405 Xiong Y, Cao F, Hu L, *et al.* miRNA-26a-5p Accelerates Healing via Downregulation of PTEN in Fracture Patients with Traumatic Brain Injury. *Mol Ther Nucleic Acids* 2019; **17**: 223-234
- 406 Hu L, Liu J, Xue H, *et al.* miRNA-92a-3p regulates osteoblast differentiation in patients with concomitant limb fractures and TBI via IBSP/PI3K-AKT inhibition. *Mol Ther Nucleic Acids* 2021; **23**: 1345-1359
- 407 Williams M, Cheng YY, Blenkiron C, *et al.* Exploring Mechanisms of MicroRNA Downregulation in Cancer. *Microrna* 2017; **6**: 2-16
- 408 Liu N-K, Wang X-F, Lu Q-B, *et al.* Altered MicroRNA Expression following Traumatic Spinal Cord Injury. *Exp Neurol* 2009; **219**: 424-429
- 409 Arzhanov I, Sintakova K, Romanyuk N. The Role of miR-20 in Health and Disease of the Central Nervous System. *Cells* 2022; **11**: 1525
- 410 Jee MK, Jung JS, Im YB, *et al.* Silencing of miR20a Is Crucial for Ngn1-Mediated Neuroprotection in Injured Spinal Cord. *Human Gene Therapy* 2012; **23**: 508-520
- 411 Chen X, Du J, Jiang R, *et al.* MicroRNA-214 inhibits the proliferation and invasion of lung carcinoma cells by targeting JAK1. *Am J Transl Res* 2018; **10**: 1164-1171
- 412 Ahmadian-Elmi M, Bidmeshki Pour A, Naghavian R, *et al.* miR-27a and miR-214 exert opposite regulatory roles in Th17 differentiation via mediating different signaling pathways in peripheral blood CD4+ T lymphocytes of patients with relapsing–remitting multiple sclerosis. *Immunogenetics* 2016; **68**: 43-54
- 413 Fioravanti A, Tenti S, Cheleschi S. MiR-214-3p, a novel possible therapeutic target for the pathogenesis of osteoarthritis. *eBioMedicine* 2021; **66**
- 414 Cao Y, Tang S, Nie X, *et al.* Decreased miR-214–3p activates NF-κB pathway and aggravates osteoarthritis progression. *EBioMedicine* 2021; **65**: 103283
- 415 Malesud CJ. MicroRNAs and Osteoarthritis. *Cells* 2018; **7**: 92
- 416 Najm A, Blanchard F, Le Goff B. Micro-RNAs in inflammatory arthritis: From physiopathology to diagnosis, prognosis and therapeutic opportunities. *Biochem Pharmacol* 2019; **165**: 134-144

- 417 Yang J, Zhou X, Lu J, *et al.* miR-146-5p restrains calcification of vascular smooth muscle cells by suppressing TRAF6. *Open Med (Wars)* 2022; **17**: 1515-1527
- 418 Gensel JC, Zhang B. Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury. *Brain Res* 2015; **1619**: 1-11
- 419 Lu J, Goh SJ, Tng PYL, *et al.* Systemic inflammatory response following acute traumatic brain injury. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2009; **14**: 3795-3813
- 420 Wang X, Zhou L. The Many Roles of Macrophages in Skeletal Muscle Injury and Repair. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2022; **10**
- 421 Mantovani A, Sica A, Sozzani S, *et al.* The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004; **25**: 677-686
- 422 Novak ML, Koh TJ. Phenotypic transitions of macrophages orchestrate tissue repair. *Am J Pathol* 2013; **183**: 1352-1363
- 423 Cherief M, Negri S, Qin Q, *et al.* TrkA+ Neurons Induce Pathologic Regeneration After Soft Tissue Trauma. *Stem Cells Translational Medicine* October 2022: szac073
- 424 Müller L, Tunger A, Wobus M, *et al.* Immunomodulatory Properties of Mesenchymal Stromal Cells: An Update. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2021; **9**
- 425 Chen Y, Wu Z, Yuan B, *et al.* MicroRNA-146a-5p attenuates irradiation-induced and LPS-induced hepatic stellate cell activation and hepatocyte apoptosis through inhibition of TLR4 pathway. *Cell Death Dis* 2018; **9**: 1-16
- 426 Essandoh K, Li Y, Huo J, *et al.* MiRNA-Mediated Macrophage Polarization and its Potential Role in the Regulation of Inflammatory Response. *Shock* 2016; **46**: 122-131
- 427 Zhang L, Zhao L, Zhu W, *et al.* miR-146a Mimics Ameliorates Traumatic Brain Injury Involving JNK and NF- κ B Signaling Pathway. *Neuromolecular Med* 2020; **22**: 484-492
- 428 Gonzalez D, Contreras O, Rebolledo DL, *et al.* ALS skeletal muscle shows enhanced TGF- β signaling, fibrosis and induction of fibro/adipogenic progenitor markers. *PLoS One* 2017; **12**: e0177649
- 429 Kaur G, Davies MR, Liu X, *et al.* The Role of Fibro-Adipogenic Progenitors in Musculoskeletal Disease. *Muscle Ligaments and Tendons J* 2021; **11**: 240
- 430 Chen Z, Zhang Y, Liang C, *et al.* Mechanosensitive miRNAs and Bone Formation. *Int J Mol Sci* 2017; **18**: 1684

- 431 Peng Z, Mai Z, Xiao F, *et al.* MiR-20a: a mechanosensitive microRNA that regulates fluid shear stress-mediated osteogenic differentiation via the BMP2 signaling pathway by targeting BAMBI and SMAD6. *Annals of Translational Medicine* 2022; **10**: 683-683
- 432 Herault S, Naser J, Carassiti D, *et al.* Mechanosensitive pathways are regulated by mechanosensitive miRNA clusters in endothelial cells. *Biophys Rev* 2021; **13**: 787-796
- 433 Huang Y, Crawford M, Higuera-Castro N, *et al.* miR-146a regulates mechanotransduction and pressure-induced inflammation in small airway epithelium. *FASEB J* 2012; **26**: 3351-3364
- 434 Yuan Y, Guo J, Zhang L, *et al.* MiR-214 Attenuates the Osteogenic Effects of Mechanical Loading on Osteoblasts. *Int J Sports Med* 2019; **40**: 931-940
- 435 Zhang H, Cai D, Bai X. Macrophages regulate the progression of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 2020; **28**: 555-561
- 436 Hanna J, Hossain GS, Kocerha J. The Potential for microRNA Therapeutics and Clinical Research. *Frontiers in Genetics* 2019; **10**
- 437 Callegari E, Domenicali M, Shankaraiah RC, *et al.* MicroRNA-Based Prophylaxis in a Mouse Model of Cirrhosis and Liver Cancer. *Mol Ther Nucleic Acids* 2018; **14**: 239-250
- 438 Bobba CM, Fei Q, Shukla V, *et al.* Nanoparticle delivery of microRNA-146a regulates mechanotransduction in lung macrophages and mitigates injury during mechanical ventilation. *Nat Commun* 2021; **12**: 289
- 439 Jia D, Li Y, Han R, *et al.* miR-146a-5p expression is upregulated by the CXCR4 antagonist TN14003 and attenuates SDF-1-induced cartilage degradation. *Mol Med Rep* 2019; **19**: 4388-4400
- 440 Jin HY, Gonzalez-Martin A, Miletic AV, *et al.* Transfection of microRNA Mimics Should Be Used with Caution. *Front Genet* 2015; **6**: 340
- 441 Nieto-Díaz M, Esteban F, Reigada D, *et al.* MicroRNA dysregulation in spinal cord injury: causes, consequences and therapeutics. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 2014; **8**: 53
- 442 Huang X, Wu W, Yang W, *et al.* Surface engineering of nanoparticles with ligands for targeted delivery to osteosarcoma. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2020; **190**: 110891
- 443 Le Moal B, Lepeltier É, Rouleau D, *et al.* Lipid nanocapsules for intracellular delivery of microRNA: A first step towards intervertebral disc degeneration therapy. *Int J Pharm* 2022; **624**: 121941

- 444 Dasgupta I, Chatterjee A. Recent Advances in miRNA Delivery Systems. *Methods Protoc* 2021; **4**: 10
- 445 Zhang X, Mosser D. Macrophage activation by endogenous danger signals. *J Pathol* 2008; **214**: 161-178
- 446 Salo H. The Role of the DAMP Molecule HMGB1 in Neuroinflammation and Macrophage Activation. Inst för medicin, Solna / Dept of Medicine, Solna; 2021.
- 447 Huang Y, Wang X, Lin H. The hypoxic microenvironment: a driving force for heterotopic ossification progression. *Cell Commun Signal* 2020; **18**: 20
- 448 Dey D, Bagarova J, Hatsell SJ, *et al.* Two tissue-resident progenitor lineages drive distinct phenotypes of heterotopic ossification. *Sci Transl Med* 2016; **8**: 366ra163

1.4 Feuille de suivi de la procédure expérimentale POAN

FICHE DE SUIVI - EXPERIENCE : _____ Autorisation n° _____

Identification animal # _____ Date de chirurgie (J0) : ___/___/___ Initiales expérimentateur SCI : _____

Boucle # _____ Patte Droite : _____ Patte Gauche : _____ Initiales expérimentateur CTX : _____

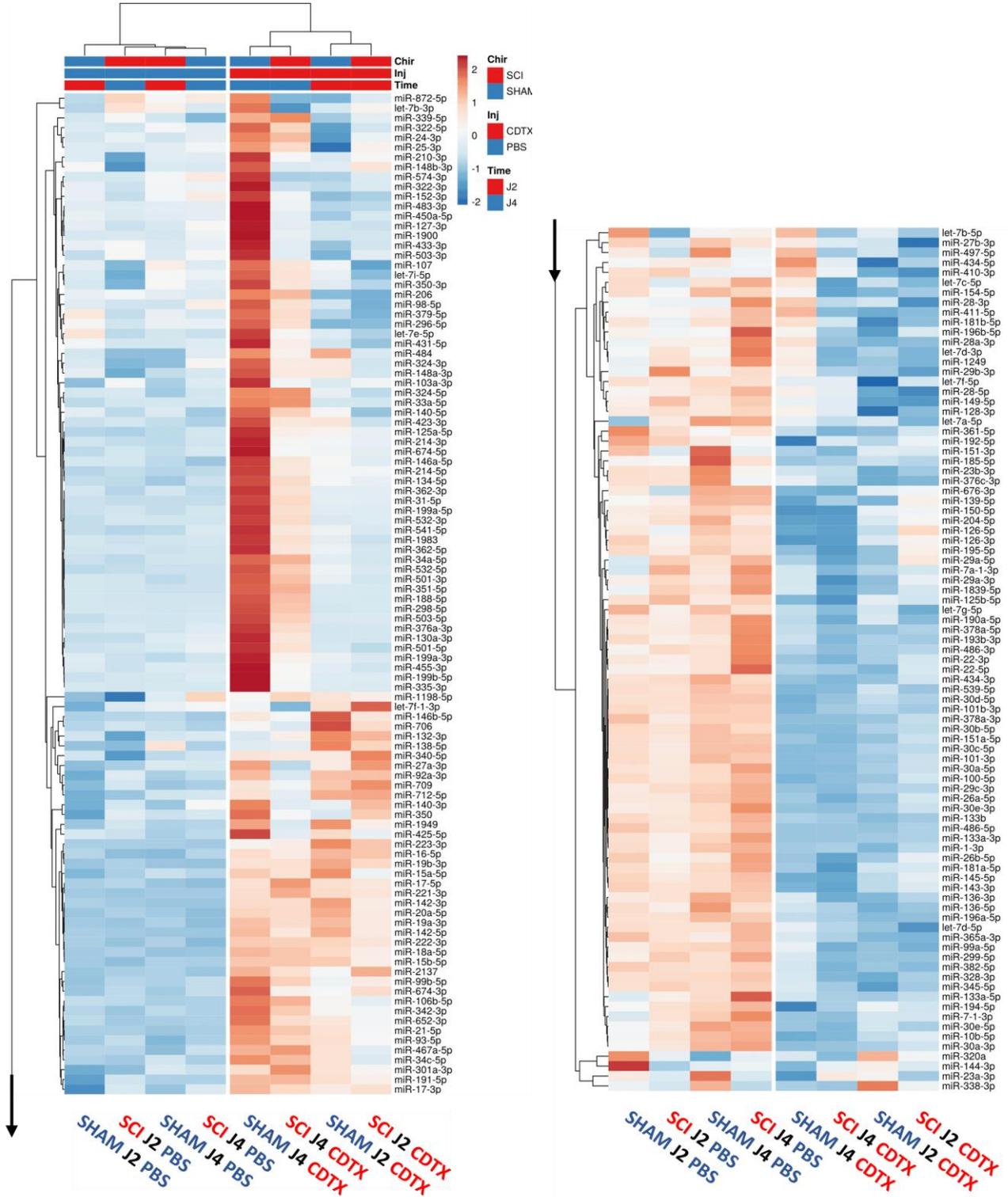
Critères	J0	J1	J2	J3	J4	J7
A : Etat de santé général A1 : Alimentation	Scores des variables indépendantes					
	0. Boit et mange sans difficulté					
	1. Changements dans les comportements d'alimentation 2. Inappétence. 3. Ne mange plus/ ne boit plus. Déshydratation sévère					
A2 : Motricité	0. Réduits légèrement du fait de la paralysie					
	1. Diminué mais se déplace rapidement après stimulation					
	2. Diminution significative, se déplace lentement après stimulation 3. Ne bouge pas après stimulation					
A3 : Comportement social	0. Normal					
	1. Isolement					
	2. Agressif ou blotti dans un coin 3. Détresse sévère					
B : Aspect clinique	0. Normal 1. Pelage ébouriffé 2. Animal apparaît déprimé, voûté, réticent à se déplacer 3. Animal apparaît sévèrement déprimé					
C : Perte de poids	0. Normal					
	1.5 - 10%					
	2. 10-15% 3. >15%					
D : Lésion cutanée & tissulaire	0. Sans					
	1. Abrasion cutanée bénigne					
	2. Lésion de moyenne gravité sans lésion musculaire 3. Lésion cutanée sévère avec lésion musculaire					
Score Total (A1+A2+A3+B+C+D)						
Poids (en g)						
Initiales observateur(s)						

<p><i>Un score supérieur à 3 dans une catégorie : euthanasie</i></p> <p>Score total : 0 = normal : pas d'action 1-5 = changements modérés: suivi quotidien 6-11 = changements significatifs: suivi biquotidien >11 = euthanasie</p>	<p style="text-align: center;">OBSERVATIONS</p>
---	--

Identification animal # _____

	Matin (8h)				Soir (18h)			
	Bupré (150µl)	Baytril (50 µl)	NaCl (200-400 µl)	Miction	Bupré (150µl)	NaCl (200-400 µl)	Miction	
J0								
J1								
J2								
J3								
J4								
J5								
J6								
J7								

1.5 Clustergramme du criblage miRnome sur muscle entier



1.6 Liste des amorces criblage miRnome

miRnome (mouse)	microRNA target sequence	miRCURY LNA™ miRNA PCR Assay	miRnome (mouse)	microRNA target sequence	miRCURY LNA™ miRNA PCR Assay
mmu-miR-3107-5p	UCCUGUACUGAGCUGCCCGGAG	YP00204001	mmu-miR-411-3p	UAUGUAAACACGGUCCAGUAAAC	YP00204434
mmu-miR-218-5p	UUGUGCUUGAUCUAAACCAUGU	YP00206034	mmu-miR-15a-3p	CAGGCCAUACUGUGUCGCCUCA	YP00205172
mmu-miR-148b-3p	UCAGUGCAUCACAGAACUUUGU	YP00204047	mmu-let-7g-3p	ACUGUACAGGCCACUGCCUUGC	YP00205203
mmu-miR-297c-5p	AUGUUAUGUGUGCAUGUACAUGU	YP00205006	mmu-miR-141-5p	CAUCUCCAGUGCAGUGGUUGGA	YP00205321
mmu-miR-127-3p	UCGGAUCCGUCUGAGCUUGGCU	YP00204048	mmu-miR-20b-3p	ACUGCAGUGUGAGCACUUCUAG	YP00205399
mmu-miR-411-5p	UAGUAGACCGUAUAGCGUACG	YP00204531	rno-miR-935	CCAGUUACCGCUUCCGCUACCGC	YP00205579
mmu-miR-335-5p	UCAAGAGCAAAUACGAAAUAUUG	YP02119293	mmu-miR-126a-5p	CAUUUAUUUUUUUGGUACGCG	YP00206010
mmu-miR-196b-5p	UAGGUAGUUUCUGUUGUUGGG	YP00204555	mmu-miR-466f	ACGUGUGUGUGCAUGUGCAUGU	YP00205206
mmu-miR-26b-5p	UUCAGUAUUUCAGGAUAGGU	YP00204172	mmu-miR-1306-3p	ACGUUGGCUUGGUGUGAUG	YP00205318
mmu-miR-22-3p	AAGCUGCCAGUUGAAGAUCUGU	YP00204606	mmu-miR-678	GUCUCGGUGCAAGGACUGGAGG	YP00205099
mmu-miR-590-5p	GAGCUUAUUCAUAAAAGUGCAG	YP00204222	mmu-miR-212-5p	ACCUUGGCUUAGACUGUUAUCU	YP00205401
mmu-miR-183-5p	UAUGGCACUGGUGAAUUCACU	YP00206030	rno-miR-463-3p	UGAUAGACGCCAAUUUGGGUAG	YP00205547
mmu-miR-323-3p	CACAUUACACGGUCGACCCUCU	YP00204278	rno-miR-29b-2-5p	CUGGUUUCACAUGUGGCUUAG	YP00204208
mmu-miR-326-3p	CCUCUGGCCCUUCCUCCAGU	YP00205187	mmu-miR-1934-5p	UUCUGUCCCGUUCUUGCCUCU	YP00205352
mmu-miR-130b-3p	CAGUGCAUUGAUAAAGGGCAU	YP00204317	mmu-miR-1954	ACUGCAGAGUGAGACCUGUUG	YP00205374
mmu-miR-26a-5p	UUCAGUAUUUCAGGAUAGGU	YP00206023	mmu-miR-673-3p	UCCGGGGCUGAGUUCUGGUCACC	YP00205095
mmu-miR-1a-3p	UGGAAUGUAAAAGUAUUGUUAU	YP00204344	rno-miR-544-3p	AUUCUGCAUUUUUAGCAAGCU	YP00205560
mmu-miR-133a-3p	UUUGGUCUCCUUAACACCGCUG	YP00204788	mmu-miR-669h-5p	AUGCAUGGUGUUAUUGUAGUGC	YP00205055
mmu-miR-574-3p	CAGGUAUGCAACACGCCACA	YP00206011	mmu-miR-1963	UGGACGAGAUCAUGAGCCUUC	YP00205383
mmu-miR-20b-5p	CAAAGUCUCAUAGUCAGGUAG	YP00204755	mmu-miR-695	AGAUUGGGCAUAGGUGACUGAA	YP00205458
mmu-let-7i-5p	UGAGGUAGUAGUUGUGUCUGU	YP00204394	mmu-miR-133a-5p	GCUGGUAUUUUGAAACCAAUU	YP00205320
mmu-let-7c-5p	UGAGGUAGUAGUUGUUAUGGUU	YP00204767	mmu-miR-448-3p	UUGCAUUAUGUAGGUAUGCCAU	YP00204643
mmu-miR-615-3p	UCCGAGCCUGGGUCUCCUCU	YP00204453	mmu-miR-490-5p	CCAUGGAUCUCCAGGUGGGU	YP00206077
rno-miR-136-5p	ACUCCAUUUUGUUUUGAUGUGGA	YP00204779	mmu-miR-344b-3p	CAUUUAGCCAAAGCCUGACUGU	YP00205420
mmu-miR-544-3p	AUUCUGCAUUUUUAGCAAGCUC	YP00205580	mmu-miR-431-3p	CAGGUCGUCUUGCAGGGCUUCU	YP00204567
mmu-miR-122-5p	UGGAGUGGACAAUGGUGUUGU	YP00205664	mmu-miR-23a-5p	GGGUUCCUGGGGAUUGGAUUU	YP00205631
mmu-miR-224-5p	UAAGUCACUAGUUGGUUCCGUU	YP00205153	mmu-miR-203-5p	AGUUGUUUUCACAGUUAACA	YP00205397
mmu-miR-16-5p	UAGCAGCACGUAUUUAGGCG	YP00205702	mmu-miR-671-5p	AGGAAGCCUGGAGGGCUGGAG	YP00205649
mmu-miR-683	CCUGCUGUAAGCUGUGUCCUC	YP00205102	mmu-miR-219a-2-3p	AGAAUUGUGGCUUGGCAUCUGU	YP00204674
mmu-miR-30c-2-3p	CUGGGAAAGCGCUGUUACUCU	YP00205632	mmu-miR-10b-3p	CAGAUUCGAUUCUAGGGAAUA	YP00205640
mmu-miR-802-5p	UCAGUAACAAGAUUCAUCCUU	YP00205002	mmu-miR-717	CUCAGACAGAGAUACCUUCUCU	YP00205469
mmu-miR-33-5p	GUGCAUUGUAGUUGCAUUGCA	YP00205690	mmu-miR-376b-5p	GUGGAUUAUCCUUCUUAUGGUUA	YP00205199
rno-miR-190b-5p	UGAUUUGUUUGAUUUAGGUU	YP00205110	mmu-miR-1839-5p	AAGGUAGAUAGAACAGGUUCUUG	YP00205327
mmu-miR-202-5p	UUCUUAUGCAUUAUCUUCUUU	YP00205654	mmu-miR-669k-3p	UAUGCAUUAACAGCAUGCAA	YP00205169
mmu-miR-330-5p	UCUCUGGGCCUGUGUCUJAGGC	YP00204372	mmu-miR-615-5p	GGGGUCCCGGUGCUGGGAUC	YP00204445
mmu-miR-449c-5p	AGGCAGUGCAUUGCUAGCUGG	YP00205726	mmu-miR-125b-2-3p	ACAAGUCAGGUUCUUGGGACCU	YP00205315
rno-miR-214-3p	ACAGCAGGACACAGCAGGCA	YP00205512	mmu-miR-1193-5p	UGGUAGACCGGUGACGUACA	YP00205308
mmu-miR-337-3p	UUCAGUCUCCUUAUUAUGCCU	YP00205085	mmu-miR-1956	AGUCCAGGCGUGAGUCAGCGGA	YP00205376
mmu-miR-351-5p	UCCUGAGGAGCCUUUGAGCCUG	YP00205011	mmu-miR-1953	UGGAAAGUUCUCAGGCUUCUG	YP00205373
mmu-miR-291a-5p	CAUCAAGUGGAGGCCUUCUCU	YP00205063	rno-miR-653-5p	UUGAAACAUUCUCUACUGAAC	YP00205562
mmu-miR-383-5p	AGAUUAGUAGGUGACUGUGCU	YP00205000	rno-miR-511-5p	CAUGCCUUUUGCUCUGCAAC	YP00205556
mmu-miR-466a-3p	UAUACAUAACAGCACAUUAGA	YP00205027	mmu-miR-1964-3p	CCGACUUCUGGGUCUCCGGUUU	YP00205384
mmu-miR-452-5p	UGUUGCAGAGGAAACUGAGAG	YP00205590	mmu-miR-743a-3p	GAAAGACACCAAGCUGAGUAGA	YP00205472
rno-miR-148b-5p	GAAGUUCUGUUUAUACACUCAGG	YP00205108	mmu-miR-29a-5p	ACUGAUUUUUUUGGUGUUCAG	YP00204430
mmu-miR-467d-5p	UAAGUGCGCGCAUGUUAUGCG	YP00205212	mmu-miR-195a-3p	CCAUAUUGGCUUGUCUCCUC	YP00204128
mmu-miR-297b-5p	AUGUAGUGUGUGCAUGAACUUG	YP00205005	mmu-miR-140-3p	UACCAACGGGUAAGAACCGG	YP00204304
mmu-miR-500-3p	AAUGCACCGGCAAGGGUUA	YP00205093	mmu-miR-377-5p	AGAGGUUGCCUUGGUGAAUUC	YP00205428
mmu-miR-370-3p	GCCUGCUGGGUGGAACCGUGG	YP00204011	mmu-miR-31-3p	UCUUAUGCCAAUUAUUGCCAU	YP00205415
mmu-miR-205-5p	UCCUUAUUAUCCACCGAGUCUG	YP00204487	mmu-miR-322-3p	AAACAUAGAGCGCUGCAACAC	YP00205416
rno-miR-493-3p	UGAAGGUCUACUGUGGCCAG	YP00205141	mmu-miR-709	GGAGGCAGAGGCAGGAGGA	YP00205463
mmu-miR-214-3p	ACAGCAGGACACAGCAGGCA	YP00204510	mmu-miR-300-5p	UUGAAGAGAGGUUAUUCUUUGU	YP00205412
mmu-miR-192-5p	CUGACCUUAUGAAUUGACAGCC	YP00204099	mmu-miR-130b-5p	ACUCUUCUCCUGUUGCACUACU	YP00205319
mmu-miR-221-3p	AGCUACAUUGUCUGUGGGUUUC	YP00204532	mmu-let-7f-2-3p	CUAUACAGUUCUACUGUUCUUC	YP00205302
mmu-miR-339-5p	UCCUGUCCUCCAGGAGCUCAG	YP00206007	rno-miR-204-3p	GCUGGGAAGGCAAGGGAGCUU	YP00205508
mmu-let-7g-5p	UGAGGUAGUAGUUGUUAUAGU	YP00204565	mmu-miR-302a-5p	ACUUAACCGUGUUUGUACUUGC	YP00205413
mmu-miR-873a-5p	GCAGGAACUUGUGAGUCUCCU	YP00204175	mmu-miR-1896	CUCUCUGAUGGUGGUGAGGAG	YP00205332
mmu-miR-374b-5p	AUAUUAUAACAACCUUGCUAAGU	YP00204608	mmu-miR-466j	UGUGGCAUGUGCAUUGUGUUA	YP00205208
mmu-miR-126a-3p	UCGUACCGUGAGUAUUAUUGCG	YP00204227	mmu-miR-327	ACUAGGGGGCAUGAGGAU	YP00205418
mmu-miR-137-3p	UUUUAUGCUUAAGAAUACGCGUAG	YP00206062	rno-miR-532-5p	CAUGCCUUGAGUUGAGCUCUGU	YP00205557
mmu-miR-203-3p	GUGAAAUUUUUAAGACCAUAG	YP00205914	mmu-miR-218-2-3p	CAUGUUUCUGUCAAGCACCGCG	YP00205639
mmu-miR-146a-5p	UGAGAACUGAAUCCAUUGGGUU	YP00204688	mmu-miR-1936	UAACUGACCUGCUGUAAUCUGGC	YP00205354
mmu-miR-212-3p	UAACAGUCUCCAGUCACGGCCA	YP00206022	mmu-miR-1958	UAGGAAAGUGGAAAGCAGUAAU	YP00205378
mmu-miR-181d-5p	AACAUAUUAUUGUUGCGGUGGGU	YP00204789	mmu-miR-1188-5p	UGGUUGAGGUGGUGGCGCAGGA	YP00205304
mmu-miR-99b-5p	CACCCUUAAGAACCCAGCUUGCG	YP00205983	rno-miR-665	ACCAGGAGGCGUGAGGUCCUUA	YP00205563
mmu-miR-30d-5p	UGUAAAUUCCCGACUGGAAG	YP00206047	mmu-miR-467g	UAUACAUAACACACAUUAU	YP00205215
mmu-miR-139-3p	UGGAGAGCGGGCCUUGUUGGAG	YP00205162	mmu-miR-1982-3p	UCUCACCCUUAUGUUUCUCCACAG	YP00205393
mmu-miR-495-3p	AAACAACAAGGUGCAUCUUCU	YP00206015	mmu-miR-759	GCAGAGUGCAACAUAUUUGAC	YP00206000
mmu-miR-155-5p	UUAAUGCUAAUUUGUUAUGGGU	YP02119303	mmu-miR-29c-5p	UGACCGAUUUCUCCUGGUUUC	YP00204132
mmu-miR-219a-5p	UGAUUGUCCAAACGAAUUCU	YP00204780	rno-miR-352	AGAGUAGUAGGUUGCAUAGUA	YP00205535
mmu-miR-217-5p	UACUGCAUCAGGAACUGACUGGA	YP00205070	mmu-miR-135b-3p	AUGUAGGGCUAAAAGCCAUUGG	YP00204427
mmu-miR-100-5p	AACCCGUAUGAUCGAAUUCUGG	YP00205689	mmu-miR-344d-3p	GAUUAACACACUGCCAGACUGA	YP00205422

mmu-miR-672-5p	UGAGGUUGGUUACUGUGUGUGA	YP00205170	mmu-miR-33-3p	CAAUGUUCCACAGUGCAUCAC	YP00204086
mmu-let-7e-5p	UGAGGUAGGAGGUUUAUAGUU	YP00205711	mmu-miR-711	GGGACCCGGGGAGAGAUUAAG	YP00205638
mmu-miR-124-3p	UAAGGCACGCGGUGAAUGCC	YP00206028	mmu-miR-532-3p	CCUCCACACCCAAGGCUUGCA	YP00204003
mmu-miR-539-5p	GGAGAAUUUACCUUGGUGUGU	YP00205656	mmu-miR-712-5p	CUCUUACCCGGGGGUUACC	YP00205644
mmu-miR-871-5p	UAUUCAGAUUAGUCCAGUCAUG	YP00205582	mmu-miR-654-3p	UAUGUCUGUGCAACCAUCACUU	YP00204054
mmu-miR-301a-3p	CAGUGCAAUAGUUAUUGCAAAGC	YP00205601	mmu-miR-666-3p	GGCUGCAGCGUGAUGCCUGCU	YP00205669
rno-miR-200b-3p	UAAUAUCUGCCUGGUAAUUAUGAC	YP00205111	rno-miR-322-3p	AAACAUAAGCGCUGCAACA	YP00205522
mmu-miR-339-3p	UGAGCGCCUCGGCGACAGAGCCG	YP00205686	mmu-miR-467d-3p	AUAUCAUAACACACACCUACAC	YP00205932
rno-miR-223-3p	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCC	YP00205120	mmu-miR-1981-5p	GAAAGGCGUGGCUUAGACGUGGC	YP00205391
mmu-miR-541-5p	AAGGGAUUCUGAUUGGUCACACU	YP00205725	mmu-miR-669n	AUUUGUGUGUGAUGUGUGU	YP00205225
mmu-miR-291a-3p	AAAGUGCUUCCACUUUGUGUGC	YP00205060	mmu-miR-450b-3p	AUUGGGAACUUUUGCAUGCAU	YP00205431
mmu-miR-342-5p	AGGGUGCUAUCUGUGAUUGAG	YP00205185	mmu-miR-1903	CCUUCUUCUUCUCCUGAGACA	YP00205339
mmu-miR-208b-3p	AUAAGACGAAACAAAGGUUUUG	YP00204636	mmu-miR-1839-3p	AGACCUACUUUACUACCAACAGC	YP00205326
mmu-miR-362-3p	AACACACCUUGUUAAGGAUUCA	YP00205012	mmu-miR-1198-3p	AAGCUAGCCUCUAACUACUUGC	YP00205312
mmu-let-7a-1-3p	CUAUACAUCUACUGUCUUUCC	YP00205586	mmu-miR-706	AGAGAAACCCUGUCUAAAAAA	YP00205976
mmu-miR-384-3p	AUUCUAGAAAUGUUCACAAU	YP00205079	mmu-miR-686	AUUGCUUCCAGACGGUGAAGA	YP00205454
mmu-miR-466c-5p	UGAUGUGUGUGUGCAUGUACAUAU	YP00206013	rno-miR-876	UGGAUUUCUUGUGAUAUCACCA	YP00205997
mmu-miR-453	AGGUUGCCUUAUGUGAGCUUGCA	YP00205020	mmu-miR-466k	UGUGUGUGUACAUUACUUGUGA	YP00205209
rno-miR-201-5p	CACUCAGUAAGCAUUGUUC	YP00205506	mmu-miR-290a-5p	ACUCAAAUUAUGGGGGCACUUU	YP00205155
mmu-miR-467e-5p	AUAAGUGUGAGCAUGUAUAUGU	YP00205213	mmu-miR-876-3p	UAUGUGUUUACAAGUAUAUCA	YP00205483
mmu-miR-20a-3p	ACUGCAUUAACGAGCAUUAAG	YP00205178	mmu-let-7i-3p	CUGCGCAAGCUACUGCCUUGCU	YP00204247
mmu-miR-501-3p	AAUGCACCCGGGCAAGGAUUUG	YP00205037	mmu-miR-200a-5p	CAUUCUACCGGACAGUGUGGA	YP00206063
mmu-miR-186-5p	CAAGAAUUCUCCUUUUGGGCU	YP00206053	mmu-miR-196b-3p	UCGACAGCACGACACUGCCUUC	YP00206018
mmu-miR-363-3p	AUUUGCACGGUAUCCAUUCUGUA	YP00204726	mmu-miR-7a-1-3p	CAACAAUACACAGUCUGCCAUU	YP00205471
mmu-miR-101b-3p	UACAGUACUGUAGUAGCUGAA	YP00205072	mmu-miR-127-5p	CUGAAGCUCAGAGGCGUCUAG	YP00204161
mmu-miR-298-5p	GGCAGAGGAGGGCUGUUUCUCC	YP00205092	mmu-miR-708-3p	CAACUAGACUGUGAGCUUCUAG	YP00204681
mmu-miR-499-5p	UUUAGACUUGCAGUGAUUUUU	YP00205935	mmu-miR-296-3p	GAGGUUUGGUGGAGGCUUCUCC	YP00204393
mmu-miR-129-5p	CUUUUUGCGGUCUGGGCUUGC	YP00204534	mmu-miR-721	CAGUGCAUUAAGAAAGGGGAA	YP00205471
mmu-miR-320-3p	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGGCGA	YP00206042	rno-miR-324-3p	CCACUGCCCGAGGUGUGCUGG	YP00205523
mmu-miR-181a-5p	AACAUUCAACGUCUGCGGUGAGU	YP00206081	mmu-miR-546	AUGGUGGCACGGAGUC	YP00205445
mmu-miR-378a-3p	ACUGGACUUGGAGUCAGAAGG	YP00204179	rno-miR-349	CAGCCUGCUGUUAUAAACCUUCU	YP00205531
mmu-miR-300-3p	UAUGCAAGGGCAAGCUCUCUUC	YP00205066	mmu-miR-883b-3p	UAUCGCAACAUUCUCAGUAU	YP00205492
mmu-miR-21a-5p	UAGCUUAUCAGACUGAUUUUGA	YP00204230	mmu-miR-1983	CUCACCCUGGAGCAUUGUUUCU	YP00205395
mmu-miR-130a-3p	CAGUGCAAUGUJAAAGGGCAU	YP00204658	mmu-miR-763	CCAGCUGGGAAGAACAGUGGC	YP00205242
mmu-miR-142-3p	UGAUGUUUCCUACUUUAUGGA	YP00204291	mmu-miR-455-3p	GCAGUCACCGGCAUAUACAC	YP00205432
mmu-miR-381-3p	UAUACAAGGGCAAGCUCUCUGU	YP00205887	mmu-miR-1247-5p	ACCUGUCCGUAUCCUCCCGGA	YP00204770
mmu-miR-149-5p	UCUGGCCUCCGUGUCUACUCUCC	YP00204321	mmu-miR-1894-5p	CUCUCCCUACACCCUCCUUCU	YP00205330
mmu-miR-29c-3p	UAGCACAUUUAGAAUUGGGUUA	YP00204729	mmu-miR-1938	CGGUGGACUUGUAGUUCGGUC	YP00205358
mmu-miR-409-3p	GAAUGUUGCUCGGUGAACCCCU	YP00204358	mmu-miR-1960	CCAGUGCUGUUAAGAGGGGCU	YP00205880
mmu-miR-23b-3p	AUCACAUUGCCAGGGAUUACC	YP00204790	mmu-miR-883a-3p	UAUCGCAACAGCUCUCAGUAU	YP00205490
mmu-miR-147-3p	GUGUGCGGAAUUGCUUCUGCUA	YP00204368	rno-miR-667-3p	UGACACUCCACCCAGCCCAA	YP00205565
mmu-miR-106b-5p	UAAAGUGCUGACAGUGCAGAU	YP00205884	mmu-miR-669l-5p	AGUUUGUGUGCAUGUAUAUGU	YP00205223
mmu-miR-151-3p	CUAGACUGAGGCUCCUUGAGG	YP00205163	mmu-miR-92a-3p	UAUUGCACUUGUCCCGGCUUG	YP00205947
mmu-miR-17-5p	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAU	YP02119304	mmu-miR-876-5p	UGGAUUUCUUGGUAUAUCAU	YP00205484
mmu-miR-182-5p	UUUGGCAUUGGUAACUCACACCG	YP00205089	mmu-miR-491-3p	CUUUAUGCAAGAUUCCUUCUAC	YP00205977
mmu-miR-19a-3p	UGUGCAAAUCUUAUGCAAAACUGA	YP00205862	mmu-miR-216b-5p	AAAUUCUUGCAGGCAAAUGUGA	YP00204289
mmu-miR-125a-3p	ACUGGUGAGGUUUUGGAGGCC	YP00204446	rno-miR-7a-1-3p	ACAACAUAUCACAGUCUGCCAU	YP00205543
mmu-miR-134-5p	UGUGACUUGUUGACAGAGGGG	YP00205989	mmu-miR-299a-5p	UGGUUUACCGUCCACAUACAU	YP00204544
mmu-miR-675-3p	CUGUAUGCCCUAACCGCUCAGU	YP00205227	mmu-let-7f-1-3p	CUAUACAUCUUAUUGCCUUCUCC	YP00204323
mmu-miR-484	UCAGGUCAGUCCUCCUCCGUAU	YP00205636	mmu-miR-466l-3p	UAUAAUAACAUAGCACACAUUU	YP00205031
mmu-miR-151-5p	UCGAGGAGCUCACAGUCUAGU	YP00204007	mmu-miR-28a-3p	CACUAGAUUGUGAGCUGCUGGA	YP00205197
mmu-miR-669b-5p	AGUUUGUGUGCAUGUGCAUGU	YP00205628	mmu-miR-743b-3p	GAAAGACAUCAUGCUAAUAGA	YP00205617
mmu-miR-875-3p	CCUGAAAUUACUGAGGCUAUG	YP00205246	rno-miR-327	CCUUGAGGGCAUGAGGGU	YP00205524
mmu-miR-30a-5p	UGUAAACAUCUCCAGCUGGAAG	YP00205695	mmu-miR-669i	UGCAUUAACACACAUAGCAUCC	YP00205603
rno-miR-200c-3p	UAAUACUGCCGGUUAUUAUGU	YP00205505	rno-miR-409a-3p	AAUUGUUCUGGUAACCCUCC	YP00205544
mmu-miR-376c-3p	AACAUAAGGAAAUUUCACGU	YP00205987	mmu-miR-467f	AUAUACACACACACCUACA	YP00205032
rno-miR-224-5p	CAAGUCACUAGUGGUUCCGUUU	YP00205514	mmu-miR-463-5p	UACCUAAUUUGUUGCUACAU	YP00205433
mmu-miR-340-5p	UUUAAAGCAAUGAGACUGAUU	YP00206068	mmu-miR-676-5p	ACUCUACAACCUUAGGACUUGC	YP00205228
rno-miR-377-3p	UGAAUCACACAAGGCAACUUUU	YP00205538	mmu-miR-467c-5p	UAAGUGGUGCAUGUAUUAUGU	YP00205439
mmu-miR-344-3p	UGAUUAGCCAAAGCCUGACUGU	YP00205008	mmu-miR-1948-3p	UUUAGGAGAGCACUCUGUACAG	YP00205368
rno-miR-505-3p	GUCAACACUJUCUGGUUUUCC	YP00205143	mmu-miR-1900	GGCCGCCUCUCUGGUUUUCA	YP00205337
mmu-miR-362-5p	AAUCUUGGAAACUAGGUGUAAU	YP00205073	mmu-miR-466e-5p	GAUGUGUGUUAUUAUUAUUA	YP00205205
mmu-miR-297a-5p	AGUAUUGUGUGCAUGUGCAUGU	YP00206016	mmu-miR-1962	AGAGGCGGACUGGACACAU	YP00205382
mmu-miR-384-5p	UGUAAACAUAUCCUAGGCAUUGU	YP00205189	mmu-miR-882	AGGAGAGAUUAGCGCAUUAUGU	YP00205489
mmu-miR-292-3p	AAAGUGCCGCCAGGUUUUAGUGU	YP00205188	rno-miR-742-3p	GAAAGCCACCAUUGGGUAAA	YP00205568
mmu-miR-449b	AGGCAUGUUAUUGUAGCUGGC	YP00205016	mmu-miR-669g	UGCAUUGUAUGUUAUUAUUAU	YP00205222
rno-miR-290	UCUCAAAUUGGGGCA	YP00206027	mmu-miR-2136	CUGGGUUGUAGCUGAUGUGU	YP00205402
mmu-miR-493-3p	UGAAGGUCCUACUGUGGCCAGG	YP00205087	mmu-miR-878-3p	GCAUGACACACUUGGGUAGA	YP00205485
mmu-miR-425-3p	AUCGGGAAUUGCUGUGCCGCC	YP00205156	mmu-miR-27a-5p	AGGGCUUAGCUGCUUUGGAGCA	YP00206021
mmu-miR-503-5p	UAGCAGCGGGAACAGUACUGCAG	YP00205094	mmu-miR-26b-3p	CCUUGUUCUUAUUAUUGGUCU	YP00204117
mmu-miR-187-3p	UCGUGUCUUGUGUUGCAGCCGG	YP00204018	mmu-miR-193b-5p	CGGGUUUUUGAGGGCGAGAUGA	YP00204065
mmu-miR-18a-3p	ACUGCCCUAAGUGCUUCCUUCUG	YP00205174	mmu-miR-191-3p	CGUCACUUGGAUUUCCUUCUCC	YP00205175
mmu-miR-369-5p	AGAUCGACCGUUAUUAUUCGC	YP00206014	mmu-miR-34c-3p	AAUCACUAAACACACAGCCAGG	YP00205424
mmu-miR-9-5p	UCUUUGGUUAUUCAGCUGUAUGA	YP00204513	mmu-miR-1192	AAACAAACAACAGCCAAUUU	YP00205991

mmu-miR-148a-3p	UCAGUGACUACAGAAUUUUGU	YP00205867	mmu-miR-568	AUGUAUAAAUGUAUACACAC	YP02119300
mmu-miR-199a-3p	ACAGUAGUCUGCACAUUUGUUA	YP00204536	mmu-miR-707	CAGUCAUGCCGUUCCUACG	YP00205235
mmu-miR-331-3p	GCCCCUGGGCCUUAUCCUAGAA	YP00206046	mmu-miR-188-3p	CUCCACAUAGCAGGGUUGCA	YP02119296
mmu-miR-494-3p	UGAAACAUACACGGGAACCCUC	YP00204579	rno-miR-25-5p	AGGCGGAGACACGGGCAUUUC	YP00205516
mmu-miR-207	GCUCUCUCCUGGUCUCUCCUCCUC	YP00205084	mmu-miR-1249-3p	ACGCCUUCUCCUCCUUCUUA	YP00204122
mmu-miR-365-3p	UAAUGCCCUAAAUAUCCUUAU	YP00204622	rno-miR-135a-3p	UGUAGGGAUGGAAGCCAUAAA	YP00205502
mmu-miR-188-5p	CAUCCUUGCAUUGGUGGAGGG	YP00204239	mmu-miR-677-5p	UUCAGUGAUGAUUAGCUUCUGA	YP00205453
mmu-miR-299a-3p	UAUGUGGGACGGUAAACCCGUU	YP00205071	mmu-miR-1190	UCAGUCUAGGUUCCUCCUUGUC	YP00205305
mmu-miR-20a-5p	UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG	YP00204292	mmu-miR-547-3p	CUUGGUACAUCUUUGAGUGAG	YP00205446
mmu-miR-29a-3p	UAGCACCUCUGAAUCCGGUUA	YP00204698	mmu-miR-669d-5p	ACUUGUGUGUGCAUGUAUUGU	YP00205051
mmu-miR-28a-5p	AAGGAGCUCACAGUCUUAUUGAG	YP00204322	mmu-miR-1905	CACCAGUCCACCACCGGUGAG	YP00205341
mmu-miR-377-3p	AUCACACAAAGGCAACUUUUGU	YP00204733	mmu-miR-1940	AUGGAGGACUGAGAAGGUGGAGCAGUU	YP00205360
mmu-let-7f-5p	UGAGGUAGUAGAUUGUAUUGU	YP00204359	mmu-miR-669f-3p	CAUAUACAUAACACACACGUUA	YP00205592
mmu-miR-301b-3p	CAGUGCAUUGGUUAUUGCAAAGC	YP00205065	mmu-miR-92a-2-5p	AGGUGGGGAUUGGUGGCAUUA	YP00205493
mmu-miR-9-3p	AUAAAGCUAGAUAAACCGAAAGU	YP00204620	rno-miR-743a-3p	GAAAGACGCCAAACUGGUUAGA	YP00205569
mmu-miR-874-3p	CUGCCUUGGCCGAGGGACCGA	YP00204761	mmu-miR-1897-3p	UCAACUCGUUUCUCCGGUGAG	YP00205333
mmu-miR-96-5p	UUUGGCACUAGCACAUUUUUGUC	YP00204417	mmu-miR-106b-3p	CCGCACUGGGUACUUGUCUC	YP00204020
mmu-miR-23a-3p	AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC	YP00204772	mmu-miR-878-5p	UAUCUAGUUGGAUGCAAGACA	YP00205486
mmu-miR-107-3p	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUA	YP00204468	mmu-miR-186-3p	GCCCUAAGGUAUUUUUUGGG	YP00205328
mmu-miR-27b-5p	UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC	YP00205915	mmu-miR-190b-5p	UGAUUUGUUUAGAUUUGGGUU	YP00206031
mmu-miR-598-3p	UACGUCACUCGUCGUAUCGUUA	YP00205045	mmu-miR-135a-1-3p	UAUAGGGAUUGGAGCCUGGCG	YP00204022
mmu-miR-361-5p	UUAUCAGAAUUCUCCAGGGUAC	YP00206054	mmu-miR-496a-3p	UGAGUAUUACAUUGGCCAUUC	YP00204441
mmu-miR-675-5p	UGUGUCGGAAGGGCCACAGU	YP00205097	mmu-miR-199b-5p	CCCAGUUUUAGACUACCUGUUC	YP00205396
mmu-miR-877-5p	GUAGGAGAUAGGGCGAGGG	YP00205626	mmu-miR-1199-5p	UCUGAGUCCCGGUCGCGCGG	YP00206004
mmu-miR-687	CAUCCUGGAAUUGCAGCAUUA	YP00205232	mmu-miR-146b-3p	GCCUAGGGGACUUCUUGUUGU	YP00205323
mmu-miR-204-5p	UUCUUUUGUCAUCCUAGCCU	YP00206072	mmu-miR-1930-5p	ACCUCUAGUACUCCGAGCGU	YP00205596
rno-miR-1-3p	UGGAUUGUAAGAGUGUGUUAU	YP00205104	rno-miR-499-3p	AACAUCACAGCAAGUCUGUGUC	YP00204438
mmu-miR-10b-5p	UACCCUGUAGAACCGAAUUUGU	YP00205637	mmu-miR-1897-5p	CUUUGGAGGGAGAAAGGGGG	YP00205646
rno-miR-207	CUUCUCCUGGUCUCCUCCUUU	YP00205509	mmu-miR-138-1-3p	CGGCUCUUCACAACACAGGG	YP00205161
mmu-miR-465b-5p	UAUUUAGAUGGUGCUGAUCUG	YP00205668	mmu-miR-470-3p	AACCAGUACUUCUGAGAAGA	YP00205217
rno-miR-337-3p	UUCAGUCUUAUAGAUUGCCUUU	YP00205125	mmu-miR-694	CUGAAAUGUUGCCUGAAG	YP00205457
mmu-miR-412-3p	UUCACUUGGUCCACUAGCCG	YP00205587	mmu-miR-742-5p	UACUCACAUUGGUUUAUUA	YP00205239
rno-miR-381-3p	UUAACAAGGGCAAGCUCU	YP00205540	mmu-miR-674-3p	CACAGUCCCAUCUAGCAACA	YP00205452
mmu-miR-345-3p	CCUGAACUAGGGGUCUGGAGAC	YP00205009	mmu-miR-1957a	CAGUGUAGAGCAUAGUC	YP00205377
rno-miR-208a-3p	AUAAGACGAGCAAAAAGC	YP00205974	mmu-miR-1907	GAGCAGCAGAGAUUCUGGAGU	YP00205343
mmu-miR-376a-3p	AUCGUGAGGAAAUUCCACGU	YP00205059	mmu-miR-542-3p	UGGACAGAUUAGUAUACUGAA	YP00205444
mmu-miR-297a-3p	UAUACAUACACAUACCCAUUA	YP00205004	mmu-miR-1966-5p	AAGGGAGCUGGUCAGGAGAGAGUC	YP00205386
mmu-miR-429-3p	UAUACUGUCUGGUAAUUGCCGU	YP00205068	mmu-miR-883a-5p	UGCUGAGAGAAGUAGCAGUUA	YP00205491
mmu-miR-592-5p	AUUGGUGCAUUAUGCGAUGAUGU	YP00205044	rno-miR-743b-3p	GAAAGACACCAUACUGAAUAGA	YP00205570
mmu-miR-465a-3p	GAUCAGGGCCUUCUUAAGUAGA	YP00205023	mmu-miR-1198-5p	UAUGUGUUCUUGGUGGCUUGG	YP00205313
rno-miR-293-5p	ACUCAACUGUGGACACUUU	YP00205519	mmu-miR-2139	AGCUGCGCUGCUCUUGUAACUCG	YP00205404
mmu-miR-470-5p	UUCUUGGACUGGCACUGGUGAGU	YP00205216	mmu-miR-880-3p	UACUCCAUCCUUCUGAGUAGA	YP00205487
mmu-miR-450a-2-3p	AUUGGGGAGUGCUUUGCAUUAU	YP00205588	mmu-miR-22-5p	AGUUCUACAGUGGCAAGCUUA	YP00204255
mmu-miR-509-3p	UGAUUGACAUUUCUGUAUUGG	YP00205038	mmu-miR-99b-3p	CAAGCUCUGUGUCUGGGUCCG	YP00204064
mmu-miR-129-2-3p	AAGCCUUAACCCAAAAGCAU	YP00206067	rno-miR-363-5p	CGGGUGGUAUCAGUAAUUU	YP00204173
mmu-miR-487b-3p	AAUCGUACAGGUCUACCAUUA	YP00204489	mmu-miR-688	UCCGAGGGGACUUAUUUUC	YP00205233
mmu-miR-18b-5p	UAAGGUGACUUAUGUCGUUAUG	YP00205076	mmu-miR-154-3p	AUAUAUACAGGUAUCCAUUA	YP00204096
mmu-miR-154-5p	UAGGUUAUCCGUGUUGCCUUG	YP00204518	mmu-miR-145a-3p	AUUCUUGGAAAUACUUGUUAU	YP00205322
mmu-let-7d-5p	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGU	YP00204124	mmu-miR-330-3p	GCAAAGCACAGGGCCUGCAGAGA	YP00205419
mmu-miR-140-5p	CAGUGGUUUUAUCCUUAUGGUAG	YP00204540	rno-miR-10b-5p	CCUUGUAGAACCAGAAUUUGUGU	YP00205499
mmu-miR-302a-3p	UAAGUGCUUCCAUUUUUGGUGA	YP00206059	mmu-miR-325-5p	CCUAGUAGGUGCUCAGUUAAGU	YP00205417
mmu-miR-193a-3p	AACUGGCCUACAAGUCCCGU	YP00204591	rno-miR-351-5p	UCCUGAGGAGCCUUUGAGCCUGA	YP00205534
mmu-miR-195a-5p	UAGCAGCACAGAAAUUUGGC	YP00205869	mmu-miR-29b-1-5p	GCUGGUUUAUUGGUGGUUUA	YP00205411
mmu-miR-324-3p	CCACUGCCCGAGGUGUCUUCU	YP00205151	rno-miR-382-3p	AAUUAUACAGGCAACACUUA	YP00206066
mmu-miR-211-5p	UUCUUUUGUCAUCCUUGCCU	YP00205091	mmu-miR-704	AGACAUUGGUCUUCUUCUAG	YP00205461
mmu-miR-150-5p	UCUCCAAACCCUUGUACAGUG	YP00204660	mmu-miR-1895	CCCCGAGGAGGACGAGGAGGA	YP00205331
mmu-miR-152-3p	UCAGUGCAUGACAGAAUUGG	YP00204294	mmu-miR-761	GCAGCAGGUGAAACUAGACACA	YP00205475
mmu-miR-200a-3p	UAACACUGUCUGUAACGAUGU	YP00204707	mmu-miR-673-5p	CUCACAGCUCUGUCCUUGGAG	YP00205096
mmu-miR-210-3p	CUGUGCGUGUGACAGCGGUGA	YP00204333	mmu-miR-1927	GACCUCUGGAUUGGAGGACUGA	YP00205344
mmu-miR-451a	AAACCCUUACAUUACUGAGU	YP00204734	mmu-miR-1943-5p	AAGGGAGGACUGGGCACCUGGA	YP00205362
mmu-miR-25-3p	CAUUGCACUUGUCUCCGGUCUGA	YP00204361	mmu-miR-1967	UGAGGAUCCUGGGGAGAAUGC	YP00205387
mmu-miR-32-5p	UAUUGCACAUUAUAGUUGCA	YP00204792	rno-miR-202-5p	UUCUUAUGCAUUAUUAUUA	YP00205507
mmu-miR-92b-3p	UAUUGCACUCUGCCGGCCUCC	YP00204384	rno-miR-760-5p	CCCCUCAGGCCACAGAGCCCG	YP00205571
mmu-miR-135a-5p	UAUGGCUUUUAUUCUUAUGUGA	YP00204762	mmu-miR-1894-3p	GCAAGGGAGAGGUGAAGGGGAG	YP00205329
mmu-miR-106a-5p	CAAAGUGCUAACAGUGCAGGUAG	YP00205061	mmu-miR-2183	UUGAACCCUAGCCUCCU	YP00205407
mmu-miR-302b-3p	UAAGUGCUUCCAUUUUAGUAG	YP00204773	rno-miR-24-1-5p	GUGCCUACUGAGCUGAUUAUCAG	YP00205515
mmu-miR-185-5p	UGGAGAGAAAGCAGUUCUUGA	YP00206037	mmu-let-7e-3p	CUAUACGGCCUCCUAGCUUUA	YP00205301
mmu-miR-30c-5p	UGUAACAUCUACACUCUCAGC	YP00204783	mmu-miR-543-3p	AAACAUCGCGGUGCAGUUAUUA	YP00204447
mmu-miR-654-5p	UGUAAGCUGCAGACACUAGUGU	YP00205046	mmu-miR-340-3p	UCCGUCUCAGUUUAUUAUAGC	YP00204250
mmu-miR-379-5p	UGGUAGACUUAUGAACGUAGG	YP00205658	mmu-miR-409-5p	AGGUUACCCGAGCAACUUGCAU	YP00204014
mmu-miR-676-3p	CCGUCCAGGUGUUGUAGCU	YP00206025	mmu-miR-744-3p	CUGUUGCCAUAAACCUAACC	YP00206082
mmu-miR-125b-5p	UCCCGAGACCCUAAACUUGUGA	YP00205713	mmu-miR-2137	GCCGCGGGAGCCCGAGGAG	YP00205680
mmu-miR-741-3p	UGAGAGAUGCCAUUCUUAUGA	YP00205237	rno-miR-28-3p	CACUAGAUUGGAGCUCUUGGA	YP00204119
mmu-miR-342-3p	UCUCACAGAAUCCGACCCGU	YP00205625	mmu-miR-30c-1-3p	CUGGGAGAGGGUUGUUAUCCU	YP00205707

rno-miR-105	CAAGUCUCAGAUGUCUGUGGU	YP00205105	mmu-miR-468-3p	UAUGACUGAUGUGGUGUGUCUG	YP00205440
mmu-miR-30e-5p	UGUAAACAUCUUGACUGGAAG	YP00204714	rno-miR-215	AUGACCUAUGAUUUGACAGACA	YP00205721
rno-miR-20b-3p	ACUGCAGUGGAGCACUUCUGG	YP00205115	mmu-miR-467b-3p	AUAUACAUAACACACCAACAC	YP00205438
mmu-miR-208a-3p	AUAAGACGAGCAAAAAGCUUGU	YP00205619	mmu-miR-483-3p	UCACUCCUCCUCCUCCGUCUU	YP00205218
rno-miR-338-3p	UCCAGCAUCAGUGAUUUUGUGA	YP00205126	mmu-miR-710	CCAAGUCUUUGGGAGAGUUGAG	YP00205464
mmu-miR-34b-3p	AAUCACUAACUCCACUGCCAUC	YP00205086	mmu-miR-879-3p	GCUUUUGGCUUCAAGCUUCCGG	YP00205247
mmu-miR-504-5p	AGACCCUGGUCUGCACUCUAUC	YP00204396	mmu-miR-16-1-3p	CCAGUAUUGACUUGUGUCUGA	YP00205324
mmu-miR-345-5p	GCUGACCCUAGUCCAGUGCUU	YP00205010	rno-miR-466b-5p	UAUGUGUGUGUGUAUGUCCAU	YP00205549
rno-miR-551b-3p	GGCGACCAUAUCUUGGUUUCAGU	YP00205145	mmu-miR-376c-5p	GUGGAUAUUCUUCUAUGUUUA	YP00205427
mmu-miR-376b-3p	AUCAUAGAGGAACAUCACUU	YP00205058	mmu-miR-1941-3p	CAUCUUAAGCAGUAUUCUCCAU	YP00205361
mmu-miR-343	UCUCCUUAUGUGCCGCAU	YP00205007	mmu-miR-1968-5p	UGCAGCUGUUAAGGAUGGUGGACU	YP00205388
mmu-miR-434-3p	UUUGAACCAUCACUCGACUCCU	YP00205190	rno-miR-196c-5p	UAGGUAGUUUCGUGUUGUUGGG	YP00205504
mmu-miR-293-3p	AGUGCCGACAGUUUGUAGUGU	YP00205003	mmu-miR-208a-5p	GAGCUUUUGGCCCGGCUUUAUC	YP00205398
mmu-miR-465a-5p	UAUUUJAGAAUGGCACUGAUGA	YP00205024	mmu-miR-1899	AGCAUGGCCGAUUCUUCUCC	YP00205336
mmu-miR-670-5p	AUCCUGAGUGUAUGUGGUGAA	YP00205001	mmu-miR-692	AUCUCUUGAGCGCCUCACUC	YP00205456
mmu-miR-488-3p	UUGAAAGGCUUUCUUGGUCU	YP00205035	rno-miR-344a-3p	UAUCUJAGCCAAAGCCUGACCCU	YP00205527
mmu-miR-463-3p	UGAUAGACACCAUAUAAGGUAG	YP00205021	mmu-miR-27b-5p	AGAGCUUJAGCUGAUGUGGUAAC	YP00204219
mmu-miR-511-5p	AUGCCUUUUGCUCUGCACUCA	YP00205591	mmu-miR-378a-5p	CUCUGACUCCAGGUCUGUGU	YP00204347
mmu-miR-433-3p	AUCAUGAUGGGCUCUCGGUGU	YP00204036	mmu-miR-194-2-3p	CCAGUGGGGUCGCUUUUACUCG	YP00204204
mmu-miR-708-5p	AAGGAGCUUAACAUCUAGCUGG	YP00204490	mmu-miR-101a-5p	UCAGUUUAUCACAGUCUGUAGC	YP00205204
mmu-miR-15a-5p	UAGCAGCACAUAUUGGUUUGUG	YP00204066	mmu-miR-491-5p	AGUGGGGAACCCUCCAUAGG	YP00204695
mmu-miR-450a-5p	UUUUGCAGUGUUCUUAUAU	YP00206085	mmu-miR-181a-1-3p	AUCCGACCGUUAUGUUAUCC	YP00204110
mmu-miR-132-3p	UAACAGUCUACAGCCAUGGUCG	YP00206035	rno-miR-132-5p	ACCGUGGCUUUCGUAUUGUACU	YP00204552
mmu-miR-760-3p	CGGUCUUGGUCUGUGGGGA	YP00204549	mmu-miR-331-5p	CUAGGUUUGGUCUCCAGGUAUC	YP00204423
mmu-miR-133b-3p	UUUGGUCUCCUUAACCCGUA	YP00206058	mmu-miR-872-3p	UUAGCUUUAUGCAGUAGCUCU	YP00205482
mmu-miR-7a-5p	UGGAAGACUJAGUUAUUUGUUGU	YP00205877	mmu-miR-875-5p	UAUACUCAGUUUAUACAGGUG	YP00205978
mmu-miR-143-3p	UGAGAUGAAGCAGUJAGCUC	YP00205992	mmu-miR-488-5p	CCCAGUAUUAAGCAGUCUCA	YP00205441
mmu-miR-325-3p	UUUAUUGAGCACCUUUAUCAA	YP00205088	mmu-miR-466g	AUACAGACACAGCACACACA	YP00205923
mmu-miR-15b-5p	UAGCAGCACAUCAGUUGUUACA	YP00204243	mmu-miR-713	UGCACUGAAGGCACACAGC	YP00205467
mmu-miR-744-5p	UGCGGGGCUAGGGCUAACAGCA	YP00204663	mmu-miR-148a-5p	AAAGUUCUGAGACACUCCGACU	YP00204188
mmu-miR-215-5p	AUGACCUAUGAUUUUGACAGAC	YP00205150	mmu-miR-681	CAGCCUUCGUCGGCAGGAGCU	YP00205529
mmu-miR-93-5p	CAAAGUCUGUUCGUGCAGGUAG	YP00204715	mmu-miR-1929-5p	UUCUAGGACUUUAUAGAGCAGAG	YP00205346
mmu-miR-425-5p	AAUGACACGAUCACUCCGUGA	YP00204337	mmu-miR-1945	UUCUUCGGGUAUCUGCGGAC	YP00205364
mmu-miR-431-5p	UGUCUUGCAGGCGUCAUGCA	YP00204737	mmu-miR-1969	AAGAUGGAGACUUUAACUUGGU	YP00205389
mmu-miR-375-3p	UUUGUUCGUUCGGCUCGCGUA	YP00204362	rno-miR-678	GUCUCGGGGCAAGGACUGGAGC	YP00205567
mmu-let-7b-5p	UGAGUAUAGGUUGUGUGU	YP00204750	rno-miR-802-5p	UCAGUAACAAGAUUCCUCCU	YP00205574
mmu-miR-138-5p	AGCUGGUGUUGUGAAUCAGGCCG	YP00206078	mmu-miR-1902	AGAGGUGCAGUAGGCAUGACUU	YP00205338
mmu-miR-190a-5p	UGAUJAGUUAUUAUUAUAGGU	YP00204763	mmu-miR-344c-3p	UGAUCUJAGUCAAGCCUGACAGU	YP00205421
mmu-miR-296-5p	AGGGCCUCCGCUCAUCCUGU	YP00204436	rno-miR-344a-5p	UCAGGCUCCUGGCUAGAUUCCAGG	YP00205528
mmu-miR-302c-3p	AAGUGCUUCCAUUGUUCAGUUG	YP00205064	mmu-miR-200b-5p	CAUCUUAUCUUGGCGAGCAUUGA	YP00204144
mmu-miR-449a-5p	UGGCAGUUAUUGUJAGCUGGU	YP00204481	mmu-miR-486-3p	CGGGGACGUCAGUACAGGAU	YP00204107
mmu-miR-324-5p	CGCAUCCCUAGGGCAUUGGUGU	YP00204057	mmu-miR-30e-3p	CUUUCAGUCGGAUUAUUAACAGC	YP00204410
mmu-miR-667-3p	UGACACCGGCCACCCAGCCCAAG	YP00205048	mmu-miR-338-5p	AACAUAUUCUUGGUCUGAGUG	YP00204114
mmu-miR-490-3p	CACCCUGGAGGACUCCAUUGCUG	YP00205999	mmu-miR-294-5p	ACUCAAAAUGAGGGCCUUAUCU	YP00205410
mmu-miR-679-5p	GGACUGGAGGUGACUCUUGGU	YP00205581	mmu-miR-10a-3p	CAAAUUCGUAUCUAGGGGAUA	YP00205688
mmu-miR-684	AGUUUUCUUAACAAGUCA	YP00205643	rno-miR-347	UGUCCUUCUGGUCGCCCA	YP00205530
mmu-miR-742-3p	GAAAGCCACCAUCGUGGGUAAA	YP00205238	rno-miR-99a-3p	CACGUCGUAUUCUAGGUCUGCUG	YP00205149
mmu-miR-206-3p	UGGAUUGAAGGAGUGUGUGG	YP00206073	rno-miR-343	UCUCCUCCGUGGCGCCAGA	YP00205526
rno-miR-143-3p	UGAGAUGAAGCAGUJAGCUCU	YP00205106	mmu-miR-1928	AGCUACAUGCCAGCUC	YP00205724
mmu-let-7a-5p	UGAGUAUAGGUUGUUAUAGUU	YP00205727	rno-miR-674-5p	GCACUGAGAGGGAGUGGUGUA	YP00205451
mmu-miR-290a-3p	AAAGUGCCGCCUAGUUUAAGCCC	YP00205180	mmu-miR-503-3p	GAGUAUUGUUCUCCAGUCCUGG	YP00205220
mmu-miR-292-5p	ACUCAACUUGGGGCUUUUUG	YP00205722	mmu-miR-881-3p	ACUUGUCUUUUUCUGAAUAGA	YP00205488
rno-miR-339-3p	UGAGCCUCCGACGACAGAGCCA	YP00205127	rno-miR-666-5p	AGCGGGCACGGCUGGAGAG	YP00205564
mmu-miR-329-3p	AACACACCCAGCUAACUUUUU	YP00205183	mmu-miR-691	AUCCUUAAGAGAGGCGAAGAA	YP00206049
rno-miR-421-5p	GGCCUCAUAAAGUUUUGUUG	YP00205136	mmu-miR-103-2-5p	AGCUUCUUUACAGUGUCUCCUUG	YP00204609
mmu-miR-346-5p	UGUCUGCCGAGUGCCUGCCUUCU	YP00205158	mmu-miR-1970	UGUGUCACUGGGGAUAGGCUUUG	YP00205390
rno-miR-598-5p	GCGGUAUGCCGAGUGGUGCGAG	YP00205146	rno-miR-20a-3p	ACUGCAUUAACGAGCACUUAACA	YP00205510
mmu-miR-380-3p	UAUGUAGUAUGGUCACAUUCU	YP00205013	rno-miR-878	GCAUGACACCAUACUGGGUAGA	YP00205576
mmu-miR-34b-5p	AGGCAGUGUAUUAUGCUGAUUGU	YP00205075	mmu-miR-1904	GUUCUGUCUCCUUGGAGGAGG	YP00205340
mmu-miR-434-5p	GCUCGACUACUGGUUJAGAACCA	YP00205015	mmu-let-7c-1-3p	CUGUACAACUUCUAGCUUUC	YP00205202
mmu-miR-542-5p	CUCGGGGAUCAUCAUGUCACGA	YP00205040	rno-miR-345-3p	CCUGAACAAGGGGUCUGGAGA	YP00205529
mmu-miR-467a-5p	UAAGUGCCUGCAUGUAUJAGCG	YP02119302	mmu-miR-93-3p	ACUGCUGAGCUAGCAGUCCCG	YP00204470
rno-miR-340-3p	UCCGUCACAGUUAUUUAUAGCC	YP00205128	mmu-miR-770-5p	AGCACCCAGGUCUGGGCCAGG	YP00205479
mmu-miR-489-3p	AAUGACACCAUAUUAUGGCAGC	YP00205036	rno-miR-136-3p	CAUCAUCGUCUCAAUAGUGUCU	YP00205503
mmu-miR-465c-5p	UAUUUJAGAAUGGCGCUGAUCUG	YP00205026	rno-let-7a-2-3p	CUGUACAGCCUCCUAGCUUUC	YP00206045
mmu-miR-540-3p	AGGUCAGAGGUCGUAUCCUGG	YP00205193	rno-miR-673-5p	CUCACAGUCCGGUCCUUGGAG	YP00205566
mmu-miR-139-5p	UCUACAGUCGACGUGUCUCCAG	YP00204037	mmu-miR-669o-5p	UAGUUGUGUGUGCAUUAUUGU	YP00205226
mmu-miR-199a-5p	CCCAGUUGUACAGACUACCUUUC	YP00204494	mmu-miR-124-5p	CGUUGUACAGCGGACCUUAGU	YP00204266
mmu-miR-551b-3p	GCGACCAUACUUGGUUUCAG	YP00204067	rno-miR-1-5p	GCACAUACUUCUUUAUUAUCC	YP00205498
mmu-miR-99a-5p	AACCCGUAGAUCCGAUCUUGUG	YP00204521	mmu-miR-295-5p	ACUCAAAUGUGGGCACACUUC	YP00205198
mmu-miR-135b-5p	UAUGGCUUUUAUCCUUAUGUGA	YP00204130	mmu-miR-17-3p	ACUGCAGUGAGGGCACUUGAG	YP00205325
mmu-miR-222-3p	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU	YP00204551	mmu-miR-698-3p	CAUUCUGUUCUCCUCCU	YP00205459
mmu-miR-216a-5p	UAUUCUACGUGGCAUCUGUGA	YP00204167	mmu-let-7a-2-3p	CUGUACAGCCUCCUAGCUUUC	YP00205300
mmu-miR-184-3p	UGGACGGAGAAUCGUAUAGGGU	YP00204601	mmu-miR-193a-5p	UGGGUUCUUGCGGGCAAGAUA	YP00205176

mmu-miR-18a-5p	UAAGGUGCAUCUAGUGCAGAUAG	YP00204207	mmu-miR-1947-5p	AGGACGAGCUAGCUGAGUGCUG	YP00205367
mmu-miR-98-5p	UGAGGUAAGUAGUUAUUGUU	YP00204640	mmu-miR-804	UGUGAGUUGUUCUCCUACCCUGGA	YP00205480
mmu-miR-223-3p	UGUCAGUUGUCAAUACCCCA	YP00205986	mmu-miR-1191	CAGUCUUAUCUAGUAGCCUA	YP00205306
mmu-miR-29b-3p	UAGCACC AUUUGAAUUCAGUGUU	YP00204679	mmu-miR-1931	AUGCAAGGGCUGGUGCGAUGGC	YP00205348
mmu-miR-193b-3p	AACUGGCCACAAAGUCCCGCU	YP00205062	mmu-miR-1946b	GCCGGGCAGUGGUGCACAUGCUUUU	YP00205366
mmu-miR-338-3p	UCCAGCAUCAGUUAUUUGUU	YP00204719	mmu-miR-1982-5p	UUGGAGGGUCCUGGGGAGG	YP00205392
mmu-miR-153-3p	UUGCAUAGUCACAAAGUGAUC	YP00204338	rno-miR-465-5p	UAUUUAGAAGCGGUGCUGGUGUG	YP00205548
mmu-miR-367-3p	AAUUGCACUUAGCAAUGGUGA	YP00204784	rno-miR-881-3p	UAACUGUGGCAUUCUGAAUAG	YP00205578
mmu-miR-455-5p	UAUGUGCCUUUGGACUACUCCG	YP00204363	mmu-miR-1906	UGCAGCAGCCUGAGGCAGGGCU	YP00205342
mmu-miR-322-5p	CAGCAGCAAUCUAGUUUUGGA	YP00205182	mmu-miR-374b-3p	GGUUGUAUUUAUCUUGCCGAG	YP00205426
mmu-miR-196a-5p	UAGGUAGUUUAGUUGUUGGG	YP00204386	rno-miR-501-5p	AAUCCUUUGUCCUGGUGGA	YP00205554
mmu-miR-27a-3p	UUCACAGUGGCUAAGUUCGGC	YP00206038	mmu-miR-214-5p	UGCCUGUCUACAUJUGCUGUGC	YP00205475
mmu-miR-105	CCAAGUGUCAGAUUGUUGGU	YP00205090	mmu-miR-344e-3p	GAUUAACCAAAGCCUGACUUAU	YP00205423
mmu-miR-31-5p	AGGCAAGAUUGCUGGCAUAGCUG	YP00205159	mmu-miR-872-5p	AAGGUUAUCUUGUUAUUGAUGG	YP00205481
mmu-miR-200c-3p	UAAUACUGCCGGUUAUUGAUGGA	YP00204482	mmu-miR-323-5p	AGGUGUCCUGGGCGUUCGCG	YP00206080
mmu-miR-34a-5p	UGGCAGUGUCUJAGCUGGUGUU	YP00204486	mmu-miR-26a-1-3p	CCUUAUCUUGGUAUCUUGCAGC	YP00204184
mmu-miR-668-3p	UGUCAUCUGGCGCUGGCCACUACC	YP00205049	mmu-let-7d-3p	CUAUCGACCCUGCCUUCUUCU	YP00205627
mmu-miR-680	GGGCAUCUGCUGACAUGGGGG	YP00205101	mmu-miR-382-3p	UCAUUCACGGACAACAUUUUU	YP00205429
mmu-miR-743b-5p	UGUUCAGACUGGUGUCAUCA	YP00205240	mmu-miR-1898	AGGUAAGGUUACACAGGGGAUC	YP00205681
rno-miR-146b-5p	UGAGAACGAAUCCAUAGGCGUGU	YP00205107	mmu-miR-302b-5p	ACUUUAACAUGGGAUUGCUUUCU	YP00205414
mmu-miR-369-3p	AAUAUAUCAGUUGUAUCUUU	YP00206028	rno-miR-350	UUCACAAGCCCAUACACUUUCAC	YP00205719
rno-miR-345-5p	UGCUGACCCUUAUGCCAGUGC	YP00205129	mmu-miR-700-3p	CACGGGGAACCGAGUCACCC	YP00205460
rno-miR-450a-5p	UUUUGCGAUGUGUCCUAAUUGU	YP00205546	mmu-miR-669c-5p	AUAGUUUGUGUGGUAUGUGUGU	YP00205196
mmu-miR-103-3p	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA	YP00204063	rno-miR-379-3p	CUAUGUAACUUGGCCACUAC	YP00205539
mmu-miR-1b-5p	UACAUAUCUUAUCUUAUCUUA	YP00205584	mmu-miR-335-3p	UUUUUUCUUAUUGCUCUCCGACC	YP00205613
mmu-miR-191-5p	CAACGGAAUCCCAAAGCAGCUG	YP00204306	rno-let-7f-1-3p	CUAUAACAUCUUAUUGCCUUC	YP00205497
mmu-miR-294-3p	AAAGUGCUUCCUUUGUGUGU	YP00205166	mmu-miR-181a-2-3p	ACCAGCCUUGCAGUUAUCCUUG	YP00205173
mmu-miR-423-3p	AGCUCGGUCUGAGGCCUUCAGU	YP00204488	mmu-miR-1932	GUUGCGGACAGCCUAGGUCGG	YP00205439
mmu-miR-758-3p	UUUGUGACCCUGUCCACUA	YP00205241	mmu-miR-1946a	AGCCGGGCAGUGGUGGCAACAUUUU	YP00205365
rno-miR-628	AUGCUGACAUAUUUACGAGAGG	YP00205147	rno-miR-133a-5p	AGCUGGUAUUUUGAACCACAAU	YP00205501
mmu-miR-466d-3p	UAUAACAUCACGCACACAUAG	YP00205029	rno-miR-376a-5p	GGUAGAUUCUCCUUCUUAUGAG	YP00205537
mmu-miR-410-3p	AAUAUAACACAGAUUGCCUGU	YP00204042	mmu-miR-467h	AUAAGUGUGGCAUGUAUUAUGU	YP00205922
mmu-miR-141-3p	UAACAGUCUGUUGUAAGAUUGG	YP00204504	mmu-miR-1952	UCUCCACCCUCCUUCUG	YP00205372
mmu-miR-194-5p	UGUAACAGCAACUCCAUUGUGGA	YP00204080	mmu-miR-466f-5p	UACGUGUGUGGCAUGUGCAUG	YP00205436
mmu-miR-181b-5p	AAAGUUCUUAUGCUGCGGUGGGU	YP00204530	rno-miR-504	AGACCCUGGUCUGCAGCUCUGC	YP00205555
mmu-miR-202-3p	AGCAGUAUAGCGCAUGGGAAGA	YP00205081	mmu-miR-192-3p	CUGCCAAUCCAUAGGUCUACG	YP00204272
mmu-miR-146b-5p	UGAGAUCAGAAUCCAUAGGCU	YP00204553	rno-miR-301a-5p	GCUCUGACUUAUUGCAGUAC	YP00205521
mmu-miR-382-5p	GAAGUUGUUCGUGGUGGAUUCG	YP00204169	mmu-miR-30a-3p	CUUUCAGUCGGAUGUUUGCAGC	YP00204457
mmu-miR-421-3p	AUCAACAGACAUUAUUGGGCGC	YP00204603	mmu-miR-19b-1-5p	AGUUUUGCAGGUUUGCAUCCAGC	YP00204310
mmu-miR-532-5p	CAUGCCUUGAGUGUAGGACCCU	YP00204221	mmu-miR-125b-1-3p	ACGGUUUAGGCUUUGGGAGCU	YP00204400
mmu-miR-200b-3p	UAAUACUGCCUGUUAUUGAUGA	YP00206071	mmu-miR-466f-3p	CAUACACACACAUACACAC	YP00205207
mmu-miR-24-3p	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG	YP00204260	mmu-miR-671-3p	UCCGGUUCUACAGGGCUCACC	YP00204024
mmu-miR-181c-5p	AACAUUAACUCCUGGUGGAGU	YP00204683	rno-miR-493-5p	UUGUACAGGUAAGGCUUUAU	YP00204166
mmu-miR-302d-3p	UAAGUGCUUCCAUUGUUAUGUGU	YP00204311	mmu-miR-433-5p	UACGGUGAGCCUUGUUAUUC	YP00205430
mmu-miR-142-5p	CAUAAAGUAGAAGCACUACU	YP00204722	mmu-miR-590-3p	UAAUUUAUGUAUAGCUAGU	YP00205448
mmu-miR-125a-5p	UCCCUAGAGCCUUUAACCUUGA	YP00204339	rno-miR-125b-2-3p	ACAAGUCAGGCUUUGGGACCU	YP00205500
mmu-miR-101a-3p	UACAGUACUGUAACUCGAA	YP00204786	mmu-miR-1195	UGAGUUCGAGGCCAGCCUCCUA	YP00205310
mmu-miR-328-3p	CUGGCCUCUCCUGCCUUCUGGU	YP00204364	rno-miR-383-5p	CAGAUCAAGGUGACUUGGG	YP00205543
mmu-miR-144-3p	UACAGUAUAGAUGAUUACU	YP00204754	mmu-miR-1950	UCUGCAUCUAAAGUAUUGGUA	YP00205370
mmu-miR-652-3p	AAUGGCGCCACUAGGGUUGUG	YP00204387	rno-miR-29b-1-5p	UUUCAUUGGUGUUUAGAUUU	YP00205520
mmu-miR-30b-5p	UGUAAACAUCUACACUCAGCU	YP00204765	mmu-miR-1194	GAUAGUAUACUUGCUAGAUCCU	YP00205309
mmu-miR-19b-3p	UGUGCAAUCCAUAGCAAACUGA	YP00204450	mmu-miR-1933-3p	CCAGGACCAUCAGUGGACUUAU	YP00205350
mmu-miR-10a-5p	UACCCUGUAGAUCCGAAUUGUG	YP00204778	mmu-miR-1951	GUAGUGGAGACUGGUGGUCUA	YP00205371
mmu-miR-145a-5p	GUCCAGUUUCCAGGAUUCUU	YP00204483	mmu-miR-466b-5p	UGUUGUGUGUACUAGUACAU	YP00205434
mmu-miR-201-5p	UACUCAGUAAGGCAUUGUUCUU	YP00205083	rno-miR-489-3p	AGACAUACAUUAUUGGCAGC	YP00205553
mmu-miR-669a-5p	AGUUGUGUGGCAUGUUAUGUCU	YP00205450	mmu-miR-669e-5p	UGUCUUGUGUGGCAUGUUAU	YP00205993
mmu-miR-34c-5p	AGGCAGUGUAGUJAGCUGAUJGC	YP00205659	mmu-miR-1955-5p	AGUCCAGGAGUACUGCAGCUUUU	YP00205375
mmu-miR-682	CUGCAGUCACAGUGAAGUCUG	YP00205230	mmu-miR-466h-5p	UGUGGCAUGGCUUUGUGUGUA	YP00205437
mmu-miR-423-5p	UGAGGGCAGAGAGCGAGACUUU	YP00205624	rno-miR-540-3p	AGGUCAGAGGUCGUAUCCGGGC	YP00205558
mmu-miR-7b-5p	UGGAAGACUUGUUAUUUGUUGU	YP00205082	mmu-miR-15b-3p	CGAAUCAUUUUUGCUGCUCUA	YP00205898
mmu-miR-128-3p	UCACAGUGAACCGGUCUCUUU	YP00205995	mmu-miR-653-5p	GUGUUGAAACAUCUCUACUG	YP00204669
rno-miR-17-1-3p	ACUGCAGUGAAGGCACUUGUGG	YP00205583	mmu-miR-379-3p	UAUGUAACAUGGUCACUUAUCU	YP00204345
mmu-miR-136-5p	ACUCCAUUUGUUUUGAUGAUGG	YP00205712	mmu-let-7b-3p	CUAUAACAACUACUCCUUC	YP00205653
mmu-miR-219a-1-3p	AGAGUUGCGUCUGGACGUCCCG	YP00205118	rno-miR-488-5p	CCCAGUAUAAUGGCACUCUCAA	YP00205981
rno-miR-582-5p	UACAGUUUUAACCAAGUUUACU	YP00205723	mmu-miR-129-1-3p	AAGCCUUAACCCAAAAGUAU	YP00206074
rno-miR-346	UGUCUGCCUGAGUGCCUGCCUCU	YP00205130	rno-miR-758-3p	UUUGGACCCUGGUCACUAACC	YP00204353
mmu-miR-337-5p	GAACGGCGUCAUGCAGGAGUU	YP00205184	mmu-miR-183-3p	GUGAAUUAACGAAGGGCAUAA	YP00205673
mmu-miR-291b-5p	GAUCAAGUGGAGGCCUCCUCC	YP00205069	mmu-miR-762	GGGCGUGGGGCCGGACAGAGC	YP00205476
mmu-miR-350-3p	UUCACAAGGCCAUACACUUUC	YP00205186	mmu-miR-291b-3p	AAAGUGCAUCCAUUUUGUUUGU	YP00205152
mmu-miR-196a-2-3p	UCGGCAACAAGAAACUGCCUGA	YP00205585	rno-miR-336-5p	UCACCCUCCAUUUCUAGUUCU	YP00205525
mmu-miR-380-5p	AUGGUUGACCAUAGAACAUGCG	YP00205165	mmu-miR-669j	UGCAUUAUCUACAUAGCAAACU	YP00205057
mmu-miR-295-3p	AAAGUGCUACUACUUUUGAGUCU	YP00205078	rno-miR-543-3p	AAACAUCGCGGUGCACUUCU	YP00205559
mmu-miR-450b-5p	UUUUGCAGUAGUUCUUGAAUA	YP00205019	mmu-miR-767	UGCACCAUGGUUGUCUGAGCA	YP00205243
mmu-miR-883b-5p	UACUGAGAUGGUGAGCAUCA	YP00205248	rno-miR-381-5p	AGCGAGGUUGCCUUUGUAUUAU	YP00206075

mmu-miR-467b-5p	GUAAGUGCCUGCAUGUAUAUG	YP00205192	mmu-miR-764-3p	AGGAGGCCAUJAGUGGCAACUGU	YP00205621
rno-miR-711	GGGACCCUGGAGAGAUUAAG	YP00205148	mmu-miR-1933-5p	AGUCAUGGUGUUCGGUCUUAGUUU	YP00205351
mmu-miR-497-5p	CAGCAGCACACUGUGGUUUUGUA	YP00205164	mmu-miR-1949	CUAUACCAGGAUGUCAGCAUAGUU	YP00205369
mmu-miR-466d-5p	UGUGUGUGCGUACAUGUACAUG	YP00205168	mmu-miR-501-5p	AAUCCUUUGUCCUGGGUGAAA	YP00205442
mmu-miR-540-5p	CAAGGGUCACCCUCUGACUCUGU	YP00205194	rno-miR-466c-5p	UGUGAUGUGUGCAUGUACAUG	YP00205550
mmu-miR-200c-5p	CGUCUUACCCAGCAGUUGUUUGG	YP00204479	mmu-miR-669h-3p	UAUGCAUAUACACACAUGCACA	YP00205054
mmu-miR-30d-3p	CUUUCAGUCAGAUUUUGCUGC	YP00204023	mmu-miR-1961	UGAGGUAGUAGUUAGAA	YP00205381
mmu-miR-21a-3p	CAACAGCAGUCGAUGGGCUGUC	YP00205400	mmu-miR-509-5p	UACUCCAGAAUGUGGCAAUCAU	YP00205443
rno-miR-483-3p	CACUCCUCCUCCCGUCUUGU	YP00205551	rno-miR-632	GUGUCUGUUUCCUGCCGGA	YP00205561

Résumés de la thèse

Titre : Rôle du microenvironnement musculaire et des micro-ARN dans le développement des paraostéoarthropathies neurogènes

Mots clés : Lésion médullaire, miRNA, paraostéoarthropathies neurogènes, muscle squelettique

Résumé : Les Paraostéoarthropathies Neurogènes (POAN) sont des formations osseuses extra-squelettiques ectopiques survenant après une lésion du système nerveux central telle qu'une lésion de la moelle épinière, un traumatisme crânien ou lors d'un accident vasculaire cérébral. Les POAN se développent aux dépens du tissu musculaire, se localisent autour des articulations et peuvent considérablement altérer la mobilité des patients. Les POAN provoquent des compressions vasculaires et nerveuses induisant des douleurs aiguës ainsi qu'une perte de l'amplitude articulaire pouvant aller jusqu'à l'ankylose complète. La chirurgie d'exérèse, bien qu'exposant à de nombreuses complications, reste actuellement le seul traitement curatif efficace. Environ 30 % des patients souffrant d'une lésion médullaire et 20 % des patients souffrant d'un traumatisme crânien développent des POAN, entraînant ainsi de lourdes comorbidités et compromettant la réadaptation des patients. Le développement des POAN implique un processus d'ossification endochondrale et conduit à la formation d'un os mature caractérisé par une niche hématopoïétique fonctionnelle. Les progéniteurs fibro-adipogéniques (FAPs) sont des cellules stromales mésenchymateuses présentes dans l'interstitium musculaire. Les FAPs soutiennent physiologiquement les fonctions des progéniteurs myogéniques (MPs) et sont les acteurs cellulaires majeurs du développement des POAN. La pathogenèse implique aussi l'activation de l'inflammation par la lésion neurologique via les macrophages et la production de cytokines inflammatoires poussant les FAPs à s'engager dans des processus ostéogéniques. En dépit des recherches menées ces dernières années, certains aspects de la pathogenèse des POAN ne sont toujours pas définis, tel que l'impact et le rôle de la lésion neurologique sur la signalisation et le destin des progéniteurs du muscle.

Les miARN sont de petits ARN non codants simple brin qui régulent de manière post-transcriptionnelle l'expression des gènes en se liant à leur ARNm cible. De nombreux miARN sont physiologiquement impliqués dans les processus du développement ou de la régénération osseuse, régulant alors la prolifération et la différenciation des ostéoblastes ou la maturation hypertrophique des chondrocytes en ciblant les acteurs moléculaires clés de ces processus. Alors que les acteurs cellulaires et de nombreuses cytokines ont été décrits dans les POAN, l'implication potentielle des miARN n'a jamais été étudiée. Nous avons donc émis l'hypothèse que les miARN pourraient participer à la formation des POAN. Nous avons étudié leur expression dans notre modèle murin de POAN, combinant une lésion neurologique associée à une lésion musculaire aiguë, ainsi que dans les FAPs isolés de muscles de patients POAN. Pour comprendre pourquoi les muscles lésés ne parviennent pas à régénérer et s'engagent dans des processus ostéo-chondrogéniques, nous avons réalisé un criblage des miARN du tissu musculaire et des progéniteurs du muscle aux stades précoces. Les miARN dérégulés ont ensuite été étudiés *in vitro*, et des tests fonctionnels ont été réalisés afin de valider leur capacité à moduler la différenciation ostéogénique des FAPs et des MPs issus de patients POAN. Dans cette étude, nous avons identifié une dérégulation précoce des miARN ostéo-suppressifs des FAPs en parallèle d'une perte d'expression des miARN myogéniques des MPs dans le modèle murin de POAN. Nous avons également confirmé que la surexpression des miARN ostéo-suppressifs miR-146a-5p et miR-214-3p ainsi que l'inhibition du miARN ostéogénique miR-20a-5p pouvaient atténuer la minéralisation et l'expression des marqueurs ostéogéniques des FAPs humains, identifiant ainsi de nouveaux acteurs de la pathogenèse des POAN.

Title : Role of muscle microenvironment and microRNAs in the development of neurogenic heterotopic ossification

Keywords : Spinal cord injury, miRNA, neurogenic heterotopic ossifications, skeletal muscle

Abstract : Neurogenic Heterotopic Ossifications (NHOs) are ectopic extra-skeletal bone formations, that occur after central nervous system injury, primarily spinal cord injury, traumatic brain injury and stroke. NHOs develop at the expense of skeletal muscle tissue, are located around major joints and can significantly impair limb mobility. NHOs induce acute pain, nervous and vascular compressions and can cause severe joint ankylosis. Surgical resection, although complex and unsatisfying, is currently the most efficient and reliable treatment. Up to 30% of SCI and 20% of TBI patients develop NHOs, leading to comorbidities and compromising patient's rehabilitation. NHOs development involves a process of endochondral ossification and can lead to a mature bone containing a functional hematopoietic niche. Fibro-adipogenic progenitors (FAPs) are muscle interstitium resident mesenchymal stromal cells that physiologically support myogenic progenitors (MPs) function and are major cellular actors in ectopic ossification development and specifically in NHOs. Pro-inflammatory cytokines and macrophages are involved and mandatory to drive FAPs towards an osteogenic fate with neurological injury triggering local and systemic inflammatory response. Despite all previous studies, several aspects of NHOs pathogenesis remain unclear, specifically the impact of the CNS lesion on muscular progenitors signaling and fate. MiRNAs are small non-coding single stranded RNA that post-transcriptionally regulate gene expression by binding and silencing their mRNA target.

Numerous miRNAs are physiologically involved in bone development and repair processes, they regulate osteoblast proliferation/differentiation or hypertrophic maturation of chondrocytes by targeting key molecular actors. While cellular actors and numerous cytokines have been studied in NHOs, the potential involvement of miRNAs has never been investigated. We hypothesized that miRNAs could participate to NHOs formation and studied their expression in our NHOs mouse model combining spinal cord injury and acute cardiotoxin muscle injury and in patient's FAPs isolated from muscle surrounding NHOs. To understand why injured muscle fails to regenerate and engages into osteo-chondrogenic processes following neurological injury, we performed a large miRNAs profiling in skeletal muscle tissue and muscular progenitor cells at early stages. Dysregulated and most relevant miRNAs were further studied in vitro, and functional assays were performed on human FAPs and MPs.

In this study, we identified early osteo-suppressive miRNAs downregulation in FAPs concomitant to myogenic miRNAs downregulation in MPs in the NHOs mouse model. We also confirmed that overexpression of osteo-suppressive miR-146a-5p and miR-214-3p as well as miR-20a-5p inhibition could attenuate mineralization and osteogenic markers expression from human FAPs, uncovering new molecular actors in NHOs pathogenesis.

 universit 
PARIS-SACLAY

ÉCOLE DOCTORALE
Innovation thérapeutique
du fondamental   l'appliqué
(ITFA)