



**HAL**  
open science

# Caractérisation et implication des cellules stromales adipeuses (ASCs) dans les processus de régénération musculaire

Maxime Mathieu

► **To cite this version:**

Maxime Mathieu. Caractérisation et implication des cellules stromales adipeuses (ASCs) dans les processus de régénération musculaire. Physiologie [q-bio.TO]. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2023. Français. NNT : 2023TOU30352 . tel-04612466

**HAL Id: tel-04612466**

**<https://theses.hal.science/tel-04612466v1>**

Submitted on 14 Jun 2024

**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.



# THÈSE

En vue de l'obtention du  
**DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**  
Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

---

Présentée et soutenue par

**Maxime MATHIEU**

Le 15 décembre 2023

**Caractérisation et implication des cellules stromales adipeuses  
(ASCs) dans les processus de régénération musculaire**

---

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **PHYSIOPATHOLOGIE**

Unité de recherche :

**RESTORE**

Thèse dirigée par

**Coralie SENGENES et Amandine GIROUSSE**

Jury

Mme Capucine Trollet, Rapporteur

Mme Isabelle Dugail, Rapporteur

M. Thomas Brioché, Examineur

M. Dominique Langin, Examineur

Mme Coralie SENGENES, Directrice de thèse

Mme Amandine Girousse, Co-directrice de thèse

## Remerciements

**Amandine**, merci de m'avoir encadré, guidé, formé et donné confiance dans mon approche de la science. Merci de m'avoir appris qu'un résultat négatif n'est pas forcément un évènement négatif, et il y en aura eu beaucoup ! Merci de m'avoir donné toute ces clefs qui me serviront pour sûr dans mon parcours, quel qu'il soit. Merci d'avoir rempli ce rôle compliqué de directrice de thèse à merveille.

**Coralie**, déjà merci de m'avoir fait confiance, de m'avoir permis de faire parti de cette équipe dans laquelle règne une ambiance juste formidable et que tu as su très bien construire. Je ne sais pas si tu te rappelle de cet entretien au lendemain de la thèse de Quentin où je te disais que les ASCs fluo ça avait l'air plutôt cool, et maintenant nous voilà 3 ans après avec les mêmes ASCs fluo qui nous ont pas mal embêter quand même. Elles n'ont pas été tout le temps super gentilles ces cellules mais en tout cas elles m'ont permis de m'éclater scientifiquement et je pense que c'est ça l'essentiel sur un projet de thèse. Donc merci de m'avoir permis de bosser sur un projet comme celui-là dans une équipe aussi formidable que tu manage à la perfection.

**Mireille**, merci de m'avoir nourri pendant 3 ans en fournissant l'ilot central de l'OS de moult friandises. Tu as très vite compris que la bouffe, et surtout les cannelais, me redonnaient le sourire dans ces moments de rush absolu, et il y en a eu des cannelais ! Même si je te charrie, tu le sais, qui aime bien châtie bien. Merci de m'avoir guidé à la paillasse quand j'étais complètement paumé pipette entre les mains.

**Laura**, merci de m'avoir accordé tout de suite ta confiance, à moi petit thésard de l'équipe, même si ça n'a duré que quelques mois je pense que cet échange nous aura été à tous les deux bénéfique et j'espère que tu t'éclateras sur la suite de ce projet !

Evidemment, un immense merci à tous les membres de l'équipe **STROMAGICS** pour votre gentillesse et joie de vivre. Je suis super fier d'avoir fait parti de cette équipe et de ce projet sur ces 3 ans donc merci à vous tous.

Tous les **doctorants** (il y en a trop pour que je vous écrive tous), merci d'avoir fait partie du même bateau et de cette équipe dans l'équipe. Avoir pu partager ces mêmes galères avec vous a permis de faire passer ces 3 années un peu plus facilement, merci pour ça.

**Papa, Maman** et ma **sœur Clara** merci de me supporter et de m'accompagner dans tous mes choix et de m'apporter autant d'amour.

Mes **taties, tontons, cousins, papis** et **mamies**, au pluriel parce que c'est important. Je ne vous le dis peut-être pas souvent mais je mesure vraiment la chance que j'ai de tous vous avoir aujourd'hui dans ma vie. Merci de me soutenir.

**Laurène**, ce n'était pas facile au début, on n'aurait pas dû se retrouver là au même endroit tous les deux ensemble presque sur le même bureau. Mais c'est passé et on l'a fait, ça n'a pas été facile tous les jours mais je pense que si on a réussi à passer ça je pense qu'on peu réussir à passer tout le reste jusqu'à la fin.

## Liste des abréviations

**$\alpha$ SMA** :  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin

**ACP** : Analyse en Composante Principal

**ADN** : Acide DésoxyriboNucléique

**ADP** : Adénosine di-phosphate

**AMM** : Autorisation de Mise sur le Marché

**AMPK** : AMP Kinase

**aP2** : Adipocyte binding Protein 2

**ARN** : Acide Ribunocléique

**ASC** : Cellule stromale adipeuse

**ATP** : Adénosine triphosphate

**BaCl<sub>2</sub>** : Chlorure de Barium

**BMP** : Bone Morphogenic Protein

**BTX/A** : Botulinium Toxine A

**CEMM** : Cellule Endothéliale Microvasculaire du Muscle

**CCL** : C-C motif Ligand

**CD** : Cluster de Différenciation

**CLEC-2** : Type C Lectin-like Receptor

**CFU-F** : Colony Forming unit – Fibroblast

**CS** : Cellule satellite

**CT-Scan** : Computer Tomography - Scan

**CTX** : Cardiotoxine

**CXCL** : C-X-C motif chemokine

**CXCR** : C-X-C chemokine receptor

**DAMP** : Damage Associated-Molecular Patterns

**DMD** : Duchenne Muscular Dystrophy

**DT** : Toxine Diphtérique

**DXA** : Dual X-ray Absorptiometry



**EDL** : Extensor Digitorum Longus

**eMyHC** : Embryonic Myosine Heavy Chain

**FACS** : Fluorescence Activated Cell Sorting

**FABP** : Fatty Acid Binding Protein

**FAP** : Progéniteur Fibro-Adipogénique

**FGF** : Fibroblast Growth Factor

**FVS** : Fraction Vasculaire Stromale

**G-CSF** : Granulocyte Colony Stimulating Factor

**GDF** : Growth Differentiation Factor

**GL** : Ganglion Lymphatique

**GLUT** : Glucose Transporter

**Hes** : Hairy and enhancer of split-1

**Hey** : Hairy and enhancer of split related with YRPW motif

**HFD** : Hight Fat Diet

**HGF** : Hepatocyte Growth Factor

**Hic1** : Hypermethylated in cancer 1

**HSC** : Hematopoietic Stem Cells

**HSL** : Hormone Sensitive Lipase

**IFN** : Interféron

**IGF** : Insulin like Growth Factor

**IL** : Interleukine

**IMAT** : Tissu Adipeux Intramusculaire

**IRM** : Imagerie à Résonance Magnétique

**JNM** : Jonction neuromusculaire

**kPa** : kilo Pascal

**LB** : Lame Basale

**LYVE-1** : Lymphatic Vessel Endothelial hyaluronan receptor 1

**M-cad** : Muscle-cadherin

**MEC** : Matrice Extra-Cellulaire

**MGL** : Monoacylglycerol Lipase

**MMP** : Matrix MetalloProteases

**MO** : Moelle Osseuse

**MRF** : Myogenic Regulatory Factors

**MSC** : Mesenchymal Stromal Cell

**MSTN** : Myostatine

**Myf** : Myogenic factor

**MyHC** : Myosine Heavy Chain

**Myod** : Myoblast determination protein 1

**NG2** : Neural/glial antigen 2

**NTX** : Notexine

**Pax3/7** : Paired-homeobox 3/7

**PDGF** : Platelet Derived Growth Factor

**PDGFR** : Platelet Derived Growth Factor Receptor

**PGAT** : Perigonadic Adipose Tissue

**Pi** : Phosphate inorganique

**PLIN 1-5** : Perilipine 1-5

**PPAR $\gamma$**  : Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma

**RT-qPCR** : Real Time – quantitative Polymerase Chain Reaction

**RyR** : Ryanodine Receptor

**Sca-1** : Stem cell antigen – 1

**ScAT** : Subcutaneous Adipose Tissue

**scRNAseq** : single cell Ribonucleic Acid sequencing

**SDF-1** : Stromal Derived Factor- 1

**SLN** : Sarcolipine

**TA** : Tissu Adipeux

**TAG** : Triacylglycérol

**Tcf4** : Transcriptor Factor 4

**TGF** : Tumor Growth Factor

**THA** : Arthroplastie de la Hanche

**Tie2** : Tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domain

**TIMP** : Tissue Inhibitor of Metalloproteinase

**TLR** : Toll-like Receptor

**TNF** : Tumor Necrosis Factor

**TPX** : Taipoxine

**Treg** : Regulatory T cells

**UCP-1** : UnCoupling Protein-1

**Vcam-1** : Vascular cell adhesion molecule 1

**VEGF** : Vascular Endothelium Growth Factor

**Wnt** : Wingless

**YAP** : Yes Associated Protein

**YFP / GFP** : Yellow/Green Fluorescent Protein

## Liste des figures

Figure 1 : Structure et composition cellulaire et acellulaire du faisceau musculaire.

Figure 2 : Structure du muscle squelettique et mécanismes moléculaires de la contraction.

Figure 3 : Caractéristiques immunophénotypiques, sécrétoires et de différenciation des FAPs.

Figure 4 : Influence de la niche sur le maintien de la cellule satellite en quiescence.

Figure 5 : Composition des différents tissus conjonctifs du muscle squelettique.

Figure 6 : Régulations intrinsèques et extrinsèques de l'entrée dans le programme myogénique des cellules satellites au cours du temps post-lésion musculaire.

Figure 7 : Evolution de l'hétérogénéité des FAPs au cours de la régénération musculaire chez la souris.

Figure 8 : Développement de tissu fibro-adipeux intramusculaire dans les dégénérescences musculaires.

Figure 9 : Perte progressive de la fonction contractile du muscle avec l'âge chez l'homme et la souris.

Figure 10 : Importance de la balance entre division symétrique et asymétrique de la cellule satellite dans l'efficacité de régénération musculaire.

Figure 11 : Répartition des différents dépôts adipeux chez l'homme et la souris.

Figure 12 : Représentation des différentes sous-populations d'ASCs et FAPs identifiées par scRNAseq présentes dans le tissu adipeux et le muscle en condition basale et lésionnelle.

Figure 13 : Mobilisation endogène des ASCs en réponse à différents stress aigus ou chroniques.

Figure 14 : La lésion musculaire déclenche une sortie massive des ASCs du ScAT suivi de leur infiltration dans le muscle.

Figure 15 : Plan expérimental et objectifs du projet de thèse.

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Capacités contractiles et métaboliques des différents types de fibres musculaires.

Tableau 2 : Liste des gènes définis en scRNAseq et exprimés par chaque sous-populations de FAPs et ASCs murines et humaines.

Tableau 3 : Les différents modèles de lésion musculaire.

## Table des matières

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Liste des abréviations</b>  | <b>3</b>  |
| <b>Liste des figures</b>   | <b>7</b>  |
| <b>Liste des tableaux</b>  | <b>7</b>  |
| <b>INTRODUCTION</b>  | <b>11</b> |
| <b>I/ Le muscle squelettique</b>   | <b>13</b> |
| <b>1) Structure et composition cellulaire</b>  | <b>13</b> |
| a) Le parenchyme musculaire  | 15        |
| b) Le stroma musculaire  | 16        |
| c) La matrice extracellulaire (MEC)  | 31        |
| <b>2) Les fonctions principales du muscle squelettique</b>   | <b>34</b> |
| a) La contraction musculaire   | 34        |
| b) Régulations métaboliques  | 35        |
| c) La thermogénèse   | 36        |
| d) Fonctions sécrétoires   | 36        |
| <b>II/ La régénération physiologique du muscle</b>   | <b>38</b> |
| <b>1) Les modèles de régénération</b>  | <b>39</b> |
| <b>2) Les acteurs de la régénération musculaire</b>  | <b>43</b> |
| a) Le rôle central des cellules satellites   | 43        |
| a) La fibre musculaire et la MEC   | 46        |
| b) Les cellules immunitaires   | 47        |
| c) Le contrôle nerveux   | 49        |
| d) Acteurs récents : FAPs  | 51        |
| <b>III/ Défauts de régénération et dégénérescence musculaire</b>                                     | <b>57</b> |
| <b>1) Définitions et situations pathologiques</b>  | <b>57</b> |
| <b>2) Acteurs cellulaires et acellulaires impliqués dans les défauts de régénération musculaire.</b> | <b>63</b> |
| a) Les progéniteurs myogéniques  | 63        |
| b) Les fibres musculaires  | 67        |
| c) Les cellules immunitaires   | 68        |
| d) Les FAPs  | 71        |
| <b>3) L'infiltrat fibro-adipeux associé aux dégénérescences musculaires</b>                          | <b>73</b> |
| <b>4) Les FAPs : cellules de choix pour expliquer la dégénérescence fibro-adipeuse</b>               | <b>75</b> |
| <b>IV/ Le tissu adipeux blanc : un réservoir de MSCs mobilisables</b>                                | <b>81</b> |
| <b>1) Similitudes entre ASCs et FAPs</b>   | <b>82</b> |
| <b>2) L'utilisation des ASCs en médecine régénérative</b>  | <b>85</b> |
| a) Les avantages de l'utilisation des ASCs en thérapie   | 86        |
| b) Limites de l'utilisation des ASCs en thérapie   | 87        |
| <b>3) La mobilisation endogène des ASCs</b>  | <b>88</b> |
| <b>OBJECTIFS</b>   | <b>97</b> |
| <b>RESULTATS</b>   | <b>99</b> |

|  |            |
|--|------------|
| <b>1) Définir le rôle de l'infiltration des ASCs dans le processus de régénération musculaire chez la souris.</b>                                  | <b>99</b>  |
| Discussion   | 111        |
| <b>2) Caractérisation de l'identité des ASCs qui infiltrent le muscle après la lésion.</b>   | <b>113</b> |
| Discussion   | 127        |
| <b>3) Détermination de l'origine cellulaire et de l'importance fonctionnelle du dépôt transitoire d'adipocytes dans la régénération musculaire</b> | <b>128</b> |
| Discussion   | 157        |
| <b>CONCLUSION</b>  | <b>166</b> |
| <b>DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b>   | <b>167</b> |
| <b>Matériel et Méthodes</b>  | <b>172</b> |
| <b>Annexes</b>   | <b>181</b> |
| Annexe n°1   | 182        |
| Annexe n°2   | 206        |
| Annexe n°3   | 215        |
| Annexe n°4   | 228        |
| <b>REFERENCES</b>  | <b>231</b> |



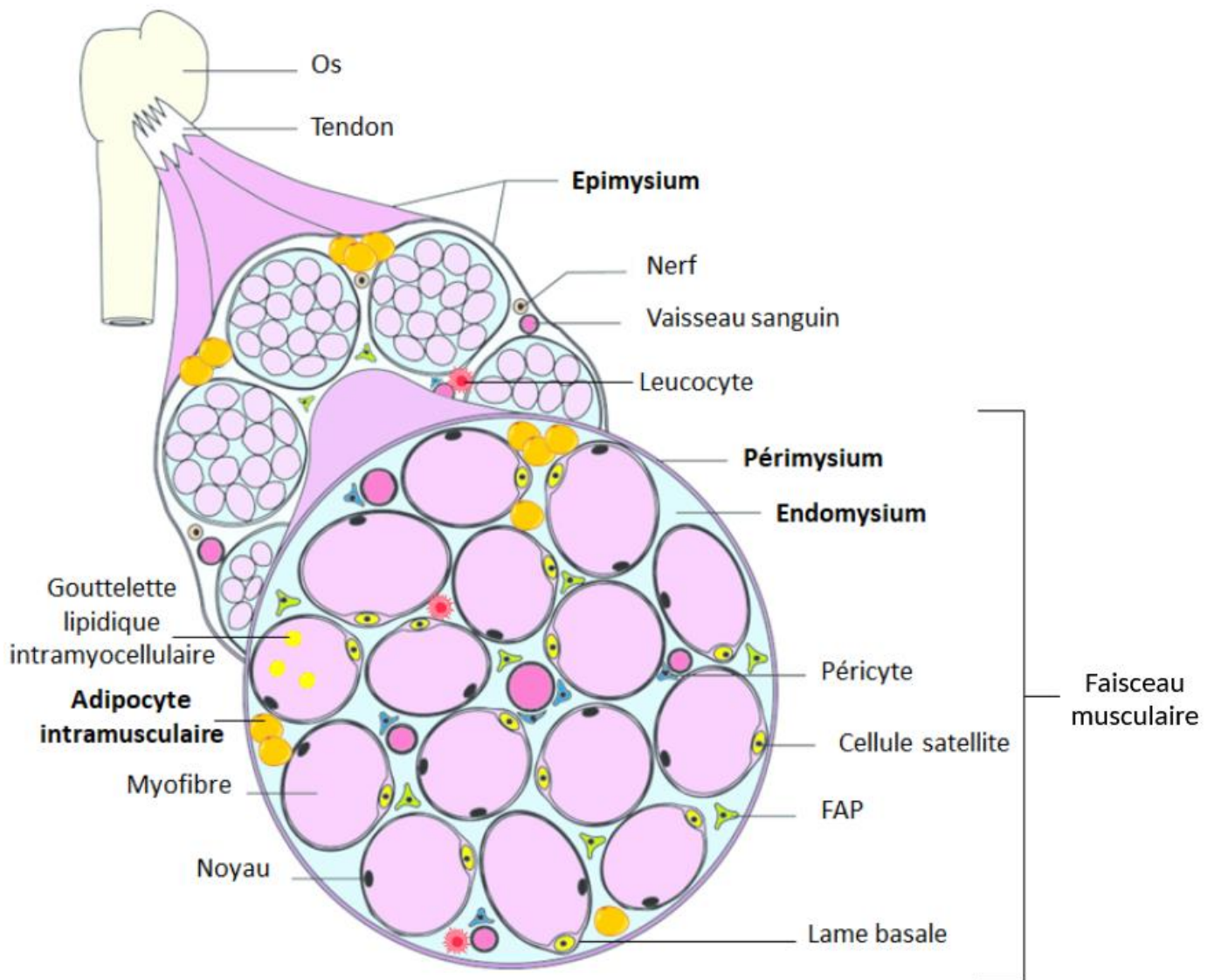
## INTRODUCTION

Au sein de leur environnement, toutes les espèces animales sont continuellement confrontées à des agressions. Quelles soient infectieuses ou mécaniques, elles peuvent aboutir à la destruction d'un tissu affectant ses fonctions. C'est alors que la capacité à réparer ces lésions s'est avérée primordiale pour la survie des espèces au cours de l'évolution. Parmi les mécanismes de réparation, la régénération complète du tissu constitue un avantage évolutif majeur, permettant aux organismes de surmonter les agressions et de restaurer la structure et la fonction des portions affectées. Cette capacité extraordinaire permet aux espèces de renouveler leurs tissus, organes voire organisme entier endommagés et de retrouver une structure et une fonction identiques à celles présentes avant l'agression. Le phénomène de régénération est très répandu parmi les métazoaires<sup>1</sup> et est présente chez certains vertébrés<sup>2</sup>. Même si la régénération est un processus qui est observé au sein de différents groupes phylogénétiques, toutes les espèces ne possèdent pas les mêmes capacités régénératrices. Il est intéressant de noter qu'il existe une corrélation entre la diminution des capacités de régénération et l'augmentation de la complexité anatomique chez les différentes espèces<sup>3</sup>. Ainsi, certaines espèces d'invertébrés comme l'hydre (*Hydra sp.*) et les vers plaires (*Plathelminthes*) sont capables de régénérer un individu entier à partir d'un fragment de leur organisme grâce à la prolifération et la différenciation de cellules souches présentes dans tout leur organisme<sup>4</sup>. Également, chez certaines espèces d'amphibiens comme le xénope (*Xenopus laevis*), l'axolotl (*Ambystoma mexicanum*) ou la salamandre (*Salamandra salamandra*) la capacité de régénérer les pattes est totale après ablation. Enfin, chez les mammifères tels que l'Homme (*Homo sapiens*) et les rongeurs (*Rodentia*), la capacité de régénération est particulièrement remarquable au cours des premiers jours après la naissance<sup>5</sup>. En effet, sur cette période ils sont en mesure de régénérer la dernière phalange des doigts ainsi que l'apex du cœur sans formation de tissu cicatriciel. Pourquoi les capacités de régénération restent très limitées chez certaines espèces et très développées chez d'autres ? Ce phénomène correspond-t-il à l'émergence de certains mécanismes au cours de l'évolution ou bien à un processus ancestral commun, peu à peu perdu dans certains phylums ? Toutes ces questions demeurent largement ouvertes aujourd'hui.

Chez le mammifère comme l'homme ou la souris, les capacités de régénération à l'âge adulte sont perdues. Néanmoins, quelques tissus ont conservé une certaine capacité à régénérer en réponse à des blessures<sup>6</sup>. C'est le cas du muscle squelettique, qui, malgré la complexité des mécanismes qui contrôlent ses diverses fonctions est en mesure de retrouver structure et fonction après une blessure. La compréhension des mécanismes qui gouvernent la régénération musculaire adulte s'est alors révélée indispensable pour tenter de découvrir un moyen de dépasser les limites actuelles de la réparation tissulaire. Bien que les mécanismes cellulaires et moléculaires qui contrôlent la régénération musculaire soient très étudiés aujourd'hui, ils demeurent encore largement incompris.

Dans les parties suivantes nous traiterons de la complexité anatomique et fonctionnelle du muscle squelettique et détaillerons le rôle des populations cellulaires résidentes qui





**Figure 1 : Structure et composition cellulaire et acellulaire du faisceau musculaire.**

Image adaptée de

[https://www.researchgate.net/publication/226334977\\_Skeletal\\_Muscle\\_Engineering\\_The\\_Need\\_for\\_a\\_Suitable\\_Niche](https://www.researchgate.net/publication/226334977_Skeletal_Muscle_Engineering_The_Need_for_a_Suitable_Niche). Représentation schématique d'un faisceau musculaire. La cellule satellite est la seule cellule à se localiser sous la lame basale des myofibrilles. Les autres types cellulaires (FAPs, leucocytes, cellules endothéliales, nerfs, péricytes, adipocytes) se situent entre les myofibrilles. Présence de lipides sous formes de gouttelettes intramyocytaires ou de quelques adipocytes intramusculaires, c'est-à-dire sous l'épimysium, dans le périmysium et l'endomysium.

participent à la régénération. Nous discuterons ensuite des changements cellulaires et morphologiques qui interviennent dans des situations pathologiques où le muscle ne régénère pas efficacement. Enfin nous discuterons d'une communication tissulaire originale entre muscle et tissu adipeux par l'intermédiaire d'un échange de cellules progénitrices dans le cadre d'une lésion musculaire qui a fait l'objet du sujet de recherche de ce projet de thèse.

## I/ Le muscle squelettique

Dans ce premier chapitre je vais présenter rapidement l'organisation anatomique et histologique du muscle squelettique avant de détailler sa composition cellulaire en condition basale, par opposition avec la situation post-lésionnelle qui sera traitée ultérieurement.

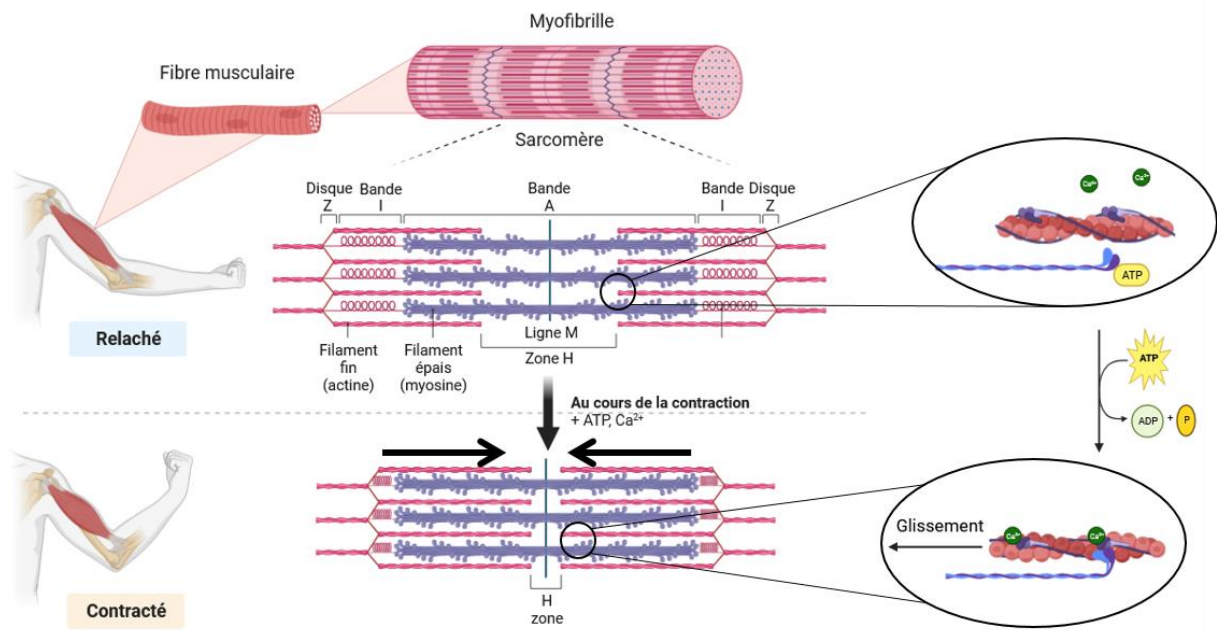
### 1) Structure et composition cellulaire

Le corps humain compte plus de 600 muscles squelettiques, qui représentent environ 40 % du poids corporel chez les jeunes adultes en bonne santé<sup>7</sup>. Chaque muscle squelettique est constitué de milliers de fibres musculaires organisées en plusieurs faisceaux de fibres (Figure 1). Ces fibres sont des cellules plurinucléées<sup>8</sup> et représentent l'unité contractile du muscle. Grâce à la connexion du réseau musculaire squelettique avec le système nerveux central, la contraction musculaire est dite volontaire<sup>9</sup>, permettant ainsi d'assurer la fonction principale de mouvement et de maintien postural.

Outre la partie contractile du muscle constituée de ses fibres, le muscle contient également une partie non contractile composée de tissu conjonctif fibreux aussi appelé la matrice extracellulaire (MEC). Elle est organisée en différentes couches qui cloisonnent et organisent les fibres musculaires. Chaque niveau de structure musculaire (muscle entier, faisceaux, fibre unique) est enveloppé par une gaine de MEC. On distingue ainsi, de façon centrifuge (Figure 1)<sup>10</sup> :

- L'ENDOMYSIUM, « l'intérieur du muscle », est une couche de tissu conjonctif aréolaire qui entoure chaque myocyte (fibre musculaire ou cellule musculaire).
- Le PERIMYSIUM, « autour du muscle », est une gaine de tissu conjonctif qui regroupe les fibres musculaires en faisceaux (entre 10 et 100).
- L'EPIMYSIUM, « sur/ au-dessus du muscle », est l'enveloppe de tissu fibreux la plus superficielle qui entoure le muscle squelettique. Il s'agit d'une couche de tissu conjonctif dense et irrégulier qui enveloppe l'ensemble du muscle et le protège des frottements contre les autres muscles et les os.

Le prolongement de ces différentes couches de tissu conjonctif aux deux extrémités du muscle permet la formation du tendon reliant ainsi le muscle à l'os au niveau de la jonction myotendineuse et responsable de la transmission de la force générée par le muscle au réseau osseux.



**Figure 2 :** Structure du muscle squelettique et mécanismes moléculaires de la contraction.

Représentation structurelle d'une myofibrille au repos (panel haut) et au cours de la contraction musculaire (panel bas).

|                       | LENTE                            | RAPIDE   |          |
|-----------------------|----------------------------------|----------|----------|
|                       | Type I                           | Type IIa | Type IIx |
| Métabolisme           | Aérobie:<br>Bêta - oxidation     |          |          |
| Glycogène             | -/+                              | +        | ++       |
| Mitochondrie          | ++++                             | +++      | +        |
| Vascularisation       | ++++                             | +++      | +        |
| Propriété contractile | Endurance<br>Force peu puissante |          |          |

**Tableau 1 :** Capacités contractiles et métaboliques des différents types de fibres musculaires.

Comme tous les tissus, le muscle squelettique comporte deux compartiments cellulaires. Le premier, appelé *parenchyme*, composé des cellules spécifiques qui déterminent la fonction globale du tissu. Le second compartiment appelé stroma, représente le tissu de soutien qui offre une structure et une organisation essentielles pour maintenir la fonctionnalité musculaire. Il n'existe pas de frontière anatomique entre le stroma et le parenchyme mais plutôt une étroite communication et une interdépendance que nous allons aborder dans les parties suivantes.

#### a) Le parenchyme musculaire

##### i. *La fibre musculaire*

Les fibres musculaires sont des cellules plurinucléées allongées et fusiformes dont les noyaux sont situés en périphérie. Leur diamètre excède rarement les 100  $\mu\text{m}$  et leur longueur varie en fonction des muscles, allant de quelques millimètres à plusieurs centimètres<sup>11</sup>. Leur membrane plasmique, le sarcolemme, renferme un cytoplasme appelé sarcoplasme. Au sein du sarcoplasme on retrouve plusieurs myofilaments caractérisés par des motifs répétitifs d'unités fondamentales : le sarcomère (Figure 2).

Les sarcomères représentent une élégante machinerie moléculaire responsable de la contraction musculaire. Ils se composent de deux ensembles principaux alternatifs de filaments protéiques : les filaments fins (composés essentiellement d' $\alpha$ -actine) enchevêtrés avec les filaments épais (constitués essentiellement de myosine) tous alignés parallèlement à l'axe de la fibre musculaire<sup>12</sup> (Figure 2).

Visuellement, le sarcomère est délimité à chaque extrémité par une fine ligne sombre appelée disque Z. Chaque disque Z divise la fibre musculaire en deux parties, et chaque partie partage une bande I plus claire avec les sarcomères adjacents. Au centre du sarcomère, on trouve une bande A dense composée de filaments épais, qui est entourée d'une zone H plus claire. La ligne M divise la zone H en deux parties. Les filaments fins sont maintenus ensemble, formant un réseau latéral au niveau du disque Z, tandis que la ligne M relie les filaments épais<sup>11,12</sup> (Figure 2).

Les fibres musculaires présentent une grande diversité et sont classées selon plusieurs caractéristiques telles que la couleur (blanche vs rouge)<sup>13</sup>, la vitesse de contraction (rapide vs lente), la fatigabilité (rapide vs endurante), les caractéristiques métaboliques (glycolytique vs oxydative) et l'expression des isoformes de la chaîne lourde de myosine (MyHC)<sup>11</sup>. La classification la plus courante se fonde sur l'expression des isoformes de MyHC, comprenant les types I, IIa et IIx chez l'homme comme chez la souris. Les fibres de type I sont caractérisées par une contraction lente, une résistance à la fatigue et un métabolisme oxydatif, elles sont également appelées fibres "rouges" en raison de leur forte vascularisation (Tableau 1). Les fibres de type IIa présentent une contraction plus rapide avec des propriétés métaboliques mixtes, tendant vers un métabolisme oxydatif. Les fibres de type IIx sont les plus rapides, avec un métabolisme fortement glycolytique, une fatigabilité rapide et une production de force

maximale<sup>11</sup>. Moins vascularisées, ces fibres possèdent une appellation de fibres « blanches ». Il est également possible que certaines fibres expriment simultanément plusieurs isoformes de MyHC, par exemple les types I et IIa, ou les types IIa et IIx<sup>14</sup>(Tableau 1). La diversité des propriétés des fibres musculaires au sein d'un même muscle mais aussi entre les différents muscles leur permet d'être utilisées pour différentes fonctions selon les besoins.

#### ii. *La jonction neuro-musculaire (JNM)*

Le parenchyme musculaire est également doté d'une composante nerveuse. La fonction contractile du muscle dépend de cette innervation. Les muscles sont connectés au système nerveux central par le biais de nerfs moteurs (motoneurones), on dit alors que la contraction du muscle squelettique est volontaire. La transmission de l'influx nerveux entre le motoneurone et chaque fibre musculaire se produit au niveau d'une jonction neuromusculaire (JNM). La gaine de myéline du motoneurone s'interrompt à la surface de la fibre musculaire, lorsque que celui-ci s'arborise lui permettant ainsi d'innover plusieurs fibres musculaires<sup>15</sup>. Les terminaisons nerveuses sont riches en vésicules renfermant de l'acétylcholine, un neurotransmetteur relargué dans la fente synaptique suite à l'influx d'un potentiel d'action (PA). Une fois libérée dans la fente synaptique, l'acétylcholine se fixe sur son récepteur post-synaptique présent à la surface des fibres musculaires. Ces récepteurs sont de type nicotinique (nAChR) formés de deux sous-unité  $\alpha$  associées à trois sous-unités  $\beta$ ,  $\epsilon$  et  $\delta$  formant alors un canal cationique<sup>16</sup>. La fixation de l'acétylcholine entraîne l'ouverture du canal et l'entrée de  $\text{Na}^+$  dans le sarcoplasme ce qui conduit à une dépolarisation de la membrane plasmique, appelé potentiel de plaque motrice. Ce potentiel provoque la libération de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) par le réticulum sarcoplasmique, déclenchant ainsi une cascade d'évènements conduisant à la contraction musculaire<sup>17</sup> que nous détaillerons par la suite.

Ayant ainsi exploré les différentes composantes cellulaires du parenchyme musculaire à l'état physiologique, nous allons maintenant nous tourner vers la description des cellules de soutien qui constituent le stroma.

#### b) Le stroma musculaire

Le stroma joue un rôle de soutien, de régulation et de maintien de l'environnement nécessaire au bon fonctionnement des cellules parenchymateuses. De nombreuses technologies allant de la cytométrie en flux à l'immunofluorescence ont permis de réaliser une description détaillée des différents composants cellulaires du stroma musculaire. Avec l'avènement d'une technologie plus puissante d'analyse de l'expression génomique en cellule unique, nous avons aujourd'hui une idée plus précise des rôles et des quantités relatives de chacune de ces populations cellulaires. Dans cette partie descriptive du compartiment stromal, j'ai choisi de classer chaque type cellulaire par ordre de proportion décroissante. Je commencerai donc par décrire les cellules endothéliales (44%), les cellules stromales mésenchymateuses (26%), les progéniteurs myogéniques (18%) puis les cellules immunitaires (6%) et les péricytes (6%)<sup>18</sup>. Enfin, nous nous intéresserons à un type cellulaire inattendu et peu documenté en tant que composant du stroma musculaire à l'état basal, l'adipocyte.

### *i. Les cellules endothéliales*

Comme pour tous les tissus de l'organisme, le muscle squelettique a besoin d'un apport constant en nutriments et en oxygène. Cet apport est réalisé par l'intermédiaire de la circulation sanguine, acheminée vers les muscles par un réseau vasculaire très bien développé au sein du tissu conjonctif musculaire (Figure 1). Les capillaires sanguins représentent la plus petite unité du réseau vasculaire et un ensemble de capillaires, appelé module, irrigue un volume localisé de tissu musculaire. Cette organisation précise permet ainsi à chaque fibre musculaire d'être entourée de trois à six capillaires<sup>19</sup> et fait des cellules endothéliales les cellules les plus présentes dans le stroma musculaire. En plus de leur fonction transport pour les nutriments, les cellules endothéliales microvasculaires du muscle (CEMM) régulent le recrutement des cellules immunitaires dans les processus inflammatoires<sup>19</sup>. Pour permettre une transition des cellules immunitaires et des nutriments, les CEMM forment une monocouche cellulaire interconnectée grâce à des jonctions serrées et adhérentes<sup>20</sup>. Les propriétés adhésives du marqueur CD31 (ou PECAM-1), une protéine exprimée à la surface de la membrane des CEMM, leur permet en partie de créer des interactions cellules/cellules via des adhésions CD31/CD31 formant ainsi un endothélium vasculaire. Les CEMM sont identifiables par l'expression de ce marqueur de surface et représentent entre 35% et 45% des cellules du stroma musculaire<sup>21</sup>.

Les muscles squelettiques sont aussi drainés par une circulation lymphatique, également formée par un ensemble de cellules endothéliales, dont les rôles sont différents de ceux assurés par la circulation sanguine<sup>22,23</sup>. Néanmoins, l'utilisation seule du marqueur CD31 ne permet pas la distinction entre les cellules endothéliales du réseau vasculaire sanguin de celles du réseau lymphatique. Les marqueurs endothéliaux lymphatiques tels que le récepteur 3 du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGFR-3), le récepteur 1 de l'acide hyaluronique endothélial des vaisseaux lymphatiques (LYVE-1) et la podoplanine<sup>24</sup> sont largement utilisés dans la détection spécifique de la lymphangiogénèse et des vaisseaux lymphatiques. Plutôt qu'un rôle d'apport d'oxygène et de nutriments, le système lymphatique a d'abord été décrit pour ses fonctions de drainage et d'évacuation des liquides et déchets métaboliques hors du muscle squelettique<sup>22</sup>. Il lui a ensuite été attribué un rôle important dans la circulation des cellules immunitaires dont l'infiltration dans le muscle est importante dans la réponse à des agents infectieux par exemple<sup>23,25</sup>. Contrairement à la circulation sanguine, le système lymphatique ne comporte pas d'organe jouant le rôle de pompe (cœur). En conséquence, lorsque le muscle squelettique se contracte, les vaisseaux lymphatiques se compriment et propulsent le liquide, la structure valvulaire des capillaires lymphatiques permettant uniquement un flux unidirectionnel de la lymphe<sup>22</sup>.

### *ii. Les progéniteurs fibro-adipogéniques (FAPs)*

Le stroma musculaire renferme également un type de cellules progénitrices appartenant à la famille des cellules stromales mésenchymateuses (MSCs), les *progéniteurs fibro-adipogéniques (FAPs)* qui représentent une population centrale dans ce manuscrit et que nous allons aborder maintenant.



## Contexte et découverte des FAPs

Le début des années 2000 marque un fort intérêt de la population scientifique à déterminer l'origine cellulaire de l'infiltration fibro-adipeuse observée au cours de la dégénérescence musculaire. Initialement, plusieurs études ont suspecté les cellules satellites (CS) d'être responsables de cette double infiltration en se différenciant à la fois en fibroblastes<sup>26</sup> et en adipocytes<sup>27,28</sup>. Les méthodes expérimentales d'isolement des CS à cette époque reposaient sur l'utilisation de l'immunophénotype CD11<sup>-</sup>/CD31<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup> ainsi que la capacité d'adhésion des cellules sur fond plastique *in vitro*. Seulement, l'utilisation d'un nombre restreint de marqueurs ainsi qu'un tri cellulaire seulement réalisé à partir de marqueurs non exprimés à la surface des CS laisse penser que cette population cellulaire était en réalité mélangée à une autre population cellulaire d'origine mésenchymateuse également CD11<sup>-</sup>/CD31<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup> et qui possède aussi des capacités d'adhésion sur fond plastique.

En parallèle, les thérapies cellulaires pour traiter les pathologies du muscle souffraient encore du manque de caractérisation des populations de cellules ré-injectables et différentes équipes cherchaient à qualifier la population au plus fort potentiel myogénique. C'est dans ce contexte, qu'en 2009 et 2010, les équipes du Pr. Jean-Thomas Vilquin et du Dr. Christian Dani ont identifié au sein du muscle squelettique humain en parallèle d'une population au fort potentiel myogénique CD31<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD34<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup>, la présence de cellules progénitrices au potentiel adipogénique<sup>29,30</sup>. Ces dernières, caractérisées par l'immunophénotype CD45<sup>-</sup>/CD31<sup>-</sup>/CD56<sup>-</sup>/CD34<sup>+</sup>, partagent des caractéristiques communes avec une population de MSCs de la moelle osseuse<sup>29,30</sup>. En effet, même si leur valence fibroblastique n'a pas été testée *in vitro* ou *in vivo* dans ces études, elles possèdent de fortes capacités de différenciation en adipocytes une fois réinjectées dans un muscle murin après lésion. Ces résultats ont permis de mettre en évidence pour la première fois la présence de deux types de progéniteurs distincts dans le muscle : une population de progéniteurs hautement myogéniques CD56<sup>+</sup> et une population de progéniteurs adipogéniques CD34<sup>+</sup> situés dans l'endomysium, entre les fibres musculaires.

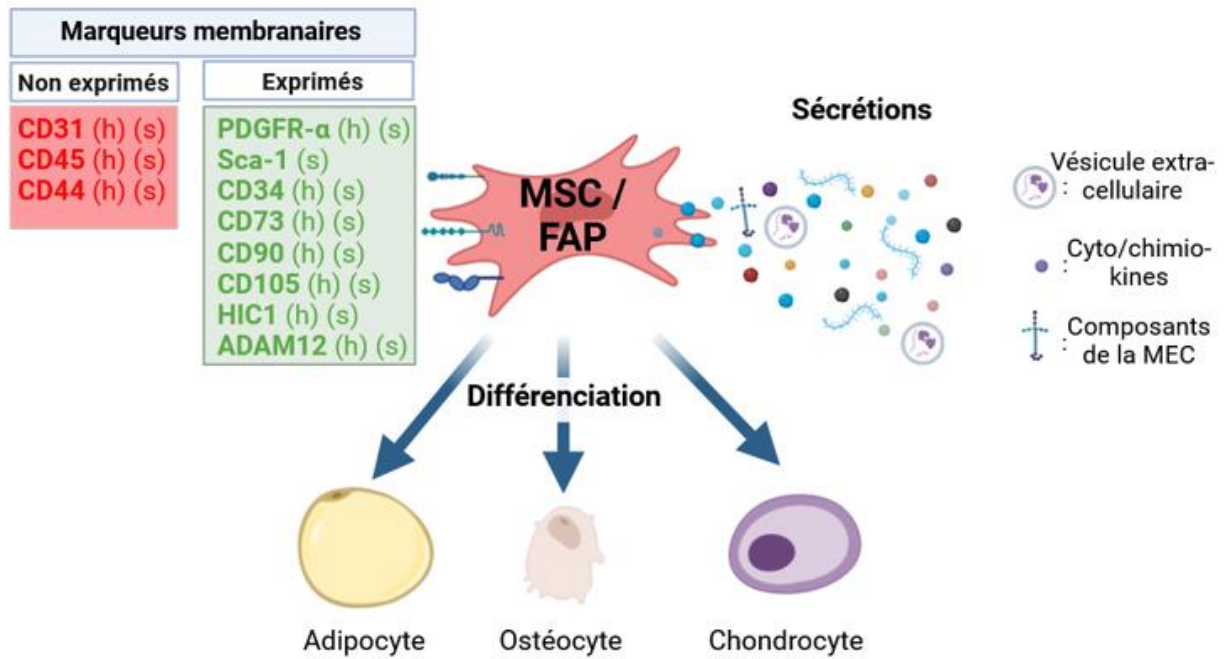
Chez la souris, en 2010 deux groupes ont décrit la présence d'une population progénitrice similaire avec des intentions expérimentales légèrement différentes. Les travaux du Dr. Kunihiko Tsuchida cherchaient à déterminer l'origine de l'infiltration fibro-adipeuse observée dans de nombreuses pathologies musculaires<sup>31</sup> tandis que les travaux du Dr. Fabio Rossi avaient pour intention de caractériser un nouvel acteur cellulaire capable d'influencer la différenciation des progéniteurs myogéniques<sup>32</sup>. Ces progéniteurs, nommés par les auteurs progéniteurs fibro-adipeux (FAPs), résident à proximité du réseau vasculaire dans l'espace inter fibrillaire de tissu conjonctif appelé interstitium (Endomysium, périnysium, Figure 1)<sup>31,32</sup>. L'utilisation d'un modèle murin exprimant la protéine fluorescente YFP sous le contrôle d'un promoteur myogénique connu, Myf5, leur a permis de montrer que ces progéniteurs ne sont pas des progéniteurs myogéniques puisqu'ils ne sont pas responsables de la formation de nouvelles fibres musculaires à la fois *in vivo* et *in vitro*<sup>32</sup>. En revanche, les FAPs se différencient en adipocytes une fois réinjectées *in vivo* dans un muscle murin lésé ou en milieux de culture *in vitro*. L'ensemble de ces travaux ont démontré la bivalence fibroblastique et adipocytaire, *in*

*vivo* et *in vitro*, et les auteurs ont alors proposé l'appellation de *progéniteurs fibro-adipogéniques (FAPs)* pour ces cellules.

#### Caractéristiques immunophénotypiques

Ces deux travaux princeps ont initialement présenté une combinaison de marqueurs différente pour caractériser les FAPs: CD45<sup>-</sup>/CD31<sup>-</sup>/ PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> dans travaux du Dr. Kunihiro Tsuchida<sup>31</sup> et CD45<sup>-</sup>/CD31<sup>-</sup>/Sca-1<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup><sup>32</sup> les travaux du Dr. Fabio Rossi. Par la suite, bien que l'immunophénotype attribué aux FAPs varie en fonction des espèces et des stratégies d'isolement, un certain consensus semble s'être installé autour de l'expression du récepteur alpha du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFR $\alpha$ ) chez l'homme comme chez la souris (Figure 3). Néanmoins, la seule expression de ce marqueur ne permet pas l'identification spécifique de la population de FAPs puisque celui-ci est également exprimé par d'autres populations cellulaires comme par exemple des sous-populations de macrophages<sup>33</sup>. A ce jour, seule une combinaison de marqueurs permet d'identifier les FAPs de manière précise. Chez l'homme comme chez la souris les marqueurs d'exclusion de la lignée hématopoïétique (CD45) et endothéliaux (CD31) sont utilisés pour l'identification de cette population cellulaire. Les FAPs murins expriment aussi les marqueurs de surfaces suivant : PDGFR $\alpha$ , Sca-1, CD90, CD105, CD73, CD34, HIC1 et ADAM12<sup>32,34,35</sup> (Figure 3). Chez l'homme, on observe la majorité de ces marqueurs à l'exception du Sca-1<sup>36-38</sup> (Figure 3). A l'aide de ces marqueurs et par des approches de cytométrie en flux, il a pu ainsi être établi chez l'homme et la souris que les FAPs représentent environ 10-15% des cellules mononuclées du muscle<sup>32,39</sup>. Cette proportion est largement inférieure à celle déterminée par des approches récentes de séquençage en cellule unique (26%) pour le même type cellulaire. On peut expliquer cette différence par le fait que la cytométrie en flux représente une approche avec à priori puisqu'elle nécessite le choix de certains marqueurs et donc restreint le nombre de cellules à ces marqueurs. De l'autre côté, les approches d'analyses en cellule unique sont sans à priori puisqu'elles ne requièrent pas de choix à faire avant analyse et prennent en compte l'ensemble des marqueurs, et donc un nombre plus étendu de cellules.





**Figure 3 : Caractéristiques immunophénotypiques, sécrétoires et de différenciation des FAPs.** A gauche de l'image sont classés les marqueurs non exprimés à la surface des MSCs en rouge et exprimés en vert. Les marqueurs sont ordonnés des plus couramment aux moins utilisés dans la littérature et résumé dans Contreras et al. (2021). (h) signifie qu'il est utilisé chez l'homme et (s) chez la souris.

### Compétence souche mésenchymateuse

La caractérisation immunophénotypique de la population de FAPs a permis d'établir un rapprochement avec les MSCs de la moelle osseuse initialement décrite en 1974 par Friedenstein<sup>40</sup>. Les critères qui définissent les MSCs, en plus de leur immunophénotype, sont<sup>41,42</sup> :

- **Leur multipotence** : ces cellules sont capables de se différencier dans plusieurs types de cellulaire du lignage mésenchymateux (adipocytes, ostéocytes et chondrocytes) à la fois *in vitro* et *in vivo* (Figure 3).
- Leur **capacité d'adhérence au plastique**.
- Leur **capacité à former des colonies de fibroblastes** : si ensemencés à faible densité, des clones indépendants issus d'une seule cellule appelée CFU-F (colony-forming unit fibroblast) sont détectables.

Comme nous l'avons vu précédemment, les travaux des équipes de Tsuchida et Rossi ont démontré les capacités de différenciation en adipocytes des FAPs murines et humaines à la fois *in vivo* et *in vitro*<sup>31,32,43</sup>. Ensuite, des études ont prouvé l'existence d'une sous-population de FAPs ayant la capacité de se différencier en ostéocytes et chondrocytes *in vitro* et *in vivo* suite à une stimulation BMP2, entraînant la formation de dépôts ectopiques d'os et de cartilage dans un muscle murin<sup>44</sup> et humain<sup>45</sup>. Enfin, des FAPs cultivés sur support plastique ont montré une activité clonogénique CFU-f<sup>46</sup>. La somme de ces différentes observations a permis de valider la caractérisation des FAPs en tant que MSC résidentes du muscle squelettique.

### Rôle et hétérogénéité des FAPs dans le muscle à l'état basal

Le rôle des FAPs dans le muscle à l'état basal a été démontré par des approches *in vivo* d'ablation conditionnelle de cette population cellulaire dans des modèles murins. Ces expériences ont révélé l'importance des FAPs dans la fonction musculaire. A l'état basal, la diminution des FAPs induite par l'administration de toxine diphtérique (DTX) à des souris transgéniques contenant le gène Fap- $\alpha$  (protéine d'activation des fibroblastes- $\alpha$ ) avec l'insertion du récepteur DTX a entraîné une réduction de la masse musculaire et de la taille des fibres musculaires trois semaines après l'injection<sup>47</sup>. De même, la diminution des FAPs induite par l'injection de tamoxifène chez les souris PDGFR $\alpha$ .creER-DTX provoque une atrophie musculaire réduisant aussi la force musculaire, pendant plus de 9 mois après l'injection<sup>44</sup>. Ces résultats indiquent que les FAPs sont nécessaires au maintien fonctionnel à long terme et soulignent l'existence d'un dialogue entre les FAPs et les composants cellulaires du parenchyme musculaire permettant ainsi d'assurer la fonction contractile du muscle en maintenant le pool de progéniteurs musculaires ainsi que la taille des fibres musculaires<sup>44</sup> positivement corrélée à la force de contraction<sup>48</sup>.

L'étude de la fonction de FAPs a depuis été enrichie par les différents travaux portant sur la description de leur hétérogénéité. Plusieurs études récentes explorant cette diversité des approches de séquençage ARN en cellule unique, permettent ainsi une analyse précise de

| Tissu         | Groupe de FAPs / ASCs                           | Marqueurs  | Espèce  | Références              |                      |
|---------------|---|--|---|-------------------------|----------------------|
| Muscle        | FAPs Quiescents (Etat basal)                    | F1 : Tie2 <sup>low</sup> , Vcam1 <sup>low</sup><br>F2 : Tie2 <sup>high</sup> , Vcam1 <sup>high</sup>   | souris  | Malecova et al. 2018    |                      |
|               |   | F1: <b>Dpp4+</b> , <i>Pi16</i> , <i>Igfbp5</i> , <i>Fbn1</i> , <i>Cd55</i> , <i>Mfap5</i> , <i>Pcolce2</i><br>F2: <b>Cxcl14+</b> , <i>Smoc2</i> , <i>Gsn</i> , <i>Lum</i> , <i>Col15a1</i> , <i>Col4a1</i>   | souris  | Opreescu et al. 2020    |                      |
|               |   | F1: <i>Sfrp4</i> , <i>Igfbp5</i> , <i>Sema3c</i> , <i>Dpp4</i> , <i>Tgfrb2</i> , <i>Wnt2</i><br>F2: <i>Cxcl14</i> , <i>Col4a1</i> , <i>Col4a2</i> , <i>Col6a1</i> , <i>6a2</i> , <i>6a3</i> , <i>Col15a1</i> , <i>Lum</i> , <i>Sparcl1</i> , <i>Podn</i> , <i>Smoc2</i> , <i>Mgp</i> , <i>Bgn</i>                | souris  | Scott et al. 2019       |                      |
|               |   | F1: <b>Fbn1+</b> , <i>Cd55</i> , <i>Mfap5</i> , <i>Fstl1</i><br>F2: <b>Lum+</b> , <i>Col4a2</i> , <i>Col15a1</i> , <i>Cxcl14</i> , <i>Smoc2</i> , <i>Dcn</i>   | Souris/<br>Humain   | Rubenstein et al. 2020  |                      |
|               |   | F1 : <i>Fbn1</i> , <i>Mfap5</i> , <i>Cd55</i><br>F2 : <i>Smoc2</i> , <i>Adh1b</i> , <i>Abc18</i> , <i>Cxcl14</i><br>F3: <i>Col1a1</i> , <i>Sfrp4</i> , <i>Serpine1</i> , <i>Ccl2</i><br>Adipocytes : <i>Apod</i> , <i>Gpx3</i> , <i>Glul</i> , <i>Cxcl14</i>   | Humain  | De Michelli et al. 2020 |                      |
|               |   | F1: <b>Cd55+</b> , <i>Tnxb</i> , <i>Mfap5</i> , <i>Pcolce2</i> , <i>Fbn1</i> , <i>Prg4</i><br>F2: <b>Mme+</b> , <i>Ptgds</i> , <i>Cxcl14</i> , <i>Smoc2</i><br>F3: <b>Gpc3+</b> , <i>Sfrp2</i>   | Humain  | Fitzgerald et al. 2023  |                      |
| Muscle        | FAPs « Activés » / « Réactifs » (0,5 - 1,5 jpl) | <i>Cxcl5</i> , <i>Cxcl3</i> , <i>Ccl7</i> , <i>Ccl2</i>  | Souris  | Opreescu et al. 2020    |                      |
|               |   | <i>Cxcl1</i> , <i>Cxcl5</i> , <i>Cxcl2</i> , <i>Cxcl14</i> , <i>Csf1</i> et <i>Ccl7</i>  | Souris  | Scott et al. 2019       |                      |
|               |   | <i>Ccl7</i> , <i>Cxcl5</i> , <i>Cxcl1</i>  | Souris  | De Michelli et al. 2020 |                      |
| Muscle        | FAPs Remodelage (3 - 10 jpl)                    | <b>Wisp+</b> , <i>Col8a1</i> , <i>Col12a1</i> , <i>Col16a1</i> , <i>Col11a1</i> , <i>Tnc</i> , <i>Fbn2</i> et <i>Adam12</i>  | <b>Dlk1+</b> , <i>B830012L14</i> , <i>Rik</i> , <i>Meg3</i> , <i>Airn</i> , <i>Peg3</i> , <i>Zim1</i> , <i>H19</i> , et <i>Igf2</i> | Souris                  | Opreescu et al. 2020 |
|               |   | <i>Col8a2</i> , <i>Col14a1</i> , <i>Col15a1</i> , <i>Fbln1</i> , <i>Fbln5</i> , <i>Hspg2</i> , <i>Lama2</i> , <i>Lama4</i> , <i>Lamc1</i> , <i>Lamb2</i> , <i>Nid2</i> , <i>Adam12</i> , <i>Postn</i> , <i>Lox</i> , <i>Acta2</i> , <i>Col1a1</i> , <i>Col1a2</i>  | Souris  | Scott et al. 2019       |                      |
|               |   | <i>Col1a1</i> , <i>Col1a2</i> , <i>Postn</i> , <i>Bgn</i> , <i>Sparc</i>   | Souris  | De Michelli et al. 2020 |                      |
| Muscle        | FAPs Résolution (7 - 21 jpl)                    | <b>Dpp4+</b> , <i>Pi16</i> , <i>Wnt2</i>   | <b>Cxcl14+</b> , <i>Enpp2</i> , <i>Crispld2</i> , <i>Hsd11b1</i>  | Souris                  | Opreescu et al. 2020 |
|               |   | « return to baseline level »   | Souris  | Scott et al. 2019       |                      |
|               |   | « return to baseline level »   | Souris  | De Michelli et al. 2020 |                      |
| Tissu adipeux | ASCs Quiescents (Etat basal)                    | A1: <b>Dpp4+</b> , <i>Wnt2</i> , <i>Bmp7</i> , <i>Pi16</i><br>A2: <b>Icam1+</b> , <i>Dlk1</i> , <i>Pparg</i> , <i>Fabp4</i> , <i>Cd36</i><br>A3: <b>Cd142+</b> , <i>Clec11a</i>  | Souris / Humain   | Merrick et al. 2019     |                      |
|               |   | A1 : <i>Cd55</i> , <i>Il13ra1</i><br>A2 : <i>Pparg</i> , <i>Fabp4</i> , <i>Prdm16</i> , <i>Adam12</i><br>A3 : <i>Cd142</i> , <i>Abcg1</i>  | Souris  | Schwalie et al. 2018    |                      |
|               |   | A1 : <i>Pparg</i> , <i>Fabp4</i><br>A2 : <i>Cd36</i> , <i>Plin1</i><br>Précurseurs fibro-inflammatoires : <i>Ly6C1</i> , <i>Sfrp4</i> , <i>Pi16</i> , <i>Limch1</i>  | Souris  | Emont et al. 2022       |                      |
|               |   | A1 : <i>Foxp2</i> , <i>Hes1</i> , <i>Lox</i> , <i>Igf1</i> , <i>Lpb</i><br>A2 : <i>Cd36</i> , <i>Lpl</i> , <i>Gata2</i> , <i>Pparg</i> , <i>Fgf10</i><br>A3 : <i>Ebf2</i> , <i>Rock2</i> , <i>Zfp521</i> , <i>Bmp6</i> , <i>Ebf1</i><br>A4 : <i>Fbn1</i> , <i>Klf4</i> , <i>Klf2</i> , <i>Fn1</i> , <i>Loxl1</i> | Souris  | Sárvári et al. 2021     |                      |
|               |   | A1 : <i>Dpp4</i> , <i>Pi16</i><br>A2 : <i>Icam1</i> , <i>Col4a2</i> , <i>Cav1</i><br>Diff. ASC : <i>Lipe</i> , <i>Adipoq</i> , <i>Plin1</i> , <i>Car3</i>  | Souris  | Burl et al. 2018        |                      |

**Tableau 2 :** Liste des gènes définis par scRNAseq et exprimés par chaque sous-populations de FAPs et ASCs murines et humaines. En gras, les marqueurs choisis par les auteurs pour définir l'appellation de la sous-population cellulaire. Les gènes soulignés sont communs aux différentes études.

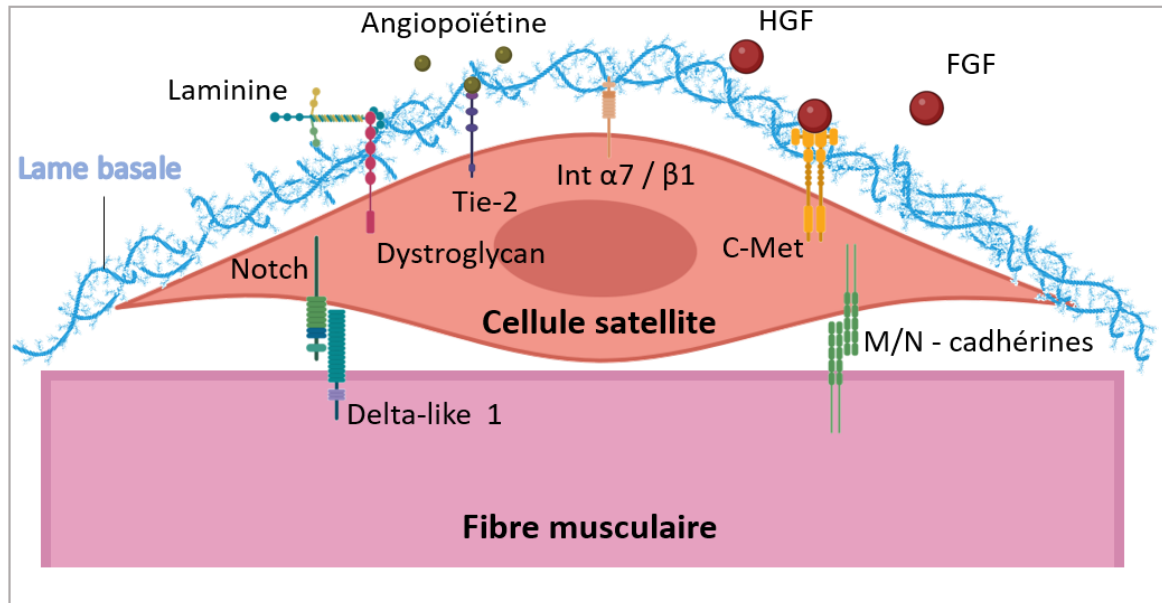
l'expression génique propre à chaque type cellulaire présent dans le muscle. À l'aide d'analyses basées sur l'ontologie génique (Gene Ontology - GO), il a été possible de prédire les fonctions de ces différents types cellulaires en se basant sur l'expression relative des gènes fortement exprimés dans chacune d'elles. Depuis 2018, une vingtaine d'études fondées sur des analyses omics sur cellule unique ont documenté l'hétérogénéité de la population de FAPs à l'état basal, triée ou non à l'aide des marqueurs immunophénotypique des FAPs décrits précédemment (Tableau 2). De manière générale, ces études de transcriptomique permettent de clusteriser différentes sous-populations cellulaires en fonction de leur expression génique.

Chez la souris, Malecova et al. ont d'abord rapporté l'existence de deux populations caractérisées par les marqueurs Tie2 et Vcam1 ; la forte expression de Vcam1 étant préférentiellement associée à un profil pro-fibrotique (Ligne FAPs quiescents, Tableau 2)<sup>49</sup>. Par la suite, d'autres études ont également décrit la présence de deux populations différentes de FAPs<sup>50-53</sup> : i) une population de progéniteurs multipotents ayant pour marqueurs dpp4<sup>+</sup>, fbn1<sup>+</sup> et cd55<sup>+</sup> et ii) une population cxcl14<sup>+</sup>, lum<sup>+</sup>, exprimant des gènes impliqués dans le remodelage de la MEC (Ligne FAPs quiescents, Tableau 2). Le secrétome « virtuel » proposé par Negroni et al. soutient le rôle fonctionnel de ces 2 sous-populations de FAPs dans l'organisation structurelle de la MEC<sup>54</sup>.

Chez l'homme, la première description de l'hétérogénéité des FAPs a été réalisée par Rubenstein et al. dans une étude qui inclut de jeunes individus sains<sup>52</sup>. Dans ce travail, ils rapportent la présence de deux populations de FAPs similaires à celles identifiées chez la souris, i.e. une population FAPs lum<sup>+</sup> et une autre fbn1<sup>+</sup> (Ligne FAPs quiescents, Tableau 2). Par ailleurs, un atlas représentatif de toutes les populations cellulaires retrouvées au sein du muscle squelettique chez l'homme a été publié<sup>55</sup> et a permis de confirmer ces sous-populations de FAPs (Ligne FAPs quiescents, Tableau 2). Récemment, Fitzgerald et ses collaborateurs identifient une population supplémentaire de FAPs, exprimant le marqueur Mme<sup>+</sup>, présentant un profil pro-adipogénique (Ligne FAPs quiescents, Tableau 2). Dans cette même étude, des approches in vitro ont démontré le fort potentiel adipogénique des FAPs Mme<sup>+</sup> en comparaison aux FAPs Mme<sup>-</sup> validant fonctionnellement le potentiel de cette sous-population cellulaire. En conclusion, dans le muscle à l'état basal, la population de FAPs présente une certaine hétérogénéité avec des potentialités variées, alliant des cellules au profil immature, mais aussi des cellules plus engagées dans la voie adipogénique ou la sécrétion de MEC.

### *iii. Les cellules satellites (CS)*

Les CS sont exclusivement retrouvées dans le muscle squelettique et représentent un acteur central du stroma musculaire. Elles représentent la fraction cellulaire unique de progéniteurs musculaires capables de former de nouvelles fibres musculaires. Elles ont été découvertes initialement chez la grenouille par des approches de microscopie électronique en 1961 par Alexander Mauro<sup>56</sup>. Il a pu décrire une localisation anatomique unique positionnée entre la lame basale et le sarcolemme. En 1965, la description de ces cellules chez le mammifère (souris) a été réalisée décrivant des cellules enrichies en hétérochromatine avec un



**Figure 4 : Influence de la niche sur le maintien de la cellule satellite en quiescence.** La cellule satellite est maintenue par contact direct à la fibre musculaire et à la lame basale. Elle reçoit également des signaux moléculaires qui traversent la lame basale.

cytoplasme appauvri en mitochondrie ainsi qu'un réticulum endoplasmique faiblement développé<sup>57,58</sup>, témoins d'une faible activité métabolique et transcriptionnelle.

Depuis, la caractérisation de ces cellules s'est affinée avec la description de marqueurs présents à leur surface comme le CD34, le c-Met, les syndécans 3 et 4, les intégrines  $\alpha 7$  et  $\beta 1$ , les molécules d'adhésion des cellules neurales et vasculaires, les cadhérines neurales et musculaires (N-CADH et M-CADH), le récepteur 4 de la chimiokine à motif C-X-C, le CALCR et la calveoline 1<sup>59-61</sup>. Néanmoins, l'ensemble de ces marqueurs est aussi partagé avec d'autres types cellulaires ne permettant donc pas l'identification spécifique des cellules satellites par l'utilisation d'un seul et unique marqueur. En revanche, le tri de cette population cellulaire par des approches de cytométrie en flux (FACS) est rendu possible par l'utilisation d'une combinaison de marqueurs exprimés ou non à leur surface couramment utilisée aujourd'hui<sup>31,32,62</sup>. Parmi les marqueurs exprimés, on observe fréquemment l'utilisation de l'intégrine  $\alpha 7$  et du CD34, aussi bien chez l'homme que chez la souris<sup>63</sup>. En revanche, le marqueur CD56 est spécifiquement utilisé chez l'homme<sup>21,64</sup> et le Sca-1 chez la souris. Tout comme les FAPs, les CS n'expriment pas les marqueurs CD45 et CD31<sup>21,63</sup>.

Les cellules satellites sont aussi caractérisées par l'expression spécifique d'un facteur de transcription, Paired box 7 (*Pax7*), découvert par l'équipe de M. Rudnicki<sup>65</sup>. A l'aide de ce marqueur, le généré de lignée murine exprimant des gènes rapporteurs comme *LacZ* ou la protéine fluorescente GFP sous le contrôle de son promoteur a permis de déterminer que les CS représentent environ 3% des cellules mononuclées du muscle<sup>66,67</sup>. Ce marqueur est indispensable à la survie des CS puisque sa délétion empêche le renouvellement de cette population et conduit la CS à la différenciation myogénique<sup>68</sup>. *Pax-7* est donc un régulateur clé des CS et de leur progression vers le lignage myogénique en permettant le maintien de cette population cellulaire dans un état dit quiescent, c'est-à-dire bloqué en phase G0 du cycle cellulaire. Le facteur de transcription *Pax-3* est également exprimé par les CS quiescentes<sup>69</sup>. Ce facteur est présent tout au long du développement embryonnaire et fœtal et permet de maintenir les progéniteurs dans un état prolifératif. La perte de fonction de *Pax-3* à l'état embryonnaire chez la souris entraîne des défauts de formation d'une partie de la musculature chez l'adulte même si certains muscles du tronc se forment correctement<sup>70</sup>. Ce résultat a été expliqué par une redondance fonctionnelle avec son paralogue *Pax-7* puisque le remplacement du gène *Pax-3* par *Pax-7* chez la souris est capable d'assurer la plupart des fonctions de *Pax-3* dans le tronc<sup>71</sup>.

La quiescence des CS, observée dans un muscle à l'état basal reste un processus actif et complexe, régulé par différentes voies de signalisation<sup>72,73</sup>. On distingue des voies activées par **contacts cellulaires** de celles activées par des **signaux paracrines** (Figure 4) :

- La position spécifique des CS le long des fibres musculaires, sous la lame basale, permet le **contact direct** entre la face apicale de la CS avec la fibre musculaire via les molécules M-cadhérine et N-cadhérine. La déplétion génétique de ces deux molécules aboutit à l'entrée en différenciation des CS<sup>73</sup>. Le rôle de la signalisation Notch dans le maintien

de la quiescence des MSCs est bien caractérisé (Figure 4)<sup>74</sup>. Le ligand Delta-like 1 situé sur les fibres musculaires peut se lier aux récepteurs Notch1-3 exprimés par les CS, ce qui entraîne la translocation du domaine intracellulaire de Notch vers le noyau, où il régule l'expression des gènes liés à la quiescence (par exemple, les gènes de la famille Hes/Hey)<sup>75</sup>. L'interférence de la signalisation Notch peut nuire à l'auto-renouvellement des CS, provoquant ainsi une différenciation spontanée et un appauvrissement du pool de cellules souches<sup>76</sup>. La CS fixée à la fibre musculaire est logée sous la lame basale, une MEC dense qui est composée notamment de laminine. Les intégrines  $\alpha 7$  et  $\beta 1$  présentes à la surface des CS se lient à la laminine et permettent d'ancrer leur cytosquelette d'actine à la MEC (Figure 4). Ces interactions physiques sont cruciales pour maintenir les CS en quiescence<sup>77</sup>.

- La **régulation paracrine** joue aussi un rôle important dans le maintien des CS au stade quiescent. En effet, l'expression du récepteur Tie-2 par les cellules satellites leur permet la fixation de l'angiopoïétine 1 (Figure 4), sécrétée en majorité par les cellules endothéliales, et le blocage en phase G0 du cycle cellulaire. La surexpression de Tie-2 dans les CS représente un frein à la différenciation cellulaire et permet l'augmentation du nombre de CS quiescente<sup>78</sup>. Aussi, des essais de transplantation cellulaire ont montré que l'oncostatine M, une cytokine sécrétée par les fibres musculaire, permet le maintien des CS et protège leur caractère « souche »<sup>79</sup>.

#### *iv. Les cellules immunitaires résidentes*

A l'état basal chez l'homme et la souris, les cellules immunitaires représentent environ 6% du stroma musculaire<sup>18,21</sup>. Chez l'Homme comme chez la souris, ces cellules sont identifiables à l'aide du marqueur de la ligné hématopoïétique CD45<sup>80</sup>. Tout comme les FAPs, ces cellules sont localisées au sein du tissu matriciel qui entoure chaque fibre musculaire<sup>81</sup>. Parmi les cellules CD45<sup>+</sup> on distingue différents types cellulaires avec des fonctions différentes.

Des approches de cytométrie en flux ont pu identifier une population de **lymphocytes, mastocytes et cellules dendritiques** minoritaires impliquées dans la reconnaissance de pathogènes et dans l'induction de mort cellulaire<sup>18,82</sup> et une population majoritaire de **macrophages** CD11b<sup>+</sup> / F4/80<sup>+</sup> qui représentent environ 3-5% des cellules mononucléés du muscle à l'état basal chez l'homme et la souris<sup>21,81</sup>. Les macrophages résidents possèdent deux origines distinctes : un premier pool de macrophages est établi avant la naissance à partir de progéniteurs embryonnaires tandis qu'un second pool dérive d'une hématopoïèse adulte au sein de la moelle osseuse puis leur infiltration dans le muscle<sup>81,83</sup>. Des approches transcriptomiques en cellule unique ont pu mettre en évidence l'hétérogénéité au sein de cette population cellulaire avec la présence d'au moins trois clusters de macrophages à l'état basal dans des muscles murins<sup>81</sup> et humains<sup>84</sup>. Chaque cluster semble avoir une fonction différente déduite de son expression génique : une population de macrophages proliférateurs présentant de fortes similitudes avec les populations de monocytes circulants immatures et donc probablement impliqués dans le maintien du pool de macrophages résidents, une population exprimant de nombreux gènes impliqués dans la reconnaissance de pathogènes et



enfin un cluster impliqué dans le remodelage matriciel<sup>84</sup>. Une étude a par ailleurs comparé les transcriptomes des macrophages résidents de différents types de muscles squelettiques (muscle quadriceps vs. diaphragme) avec des macrophages résidents d'autres tissus comme les poumons et le péritoine<sup>81</sup>. Les macrophages résidents dans les différents types de muscles squelettiques sont très similaires les uns aux autres mais se distinguent des macrophages des autres tissus. Comparés aux macrophages du péritoine et des alvéoles pulmonaires, les macrophages résidents du muscle squelettique expriment un niveau relativement plus élevé de gènes impliqués dans la régulation de la réponse immunitaire et de la croissance musculaire<sup>81</sup>. Le muscle squelettique subissant une force mécanique constante et, par conséquent, étant soumis à une fréquence plus élevée de micro dommages tissulaires les auteurs proposent que les lésions tissulaires pourraient générer un microenvironnement qui stimule l'activité accrue des macrophages résidents dans l'élimination des micro dommages, le maintien de l'homéostasie tissulaire et la promotion de la croissance musculaire.

Outre leurs rôles à l'état basal, les cellules immunitaires musculaires remplissent aussi des fonctions importantes en réponse à des agressions que nous traiterons dans le chapitre dédié à la régénération musculaire.

#### v. *Les cellules périvasculaires*

Enfin, le stroma musculaire renferme un groupe cellulaire hétérogène en position périvasculaire. Différentes études<sup>18,51,55,85</sup> indiquent que les cellules périvasculaires sont composées d'au moins trois populations de cellules transcriptionnellement distinctes : les péricytes, les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) et les cellules de type myofibroblastes multipotents.

- Les *péricytes* sont présents en abondance dans tous les organes vascularisés (Figure 1), où ils régulent plusieurs fonctions telles que la croissance des vaisseaux, leur perméabilité et leur contractilité<sup>86</sup>. Les aspects fonctionnels de ces cellules ont été abordés par des approches *in vitro*, de co-culture avec des cellules endothéliales, mais aussi des approches de déplétion *in vivo*. Les expériences de co-culture entre péricytes et cellules endothéliales ont démontré un rôle bénéfique des péricytes sur la prolifération, la survie et l'organisation des cellules endothéliales<sup>87</sup>. Il est également connu que les péricytes contribuent au maintien de la fonction microvasculaire, car la perte de péricytes *in vivo* est associée à une dysfonction microvasculaire diminuant le débit sanguin basal<sup>88</sup>. Plus récemment, il a été déterminé que le rôle de ces cellules s'entendait au-delà d'un dialogue avec les cellules endothéliales mais pouvait également stabiliser le pool de CS dans le muscle. En effet, il a été démontré que les péricytes musculaires favorisent la quiescence des CS grâce à la sécrétion d'Ang1 et d'IGF1<sup>89</sup>. L'ablation des cellules périvasculaires NG2+ dans un modèle murin expérimental a considérablement altéré la quiescence des CS et a entraîné une augmentation importante des cellules progénitrices myogéniques Pax7+ en prolifération à court terme<sup>89</sup>. Tout comme les FAPs, une multitude de marqueurs moléculaires ont été suggérés dans le but d'identifier et isoler ces cellules<sup>90,91</sup>. Les



marqueurs de péricytes largement reconnus comprennent le récepteur bêta du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFR $\beta$ ), NG2 (protéoglycane 4 du sulfate de chondroïtine), CD13, l'actine alpha des muscles lisses ( $\alpha$ SMA), desmine et CD146. Enfin, l'expression de CD34 a également été utilisée dans l'identification et l'isolement des péricytes<sup>92</sup>. Néanmoins, l'utilisation du CD34 pour le tri des péricytes reste sujet à débat puisque des études ont rapporté par des approches d'imagerie *in situ* chez l'homme que les cellules périvasculaires NG2<sup>+</sup> ne coexpriment pas le CD34<sup>93</sup>. En réalité, les péricytes partagent un immunophénotype quasi-identique avec les MSCs, avec l'expression commune de plusieurs marqueurs de surface dont CD29, CD44, CD73, CD90 et CD105. Crisan et al. ont isolé des cellules périvasculaires humaines provenant de plusieurs organes, y compris le muscle. Ces cellules périvasculaires, principalement des péricytes, identifiées par une forte expression de CD146, NG2 et une absence d'expression de CD45 (marqueur hématopoïétique), CD56 (marqueur myogénique) et CD31 (marqueur endothéliale) ont démontré des capacités de différenciation dans différents lignages mésenchymateux : adipocytes, chondrocytes et ostéocytes en culture<sup>94</sup>. L'ensemble de ces résultats peut néanmoins être critiqué puisque bon nombre de leurs marqueurs sont aussi partagés avec les populations de MSCs. Il est donc possible d'imaginer que la population de péricytes était en fait contaminée par des MSCs.

- Les *CMVL* sont les seconds représentants de ce groupe de cellules périvasculaires. Avec les péricytes, elles sont généralement regroupées sous le terme de cellules "murales" et sont enrichies en marqueurs péricytaires tels que *rgs5* et *cspg4* (NG2)<sup>18,51</sup>. Les CMLV expriment sélectivement des gènes associés aux fonctions contractiles, tels que la chaîne lourde de myosine 11 (*myh11*), l'actine alpha des muscles lisses ( $\alpha$ -SMA ; *Acta2*) et la transglutinin (TAGLN ; *Tagln*), et sont situées dans la *tunica media* en soutien des artères et des veines.
- La troisième population de cellules périvasculaires est représentée par des cellules de type *fibroblastes multipotents*, caractérisés par l'expression de gènes de la MEC. Chez la souris, cette population se caractérise par un enrichissement de l'expression de *pdgfra* et *Ly6a*, codant pour la protéine Sca-1, deux marqueurs également utilisés dans l'identification des FAPs. A ce jour, l'identité de ces fibroblastes est tout aussi débattue que celle des péricytes étant donné que ces deux populations cellulaires partagent de nombreux marqueurs communs avec les MSCs. deux hypothèses sont proposées : (i) ces fibroblastes seraient le résultat d'un événement de choix de lignée et représenteraient un état de différenciation terminale d'une lignée spécifique, ou (ii) ils représenteraient un état fonctionnel réversible acquis par plusieurs types de MSCs<sup>95</sup>. Il existe également une ambiguïté quant à la définition du terme « myo »fibroblaste qui doit remplir plusieurs critères pour être considéré comme tel<sup>96</sup> : la présence de faisceaux actine-myosine, (appelés fibres de stress *in vitro*), la capacité contractile et la production de collagène. Les cellules fibroblastiques produisant de grandes quantités de collagène en l'absence de caractéristiques contractiles ne sont pas des

myofibroblastes mais des fibroblastes, bien qu'il soit admis que de tels phénotypes représentent souvent des états de transition dans le spectre d'activation des myofibroblastes<sup>96</sup>. Ainsi, les premières stratégies d'identification des myofibroblastes dans les tissus se sont concentrées sur la détection des caractéristiques contractiles. Pour cela, l'utilisation de marqueurs anti  $\alpha$ -SMA dans les fibres de stress, nécessaires à la contraction des myofibroblastes, a été utilisée<sup>97,98</sup>. S'ajoutant à la complexité de leur identification, d'autres cellules, telles que les cellules musculaires lisses ou les péricytes peuvent également exprimer l' $\alpha$ -SMA<sup>99</sup>.

L'absence de marqueurs uniques spécifiques des cellules périvasculaires et des FAPs ainsi qu'une possible localisation anatomique commune peut conduire à une confusion importante et à une surestimation de l'hétérogénéité de ces populations cellulaires.

#### *vi. Les adipocytes intramusculaires*

Le stroma musculaire renferme enfin un type cellulaire inattendu et peu documenté, l'adipocyte. Ces cellules se logent entre les fibres musculaires ou les faisceaux de fibres (Figure 1). Bien que proportionnellement anecdotique à l'état physiologique, ce type cellulaire devient abondant dans différentes situations pathologiques que nous détaillerons plus loin. La présence d'un dépôt adipeux intramusculaire (IMAT) chez la souris normopondérée a été décrite pour la première fois en 1976<sup>100,101</sup>. Ces adipocytes intramusculaires, véritables entités cellulaires par opposition aux vésicules lipidiques intramyocytaires, sont qualifiés d'ectopiques, du grec  $\epsilon\kappa\tau\omicron\pi\omicron\varsigma$  « éloigné, déplacé » c'est-à-dire hors de leur localisation habituelle (le tissu adipeux) faisant alors référence à une anomalie. En effet, l'accumulation d'IMAT est aujourd'hui presque exclusivement étudiée et corrélée à des conditions pathologiques associée à une diminution de la masse musculaire comme l'obésité<sup>102</sup>, le diabète de type 2<sup>103</sup>, le sujet âgé atteint de sarcopénie<sup>104,105</sup> ou encore chez des patients présentant des dysfonctions musculaires dues à une anomalie génétique comme la myopathie de Duchenne<sup>106,107</sup>. Néanmoins, la présence de ces adipocytes est également observée en plus faible quantité dans les muscles squelettiques, c'est-à-dire sous l'épymisium, de patients jeunes ne présentant aucune de ces pathologies (Figure 1)<sup>108</sup>. Il semblerait alors que les adipocytes intramusculaires représentent une composante cellulaire distincte au sein d'un muscle sain. Dans ces conditions physiologiques, les propriétés moléculaires, cellulaires et fonctionnelle de l'IMAT restent très faiblement étudiées.

Au cours de la dernière décennie, de nombreuses méthodes d'imagerie ont été utilisées et adaptées pour quantifier de manière non invasive la présence des dépôts adipeux sur petit animal *in vivo*, notamment les rongeurs<sup>109</sup>. Celles-ci incluent la densitométrie à rayons X (DXA, PIXImus DXA), la tomодensitométrie (CT) ainsi que l'imagerie par résonance magnétique (IRM,  $\mu$ MRI). Bien que ces méthodes offrent la possibilité de quantifier masse grasse et masse maigre à l'échelle de l'organisme entier, elles présentent cependant une faible capacité à distinguer les lipides contenus sous formes de gouttelettes intramyocytaires de ceux présents sous formes de véritables adipocytes. Dans cet objectif, d'autres méthodes d'imagerie plus fines ont été développées chez la souris. Ainsi, la localisation anatomique de l'IMAT a pu être validée

par des approches histologiques par simple marquage hématoxyline/éosine sur coupe transversale de muscle<sup>110</sup> ou par l'utilisation de différents colorants, fluorescents ou non, comme le RedOil<sup>111</sup>, le Nile Red<sup>112</sup> ou le Bodipy<sup>113</sup> ayant tous une affinité pour les lipides, en particulier les lipides neutres comme les triglycérides, contenus dans les gouttelettes lipidiques intracellulaires. Aujourd'hui, la réalisation de marquages à l'aide d'anticorps dirigés contre des protéines de structure membranaire des gouttelettes lipidiques permet de mieux différencier les lipides intramyocytaires de ceux contenus au sein des adipocytes. Par exemple, les isoformes un à cinq des périlipines (PLIN1-5)<sup>114</sup> sont les plus décrites et utilisées pour identifier les gouttelettes contenues dans les adipocytes tandis que seulement les isoformes deux à cinq sont exprimées à la surface des gouttelettes intramyocytaires<sup>115</sup>. La périlipine 1 (PLIN1) apparaît alors comme un marqueur de choix pour distinguer les adipocytes des micro gouttelettes intramyocytaires<sup>116</sup>. Néanmoins, ces approches réalisées sur coupe fine (8 µm) ne permettent pas d'établir de quantification précise du nombre et de l'organisation des adipocytes (dont la taille s'échelonne de 50 à 100 µm<sup>117</sup>) au sein d'un muscle murin entier (environ 1cm de long pour un muscle quadriceps).

Chez l'homme, la présence d'IMAT est principalement quantifiée de façon indirecte par tomographie assistée par ordinateur (CT-scan)<sup>118</sup> ou de façon directe par imagerie à résonance magnétique (IRM)<sup>119,120</sup>. L'IMAT a alors été décrit comme un tissu adipeux intercalé entre et autour des fibres musculaires ou des groupes de tissus musculaires. Les adipocytes intramusculaires représentent entre 5% et 8% de l'aire musculaire totale réalisée par des approches de marquage Red Oil, imagerie DEXA ou CT-Scan sur des biopsies humaines à l'état basal<sup>121-124</sup>.

Fonctionnellement, les premières études basées sur une quantification biochimique des triglycérides totaux extraits de biopsies musculaires humaines à l'état physiologique ont révélé une diminution des triglycérides après un exercice prolongé, proposant alors un rôle de soutien énergétique de l'IMAT<sup>125,126</sup>. En revanche, de nombreuses études ont aussi démontré l'inverse, c'est-à-dire un contenu en triglycérides inchangé après exercice physique<sup>127</sup>. On peut expliquer cette disparité des résultats probablement par des facteurs expérimentaux tels que la contamination des biopsies musculaires par des adipocytes intermusculaires, c'est-à-dire autour du muscle, pouvant masquer les différences du contenu en triglycérides intramusculaires après l'exercice<sup>128</sup>. Il est aussi possible d'imaginer que les acides gras libres plasmatiques peuvent reconstituer les réserves de triglycérides intramusculaires après l'exercice. La cinétique de prélèvement de la biopsie post-exercice est alors un élément crucial du plan expérimental pas toujours identique entre les études. D'autres études utilisant des méthodologies de traçage isotopique<sup>129</sup> et de spectroscopie par résonance magnétique protonique (MRS)<sup>130</sup> ont permis de réellement démontrer que les triglycérides intramusculaires sont utilisés comme source d'énergie par le muscle en exercice. Il est également établi que la lipase sensible aux hormones (HSL) du muscle squelettique peut être activée par la contraction musculaire<sup>131</sup>, et que l'expression de la lipase des triglycérides adipeux (ATGL) est activée par l'entraînement<sup>132</sup>, deux lipases impliquées dans la lipolyse des

triglycérides en acide gras. Ces données fournissent ainsi un soutien supplémentaire à l'observation selon laquelle les acides gras provenant des gouttelettes lipidiques sont utilisés en tant que source d'énergie pour le muscle en exercice.

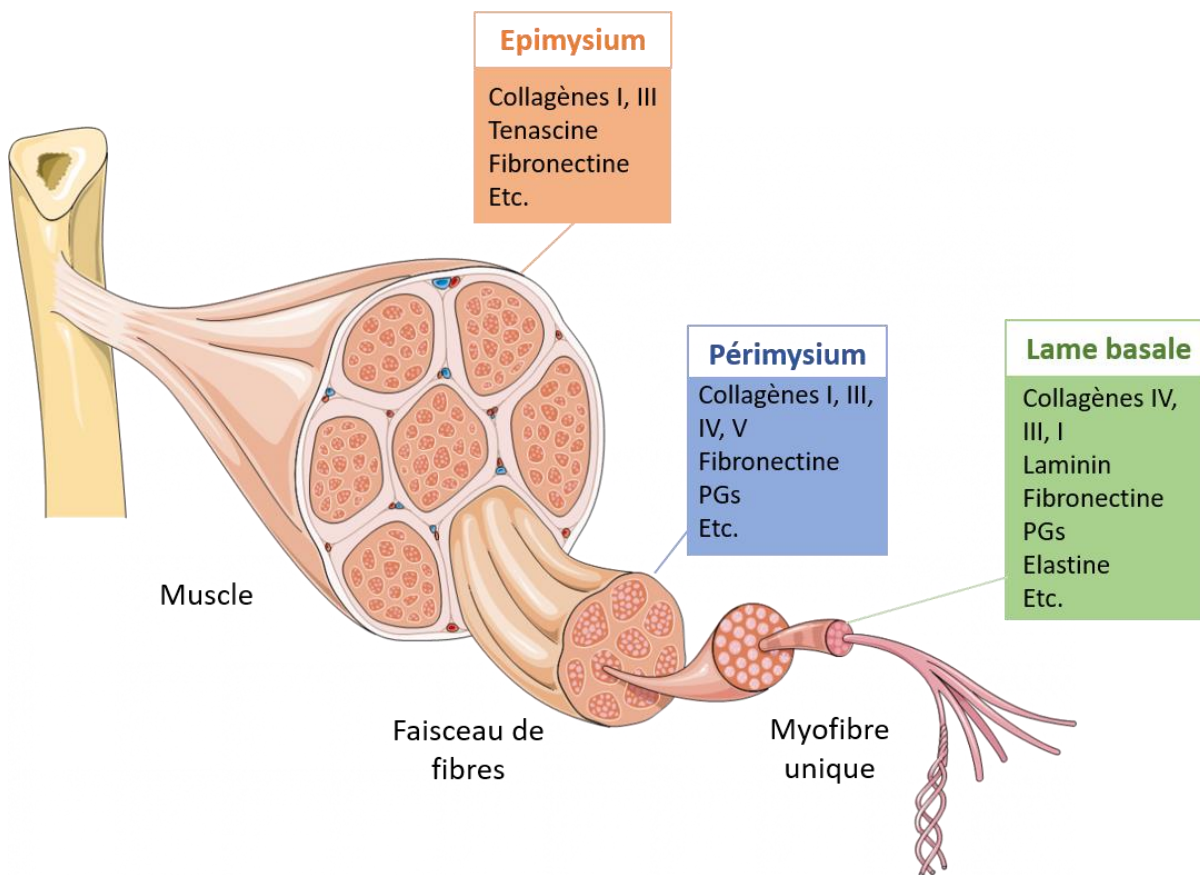
En situation physiologique, des études menées chez le rongeur ont aussi permis de proposer un rôle aux adipocytes intramusculaires en tant que fournisseurs énergétique nécessaire à la contraction musculaire au cours d'un exercice physique. Par exemple, chez des cobayes ayant suivi trois mois d'exercice physique la quantité de lipides intramusculaires est inférieure à celle quantifiée avant exercice alors que l'absorption du glucose par l'IMAT reste inchangée<sup>133</sup>. Les auteurs proposent que l'exercice physique entraîne la libération des lipides contenus dans le muscle qui serviront de substrat énergétique nécessaire à la contraction musculaire. En plus, chez les mêmes animaux, les quantités de lipides contenues dans l'IMAT diminuent fortement après l'exercice physique, suggérant un approvisionnement local en lipides aux fibres adjacentes nécessaires à leur contraction. Pour appuyer cette idée, une étude menée sur des adipocytes isolés de multiples dépôts adipeux différents chez le cochon d'inde a révélé que l'IMAT présente les taux de lipolyse les plus bas à l'état basal mais est capable de s'activer plus rapidement en réponse à une stimulation à la noradrénaline<sup>134</sup>, un neurotransmetteur relargué au niveau musculaire pendant la contraction et dont le rôle d'activateur de la lipolyse<sup>135</sup> est bien connu.

### c) La matrice extracellulaire (MEC)

Les fibres musculaires et les cellules du stroma musculaire sont organisées dans une structure tridimensionnelle composée de diverses protéines communément appelé matrice extracellulaire (MEC). Selon les études, le nom qui lui est attribué peut varier : on retrouve généralement les appellations « tissu interstitiel », « interstitium », « tissu conjonctif », « fascia » pour désigner le réseau matriciel au sein duquel se loge l'ensemble des composants cellulaires du muscle.

La MEC intramusculaire est structurée en différentes couches d'épimysium, péri-mysium et endomysium extrêmement dynamique composée de (Figure 5) :

**Collagènes.** Ce sont les composants prédominants de la MEC. Ils peuvent être sécrétés par trois types de cellules : fibroblastes, FAPs et progéniteurs musculaires<sup>136</sup>. La famille des collagènes est composée de vingt-huit isoformes<sup>137</sup>. Chacun possède une structure hélicoïdale formée, par l'association de 3 chaînes polypeptidiques, qui diffère selon l'isoforme. Chaque isoforme est présent dans des proportions différentes dans le muscle squelettique à l'état basal et présente des fonctions différentes. Pour n'en citer que quelques-uns, les collagènes de type I et III sont les plus abondants dans les péri/épi/endo-mysium du muscle et représentent environ 75% des collagènes totaux (Figure 5)<sup>138</sup>. Ils possèdent de bonnes performances biomécaniques de résistance à l'étirement. Le collagène de type IV est le composant majeur de la lame basale (Figure 5), plus proche des CS, et favorise la différenciation et la fusion des myoblastes. La perte de fonction de l'hélice  $\alpha 1$  dans un modèle murin *Col4 $\alpha$ 1* déficient entraîne une



**Figure 5 : Composition des différents tissus conjonctifs du muscle squelettique.** Le périnysium et l'endomysium ayant des compositions similaires, l'endomysium n'est pas représenté sur le schéma. Inspiré de Zhang et al. (2021)

infiltration anormale de dépôts matriciels intramusculaire qui conduit à une atrophie musculaire à long terme<sup>139</sup> démontrant le rôle majeur de ce composant de la MEC dans l'homéostasie musculaire.

- **Protéoglycanes.** Ils sont un composés d'un axe protéique et de plusieurs chaînes de glycosaminoglycanes<sup>140</sup>. Ils incluent les fibromodulines, les héparines sulfate glycosaminoglycanes (HSPG). Ils permettent de connecter le cytosquelette cellulaire aux autres composants de la MEC créant ainsi des interactions cellules/MEC et sont essentiellement présents dans la lame basale (Figure 5)<sup>141,142</sup>. Les HSPG ont été identifiées comme jouant un rôle dans la balance différenciation / auto-renouvellement de la CS puisque l'injection intramusculaire de chlorate entraînant la dégradation des HSPG entraîne un retard de prolifération des CS suite à une stimulation proliférative de type lésionnelle<sup>143</sup>.
- **Glycoprotéines.** Ce sont des macromolécules qui aident à stabiliser les liaisons entre les collagènes et les protéoglycanes<sup>140</sup>. La fibronectine et la laminine sont les deux principales glycoprotéines. La fibronectine est retrouvée au niveau de l'épi/peri/endomysium<sup>144</sup>. Elle est essentiellement sécrétée par des cellules de type fibroblastes/FAPs et induite par la signalisation TGF $\beta$  dans le muscle squelettique à l'état basal<sup>145</sup>. Elle favorise la différenciation et la fusion des CS. Par exemple, dans un modèle murin déficient en fibronectine, il a été montré une perte de fonction des CS, restaurée lorsque les niveaux de fibronectine sont récupérés<sup>146</sup>. La laminine est un composant essentiel de la lame basale (Figure 5) composée de 3 chaînes  $\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\gamma$ . Il existe 16 hétérodimères de laminine<sup>147</sup>. La laminine-1 favorise les adhésions entre la fibre musculaire et la lame basale permettant de maintenir cette matrice proche de la fibre et favorisant ainsi la prolifération et la migration des myoblastes. L'injection de laminine dans un modèle murin déficient dystrophique permet de stabiliser la lame basale et de ralentir l'apparition d'une atrophie musculaire<sup>148</sup>.

Alors qu'on l'a longtemps crue relativement inerte, les recherches actuelles révèlent que la MEC est impliquée dans de nombreux processus physiologiques importants du muscle squelettique. Au-delà de sa fonction initiale de support architectural des composants musculaires<sup>149</sup> ce réseau matriciel présente un rôle majeur mécanique dans la transmission de la force<sup>150</sup>. Le modèle traditionnel de transmission de force qui était considéré avant la description de la MEC décrivait des forces générées longitudinalement le long des fibres musculaires puis transmises aux tendons au niveau des jonctions myotendineuses<sup>151</sup>. Suite aux descriptions précises et détaillées de la fonction et structure de la MEC ce modèle a été révisé. On sait aujourd'hui que la MEC permet d'appliquer des forces latérales, perpendiculaires à celles des fibres musculaires, autorisant un meilleur alignement des fibres musculaire et une optimisation de la transmission longitudinale<sup>137</sup>.



## 2) Les fonctions principales du muscle squelettique

Après avoir examiné les différentes catégories cellulaires présentes dans le muscle squelettique à l'état basal, nous allons à présent nous concentrer sur les fonctions assurées par ce tissu. Nous allons ainsi explorer quatre fonctions essentielles du muscle : contraction musculaire, fonction métabolique, thermogénèse et fonction sécrétoire.

### a) La contraction musculaire

La contraction est la fonction fondamentale des muscles striés squelettiques, responsable du maintien, de l'évolution de la posture ainsi que des mouvements du squelette. Le processus de contraction est déclenché par une stimulation en provenance du système nerveux central, caractérisant ainsi une contraction volontaire liée à un système d'apport énergétique qui convertit l'énergie chimique en énergie mécanique.

La contraction du muscle squelettique débute au niveau de la jonction neuromusculaire (JNM), qui est la synapse entre un motoneurone et une fibre musculaire. La propagation des potentiels d'action de l'axone du motoneurone vers la JNM entraîne la dépolarisation de la membrane nerveuse permettant ainsi l'ouverture de canaux calciques ( $\text{Ca}^{2+}$ ) voltage-dépendants de la membrane présynaptique. L'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la terminaison axonale provoque la libération d'acétylcholine (ACh) dans la fente synaptique, qui se diffuse vers la membrane postsynaptique de la fibre musculaire, également appelée plaque motrice (Figure 2). L'ACh se lie aux récepteurs nicotiques situés sur la plaque motrice. Cette fixation conduit à l'ouverture des canaux qui à leur tour provoque l'entrée d'ions sodium dans le sarcoplasme. Ce processus entraîne la dépolarisation de la fibre musculaire initiant ainsi la propagation de potentiels d'actions le long de la membrane de la fibre musculaire. On parle alors de conversion d'énergie électrique en énergie chimique. Ensuite, le phénomène de couplage excitation-contraction, est responsable de la conversion de l'énergie chimique en énergie mécanique. La synchronisation de la contraction musculaire le long de la fibre est réalisée via les tubules T, ou tubules transverses.

Sur le plan moléculaire, la génération de force se produit en plusieurs étapes : suite à l'influx nerveux, les ions  $\text{Ca}^{2+}$  qui sont libérés dans le sarcoplasme entraînent un changement de conformation de la troponine, révélant les sites de liaison de la myosine sur les filaments d'actine. La tête de la myosine pivote vers le filament mince d'actine. L'adénosine triphosphate (ATP) disponible se lie à la myosine, dissociant brièvement la myosine de l'actine. L'activité ATPase de la myosine hydrolyse l'ATP en ADP (adénosine diphosphate) et  $\text{P}_i$  (phosphate inorganique) ce qui permet au filament de myosine de se relier à l'actine avec un angle plus important (Figure 2). La libération de  $\text{P}_i$  déclenche le coup de force. La tête de myosine tourne sur sa charnière, poussant le filament d'actine devant elle, en direction de la bande M, permettant un raccourcissement du sarcomère. À la fin du processus de contraction, la tête de myosine libère l'ADP et retrouve sa conformation initiale.

## b) Régulations métaboliques

Outre ses capacités contractiles, le muscle squelettique représente un site majeur de maintien de l'homéostasie énergétique de l'organisme. Il est responsable de 80% de l'absorption postprandiale du glucose dans la circulation<sup>152</sup>. Le transport du glucose à travers le sarcolemme s'effectue par le transporteur GLUT4 sensible à l'insuline<sup>153</sup>. Le métabolisme du glucose permet de satisfaire les besoins en ATP nécessaires à la contraction musculaire. Il peut se faire de manière aérobie lors d'un exercice physique peu intense comme la marche, ou de manière anaérobie dans un muscle en exercice intense et de courte durée comme un sprint. Au cours des différentes étapes de la glycolyse anaérobie, deux molécules d'ATP sont générées à partir d'une molécule de glucose et la dernière étape de la glycolyse anaérobie entraîne la conversion du pyruvate en lactate par la lactate déshydrogénase (LDHA/LDHB) permettant une production rapide d'énergie et de resynthétiser du NAD<sup>+</sup> nécessaire pour soutenir la glycolyse en continu<sup>154</sup>. Au cours de la glycolyse aérobie, le pyruvate est converti en acétyl CoA via le complexe de la pyruvate déshydrogénase (PDHA), et sera utilisé par le cycle de Krebs pour générer de l'ATP dans la matrice mitochondriale<sup>154</sup>. Ce dernier permet de générer davantage d'ATP que le métabolisme anaérobie mais de manière plus lente, et donc caractéristique des fibres lentes contrairement au métabolisme anaérobie caractéristique des fibres rapides de type IIx (Tableau 1)<sup>155</sup>.

Les lipides représentent aussi une source de substrats qui alimente le métabolisme oxydatif pour répondre aux besoins énergétiques soutenu par l'oxydation aérobie. Les lipides pénètrent principalement dans la cellule musculaire par l'intermédiaire de transporteurs d'acides gras tels que les translocases (par exemple, CD36) et de protéine de liaison associée à la membrane plasmique (par exemple, FABP3). La dégradation des lipides dans le muscle se produit principalement par le processus de  $\beta$ -oxydation des acides gras qui a principalement lieu dans les mitochondries des fibres de type I et IIa (Tableau 1)<sup>156</sup>. Elle commence par un processus d'hydrolyse des triglycérides en acides gras libres (et glycérol), appelé lipolyse, par l'intermédiaire de trois lipases successives : l'ATGL<sup>157</sup> (adipose triglycéride lipase), la LHS<sup>158</sup> (hormone sensitive lipase) et la MGL<sup>159</sup> (monoacylglycerol lipase) responsables respectivement de l'hydrolyse des triglycérides en diacylglycérol puis en monoacylglycérol, libérant à chaque étape un acide gras libre. Un groupe CoA est ensuite ajouté à chaque acide gras par l'acyl-CoA synthase formant ainsi de l'acyl-CoA à longue chaîne. L'acyl-CoA entre alors dans la voie de la  $\beta$ -oxydation pour former (1) de l'acétyl-CoA qui sera utilisé dans le cycle de Krebs pour produire de l'énergie sous forme d'ATP de la même manière que décrite précédemment pour le métabolisme du glucose aérobie et (2) du FADH et du NADH dont les électrons alimentent la chaîne respiratoire mitochondriale aboutissant également à la formation d'ATP<sup>152</sup>. Le métabolisme oxydatif basé sur les  $\beta$ -oxydations des acides gras est considéré comme un métabolisme lent qui produit de grosses quantités d'énergie nécessaires pour la contraction des fibres de type I lors d'effort long et peu intenses.



### c) La thermogénèse

En plus d'être une machine contractile et métabolique, le muscle squelettique joue un rôle central dans la régulation homéostatique de la température corporelle résultant de la balance entre la thermogénèse et la thermolyse. La thermogénèse peut prendre deux formes différentes: la thermogénèse de frisson<sup>160</sup> et la thermogénèse de non frisson<sup>161</sup>.

Le muscle squelettique est considéré comme un centre majeur de la thermogénèse et utilise ses capacités de contraction et métaboliques dans un objectif de production de chaleur que nous allons décrire maintenant. Dans un objectif de production de chaleur, l'organisme déclenche de manière spontanée et involontaire des contractions musculaires répétées de faibles intensité. Le mécanisme est similaire à celui de la contraction musculaire en puisant dans les réserves locales glycolytiques et lipidiques et en dissipant l'énergie sous forme de chaleur<sup>160</sup>.

Le « mécanisme classique » de la thermogénèse de non-frisson est principalement décrit dans le tissu adipeux brun et implique la protéine découplante UCP1 exprimée au niveau du feuillet interne de la membrane mitochondriale. Elle assure le découplage entre la chaîne respiratoire mitochondriale et la phosphorylation oxydative, et permet une oxydation très active du glucose et des acides gras pour générer de la chaleur<sup>162</sup>. Dans le muscle, la thermogénèse sans frisson est un processus métabolique indépendant d'UCP1. Les myocytes expriment l'homologue d'UCP1, UCP3 qui est capable de découpler la phosphorylation oxydative des mitochondries mais la démonstration directe de son implication dans la production de chaleur reste à ce jour controversée<sup>163</sup>. Par ailleurs, le muscle squelettique peut produire de la chaleur via un cycle « futile » de calcium. Une sortie de calcium du réticulum sarcoplasmique est provoquée par l'ouverture des récepteurs à la ryanodine (RyR)<sup>164</sup>. Pour maintenir les niveaux de Ca<sup>2+</sup> cytosoliques stable il est observé l'activation d'une protéine appelée SERCA (sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase), située à la membrane du réticulum sarcoplasmique et qui propulse le Ca<sup>2+</sup> à l'intérieur du réticulum sous l'effet de l'hydrolyse de l'ATP produisant ainsi de la chaleur<sup>161</sup>. Ce phénomène appelé « glissement de Ca<sup>2+</sup> » est un processus régulé par une protéine appelée SLN (Sarcoplipine), un activateur endogène de la SERCA<sup>165</sup>. Ce mécanisme permet au muscle de générer de la chaleur instantanément en réponse au froid et de maintenir la température corporelle sans provoquer de tremblements musculaires visibles.

### d) Fonctions sécrétoires

Nous allons maintenant terminer ce chapitre par la description d'une quatrième fonction du tissu musculaire en s'attardant sur ses capacités sécrétoires et leurs actions à différents niveaux de l'organisme.

Il est maintenant établi que les fibres musculaires mais aussi les différents acteurs du stroma musculaire possèdent des capacités de sécrétion comprenant un large éventail de cytokines et de peptides appelés myokines, qui exercent des effets locaux et à distance permettant le

bon fonctionnement du muscle mais aussi établissant un dialogue avec d'autres tissus/organes à distance<sup>166</sup>. On distingue alors :

- Les **sécrétions locales qui agissent de manière auto/para-crine** pour réguler la fonction musculaire. Par exemple, le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) est un membre de la famille des neurotrophines, fortement exprimé dans le cerveau et plus faiblement dans le muscle squelettique<sup>167</sup>. Les niveaux de BDNF augmentent dans le muscle squelettique en réponse à l'exercice, contribuant ainsi à une oxydation accrue des acides gras en activant l'AMPK<sup>168</sup>. Cependant, le BDNF musculaire n'est pas retrouvé dans la circulation sanguine après exercice chez l'homme, ce qui indique que le BDNF agit principalement de manière autocrine et/ou paracrine. En plus des effets sur les propriétés métaboliques oxydatives, les sécrétions de BDNF musculaire s'étendent à la myogenèse, en favorisant la prolifération des CS *in vivo*<sup>169</sup>. En effet, dans un modèle murin pour lequel l'expression génique de BDNF musculaire est réprimée il a été observé une diminution du nombre de CS Pax-7<sup>+</sup><sup>169</sup>. D'autres **sécrétions locales**, dites **paracrines** permettent d'établir une communication avec le stroma. En réponse à l'activité physique, les niveaux intramusculaires de follistatine augmentent rapidement<sup>170</sup>. Plusieurs types cellulaires sont capables de la sécréter, dont les fibroblastes/FAPs<sup>54,171</sup>. La follistatine agit comme un antagoniste de l'activine A, supprimant ainsi les effets de l'activine A sur SMAD2/3, inhibant l'entrée du glucose dans les fibres musculaires régulant ainsi le métabolisme glycolytique du muscle<sup>170</sup>. De plus, la follistatine induit la différenciation en adipocytes et régule le métabolisme énergétique dans des cultures primaires de fibroblastes embryonnaires murins<sup>172</sup>.
- **Les sécrétions endocrines**, libérées dans la circulation sanguine agissent comme des médiateurs permettant d'établir une communication avec d'autres organes. Par exemple, la myostatine (MSTN, un membre de la superfamille des TGF- $\beta$ ) sécrétée par les cellules musculaires, joue un rôle de régulation du développement de la masse musculaire puisque les souris déficientes pour MSTN présentent une hypertrophie et hyperplasie des fibres musculaires déterminé par des approches histologiques<sup>173</sup>. Ces premiers résultats décrivent un rôle auto/paracrine de la MSTN, néanmoins, il a été démontré chez les mêmes animaux déficients une réduction de la masse grasse des différents dépôts adipeux murins, suggérant alors un effet endocrinien de la MSTN. Des approches *in vitro* ont également démontré une inhibition de la différenciation des préadipocytes 3T3-L1 ainsi qu'une diminution de l'expression des différents marqueurs adipogéniques tels que le récepteur activé par les proliférateurs de peroxydases  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), la protéine CCAAT-enhancer-binding  $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ ), la protéine adipocytaire 2 (aP2) et la leptine<sup>174</sup>.

Ces myokines exercent des effets autocrines, paracrines et/ou endocrines, conférant ainsi au muscle squelettique le statut d'organe endocrinien<sup>175</sup>.

Ayant exploré les différentes structures et fonctions du tissu musculaire dans un état physiologique dans ce premier chapitre, nous allons maintenant explorer les modifications de

ces divers paramètres observées lors du processus de régénération musculaire physiologique, induit par une lésion.

#### **Le tissu musculaire à l'état basal :**

- Le parenchyme du muscle squelettique est formé de fibres musculaires organisées en faisceaux et séparées par des tissus matriciels qui renferment la plupart des cellules du stroma musculaire.
- Les FAPs constituent une population de MSCs résidentes du stroma musculaire qui présente une certaine hétérogénéité et dont chaque sous-population semble avoir une fonction déterminée.
- Il n'existe pas de marqueur unique et spécifique de la population de FAPs qui permettrait de les distinguer des autres types cellulaires du stroma, il est donc nécessaire d'utiliser une combinaison de marqueurs de surface pour les identifier.
- On observe au sein du muscle la présence d'adipocytes intramusculaires, dits ectopiques, dont l'origine et la fonction physiologique sont encore discutées aujourd'hui.

## II/ La régénération physiologique du muscle

Dans le fonctionnement normal du muscle squelettique, les forces mécaniques générées par les contractions constantes exposent le tissu à des lésions. Chez l'homme, une classification des différents types de lésions musculaires a été décrite dans le livre « Muscle traumatique et mécanique » par A. Durey et J. Rodineau selon plusieurs études réalisées chez des sportifs. Les lésions musculaires sont alors classées par ordre croissant de gravité, fondé sur des critères histologiques (nombre de fibres musculaires impactées / atteinte du tissu conjonctif / présence d'un hématome) déterminés par échographie et/ou IRM :

- **Stade 0** : atteinte réversible de la fibre musculaire sans atteinte du tissu conjonctif de soutien – récupération totale en quelques heures
- **Stade 1** : atteinte irréversible de quelques fibres musculaires aboutissant à leur nécrose sans atteinte du tissu conjonctif de soutien – récupération totale en quelques jours
- **Stade 2** : atteinte irréversible d'un nombre réduit de fibres musculaires et atteinte minimale du tissu conjonctif de soutien (élongation) – récupération qui peut être obtenue en une dizaine de jours
- **Stade 3** : atteinte irréversible de nombreuses fibres musculaires, atteinte marquée du tissu conjonctif de soutien et formation d'un hématome intramusculaire localisé (déchirure/ claquage) – récupération en 4 à 12 semaines
- **Stade 4** : rupture ou désinsertion musculaire complète récupération longue mais variable selon le muscle touché – récupération en plusieurs mois

Quel que soit le type de blessure, une récupération fonctionnelle du muscle a lieu dans des délais qui peuvent varier en fonction du degré d'atteinte. Contrairement à de nombreux autres tissus, le muscle possède une capacité unique à se réparer complètement par un **processus de régénération**. La régénération musculaire implique une interaction complexe entre les composants du parenchyme et du stroma qui sont modifiés suite à une lésion. Malgré les nombreuses études menées sur ce sujet, la compréhension de cette collaboration reste encore incomplète. Dans le but de mieux comprendre les mécanismes qui contrôlent la régénération et d'identifier les verrous qui sont mis en place dans les cas de dégénérescences pathologiques, des modèles expérimentaux ont été développés.

Dans ce chapitre nous commencerons par détailler les différents modèles de lésions musculaires murins qui ont été développés dans le but de mimer le processus de régénération puis nous aborderons les différents acteurs cellulaires et acellulaires du muscle impliqués dans ce processus.

### 1) Les modèles de régénération

Tous les modèles de lésions ont en commun une destruction de la fibre musculaire mais se différencient sur les atteintes des autres structures, comme la JNM et la lame basale (LB). Ces différences peuvent conduire à des processus de régénération différents que nous allons détailler dans cette partie. On distingue différents types de modèles (Tableau 3) :

- **Lésions musculaires aiguës provoquées par injection de myotoxines** ; elles agissent sur des cibles structurales différentes (Tableau 3). Par exemple, la taipoxine (TPX), la toxine botulique A (BTX/A) ou la cardiotoxine (CTX) se fixent au niveau des jonctions neuromusculaires (JNM). Cette fixation peut entraîner une inhibition du relargage des neurotransmetteurs dans la fente synaptique (cas de la BTX/A) et ne conduit pas directement à la destruction des fibres. Ou alors, elle conduit à une dépolarisation membranaire induite par un influx calcique activant un phénomène d'autophagie à la fois des cellules nerveuses et musculaires (cas de la TPX, NTX et CTX). Ensuite, selon la myotoxine utilisée, la nature et la cinétique des cellules impliquées dans le processus de régénération peut varier. Plusieurs études comparatives ont été réalisées dans le but de déterminer les différences observées dans le processus de régénération de ces différents modèles<sup>116,176-179</sup> (Tableau 3). Dans l'ensemble, ces études chez la souris s'accordent sur le fait d'une récupération fonctionnelle et morphologique du muscle autour du 28<sup>ième</sup> jour après la lésion (jpl) pour l'utilisation des modèles CTX, NTX et TPX.

| Modèle de lésion   | Mécanisme lésionnel   | Cinétique de régénération  | Réf             |
|--|---|--|-----------------|
| <b>Lésions par injection de myotoxines</b>   |   |  |                 |
| <b>Notexine (NTX)</b><br>(Peptide neurotoxique de la famille des phospholipases A2 extrait du venin du serpent tigre)              | Fixation au sarcolemme et hydrolyse des phospholipides membranaires augmentant la perméabilité. Influx de calcium. Destruction des fibres. Bloque la JNM. N'affecte pas LB.                   | Régénération efficace en 28 jpl sur le plan histologique. Taux de cellules immunitaires encore élevé 1 mois après la lésion.   | 181             |
| <b>Cardiotoxine (CTX)</b><br>(Peptide inhibiteur spécifique des protéines kinases C extrait du venin du cobra cracheur à cou noir) | Fixation sur la JNM. Activation des protéases calciques. Influx de calcium dans le sarcoplasme. Dépolarisation des membranes plasmiques puis rupture des membranes. N'affecte pas LB.         | Début de la phase de régénération à 7 jpl. Forte densité de fibres musculaires centronucléées. Dépôt fibrotique transitoire à partir de 7 jpl. Récupération structurelle efficace à 28 jpl.  | 176,184,191     |
| <b>Taipoxine (TPX)</b><br>(idem NTX)   | Bloque la JNM et lyse des membranes plasmiques des fibres.  | Très similaire à la régénération NTX   | 181             |
| <b>Botulinium Toxine A (BTX/A)</b><br>(Peptide neurotoxique sécrété par <i>Cl. botulinum</i> )                                     | Bloque le relargage des neurotransmetteurs de la JNM, paralysie puis atrophie. N'affecte pas directement la fibre musculaire ni la LB.  | Paralysie musculaire jusqu'à 4 semaines après l'injection. Dégénérescence rapide des JNM et progressive des fibres musculaires.  | 180             |
| <b>Lésions par injections d'agents chimiques</b>   |   |  |                 |
| <b>BaCl2</b>   | Interférence avec les canaux calciques. Entraîne une surcharge calcique dans le sarcoplasme et rupture des membranes plasmiques. Induit une fragmentation de la JNM mais n'affecte pas la LB. | Comparable lésion CTX. Pas de dépôt fibrotique. Régénération structurelle efficace en 28 jours.  | 176,177,183     |
| <b>Glycérol</b>  | Choc osmotique, augmentation de la pression intramusculaire et rupture des membranes plasmiques des fibres et de la LB.   | Comparable lésion CTX. Dépôts adipeux autour de 7 jpl. Plus faible densité et organisation des myotubes sur les phases précoces de la régénération, récup. structurelle en 28 jours.   | 110,116,178,182 |
| <b>Lésions mécaniques</b>  |   |  |                 |
| <b>Pincement</b>   | Rupture mécanique des fibres musculaires affectant les fibres neuronales de la JNM. N'affecte pas la LB   | Activation rapide du processus de régénération. Fibres centronucléées présentes de 6 à 14 jpl.   | 185             |
| <b>Lacération</b>  | Rupture mécanique des fibres musculaire. Rupture locale de la LB.   | Récupération fonctionnelle lente, récupération de 80% de la force de contraction 1 mois post-lésion.   | 186             |
| <b>Exercice (chronique)</b>  | Dommages localisés au niveau des sarcomères. JNM et LB non affectés.  | Premiers dégâts observés dès 30min et réparation effectuée à 96h. Pas d'activation/prolifération et fusion des cellules satellites. Migration des noyaux de la fibre vers la zone affectée.  | 177,187         |
| <b>Stimulation électrique du système neuromusculaire</b>   | Sensiblement identique aux dommages subis lors d'un exercice physique. Pas d'atteinte de la LB.   | Premières fibres lésées à partir de 2 jpl et régénération complète en 7 jours. Augmentation du nombre des CS jusqu'à 7 jpl et des cellules immunitaires jusqu'à 14 jpl.  | 190,192         |
| <b>Lésions par le froid</b>  |   |  |                 |
| <b>Cryolésion</b>  | Dégradation des fibres et des cellules mononucléées présentes dans la zone touchée (nécrose). Destruction des JNM et de la LB.  | Formation d'un front de lésion qui progresse de la périphérie vers l'intérieur de la « dead zone ». Phases précoces de la régénération retardées: faible prolifération des CS et revascularisation. Régénération structurelle en 28 jours. | 176             |
| <b>Lésions ischémiques</b>   |   |  |                 |
| <b>Ischémie/reperfusion de l'artère fémorale</b>   | Destruction du réseau de capillaires sanguins du muscle. Nécrose des fibres musculaires et des cellules qui sécrètent la LB en 4h, des neurones (JNM) en 8h.                                  | Régénération lente. A 14 jpl, taille des fibres musculaires très inférieure à celle retrouvée pour les modèles utilisant des myotoxines. A 56 jpl, force maximale musculaire non récupérée.  | 188,189         |
| <b>Lésions ex vivo</b>   |   |  |                 |
| <b>In vitro/Ex vivo lésion au laser sur fibre unique</b>   | Dommages localisés au niveau des sarcomères.  | Migration des noyaux de la fibre vers la zone de la fibre affectée.  | 187             |

**Tableau 3 : Les différents modèles de lésions musculaires.**

En revanche, le modèle BTX/A présente une cinétique de régénération musculaire beaucoup plus lente puisqu'à 28 jpl la taille des fibres musculaires reste largement inférieure à celle observée pour les modèles CTX ou NTX<sup>180</sup>. Un mois après une lésion provoquée par l'injection de NTX, les nombres de vaisseaux sanguin et de cellules immunitaires intramusculaires sont largement supérieures à ceux observés pour une lésion CTX<sup>176,181</sup>, suggérant des mécanismes de régénération différents en réponse à des cibles moléculaires différentes (la CTX est un inhibiteur de protéines kinases C tandis que la NTX ou la TPX sont des phospholipases) (Tableau 3).

- **Lésions musculaires par injection d'agents chimiques.** Parmi ces modèles, les deux plus couramment utilisés sont l'injection de glycérol ou de BaCl<sub>2</sub> (Tableau 3). Le glycérol provoque un choc osmotique qui entraîne une augmentation brutale de la pression intramusculaire entraînant à la fois une rupture du sarcolemme des fibres musculaires et de la lame basale (LB)<sup>182</sup>. Le BaCl<sub>2</sub> interfère avec les canaux calciques présents à la surface du sarcolemme entraînant une surcharge intra cytosolique de calcium et une rupture des membranes. En revanche ce type d'injection n'affecte pas la LB. En terme de cinétique de régénération, ces deux modèles sont comparables avec ce qui est retrouvé pour les lésions utilisant des myotoxines : une régénération morphologique et fonctionnelle qui s'effectue autour de 28jpl<sup>176,178,183</sup>. En revanche, la nature des cellules impliquées semble être différente (Tableau 3). En effet, une lésion provoquée par l'utilisation de cardiotoxine (CTX) entraîne la formation de dépôts fibrotiques transitoires autour de 7 jpl<sup>176,184</sup> tandis qu'il est rapporté la présence de dépôts adipeux suite à une lésion par injection de glycérol<sup>110,116,178</sup>. Une lésion provoquée par l'injection de BaCl<sub>2</sub> est comparable avec une lésion CTX : il a été observé une prolifération de CS, de cellules immunitaires et endothéliales identiques à 18 heures, 2, 4, 30 jpl dans les deux modèles<sup>176</sup> (Tableau 3).
- **Lésions musculaires par induction mécanique** englobent différents types de blessures qui peuvent affecter soit directement les fibres musculaires par l'exertion d'une force mécanique extérieure, soit la réalisation d'un exercice physique prolongé. Parmi les modèles qui agissent directement sur les fibres musculaires, on trouve les lésions par pincement et les lacérations, qui entraînent une destruction importante des fibres ainsi qu'une rupture de la LB. Dans ces cas, la récupération de la morphologie initiale des fibres est lente et la fonction contractile du muscle n'est pas pleinement récupérée même 1 mois après la lésion<sup>185,186</sup> (Tableau 3). Dans le cas d'un exercice physique chronique intense (55 min de course sur tapis à 18m/min chez la souris et 40 min à 60% VO<sub>2max</sub> chez l'homme), des études montrent une apparition de dommages au niveau des sarcomères dès 30 minutes après le début de l'exercice, sans atteinte de la LB ni de la JNM<sup>177,187</sup>. Ces dommages sont quantifiés par immunofluorescence à l'aide d'un marquage anti-Filamin C, une protéine structurale de la fibre musculaire qui s'accumule localement au niveau des ruptures membranaires. Dès 48 heures après



l'arrêt de l'exercice, il a été observé une diminution d'un facteur 3 du marquage Filamin C.

- **Lésion musculaire par ischémie.** Elle consiste à ligaturer une artère qui irrigue un muscle pendant quelques heures (généralement 3 heures)<sup>188,189</sup> afin de limiter transitoirement l'apport en oxygène et nutriments dans le muscle et induire une mort cellulaire par nécrose. Ces modèles induisent de gros dommages et affectent toutes les cellules i.e à la fois les fibres musculaires, les JNM et les cellules qui sécrètent la LB (fibroblastes/FAPs et progéniteurs musculaires). La régénération est très lente, à 56 jpl la récupération fonctionnelle du muscle n'a toujours pas été effectuée<sup>188,189</sup> (Tableau 3). C'est pour cette raison que les modèles d'ischémie ne sont pas autant utilisés que les modèles d'injections de myotoxines ou d'agents chimiques dans la littérature.
- **Lésions musculaires par induction thermique ou cryolésion.** Par l'utilisation d'une lame de scalpel refroidie à l'azote liquide, les cryolésions ont un effet sur l'ensemble des cellules présentes dans la zone touchée, lame basale comprise (fibres musculaires et cellules mononucléés). Ce type de lésion entraîne une régénération efficace en 28 jours, comparable à l'utilisation d'agents chimiques et toxines (Tableau 3). Cependant, le processus de régénération semble différent. On observe la formation d'un front de régénération principalement constitué de cellules immunitaires qui progressent de la périphérie vers le centre de la zone lésée<sup>176</sup>. De plus, les phases très précoces de la régénération semblent décalées, avec un retard de prolifération des CS et une revascularisation plus tardive<sup>176</sup>.

Une critique majeure concernant l'ensemble des modèles de lésions musculaires utilisés aujourd'hui réside dans leur caractère extrême et leur éloignement par rapport aux lésions que l'on observe chez l'homme et que nous avons énuméré au début de ce chapitre. Cependant, certaines études ont tenté de pallier ces limites en proposant de reproduire des microlésions chez la souris (Tableau 3). C'est le cas des études menées par Pessina et al. (2014) et Roman et al. (2021) qui ont provoqué des micro lésions induites par l'exercice chronique chez la souris<sup>177,187</sup>. Grâce à ces modèles, ils ont pu observer des cinétiques et des mécanismes de régénération supplémentaires à ceux décrits précédemment. En effet, ils ont décrit un mécanisme de régénération indépendant de l'activation des CS, mais reposant plutôt sur la migration des noyaux des fibres musculaires elles-mêmes vers le site lésé. Le blocage de cette migration nucléaire entraîne un retard dans le processus de régénération, soulignant ainsi l'importance de ce mécanisme pour la réparation des microlésions. De même, en 2021, Roman et al. ont développé un modèle de lésions de fibres musculaires unique *ex vivo* par l'utilisation d'un laser<sup>187</sup>. A l'aide de ce modèle, ils ont également observé une migration nucléaire essentielle au processus de régénération. Plus récemment, un modèle de lésion musculaire par cycles répétés de contractions musculaires induite électriquement a été développé<sup>190</sup>. Ce modèle présente l'avantage de reproduire les contractions musculaires violentes présentes lors d'un exercice physique tout en évitant les contraintes des modèles d'exercices physique chez les rongeurs. Au sein de ce modèle ils ont observé les premières lésions des fibres musculaires par immunofluorescence à partir de 2 jpl et une régénération complète du muscle

à 7 jpl. Le processus de régénération est donc plus rapide que les modèles d'injection de myotoxines ou d'agents chimiques.

Maintenant que nous avons passé en revue l'ensemble des modèles de lésions développés chez la souris et décrit leurs spécificités, nous allons aborder le rôle des différentes populations cellulaires impliquées dans le processus de régénération physiologique.

## 2) Les acteurs de la régénération musculaire

Nous commencerons cette partie en décrivant le rôle des cellules souches du muscle au cours du processus de régénération et nous détaillerons ensuite l'implication des chaque autre acteurs cellulaires ou acellulaire en mettant en avant le dialogue de chacun d'eux avec la CS.

### a) Le rôle central des cellules satellites

La CS est l'unique progéniteur musculaire responsable de la formation de nouvelles fibres musculaire au cours du processus de régénération. Ce processus repose des phénomènes séquentiels intervenant au fur et à mesure du processus de myogenèse avec en premier lieu l'activation des progéniteurs, leur différenciation puis leur fusion.

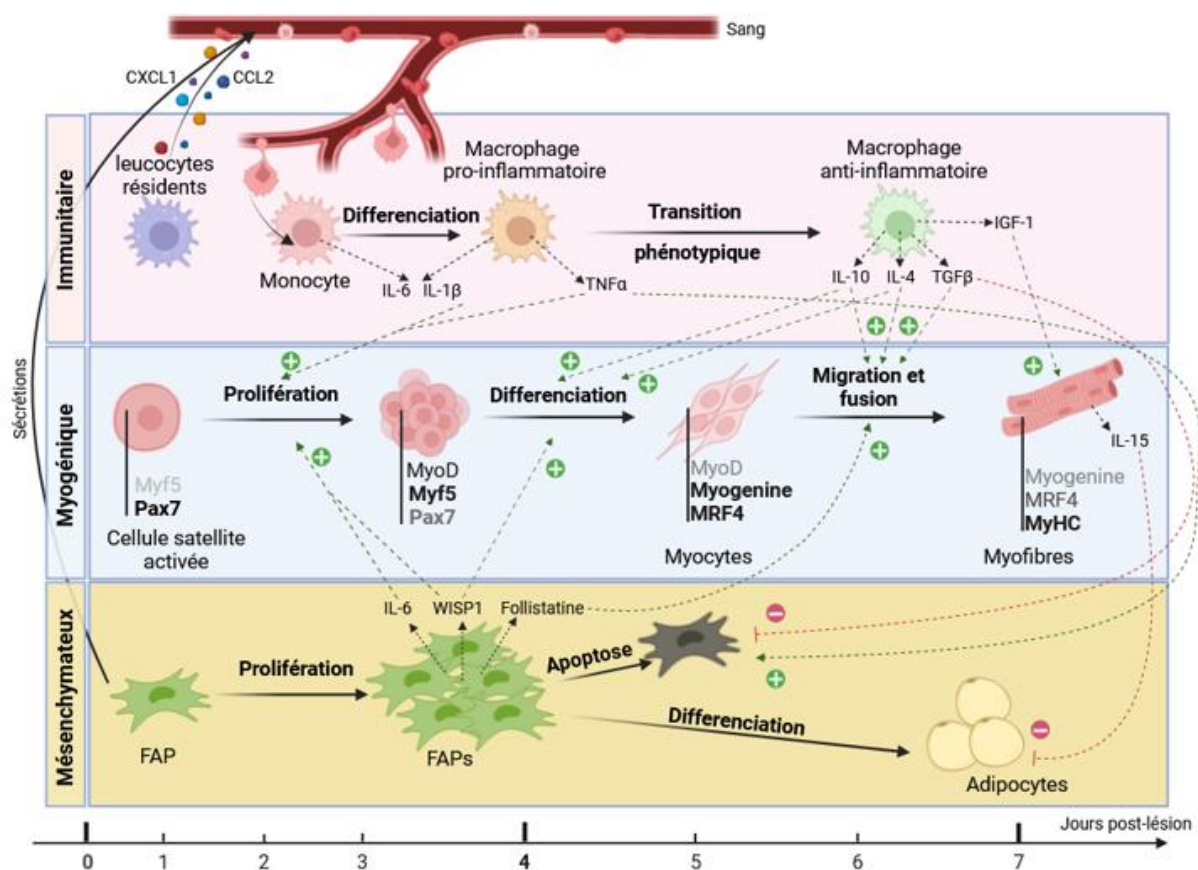
#### *Activation et prolifération des cellules satellites*

Une lésion musculaire entraînant la rupture de la fibre, induit la sortie des CS de leur état quiescent, elles sont alors activées et prêtes à proliférer. Ces mécanismes d'activation et prolifération des CS s'effectuent en réponse à des signaux, structurels et chimiques, émis suite au changement de leur environnement.

Les changements conformationnels engendrés par la lésion perturbent l'adhésion des CS au sein de leur niche dès les premières heures après la lésion. Plus particulièrement, la rupture des jonctions N-cadhérines et M-cadhérines responsables de l'adhésion des CS à la fibre musculaire régule la transition quiescence/activation des CS suite à une lésion (Figure 4)<sup>191</sup>. On pourrait alors penser qu'en fonction du type de lésion et donc de la structure affectée il puisse y avoir des réponses prolifératives différentes des CS. Par exemple, une lésion par injection de glycérol entraîne la rupture à la fois de la lame basale et de la membrane plasmique de la fibre musculaire (Tableau 3) entre lesquelles se situent les CS. A contrario, une lésion par injection de CTX entraîne uniquement une rupture de la membrane plasmique des fibres (Tableau 3). Or, l'activation et la prolifération des CS qui suit ces deux types de lésions ne présente aucune différence au cours des 21 jours qui suivent la lésion<sup>116</sup>. Ces travaux permettent d'en déduire que la fixation de la CS du côté de la membrane plasmique de la fibre joue bien un rôle dans cette activation mais que les signaux mécaniques ne sont pas les seuls responsables de la transition quiescence/activation des CS.

Effectivement, plusieurs facteurs sécrétés ont été identifiés *in vivo* et *in vitro* comme étant impliqués dans l'activation et la prolifération des CS. C'est le cas de nombreux facteurs de croissance comme le facteur de croissance de l'hépatocyte (HGF)<sup>192,193</sup>, les facteurs de croissance à l'insuline (IGF)<sup>194</sup> et les facteurs de croissance des fibroblastes (FGF)<sup>195</sup> (Figure 4).





**Figure 6 : Régulations intrinsèques et extrinsèques de l'entrée dans le programme myogénique des cellules satellites au cours du temps post-lésion musculaire.** Les compartiments immunitaires (rose), myogéniques (bleu), mésochymateux (jaune) et sanguin (rouge) sont représentés et les populations cellulaires de chacun figurent au cours du temps après la lésion musculaire. Les flèches vertes correspondent à des sécrétions activatrices tandis que dans les flèches rouges sont inhibitrices. Les flèches noires désignent des sécrétions à l'origine du recrutement des monocytes circulants. Inspiré de Molina et al. (2021)

Ces derniers, notamment les FGF2 (ou bFGF) et FGF6 sont par exemple aujourd'hui largement utilisés dans les milieux de culture pour maintenir la prolifération des CS. Pour permettre leur cascade d'activation, ces facteurs nécessitent la présence de co-facteurs tels que les héparanes sulfates pour se fixer au récepteur FGFR exprimé à la surface des cellules satellites. Une fois fixés, ils permettent l'activation de différentes voies de signalisation dont la voie PI3K-Akt<sup>196</sup> conduisant à l'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire.

Au cours de leur prolifération, les CS peuvent réaliser deux types de division cellulaire différentes : une division symétrique aboutissant à la formation de deux cellules filles identiques et une division asymétrique menant à la formation d'une nouvelle cellule souche ainsi qu'une autre cellule destinée à se différencier en cellule musculaire mature<sup>197</sup>. Ce type de division permet de maintenir le pool de CS souche à l'état quiescent tout en conservant les capacités de différenciations nécessaires au processus de régénération.

#### *Différenciation et fusion des cellules satellites*

Après plusieurs cycles de divisions, les CS sortent du cycle cellulaire et entament leur différenciation. En culture les CS ont besoin d'une quantité importante de sérum pour maintenir leur prolifération et la privation en sérum constitue un signal clé pour l'entrée des CS en différenciation. Des approches *in vitro* et *in vivo* chez la souris et chez l'Homme, ont permis d'établir différents niveaux de régulation de l'activité de la CS aboutissant à leur différenciation en myoblastes :

- **Régulation transcriptionnelle** ; au cours du processus de régénération, les CS expriment de manière séquentielle différents gènes régulant la différenciation myogénique (MRF). Notamment, les facteurs transcriptionnels Myf5, MyoD, Mrf4 et la myogénine, déterminent le contrôle séquentiel du développement myogénique (Figure 6)<sup>198</sup>. A l'état quiescent, les SC expriment Pax-7 sans exprimer les MRFs. Lorsque les SC sont activées et prolifèrent, l'expression de Pax-7 diminue et les MRF commencent à être exprimés. Lorsque la prolifération laisse place à la différenciation, les premiers myoblastes formés expriment MyoD et Myf5 dès 48h après la lésion<sup>193</sup>, tandis que Pax-7 est faiblement exprimé<sup>72,199</sup>. Entre 4 et 5 jpl, les myoblastes se différencient en myocytes exprimant à la fois la myogénine et MRF4<sup>200</sup>, avant de fusionner vers 7 jpl pour former des myotubes multinucléés et restaurer les fibres musculaires affectées par la lésion (Figure 6, compartiment myogénique). Des analyses génomiques ont permis de révéler les cibles géniques des MRFs et ont montré que MyoD permet l'expression à la fois de l'actine et la myosine<sup>201,202</sup>, deux protéines structurant les sarcomères et nécessaires à la fonction contractile. La perte génétique de ces différents MRFs perturbe drastiquement la différenciation des CS à la fois *in vitro* et *in vivo*<sup>68,203,204</sup>, soulignant ainsi leur importance dans la régulation du programme myogénique.
- **Régulation métabolique** ; de façon originale, des travaux récents chez la souris ont identifié l'importance de l'accumulation de lipides sous forme de micro gouttelettes au sein des CS corrélée à leur pouvoir régénératif<sup>205</sup>. Dans cette étude, les auteurs ont favorisé l'accumulation des lipides spécifiquement dans les CS en inhibant le

catabolisme lipidique, par l'inhibition *in vivo* de l'ATGL dans un modèle murin Pax7<sup>CreERT2</sup>;Pnpla2<sup>flox/flox</sup> avec lequel ils ont pu montrer un épuisement du pool de CS quiescentes. En revanche, l'inhibition pharmacologique de la biogénèse des gouttelettes lipidiques bloque leur engagement dans le programme myogénique représentant un frein pour la régénération musculaire<sup>205</sup>. Les CS qui accumulent faiblement ces gouttelettes lipidiques correspondent aux cellules restant dans un état de quiescence et celles qui en accumulent fortement s'engagent dans la différenciation, soulignant ainsi l'importance de l'accumulation lipidique sous forme de microgouttelettes dans le processus de régénération.

- **Régulation par les sécrétions de l'environnement** ; le microenvironnement de la CS, aussi appelé niche, joue un rôle majeur dans la régulation de son activité<sup>206</sup>. Les interactions physiques ainsi que les signaux moléculaires provenant de la niche jouent un rôle essentiel pour une régénération efficace<sup>206,207</sup>. De plus, des études récentes suggèrent que les CS ne sont pas uniquement des récepteurs passifs des signaux de la niche, mais qu'elles émettent également des signaux actifs qui régulent les cellules avoisinantes<sup>208</sup>.

Lors des étapes de fusion, les interactions cellules-cellules via les molécules d'adhésion M-cadhérines et N-cadhérines contrôlent l'alignement par contact des myoblastes<sup>209,210</sup>. Les protéines myomaker et myomixer ont été identifiées comme responsables de l'initiation de la fusion et la formation du pore membranaire nécessaire à la fusion des myoblastes<sup>211</sup>. L'ablation génétique de ces gènes conduit à une absence de fusion des cellules myogénique de la lignée C2C12 en culture et un défaut de formation musculaire chez le poisson zèbre<sup>212</sup>, soulignant ainsi l'importance de ces protéines dans le processus de fusion des myoblastes au cours de la formation de fibres musculaires.

Sur un plan histologique, lorsque les myocytes fusionnent entre eux ou avec une fibre musculaire, leurs noyaux se localisent au centre de la cellule plurinucléée. L'observation de fibres centronucléées est donc caractéristique d'évènements de fusion cellulaire. Par la suite, les noyaux rejoignent la périphérie de la fibre musculaire et intervient ensuite la phase de maturation qui conduit à une récupération morphologique de la taille des fibres<sup>182,213</sup>. Ainsi, la proportion de fibres centronucléées et la taille des fibres sont des critères essentiels pour évaluer l'efficacité de la régénération musculaire.

Dans les sections suivantes, nous explorerons les différentes interactions entre les CS et les éléments de la niche pendant le processus de régénération musculaire.

#### a) La fibre musculaire et la MEC

Le maintien physique de la CS au sein de sa niche est contrôlé par des adhésions via les cadhérines<sup>191</sup> permettant sa fixation sur la fibre musculaire. La perturbation de ces interactions entre les cellules souches et leur niche, provoquée par une lésion et la rupture membranaire de la fibre, est un mécanisme clé de la transition de la quiescence à l'activation<sup>191</sup> comme cité précédemment. Par exemple, le facteur Wnt4, sécrété par les fibres musculaires lésées par

injection de BaCl<sub>2</sub>, entraîne chez la souris une rigidification mécanique des CS. Wnt4, en se fixant sur son récepteur Frizzled à la surface de la CS permet l'activation de la GTPase RhoA impliquée dans le changement conformationnel du cytosquelette d'actine. Ce changement de structure inhibe la translocation nucléaire et l'activité transcriptionnelle de YAP<sup>214</sup>. YAP est un mécano transducteur cellulaire impliqué dans la régénération tissulaire, et il a été démontré qu'il est nécessaire pour l'activation des CS<sup>215</sup>. De plus, l'activation de la voie Wnt permet la transition prolifération/différenciation des CS puisque son inhibition sur des cellules en culture entraîne une diminution du nombre de fibres matures tout en conservant un nombre important de CS immatures<sup>216</sup>.

Nous avons précédemment évoqué l'importance de l'interaction directe entre la CS et la MEC dans leur maintien au stade quiescent. Plusieurs études ont démontré des boucles de régulation entre les CS et leur microenvironnement avec une participation active des CS dans ce processus. Lorsque les CS s'activent, elles sécrètent de la laminine  $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 5 au niveau de la lame basale, à l'origine d'un processus de division cellulaire asymétrique favorisant l'expansion et l'auto-renouvellement des CS au cours de la régénération dans un modèle murin de lésion CTX<sup>217</sup>. Des études de transplantation cellulaire ont également démontré que les CS peuvent modifier la composition de leur microenvironnement en déposant des protéines de la MEC telles que la ténascine C, la fibronectine et le collagène VI favorisant à leur tour l'expansion des CS<sup>218</sup>. La nature ainsi que la proportion des composants de la MEC sont d'une importance clé pour la régénération. En effet, la sécrétion de collagène VI durant les premiers jours après une lésion permet de réguler les propriétés élastiques de la MEC en adéquation avec une régénération efficace alors que l'inhibition de cette sécrétion compromet la régénération en augmentant la rigidité de la matrice<sup>219</sup>.

## b) Les cellules immunitaires

Suite à une blessure, les fibres musculaires endommagées libèrent divers composés présents à l'intérieur de leur cytoplasme, tels que des fragments d'ADN ou des protéines comme la créatine kinase (CK), des protéines *heat-shock* (HSP) et des protéines associées à la chromatine comme HMGB1. Ces éléments relâchés dans le milieu extracellulaire agissent comme des signaux de danger appelés motifs moléculaires associés aux dommages (DAMP). Ils sont détectés par les **cellules immunitaires résidentes** qui expriment des récepteurs à reconnaissance de motifs, comme les récepteurs Toll-like (TLR). Cette reconnaissance entraîne rapidement la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que le facteur de nécrose tumorale-alpha (TNF- $\alpha$ ) et le ligand chimiotactique 2 (CCL2), favorisant ainsi le recrutement rapide de leucocytes circulants (Figure 6, compartiment immunitaire)<sup>220-222</sup>. Parmi ces cellules immunitaires résidentes, les **mastocytes** jouent un rôle particulièrement important dans les premiers stades de la réaction inflammatoire. Ils ont la capacité de libérer des facteurs préformés stockés dans leurs granules, tels que le TNF- $\alpha$  et l'histamine. De plus, les mastocytes sont capables de produire de nouvelles cytokines, comme l'interleukine-6 (IL-6) et l'IL-1 $\beta$ <sup>223</sup>. En plus de leur implication dans le recrutement des leucocytes circulants, ces différentes cytokines favorisent l'activation et la prolifération des myoblastes (Figure 6)<sup>220,224</sup>. En effet, il a

été observé *in vitro* que le milieu de culture conditionné par des mastocytes murins stimule la prolifération des myoblastes, tandis qu'*in vivo*, l'inhibition des mastocytes perturbe le recrutement des leucocytes et la récupération musculaire à long terme<sup>225</sup>. Ainsi, l'initiation de l'inflammation est directement liée à l'activation des cellules myogéniques.

Les **granulocytes** jouent également un rôle dans la libération de cytokines qui influencent le déroulement de l'inflammation par le recrutement rapide de **monocytes sanguins**<sup>226</sup>. Chez l'homme, il existe deux catégories de monocytes caractérisés par l'expression de différents marqueurs de surface : les monocytes classiques CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> (homologues des monocytes murin Ly6C<sup>+</sup>CCR2<sup>+</sup>) et les monocytes CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup> (homologues des monocytes murins Ly6C<sup>-</sup>CCR2<sup>-</sup>)<sup>227</sup>. Ces deux types de monocytes ont des fonctions et des propriétés différentes. Les monocytes Ly6C<sup>-</sup> patrouillent au sein des vaisseaux sanguins dans les tissus sains, tandis que les monocytes Ly6C<sup>+</sup> infiltrent les tissus endommagés à l'aide de leur récepteur CCR2<sup>227-229</sup>. Les souris présentant une déficience en CCR2 montrent une altération importante de l'infiltration des monocytes (alors que la migration des neutrophiles et des lymphocytes est normale) et une régénération musculaire significativement retardée<sup>230</sup>. De manière intéressante, la régénération musculaire est entièrement restaurée lorsque les souris CCR2-KO reçoivent une greffe de moelle osseuse provenant de souris non déficientes pour ce récepteur avant la lésion, ce qui met en évidence l'importance du recrutement des monocytes CCR2<sup>+</sup> dans l'amorce de la régénération musculaire<sup>231</sup>. Par ailleurs, les souris déficientes en CCL2, le ligand de CCR2, présentent un défaut de régénération musculaire moins prononcé après une lésion musculaire par rapport aux souris CCR2-KO<sup>230</sup>. Cela suggère que CCL2 n'est pas essentiel et que d'autres ligands de CCR2 tels que CCL7 et CCL12, ou d'autres petites molécules, pourraient participer l'attraction des cellules immunitaires au cours de la régénération musculaire<sup>230,232</sup>.

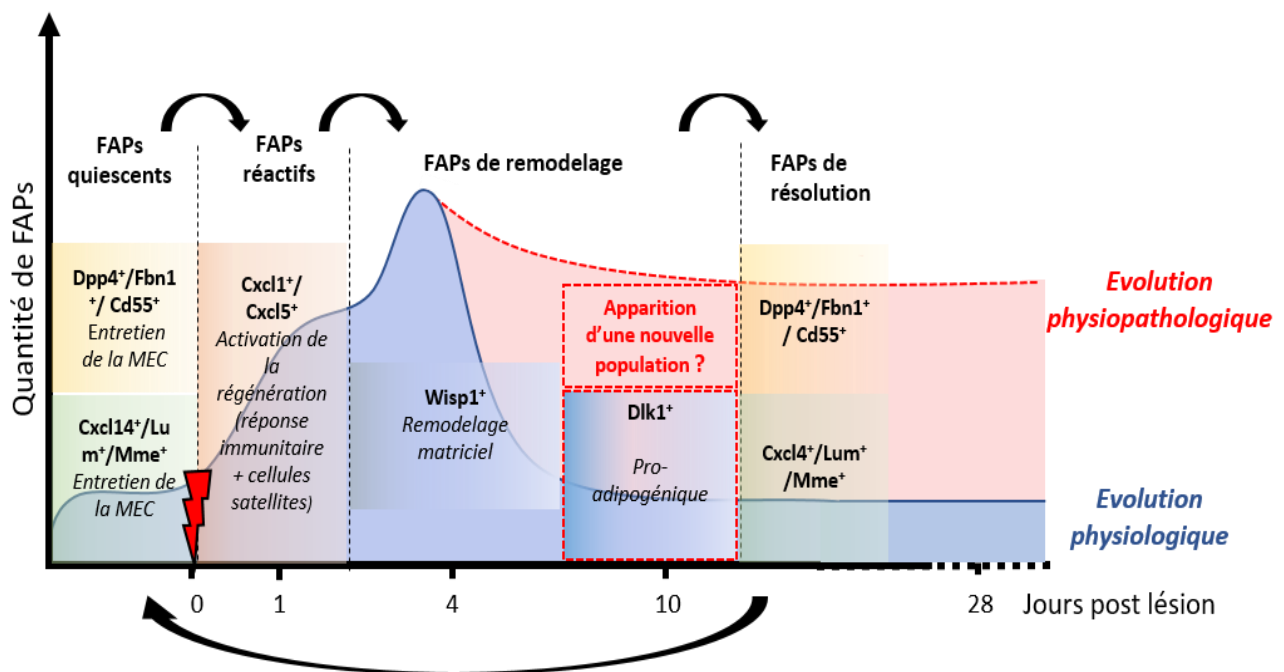
Une fois infiltrés dans le tissu, les monocytes Ly6C<sup>+</sup> mûrissent en macrophages Ly6C<sup>+</sup>. Autour du 2<sup>ème</sup> jour après la blessure, les cellules immunitaires CD45<sup>+</sup> représentent environ 60-70% des cellules mononucléées du muscle dans un modèle murin de lésion BaCl<sub>2</sub><sup>233</sup> et les macrophages Ly6C<sup>+</sup> sont les cellules prédominantes parmi celles-ci. L'accumulation de ces macrophages dans le tissu lésé peut aussi être due à une prolifération locale<sup>234</sup>. Les **macrophages Ly6C<sup>+</sup>** sont considérés comme **pro-inflammatoires** car ils sécrètent des quantités élevées de cytokines pro-inflammatoires telles que le IL-6, TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$ <sup>228</sup>. En plus de favoriser le recrutement des leucocytes, ces macrophages participent à la clairance des débris nécrotiques par phagocytose et influencent les cellules myogéniques par leurs sécrétions en favorisant la prolifération des myoblastes et en inhibant leur différenciation (Figure 6, compartiment immunitaire)<sup>228</sup>. En effet, une suppression des macrophages *in vivo* chez le rat est associée à la persistance de débris tissulaires, à une accumulation de tissu fibreux et adipeux, ainsi qu'à une diminution de la prolifération des cellules myogéniques<sup>235</sup>. Par conséquent, une accumulation transitoire et contrôlée de leucocytes pro-inflammatoires est nécessaire pour coordonner efficacement l'activité des cellules myogéniques et permettre une régénération musculaire optimale. Par la suite, autour 7 jpl<sup>236,237</sup>, les macrophages Ly6C<sup>-</sup> deviennent la population majoritaire<sup>238</sup>. Il a été démontré que l'accumulation de ces

macrophages provient principalement de la maturation des macrophages Ly6C<sup>+</sup>, induite notamment par la phagocytose de neutrophiles apoptotiques ou de débris cellulaires<sup>228</sup>. Ce changement de phénotype des macrophages est crucial, car ces deux populations ont des effets différents. Contrairement aux macrophages Ly6C<sup>+</sup>, les **macrophages Ly6C<sup>-</sup>** expriment des niveaux plus faibles de cytokines pro-inflammatoires. En revanche, ils produisent des quantités élevées de molécules **anti-inflammatoires** et de facteurs de croissance tels que l'IL-10, l'IL-4 et le TGF- $\beta$  (Tumor Growth Factor  $\beta$ )<sup>228</sup> dont le rôle est de réduire l'infiltration des leucocytes (Figure 6, compartiment immunitaire). De plus, les macrophages anti-inflammatoires ont un impact différent sur les cellules myogéniques. Ils inhibent la prolifération des myoblastes tout en stimulant leur différenciation et leur fusion en myotubes grâce à la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-4. De plus, la sécrétion de facteurs de croissance tel que IGF-1 (Insulin Growth Factor 1) par les macrophages anti-inflammatoires stimule la croissance et la maturation des fibres musculaires en favorisant la synthèse protéique et réduisant la dégradation des protéines via la voie de signalisation Akt (Figure 6, compartiment immunitaire)<sup>239</sup>. Dans un modèle de souris transgéniques dans lequel la transition des macrophages vers le phénotype anti-inflammatoire est bloquée, il a été observé que l'élimination des débris tissulaires n'est pas altérée, mais que la différenciation des myoblastes et la croissance des fibres musculaires sont déficientes<sup>240</sup>. *In vitro*, une augmentation de la différenciation des myoblastes a été observée en coculture avec des macrophages préactivés par l'IL-10, favorisant leur polarisation vers le phénotype anti-inflammatoire<sup>241</sup>.

Il convient de noter que les phases pro-inflammatoires et anti-inflammatoires peuvent se chevaucher, ce qui signifie que différentes sous-populations de macrophages peuvent coexister dans la même zone de régénération à un moment donné<sup>242</sup>. Chez l'Homme, il a été observé que les zones régénératives d'un muscle contenant des myoblastes en phase de prolifération présentent principalement des macrophages pro-inflammatoires. En revanche, les zones régénératives du même muscle où les myocytes sont différenciés contiennent principalement des macrophages anti-inflammatoires<sup>243</sup>. Cette proximité entre les deux types cellulaires renforce l'hypothèse selon laquelle les macrophages exercent un effet paracrine sur les cellules myogéniques régulé dans l'espace et dans le temps au cours de la régénération<sup>236,237,243,244</sup>.

### c) Le contrôle nerveux

Le maintien de la fonction contractile des muscles squelettiques dépend de l'innervation motrice au niveau des jonctions neuromusculaires (JNM). Suite aux lésions musculaires qui endommagent la JNM, bien que de nombreux mécanismes participent à la réparation et à l'entretien des JNM, le rôle des CS dans ces processus est considéré comme limité et restent



**Figure 7 : Evolution de l'hétérogénéité des FAPs au cours de la régénération musculaire chez la souris.** La courbe bleue correspond à l'évolution de la quantité de FAPs en situation post-lésionnelle issue de l'étude de Lemos et al. 2015. Les encadrés correspondent à chaque sous-population de FAPs définie par leur(s) marqueur(s) en scRNAseq. Les flèches en gras correspondent au changement d'état de chacune des populations conformément à l'hypothèse des différents auteurs.



très peu décrit. Une étude assez récente a démontré des interactions fonctionnelles bidirectionnelles entre les CS et la JNM<sup>245</sup>. L'activation des CS à proximité des JNM semble nécessaire à la réinnervation fonctionnelle du muscle tandis que la perte de fonction de l'innervation motrice du muscle inhibe la prolifération des CS<sup>245</sup>. Néanmoins, la contribution des cellules nerveuses en tant que cellules de niche nécessaires à la régulation des CS pendant la régénération est actuellement très peu établie.

#### d) Acteurs récents : FAPs

Au-delà de leur rôle dans le maintien l'homéostasie du muscle à l'état basal, les FAPs représentent un acteur majeur de la niche des CS, qui ont été décrits cette dernière décennie comme partenaires indispensables dans le processus de régénération musculaire.

##### *Rôles des FAPs dans la régénération physiologique du muscle*

D'un point de vue quantitatif, plusieurs études décrivent l'évolution la population de FAPs au cours du temps post-lésion<sup>31,32,246,247</sup>. La quantité de FAPs, mesurée par cytométrie en flux, double dès le premier jpl pour atteindre des quantités quatre fois supérieures à l'état basal autour de 3-4 jpl (Figure 7). Cette augmentation de FAPs est soutenue par une prolifération qui, elle, débute à 2 jpl<sup>32,246</sup>, laissant la phase précoce d'amplification des FAPs sans explication (Figure 7). L'augmentation de cette population est transitoire et retrouve des quantités basales autour du 9<sup>ème</sup> jpl. Cette diminution est le résultat d'une apoptose cellulaire médiée par la sécrétion de TNF- $\alpha$  par les macrophages pro-inflammatoires (Figure 6, compartiment mésenchymateux)<sup>246</sup>.

D'un point de vue fonctionnel, plusieurs travaux montrent que la présence des FAPs est nécessaire au processus de régénération<sup>44,248</sup>. En effet, leur déplétion dans un modèle de souris transgéniques qui expriment le récepteur à la toxine diphtérique sous le contrôle du promoteur de Tcf4<sup>248</sup> ou du PDGFR $\alpha$ <sup>44</sup> entraîne une baisse de prolifération des CS suite à la lésion musculaire ainsi qu'un retard de récupération morphologique des fibres musculaires, conduisant à une atrophie tissulaire. Si la présence des FAPs est indispensable au processus de régénération musculaire, leur diminution à partir de 5 jpl est néanmoins indispensable au bon déroulement de la régénération puisque leur persistance sur des temps plus tardifs aboutit à une sécrétion de MEC excessive et la mise en place d'une fibrose musculaire<sup>246</sup>. Ces études démontrent bien l'importance de l'apparition transitoire des FAPs pour maintenir l'efficacité du processus de régénération.

Plusieurs études attribuent aux FAPs un rôle central dans le processus de régénération musculaire en tant qu'acteur orchestrant les dialogues cellulaires essentiels à la régénération. Ainsi, les FAPs sont capables de coordonner un dialogue avec différents types cellulaires au cours de la régénération :

- **Les progéniteurs myogéniques.** Les dialogues entre FAPs et CS sont très documentés dans la littérature. Dans un modèle murin, la déplétion de la population de FAPs par injection de la toxine diphtérique sous le contrôle du promoteur Tcf4<sup>248</sup> ou PDGFR $\alpha$ <sup>44</sup> est associée à une forte diminution du nombre de CS à un stade précoce (3 jpl), et à



une réduction de la taille des fibres nouvellement formées à un stade ultérieur (14 jpl)<sup>44,249</sup>, deux indicateurs d'une diminution des capacités régénératives des CS. Des effets similaires de l'expansion du pool de CS et de la régénération musculaire est observée lorsque les souris sont traitées avec l'inhibiteur de la tyrosine kinase Nilotinib (inhibiteur du PDGFR), induisant l'apoptose des FAPs le muscle blessé<sup>246,250</sup>. Des expériences de co-culture ont montré que les FAPs favorisent la différenciation et la fusion des CS en myotubes multinucléés<sup>31,32</sup>. L'analyse de l'expression génique a confirmé que les FAPs réduisent l'expression des marqueurs de myogenèse précoce (comme Pax3, Pax7) et favorisent l'expression des marqueurs myogéniques tardifs (comme MyoD, Myog). Des expériences de co-culture en transwell de FAPs et de cellules myogéniques ont aussi montré que les facteurs paracrines sécrétés par les FAPs améliorent les capacités de fusion des CS<sup>251</sup>. Les facteurs sécrétés par les FAPs qui orchestrent l'activité des CS au cours de la myogenèse font l'objet de nombreuses recherches. Les principaux composants moléculaires du sécrétome des FAPs ont été récemment répertoriés dans deux revues<sup>171,252</sup>. Aussi, les recherches menées par Negroni et al. ont proposé un « sécrétome virtuel » des FAPs prédit de leur expression génique déterminée à partir des analyses transcriptomiques en cellules uniques que nous détaillerons plus tard<sup>54</sup>. Les FAPs expriment des niveaux élevés de cytokines telles que l'IL-6, initialement décrite comme une myokine, mais qui est 10 fois plus élevée dans les FAPs que dans les cellules progénitrices myogéniques en réponse à la lésion chez la souris<sup>31,32</sup>. L'IL-6 favorise la prolifération des CS (Figure 6, compartiment mésenchymateux)<sup>253</sup>. Les FAPs sécrètent également de nombreuses protéines de la MEC comme les collagènes et les laminines dont nous avons déjà décrit précédemment l'implication dans la régulation de l'activité des CS. Les FAPs expriment aussi des niveaux élevés de facteurs de croissances comme l'IGF-1. En activant la voie Akt, l'IGF-1 contrôle à la fois la synthèse et la dégradation des protéines et entraîne l'expansion du nombre de CS in vitro (Figure 6)<sup>254</sup>. Les FAPs sécrètent enfin des niveaux élevés de follistatine après une lésion musculaire<sup>255</sup> qui est un antagoniste de l'inhibiteur de croissance musculaire, la myostatine. La follistatine sécrétée par les FAPs favorise la fusion des myoblastes nécessaires à la formation de fibres musculaires plurinucléées<sup>255,256</sup>. Les FAPs sont donc capables de sécréter un large éventail de molécules impliquées une à une dans les processus séquentiels de la différenciation de la CS, à savoir leur prolifération, leur différenciation et leur fusion (Figure 6, compartiment mésenchymateux). Il serait alors intéressant de comprendre si les sécrétions des FAPs sont régulées temporellement après la lésion en synchronisation avec le processus myogénique. Les analyses transcriptomiques en cellule unique, que nous détaillerons dans une partie suivante, ont mis en évidence qu'en plus d'une activité sécrétoire séquentielle, il existe différentes sous-populations de FAPs responsables de ces sécrétions.

- **Les cellules endothéliales.** Au cours de la régénération il a été démontré que les FAPs jouent un rôle dans le soutien de la revascularisation<sup>257</sup>. Dans cette étude, les auteurs

montrent que l'ablation de FAPs PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> dans un modèle murin transgénique aboutit à un défaut de revascularisation du tissu avec une diminution de maturité et de perméabilité des vaisseaux alors que le nombre de capillaires semble inchangé. Une transplantation de FAPs au sein de ce modèle permet une restauration complète de ces paramètres et améliore l'efficacité de la régénération. Ainsi, cette étude démontre l'importance des FAPs dans la revascularisation efficace du muscle squelettique lésé, bien que le(s) facteur(s) qu'ils synthétisent restent encore non identifié(s) dans l'étude. Une possibilité pourrait être la sécrétion de facteurs de croissance vasculaire, comme les angiopoïétines ou le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), connus pour réguler l'angiogenèse embryonnaire et postnatale<sup>258</sup>. Ces protéines favorisent la croissance des vaisseaux sanguins et, dans les muscles, semblent être exprimées par les cellules endothéliales, les CS mais aussi les FAPs<sup>259</sup>.

- **Les cellules immunitaires.** Dans un modèle murin, l'absence de cellules PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> a entraîné une diminution des leucocytes (CD45<sup>+</sup>) dans les muscles à 3 jpl associée à une perte d'efficacité de la régénération<sup>44</sup>. Néanmoins, ces résultats ne démontrent pas si cette diminution du nombre de cellules CD45<sup>+</sup> est le résultat d'une inhibition de la prolifération cellulaire, du recrutement des cellules immunitaires ou même d'une mort cellulaire dans le muscle lésé. En effet, après une lésion, les monocytes Ly6C<sup>+</sup> circulants dans le sang infiltrent la zone endommagée dans les 24 premières heures suivant la blessure, se différencient en macrophages et prolifèrent<sup>260</sup>. L'importance de la production de cytokines par les FAPs nécessaire à une régénération musculaire efficace a été largement démontrée par ailleurs<sup>171,255,261,262</sup>. C'est le cas, par exemple de l'IL-33, majoritairement produite par les FAPs au cours des 12 premières heures après la lésion, et qui permet de stimuler la prolifération des cellules immunitaires Treg<sup>262</sup>. Les FAPs ont aussi été rapportés comme sécrétant de l'IL-10 en réponse à une lésion<sup>247</sup>, jouant un rôle important dans le changement phénotypique des macrophages vers un profil anti-inflammatoire et favorisant ainsi la régénération musculaire<sup>263</sup>. Cette réponse primaire complexe des FAPs au cours de la régénération soutient l'idée qu'ils sont des modulateurs importants de la réponse immunitaire précoce.
- **Les fibres musculaires :** Les travaux à l'origine de la découverte des FAPs intramusculaires avaient abordé la question du dialogue entre cette population cellulaire et les progéniteurs myogéniques par des approches de co-culture *in vitro*<sup>31,32</sup>. Les différents auteurs ont pu montrer que la co-culture de FAPs avec des CS favorise leur prolifération, différenciation en myoblastes ainsi que la fusion des myocytes<sup>31,32,62</sup>. Néanmoins, il semblerait aussi que les fibres musculaires matures puissent impacter le développement des FAPs. En effet, les études qui ont mis à jour les FAPs chez la souris ont aussi observé que la co-culture primaire entre des fibres musculaires et des FAPs inhibait la différenciation des FAPs en adipocytes<sup>31</sup>. Par la suite, d'autres études complémentaires ont démontré que la sécrétion d'IL-15 par les fibres musculaires était responsable de cette inhibition (Figure 6)<sup>264</sup>.

### *Hétérogénéité des FAPs en réponse à la lésion.*

Par la suite, c'est en étudiant l'hétérogénéité de la population de FAPs post-lésion musculaire que la définition de leur rôle s'est affiné. Comme nous l'avons évoqué dans un chapitre précédent, la population de FAPs présente une hétérogénéité, également post-lésion, résultant à la fois de différences d'expression génique (intrinsèque à la cellule) et d'influence du microenvironnement. L'étude de cette hétérogénéité en situation lésionnelle, initialement réalisée par des mesures d'expression génique sur FAPs triés et par cytométrie en flux, s'est enrichie par séquençage de l'ARN en cellule unique. Les différents travaux comparant situation basale et lésionnelle ont révélé des sous-populations « réactives », « remodelantes » et « résolutive » qui apparaissent tour à tour au cours de la régénération musculaire (Figure 7). Ainsi, l'analyse bio-informatique de l'expression génique des différentes sous-populations de FAPs qui apparaissent au cours de la régénération a permis de formuler des hypothèses sur le rôle fonctionnel des FAPs dans la régénération musculaire.

### *FAPs réactifs : sécrétions paracrines.*

Afin d'étudier la diversité et l'évolution des populations de FAPs en condition de régénération musculaire, le modèle murin de lésion musculaire induite par injection CTX ou NTX a été utilisé pour mesurer les changements d'expression géniques des FAPs. Qualitativement, dans la phase précoce (0.5-2 jpl), différents auteurs décrivent un changement d'expression génique des FAPs caractérisé par l'expression de marqueurs communs, dont de nombreuses cyto/chimiokines (Tableau 2) et qui a été traduite par une « activation » des FAPs. Il est intéressant de noter que cette population apparaît dès 12h<sup>50</sup> post-lésion et perdure à 48h<sup>51,53</sup>. A ce stade précoce du processus de régénération, les « FAPs quiescents », subissent un changement d'état vers un statut « activé ». Ce profil d'expression génique distinct, orienté vers la sécrétion de cytokines et de chimiokines permettrait d'établir spécifiquement leur communication avec les cellules environnantes, notamment les CS et les cellules immunitaires, essentielles à l'initiation du processus de régénération musculaire. Pour illustrer l'adaptation très rapide des FAPs au changement du microenvironnement induit par la lésion et leur mission support dès l'initiation de la régénération musculaire peut-être qu'un statut de FAPs « réactifs » plutôt qu'« activés » (comme mentionné dans la littérature) serait plus adapté à cette phase (Figure 7).

### *FAPs de remodelage : structuration de la MEC.*

Une régénération musculaire est considérée comme aboutie lorsque la récupération morphologique et fonctionnelle du tissu a lieu<sup>265</sup>. Dans ce contexte, les analyses OMICS en cellule unique ont révélé là aussi un changement de l'expression des gènes des FAPs « réactifs ». Entre 3 et 10 jpl il est rapporté par Oprescu et al., De Michelli et al. et Scott et al., une diminution de l'expression des cytokines et chimiokines au profit d'une expression de gènes liés à la modulation de la MEC tels que les gènes de la grande famille des collagènes, des laminines et des fibrillines<sup>50,51,53</sup> (Tableau 2). L'étude d'Oprescu et al. définit cette population de FAPs par l'expression dominante du marqueur *Wisp1*<sup>50</sup>. A 10 jpl, les FAPs adoptent ensuite un profil d'expression qui se caractérise par l'expression majeure de *dlk1*

(Figure 7), un marqueur connu des progéniteurs adipogéniques<sup>266</sup> pouvant suggérer un engagement de cette population vers un profil adipeux dans des temps plus tardifs de la régénération.

D'un point de vue fonctionnel, *wisp1* (la protéine 1 inductible par la voie de signalisation WNT-1) est un facteur composant la MEC connu comme étant sécrété par les FAPs au cours de la régénération musculaire favorisant l'expansion des CS par division asymétrique et garantissant ainsi l'entrée en différenciation des CS (Figure 6)<sup>267</sup>. Au sein du muscle, les FAPs représentent la principale source de composants de la matrice extracellulaire, tels que les collagènes (par exemple *Col6a1*, *Col5a1*), la laminine (*lama2*, *lamb1*) et la fibronectine (*Fbn1*) au cours du processus de régénération favorisant ainsi l'entrée de la CS dans le programme myogénique<sup>136</sup>. L'inhibition de la sécrétion de collagènes impacte drastiquement la prolifération des CS résultant sur une récupération morphologique des fibres musculaire retardée dans un modèle murin de lésion NTX<sup>246</sup>. L'étude menée par Negroni et al. soutient également ces observations, mettant en évidence la prédiction de la sécrétion de protéines essentielles à la composition et l'organisation de la MEC<sup>54</sup>, un processus nécessaire à la régénération musculaire<sup>268</sup>. Par leurs sécrétions les FAPs agissent alors comme des « ouvriers » capables de restaurer le réseau matriciel qui a été désorganisé suite à la lésion musculaire<sup>265,269</sup>.

#### *FAPs de résolution : un retour à la quiescence.*

Au cours des stades terminaux de la régénération musculaire, entre 21 et 28 jpl, Oprescu et al. ont identifié une population de FAPs caractérisée par l'expression de *Osr1*. Au sein de cette population, l'étude de trajectoire permettant d'établir le devenir de cette population à partir de l'expression génique, a permis de révéler une divergence de la population *Osr1*<sup>+</sup> vers deux sous-populations distinctes marquées par l'expression respective de *dpp4* et *cxcl14* décrits initialement à l'état basal (Tableau 2). Entre 7 jpl<sup>53</sup> et 14 jpl<sup>51</sup>, De Micheli et al. et Scott et al. décrivent une réapparition des populations de « FAPs quiescents » (Figure 7).

Suite à une blessure, la capacité du muscle squelettique à se régénérer est remarquablement efficace chez l'adulte. Nous venons de voir que cette efficacité est soutenue par des interactions fonctionnelles réciproques entre différents types cellulaires. Plus précisément, une coordination finement régulée des signaux émis par l'infiltrat inflammatoire puis par les FAPs, semblent jouer un rôle clé dans l'activation des CS, en les incitant à sortir de leur état de quiescence, à proliférer et à se différencier. Cependant, l'efficacité de cette coordination peut décliner dans différentes situations physiopathologiques conduisant à l'apparition progressive de dégénérescences musculaires que nous aborderons dans le chapitre suivant.

### **Le tissu musculaire après lésion :**

- Plusieurs modèles murins ont été développés pour étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en place au cours de la régénération musculaire.
- Les CS sont les acteurs centraux de la régénération à l'origine de la formation des nouvelles fibres musculaires.
- Le dialogue avec leur micro-environnement est déterminant pour assurer une régénération efficace.
- Les FAPs agissent comme des chefs d'orchestre dans ce micro-environnement et coordonnent les dialogues entre les différents composants cellulaires et acellulaires.
- La phase initiale d'augmentation des FAPs à 1 jpl n'est pas soutenue par la prolifération de ces cellules et reste encore incomprise.
- De nouvelles sous-populations de FAPs aux rôles précis apparaissent tandis que d'autres disparaissent au cours du temps post-lésion mais la régulation de ces changements reste encore inexpliquée à ce jour.

### III/ Défauts de régénération et dégénérescence musculaire

La plupart des défauts de régénération musculaire observés en pathologie sont associés à une présence accrue de tissus fibrotique et adipeux à l'intérieur du muscle<sup>270</sup>. Dans un premier temps, nous clarifierons les termes "dégénérescence musculaire" et "défauts de régénération", mettant en lumière leurs différences mais aussi les liens causatifs qui les relient. Par la suite, nous explorerons les acteurs identifiés au cours du processus de régénération physiologique (tel que décrit dans le deuxième chapitre) et mettrons en évidence leurs implications dans les perturbations de la régénération musculaire observés en pathologie. Enfin, nous examinerons les diverses cellules qui ont été proposées pour expliquer l'origine de l'infiltration fibro-adipeuse du muscle dans les différents cas pathologiques choisis, en expliquant pourquoi les FAPs se démarquent comme acteurs clés de ce phénomène.

#### 1) Définitions et situations pathologiques

La dégénérescence musculaire et les défauts de régénération sont deux notions distinctes, mais leurs similitudes peuvent prêter à confusion.

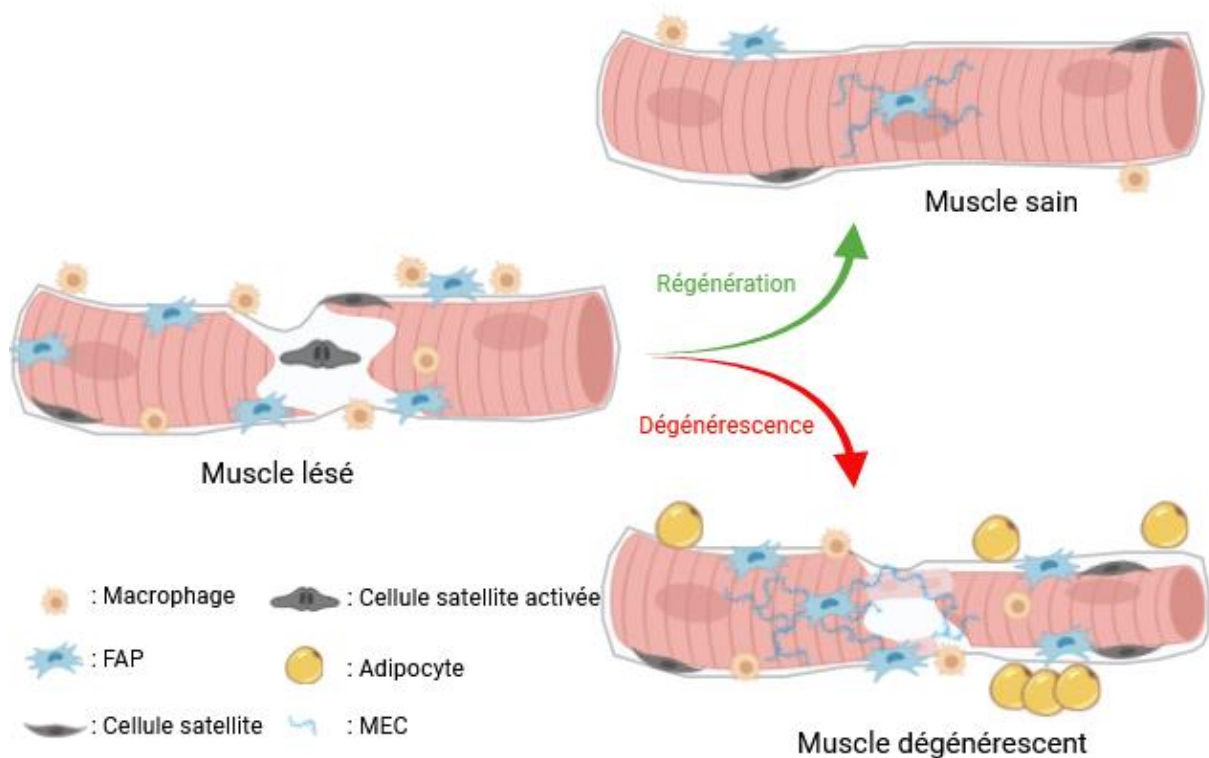
**Les défauts de régénération musculaire** se réfèrent aux anomalies qui perturbent le processus de régénération des fibres musculaires après une blessure comme décrit dans le chapitre II. Ces défauts peuvent aboutir à une absence ou un retard de régénération et une altération des différentes fonctions du muscle<sup>271</sup>.

**La dégénérescence musculaire** se réfère à la perte progressive de la masse musculaire associée à une diminution de la force de contraction. Elle est observée dans différentes situations liées à des comportements (inactivité physique chronique<sup>272</sup>), des situations physiologiques (comme le vieillissement<sup>273</sup>) ou pathologiques (comme les myopathies<sup>274</sup>). Les myopathies regroupent des pathologies hétérogènes, héréditaires ou acquises, avec des atteintes musculaires généralisées ou spécifiques à certains groupes musculaires. Les dystrophies musculaires sont des myopathies d'origine génétique qui pour la plupart sont caractérisées par une dégénérescence musculaire<sup>275</sup>. La perte progressive de force s'explique par une diminution de la taille des fibres musculaires (atrophie), la présence d'infiltrats inflammatoires et un développement intramusculaire de tissus fibreux et adipeux (Figure 8)<sup>276</sup>.

Il existe donc un lien de causalité entre ces deux notions, les défauts de régénération musculaires sont une des causes de la dégénérescence musculaire progressive.

L'évaluation de la dégénérescence musculaire chez l'homme peut être réalisée à travers diverses méthodes et tests médicaux<sup>277-279</sup> :

1. Mesures de la masse musculaire : la mesure de la masse musculaire totale (masse maigre) peut être effectuée à l'aide de techniques telles que la bioimpédance électrique (BIA), la densitométrie à rayons X à double énergie (DEXA) ou l'absorptiométrie biphotonique à rayons X (DXA).



**Figure 8 :** Développement de tissu fibro-adipeux intramusculaire dans les **dégénérescences musculaires**. Cette figure montre l'évolution des différents composants cellulaires et acellulaires, du stroma et du parenchyme, au cours de la régénération musculaire et dans des cas de défaut de régénération qui aboutissent à une dégénérescence musculaire. On observe alors une atrophie des fibres musculaires dans ces cas pathologiques associée à un développement d'adipocytes et d'un dépôt de MEC.

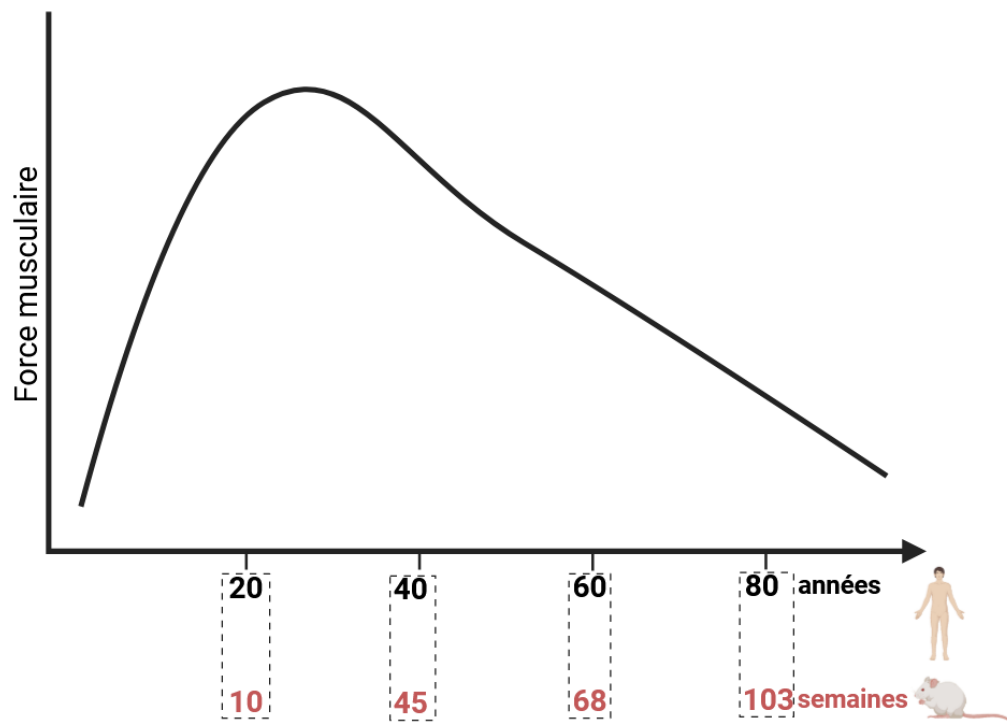
2. Tests de force musculaire : la mesure de la force de préhension manuelle, peut être utilisée pour évaluer la capacité fonctionnelle des muscles. Des appareils de dynamométrie sont souvent utilisés pour mesurer la force musculaire isométrique. Des échelles de cotation spécifiques peuvent être utilisées pour évaluer la force musculaire et la fonctionnalité dans différentes parties du corps. Par exemple, l'échelle du Medical Research Council (MRC) est souvent utilisée pour évaluer la force musculaire de différents groupes musculaires.
3. Évaluation de la fonction physique générale : des tests de capacité physique tels que le test de marche de six minutes ou le test de montée des escaliers peuvent fournir des indications sur la capacité fonctionnelle globale et la fatigue musculaire.
4. Imagerie médicale : l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et l'échographie peuvent fournir des informations détaillées sur la structure musculaire, y compris la taille des fibres musculaires et la présence de graisse ou de fibrose.
5. Mesures de biomarqueurs : certains biomarqueurs sanguins peuvent être utilisés comme indicateurs de dégénérescence musculaire. Par exemple, la créatine kinase (CK) est une enzyme libérée dans le sang en cas de lésion musculaire.
6. Analyse de biopsies musculaire : par histologie pour évaluer plusieurs paramètres comme la taille et le type des fibres musculaires par histologie ou par analyse de l'expression de certains gènes spécifiques.

Chez le rongeur, l'analyse histologique de coupes transversales de muscle reste la plus utilisée pour évaluer les critères de dégénérescence musculaire comme la présence de dépôts fibreux et adipeux, la diminution de la taille des fibres musculaires et la présence de fibres centronuclées<sup>213</sup>. Ensuite, il est également possible d'effectuer des tests fonctionnels chez le rongeur. Le test le plus largement utilisé est le « grip test, » qui permet d'évaluer la force de contraction des muscles des membres antérieurs<sup>280</sup>. Cependant, ce test ne permet pas de mesurer la force dans d'autres groupes musculaires. Pour ce faire des tests de contraction musculaire *ex vivo* par stimulation électrique du système neuromusculaire et mesure de la réponse contractile à l'aide de capteurs dynamométriques ont été développés<sup>281</sup>. De manière similaire à ce qui est fait chez l'homme, l'expression de certains gènes spécifiques, tels que ceux impliqués dans la régulation transcriptionnelle de la myogenèse (*Pax-7*, *Myf5*, *Myogenine*, *MyoD*, *Mrf4*, *eMyHC*), peut aussi être quantifiée en tant que critère d'évaluation de l'efficacité de la régénération musculaire ou témoigner d'une dégénérescence<sup>282</sup>.

Dans la suite de cette section j'ai choisi de décrire les défauts de régénération musculaire associés à des développements fibreux et adipeux intramusculaires (Figure 8) :

**La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD)** est l'une des myopathies les plus fréquentes et les plus étudiées. Myopathie dégénérative caractérisée par une faiblesse musculaire progressive et irréversible, elle diminue fortement l'espérance de vie. C'est une maladie rare





**Figure 9 : Perte progressive de la fonction contractile du muscle avec l'âge chez l'homme et la souris.** D'après l'étude de Shaw et al. (2017) et la corrélation de l'âge homme/souris de Wang et al. (2020).

qui touche chaque année 150 à 200 garçons nouveau-nés en France dont les symptômes se manifestent à partir de l'âge de trois ans. Environ 2 500 personnes sont affectées par la maladie en France<sup>283</sup>. Elle est causée par une mutation du gène de la dystrophine, situé sur le chromosome X<sup>284</sup>. La dystrophine est une longue protéine qui se lie aux filaments d'actine par sa région N-terminale et au complexe dystroglycane (DCG) à la membrane cellulaire par sa région C-terminale. La dystrophine joue un rôle essentiel dans le maintien de l'architecture et de l'intégrité des fibres musculaires en permettant le maintien du sarcomère à la membrane plasmique. En raison de l'absence de dystrophine, les muscles dystrophiques présentent une fragilité mécanique et subissent des dommages à chaque contraction musculaire<sup>285</sup>, ce qui entraîne une activation constante des CS impliquées dans le processus de régénération<sup>286</sup>. La DMD se caractérise alors par des cycles continus de dégénérescence et de régénération jusqu'aux stades tardifs de la maladie aboutissant à un épuisement du système et les fibres musculaires sont alors progressivement remplacées par des tissus fibrotiques et adipeux, compromettant la fonction du muscle<sup>287</sup>. Plusieurs modèles de souris transgéniques ont été générés en reproduisant la mutation du gène de la dystrophine, notamment le modèle murin *mdx*<sup>288,289</sup>, afin de mieux caractériser cette pathologie et comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires qui mènent au remplacement du tissu musculaire par ces tissus.

**Le vieillissement** n'est pas qualifié de myopathie mais il implique le développement progressif d'une dégénérescence musculaire liée à l'âge. D'ici 2050, la proportion mondiale de personnes de plus de 65 ans va passer de 9% à 16% d'après les données l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé, 2019). À mesure que la société vieillit, l'incidence des limitations physiques augmente de manière spectaculaire réduisant la qualité de vie et augmentant les dépenses de santé. Dans la société occidentale, environ 30 % de la population de plus de 55 ans est confrontée à des limitations physiques modérées ou sévères. Plusieurs études rapportent une perte de la force musculaire chez l'homme à partir d'environ 40 ans<sup>290</sup> (correspondant à environ 45 semaines chez la souris<sup>291</sup>) avec une intensification du phénomène à 60 ans (Figure 9). Bien que ce ne soit pas la seule cause de ces limitations, la perte progressive de masse et de force musculaires liée à l'âge (également appelée sarcopénie) représente un aspect majeur du vieillissement<sup>292</sup>. Les changements progressifs liés au vieillissement comprennent, entre autres, une diminution de la taille des fibres musculaires, une modification du réseau matriciel et une augmentation de l'infiltration grasseuse du muscle squelettique<sup>292</sup>. Cette dégénérescence musculaire liée au vieillissement est également accompagnée d'une perte progressive du muscle de sa capacité à se régénérer après des lésions tissulaires<sup>293</sup>. Cela suggère que les pertes progressives de masse et de fonction contractile musculaire liées au vieillissement pourraient résulter en partie d'évènements accumulés de régénérations musculaires incomplètes qui surviennent tout au long de la vie et qui s'intensifient avec le vieillissement. Ces défauts liés à l'âge dans les mécanismes de régénération peuvent être inhérents au muscle lui-même mais aussi résulter de changements dans les systèmes de régulations externes comme décrit par Munoz-Canoves et al.<sup>294</sup>. L'exemple du vieillissement

est alors intéressant pour mieux comprendre les verrous qui s'installent dans un contexte physiologique où la régénération musculaire n'est plus efficace.

**L'obésité** est une maladie métabolique caractérisée par un dépôt excessif de tissu adipeux dans l'organisme en raison d'un bilan énergétique positif (apport énergétique supérieur à la dépense)<sup>295</sup>. La prévalence de l'obésité dans la population a considérablement augmenté au cours des dernières décennies dans le monde. D'après les données de Santé Publique France et les rapports Obepi-Roche<sup>296</sup> menés entre 2016 et 2020 en France, 47% des personnes sont en situation de surpoids et 17% sont obèses, avec un indice de masse corporelle (IMC) supérieure à 30,0 kg/m<sup>2</sup>. Selon les projections de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), ces chiffres vont s'accroître et environ 25-29% de la population française sera en situation d'obésité d'ici 2030<sup>297</sup>. L'obésité conduit à l'apparition de différentes pathologies dont le diabète de type 2 (DT2, représentant 80% des individus obèses) associé à une résistance à l'insuline<sup>298</sup>. Sur le plan physiologique, la résistance à l'insuline se caractérise par une diminution de l'absorption du glucose sanguin stimulée par l'insuline par les muscles squelettiques et les tissus adipeux (responsable de l'hyperglycémie), ainsi qu'une levée d'inhibition de la lipolyse et de la production de glucose dans le foie (responsables de l'hyperlipémie et l'hyperglycémie)<sup>299</sup>. Il a été rapporté dans l'obésité et le DT2 des défauts de régénération musculaires chez l'homme et la souris<sup>295</sup>. Deux types d'évènements ont été décrits comme pouvant influencer ce processus : (1) des évènements intramusculaires avec une infiltration adipeuse excessive chez les individus obèses. (2) des paramètres extrinsèques aux muscles, comme l'hyperinsulinémie et l'hyperglycémie<sup>300</sup>. En revanche, l'obésité est une situation qui est différente des deux précédentes puisque l'infiltration adipeuse intramusculaire prend place avant l'apparition des défauts de régénération du muscle mais les relations de causes à effet avec la régénération n'ont jamais été démontrées dans la littérature. Différents modèles murins d'obésité / DT2 peuvent être utilisés pour étudier l'impact de ces différents paramètres sur la régénération du muscle. Les modèles ob/ob et db/db sont des modèles génétiques respectivement mutés pour le gène de la leptine ou son récepteur<sup>300</sup>. Ces modèles se caractérisent par des niveaux de résistance à l'insuline avancés, tandis que les modèles d'obésité induite par une alimentation riche en graisses (HFD) présentent une résistance à l'insuline moins sévère<sup>300</sup>. Il semble alors intéressant de comprendre l'influence de ces différents paramètres sur la régénération du muscle et en particulier celle des adipocytes intramusculaires.

Dans les parties suivantes nous synthétiserons les connaissances actuelles sur l'implication des différents acteurs cellulaires et acellulaires dans les cas pathologiques de défauts de régénération musculaires énumérées précédemment et discuterons de l'origine de l'infiltration des tissus fibreux et adipeux, dans ces différents cas.

## 2) Acteurs cellulaires et acellulaires impliqués dans les défauts de régénération musculaire.

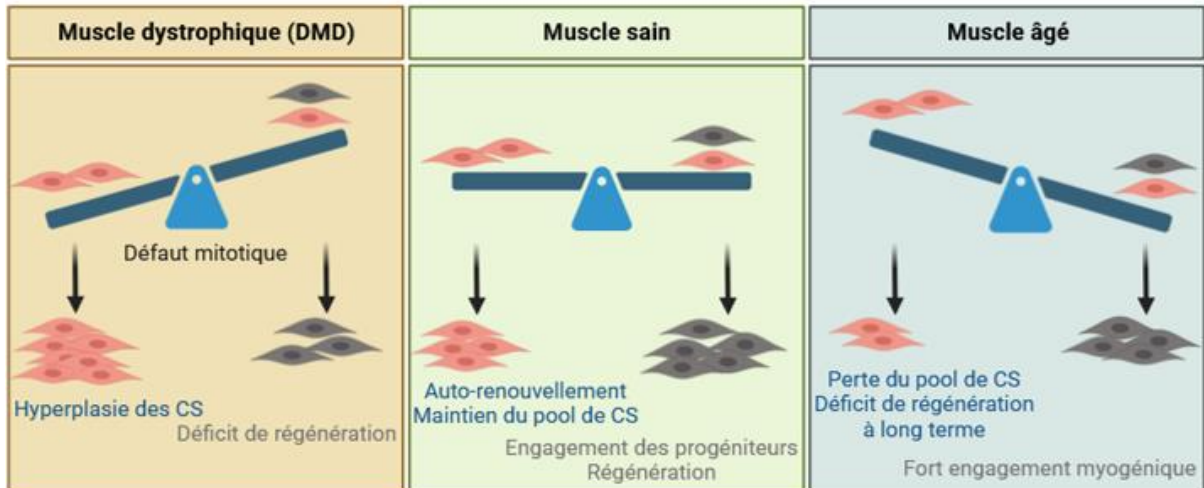
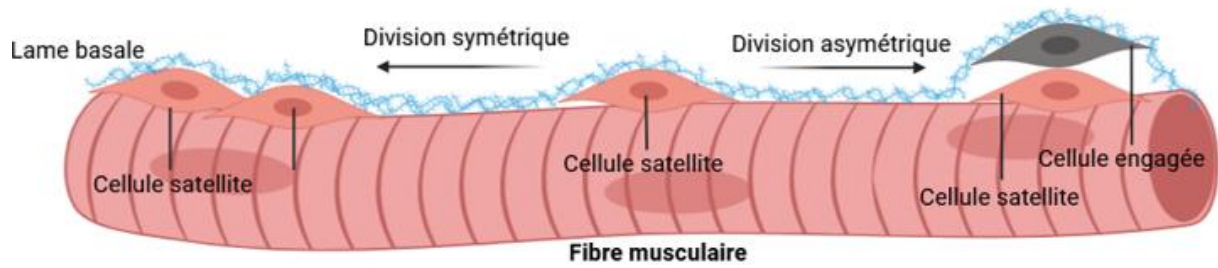
### a) Les progéniteurs myogéniques

La capacité de régénération du muscle squelettique diminue chez les animaux dystrophiques DMD<sup>301</sup>, au cours du vieillissement<sup>273</sup> mais aussi chez les animaux obèses développant un DT2<sup>302</sup>. Les CS ont été étudiées en première intention pour tenter d'expliquer les défauts de régénération observés. Néanmoins, leur évolution dans ces trois situations sont complètement différentes, laissant sous-entendre que les mécanismes qui contrôlent leur activité sont variés.

**Evolution quantitative des CS.** L'analyse de biopsies musculaires prélevées sur des **patients atteints de DMD** âgés de deux à sept ans a révélé une quantité plus élevée de CS dans les muscles dystrophiques par rapport aux muscles prélevés chez des individus sains du même âge<sup>303</sup>. Chez la souris, des études récentes ont démontré la présence d'un nombre accru de CS dans les muscles du modèle murin *mdx* de tous âges par rapport à des souris saines aux mêmes âges<sup>72,301,304,305</sup>. Ces résultats suggèrent collectivement que la capacité régénérative réduite des muscles dystrophiques DMD ne peut pas simplement être attribuée à l'épuisement du nombre des CS. En revanche, chez l'homme comme chez la souris, **le vieillissement** s'accompagne d'une diminution du nombre de CS d'environ 50% dans un muscle de souris âgée de 20 à 24 mois par rapport à un muscle jeune (Figure 10)<sup>306-309</sup>. Enfin, chez la souris **obèse** ob/ob et induite par HFD pendant 12 semaines il n'a été observé aucune mort par apoptose, d'autophagie ou de protéolyse des CS indiquant un nombre de CS inchangé dans les modèles d'obésité à l'état basal, sans lésion musculaire<sup>310</sup>.

**Fonctionnalité des CS.** Dans les trois situations que nous avons décrites, les capacités intrinsèques des CS à régénérer le muscle lésé sont altérées. Ces résultats soulèvent alors la question de savoir si la baisse fonctionnelle des CS est fondamentalement intrinsèque ou extrinsèquement induite par l'évolution de l'environnement, une question qui soulève beaucoup d'intérêt dans la littérature. De plus en plus de preuves suggèrent que les deux processus sont impliqués<sup>311</sup> et nous allons maintenant détailler en quoi les mécanismes qui régulent les CS dans le processus de régénération musculaire peuvent être altérés et emmener à des défauts de régénération dans chaque situation.

Chez les individus atteints de la **myopathie de Duchenne**, des études récentes ont révélé que les CS peuvent aussi exprimer la dystrophine et la plupart des composants du DGC<sup>304,312</sup>. Plus précisément, elles expriment la protéine dystroglycane (Dag1), qui joue un rôle essentiel dans leur fonctionnement. La délétion spécifique de Dag1 dans les fibres musculaires entraîne une dégénérescence musculaire moins sévère que lorsque Dag1 est supprimée dans les fibres musculaires et les CS<sup>313</sup>. Ces résultats mettent en évidence l'importance des protéines du DGC dans la fonction des CS et suggèrent que l'incapacité des CS à régénérer les muscles



**Figure 10 :** Importance de la balance entre division symétrique et asymétrique de la cellule satellite dans l'efficacité de régénération musculaire.

dystrophiques peut être due à des déficits cellulaires intrinsèques. En plus, il a également été observé par des approches *in vitro* que la dystrophine est exprimée dans une fraction de CS peu après leur activation. La dystrophine interagit avec des protéines jouant des rôles clés dans l'établissement de la polarité cellulaire comme la protéine Mark2 et Pard3, dont leur distribution aux pôles opposés de la cellule est nécessaire au processus de division asymétrique<sup>304</sup>. Cette division asymétrique est une caractéristique des cellules souches et permet de générer deux types de cellules filles différentes : un myoblaste impliqué dans la régénération musculaire et une cellule satellite indifférenciée qui permet le maintien du pool de CS (Figure 10). Dans le modèle murin *mdx*, il a été observé une expression réduite de Mark2 et un dysfonctionnement de la polarité cellulaire entraînant une réduction significative du nombre de divisions asymétriques des CS, tandis que le nombre de divisions symétriques reste inchangé (Figure 10)<sup>304</sup>. La diminution des divisions asymétriques limite alors le nombre de CS engagées dans la différenciation et conduit à une accumulation de CS indifférenciées. Ces résultats permettent de réconcilier l'observation d'une augmentation du pool de CS chez les patients DMD sans pour autant bénéficier d'une régénération musculaire plus efficace.

Dans le cadre du **vieillessement**, au-delà de l'épuisement du pool de CS, la capacité myogénique intrinsèque des CS est également altérée au cours du vieillissement. Par exemple, des expériences de culture primaire *in vitro* ont démontré que les progéniteurs musculaires de sujets âgés conservaient leur capacité de proliférer et de se différencier, mais avec un rythme bien plus lent que celui des jeunes sujets, tant chez l'homme que chez la souris<sup>314,315</sup>. Il semblerait qu'à la fois des modifications intrinsèques des CS et de leur environnement altèrent leur activité.

Parmi les influences intrinsèques on observe le raccourcissement des télomères, qui est associé au vieillissement et a été proposé comme étant responsable de la sénescence cellulaire, c'est-à-dire de l'arrêt du cycle cellulaire dû au vieillissement<sup>316</sup>. Une corrélation entre la longueur des télomères et le potentiel prolifératif des CS a été observée<sup>317</sup>. Cependant, les CS humaines ne montrent que des signes marginaux de raccourcissement des télomères au cours du vieillissement<sup>318</sup>. Par conséquent, le rôle précis du raccourcissement des télomères dans le comportement des CS âgées reste à déterminer. Les CS présentes dans les muscles de souris âgées se trouvent dans un état de présénescence caractérisé par une forte expression de l'inhibiteur du cycle cellulaire CDK p16INK4a<sup>319</sup> qui les rendent incapables de proliférer correctement et de maintenir actif le processus d'auto-renouvellement<sup>319</sup>. Il a été démontré que l'inhibition de l'expression du gène p16INK4a permet de relancer les CS dans le cycle cellulaire et maintenir leur capacité d'auto-renouvellement améliorant alors le potentiel de régénération musculaire chez la souris âgée<sup>319</sup>. De manière intéressante, l'élimination des cellules exprimant p16INK4a est suffisante pour atténuer la progression du déclin musculaire lié à l'âge : le diamètre des fibres musculaires des animaux traités est augmenté et leur performance lors du test d'effort sur tapis roulant est améliorée<sup>320</sup>. Dans l'ensemble, les fonctions des CS dépendent d'un équilibre finement régulé entre des facteurs intrinsèques et extrinsèques, qui peuvent être perturbés par le processus de vieillissement.

Les influences extrinsèques affectant les CS au cours du vieillissement peuvent être systémiques ou locales<sup>321</sup>. *In vitro*, les myoblastes primaires exposés au sérum de jeunes souris ont un potentiel myogénique plus élevé que les cellules traitées avec du sérum de souris âgées<sup>322</sup>. *In vivo*, des expériences pionnières de transplantation de muscle entier chez le rat ont montré que l'âge du receveur définit la capacité de régénération des CS<sup>323</sup>. Par conséquent, les muscles âgés transplantés chez un receveur jeune ont une capacité de régénération plus élevée que les muscles jeunes transplantés chez un receveur âgé, démontrant l'importance des facteurs circulants dans la régénération du muscle. Une récente étude menée chez la souris a employé des technologies de séquençage en cellule unique associées à la transplantation cellulaire afin de mettre en évidence que les CS d'animaux âgés subissent une "reprogrammation transcriptionnelle" après leur transplantation dans un muscle de souris jeune<sup>324</sup>. Ces CS issus de muscle âgés présentent un profil transcriptionnel similaire à celui observé chez les jeunes animaux. Bien que les mécanismes moléculaires sous-jacents à cette reprogrammation restent indéterminés, une expérience de parabiose (un système de circulation sanguine partagée entre deux souris) entre une souris jeune et une souris vieille a révélé que la signalisation Notch peut être restaurée dans les CS âgées par l'exposition à du sérum jeune<sup>325</sup>. Comme nous l'avons vu précédemment, Notch joue plusieurs rôles essentiels dans l'activation, la prolifération et l'auto-renouvellement des CS. En plus, les myofibres des muscles âgés présentent une expression augmentée du facteur FGF2 entraînant la sortie des CS de leur état de quiescence et la perte de leur capacité d'auto-renouvellement perturbant l'équilibre entre la quiescence et l'activation/prolifération des CS ce qui aboutit à l'altération de leur pool dans le muscle âgé<sup>309,321</sup>.

Enfin, dans le cas de **l'obésité** associée à un DT2, plusieurs études ont examiné la régénération musculaire chez des souris obèses ou diabétiques en utilisant des myotoxines et des lésions induites par le froid<sup>302,326,327</sup>. Une courte période de HFD (3 semaines) chez de jeunes souris a entraîné une réduction du nombre de fibres musculaires centronucléées témoignant d'une altération de la régénération musculaire du tibialis antérieur après une lésion induite par le froid par rapport à des animaux normo-pondérés sains et lésés dans les mêmes conditions<sup>302,327</sup>. Pour expliquer ces résultats, il a été observé une diminution de la capacité des progéniteurs myogéniques à fusionner chez des animaux soumis au HFD<sup>327,328</sup> alors que les CS ne présentent pas d'altération de leur capacité proliférative après lésion<sup>329,330</sup>. Les modifications de certains paramètres métaboliques systémiques comme l'hyperinsulinémie, hyperglycémie, hyperlipémie ou encore hyperleptinémie<sup>299,331</sup> ont orienté les recherches vers une altération de l'environnement des CS modifiant leur processus de différenciation. Il était déjà décrit dans des contextes d'obésité que l'excès d'accumulation de lipides résultant d'un taux élevé d'acides gras plasmatiques était responsable d'un phénomène de lipotoxicité dans le muscle participant à la mise en place de l'insulino-résistance<sup>159,332</sup>. Le terme « lipotoxicité » a été choisi pour décrire comment l'accumulation de lipides entraîne un dysfonctionnement et une mort cellulaire dans les tissus non adipeux<sup>333</sup>. Chez l'homme comme chez la souris obèse, les phénomènes de lipotoxicité associés à l'accumulation excessive de lipides intramusculaires<sup>108,126</sup> ont été décrits comme altérants les fonctions des CS. La lipotoxicité a



été modélisée *in vitro* sur des lignées de progéniteurs musculaires par plusieurs groupes en les exposant avec des acides gras (palmitate) ou des sphingolipides (céramides) dans leur milieu de culture. Ces études ont montré que la présence de ces composés réduit considérablement l'expression du facteur de transcription myogénique MyoG. *In vivo*, dans une étude menée sur des souris nourries pendant 8 mois avec un régime HFD il a été observé une réduction de la masse musculaire du tibialis anterior après une lésion par CTX, caractérisée par des myofibres plus petites, des espaces interstitiels plus grands et un dépôt accru de collagène par rapport à des souris lésées non obèses<sup>326</sup>. Dans une autre étude, l'expression du facteur de régulation de la différenciation myogénique, MyoD, est significativement réduite dans les CS isolées à partir d'un modèle murin d'obésité induite par l'alimentation<sup>328</sup>. De plus, dans un autre modèle murin d'obésité induite, on observe une altération de l'activation des CS après blessure, en partie attribuable à une diminution de la signalisation du facteur de croissance des hépatocytes (HGF) dans le muscle squelettique<sup>334</sup>. L'activité du HGF nécessite la présence de la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) essentielle pour maintenir le pool de CS et induire la formation de myotubes. Il a été suggéré que les CS isolées à partir de muscles lésés de souris soumises au HFD présentent une activité réduite de l'AMPK, ce qui altère la régénération musculaire<sup>335</sup>. Cependant, on ignore encore largement quels autres processus physiologiques sont altérés chez les individus obèses menant au dysfonctionnement de la régénération du muscle squelettique et la relation de causalité entre l'infiltrat adipeux chez l'obèse et les dysfonctions observées des CS.

A partir de ces observations faites dans les contextes DMD, âgé et d'obésité, il est de plus en plus évident que l'environnement des CS joue un rôle plus important que les changements intrinsèques dans l'établissement des défauts de régénération. Par conséquent, la niche des CS semble représenter une cible thérapeutique de choix, plutôt que les CS elles-mêmes. Dans les parties suivantes, nous allons détailler les modifications observées des différents constituants de la niche des CS dans ces contextes.

#### b) Les fibres musculaires

Malgré l'importance de la myofibre dans la régulation de l'activité des CS, on connaît peu de choses sur les signaux moléculaires exprimés sur ou par la myofibre qui régulent le comportement des CS et dont leurs perturbations au cours du vieillissement, de l'obésité ou dans les myopathies pourraient entraîner des défauts de régénération.

Dans le cas de la **DMD**, les cycles de dégénération/régénération de la fibre musculaire empêche la CS de se fixer de manière stable via les interactions M et N-cadherines et Notch / delta like 1 avec la fibre que nous avons décrit dans le chapitre I. La CS est donc continuellement sollicitée, ne lui permettant pas de garder son état quiescent<sup>336</sup>. De façon intéressante, on observe de manière **commune aux trois situations** un switch phénotypique du type de fibre musculaire, une augmentation de fibres de type I (à contractions lente, oxydatives) au détriment d'une perte de fibres de type II (à contraction rapide, glycolytiques). Dans le cas de la **myopathie de Duchenne**, il est observé une altération préférentielle des fibres de type II<sup>337</sup> ce qui a pour conséquence une altération de leur proportion dans le muscle.



Dans le cadre de l'**obésité**<sup>338</sup> ou du **vieillessement**<sup>339</sup>, il est observé à la fois chez l'homme et la souris un switch des types de fibres entraînant une proportion plus élevée de fibres de type I. Les raisons sous-jacentes à ces changements demeurent encore largement méconnues, de même que les facteurs qui pourraient les influencer<sup>340</sup>. Il n'a jamais été démontré si le type de fibre influence l'activité des CS. En revanche, une étude montre que le nombre de CS observées le long des fibres de type I est le même que celui pour les fibres de type II chez l'homme<sup>341</sup>, donc on pourrait penser que la nature de la fibre n'influence pas le nombre de CS. Il est envisageable que, en fonction du type de fibre musculaire, des protéines de surface ou sécrétées soient exprimées de manière différente et puissent avoir un impact variable sur les CS. Par exemple, une étude a montré que l'expression du récepteur Notch par les CS reste stable avec le vieillissement, bien qu'il y ait une diminution de l'activité de la voie Notch subséquente<sup>342</sup>. Cette diminution a été attribuée à un défaut d'expression du ligand Delta 1 à la surface des fibres musculaires de souris âgées. Ces résultats suggèrent que les modifications des fibres musculaires observées dans les cas de défauts de régénérations pourraient jouer un rôle dans la régulation de la CS.

#### c) Les cellules immunitaires

Les altérations de la réponse inflammatoire dans le cadre de la régénération musculaire dans la **DMD** sont les plus documentées dans la littérature<sup>343</sup>. Il est décrit que la nécrose tissulaire permanente entraîne une libération constante de DAMPs qui provoque un recrutement chronique de leucocytes, conduisant à une inflammation persistante<sup>72</sup>. D'ailleurs la population de leucocytes CD45<sup>+</sup> dans un muscle *mdx* murin à l'état basal représente 47% de la population des cellules mononuclées du muscle quadriceps<sup>344</sup> (contrairement aux 6% retrouvés chez des animaux sains).

Les macrophages représentent la population majoritaire (60%) parmi les leucocytes<sup>344</sup>. Bien qu'essentiels à la réparation tissulaire lors d'une blessure aiguë, ils présentent une activité "anarchique" dans le contexte d'une blessure chronique. En effet, les macrophages pro-inflammatoires qui sont normalement actifs pendant quelques jours après une blessure aiguë sont présents de manière chronique dans les muscles dystrophiques, limitant ainsi leur transition vers un profil anti-inflammatoire nécessaire à la réparation musculaire<sup>242</sup>. Cette observation a également été réalisée dans un modèle murin de lésions répétées à la NTX à 4 jours d'intervalle (mimant le cycle de dégénérescence/régénération DMD). Dans ce modèle, la répétition des lésions provoque une régénération musculaire asynchrone associée à un recrutement chronique de leucocytes et une augmentation de la fibrose tissulaire<sup>345</sup>. De plus, les macrophages en culture isolés de souris *mdx* sont incapables d'induire l'apoptose des FAPs nécessaire à la régénération musculaire<sup>246</sup>.

Les neutrophiles et les mastocytes comptent pour environ 15% des leucocytes intramusculaires des animaux *mdx*<sup>344</sup>. Ils jouent un rôle néfaste dans les muscles dystrophiques de souris *mdx* et la déplétion de ces cellules réduit la nécrose cellulaire<sup>346,347</sup>. Les mastocytes et les neutrophiles libèrent des enzymes protéolytiques et des agents oxydants toxiques pour les cellules musculaires lorsqu'ils sont présents en concentrations élevées, ces

enzymes oxydent les résidus thiol et carbonyle des protéines vitales du sarcomère, entraînant la modification ou la perte de la fonction des protéines, le stress oxydatif contribuant ainsi à la physiopathologie de la DMD<sup>348</sup>.

Les lymphocytes sont également impliqués dans la dégénérescence des muscles dystrophiques<sup>349</sup>. Par exemple, chez les souris dystrophiques *mdx*, la déplétion des lymphocytes B et T réduit considérablement la fibrose dans les muscles de la cuisse<sup>350</sup>. Cependant, l'ablation du thymus, où résident les lymphocytes T, entraîne une dysfonction musculaire à long terme chez les souris dystrophiques. Cette ablation entraîne en réalité aussi l'élimination des lymphocytes T régulateurs (Treg) qui jouent normalement un rôle dans les zones nécrosées des souris *mdx*, augmentant ainsi l'expression d'IL-10 et favorisant l'activité des macrophages anti-inflammatoires<sup>351</sup>.

Il semblerait alors que la dégénérescence chronique observée dans les muscles dystrophiques perturbe le recrutement des leucocytes dont les proportions et la cinétique avec lesquels ils sont recrutés semblent jouer un rôle majeur dans le maintien de l'efficacité de la régénération musculaire.

Enfin, la réponse inflammatoire post-lésion décrite dans le cadre du **vieillessement** et de l'**obésité** semble elle aussi altérée, aussi bien en termes de recrutement cellulaire qu'en polarisation phénotypique des macrophages. Bien qu'elles soient moins décrites que pour la dystrophie DMD il semblerait que les altérations observées au cours du vieillissement<sup>352</sup> ne soient pas similaires à celles décrites pour l'obésité<sup>300</sup>. C'est pourquoi nous allons d'abord décrire les modifications de la réponse inflammatoire au cours du vieillissement puis dans l'obésité et tenter à chaque fois de comprendre comment elles affectent la myogenèse. Les études qui se sont intéressées à ces processus ont essentiellement observé les variations aux seins des populations de macrophages, les populations majoritaires des leucocytes présents post-lésion.

De manière générale, le vieillissement du système immunitaire a plus largement été décrit comme une augmentation systémique de cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  et IFN $\gamma$ ). Cependant, de manière inattendue les muscles âgés murins et humains présentent une proportion de macrophage anti-inflammatoires CD163<sup>+</sup>, CD206<sup>+</sup><sup>353-355</sup> plus importante, alors que l'expression des cytokines est plutôt un profil pro-inflammatoire<sup>356</sup>. A ce jour les raisons de l'apparition de ces deux événements contradictoires et leur impact sur le muscle ne sont pas identifiés dans la littérature. En réponse à une lésion musculaire, les résultats obtenus sur le recrutement des monocytes/macrophages CD68<sup>+</sup> fait l'objet de débats. Des observations récentes ont montré que les muscles EDL (*extensor digitorum longus*) blessés par une série de contractions musculaires forcées présentaient une diminution de l'infiltration des monocytes/macrophages CD68<sup>+</sup> à 5 jpl chez les souris âgées (25 à 27 mois) par rapport aux animaux jeunes (3 à 5 mois)<sup>356</sup>. Ces résultats sont en accord avec un défaut de recrutement ou d'expansion des macrophages après la blessure. Cette observation n'est pas retrouvée chez l'homme âgé (71 ans vs contrôles de 32 ans) dans le muscle quadriceps blessé par des exercices de résistance.<sup>357</sup> On peut expliquer ces résultats contradictoires par le fait que les blessures

aient été réalisées par la contraction musculaire elle-même, or nous avons vu plus haut qu'en réponse à ce type de blessure, la régénération du muscle s'effectue plus rapidement qu'avec l'injection de toxines, prenant environ 96h. Il est probable que les premières études, se plaçant à 5jpl, ne puisse pas observer les différences recherchées tandis que les études menées chez l'homme, qui se sont intéressées à des délais plus précoces de 72 heures, semblent être plus en phase avec la dynamique de régénération qui suit un exercice. La perturbation de l'infiltration des monocytes/macrophages en réponse à des lésions musculaires au cours du vieillissement ne fait donc pas consensus. Sur le plan de la polarisation phénotypique des macrophages vers un profil anti-inflammatoire qui prend place autour du 5ième jpl, il a aussi été décrit des altérations avec l'âge. Par exemple, les muscles quadriceps humains soumis à des contractions répétées ont montré une réduction des macrophages CD68<sup>+</sup>, CD11b<sup>high</sup> (pro-inflammatoires) et une augmentation des macrophages CD206<sup>+</sup> (anti-inflammatoires) dans les muscles âgés (~77 ans) par rapport aux jeunes muscles (~22 ans) dès 3h après l'exercice<sup>355</sup>. De manière similaire, après une lésion musculaire à la CTX, les souris âgées présentaient une réponse inflammatoire atténuée par rapport aux souris «jeunes», ainsi qu'un nombre plus important de macrophages anti-inflammatoires CD206<sup>+</sup> et une forte expression de l'IL-10, à 3 jpl<sup>358</sup>. Dans les deux cas, la présence de macrophages anti-inflammatoires est plus précoce qu'au cours de la régénération qui a lieu chez le sujet jeune. Ce changement phénotypique plus précoce empêche probablement les macrophages pro-inflammatoires d'agir correctement pour stimuler la prolifération des progéniteurs musculaires. Pour répondre à cette observation, une étude récente a réalisé des transplantations de moelle osseuse (MO) de souris jeunes vers des animaux âgés<sup>358</sup> dans l'objectif d'apporter des précurseurs myéloïdes fonctionnels dans un contexte âgé et de permettre d'observer les conséquences sur la cinétique du switch phénotypique immunitaire. Les résultats obtenus à l'aide de ce modèle ont montré une restauration de la sécrétion de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 ainsi que du nombre de macrophages CD206<sup>+</sup> sur une cinétique plus tardive chez les chimères transplantées avec de la MO « jeune ». Aussi, l'amélioration de la réponse immunitaire chez ces chimères a été associée à une prolifération des CS plus importante que chez les chimères transplantées avec de la MO d'animaux âgés. Par ailleurs, pour déterminer comment le vieillissement des cellules immunitaires affecte la fonction des progéniteurs musculaires, des milieux conditionnés provenant de macrophages « jeunes » ou « âgés » activés ont été appliqués à des myoblastes « vieux » en culture. Le milieu conditionné par des macrophages d'animaux jeunes a inhibé la myogenèse et augmenté la prolifération<sup>359</sup> tandis que celui conditionné par des macrophages de sujets âgés a réduit la prolifération<sup>358</sup>. Les perturbations dans le recrutement et la cinétique de polarisation des monocytes/macrophages peuvent donc nuire aux différents stades de la régénération des muscles vieillissants<sup>360</sup>.

Contrairement au vieillissement, la phase pro-inflammatoire (zone nécrotique mesurée par histologie et infiltrat macrophagique CD68<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>) est prolongée jusqu'à au moins 10 jpl chez des souris **obèses** induit par HFD, alors qu'elle s'arrête autour de 5 jpl chez des souris normo-pondérées<sup>328,361</sup>. Il n'a pas été démontré de variations du nombres de macrophages post-lésion mais plutôt un décalage dans la phase initiale pro-inflammatoire qui pourrait être

à l'origine des défauts de régénération observés en cas d'obésité associée à un DT2<sup>330</sup>. D'Souza et al. ont été parmi les premiers à démontrer que l'activité des CS est compromise chez les souris obèses comparativement aux souris non obèses<sup>328</sup>. Différents travaux ont montré que la prolifération *in vivo* des CS n'est pas altérée après lésion chez des animaux nourris en HFD tandis que le processus de différenciation et de fusion sont fortement affectés par l'obésité<sup>326-329,335</sup>. Ces études démontrent que l'expression de marqueurs de différenciation musculaire normalement exprimés au cours des phases de différenciation et fusion des CS, tels que *MyoD* et *MyoG*, est retardée et réduite au cours du processus de régénération musculaire chez les souris obèses alors que l'expression de eMyHC, c'est-à-dire une forme immature de myosine, persiste après la lésion. Ces résultats témoignent alors d'un retard de régénération dû à un décalage de la phase pro-inflammatoire de 5 jours en condition normale et au moins 10 jours en condition d'obésité. Enfin, peu de choses sont décrites sur la phase anti-inflammatoire de la régénération en condition d'obésité. Néanmoins, il a été mis en évidence que la signalisation de la leptine est aussi un facteur à prendre en considération dans les dérégulations de la réponse immunitaire en conditions d'obésité associée à un DT2. En effet, l'études de M. Nguyen et al. a démontré une diminution du nombre de macrophages F4/80<sup>+</sup> chez les animaux ob/ob et db/db à 5 jpl alors qu'il ne l'observe pas chez les animaux nourris en HFD, conformément à ce qui est décrit dans les études citées précédemment<sup>300</sup>. Ainsi, la signalisation à la leptine est un facteur responsable du recrutement ou de la prolifération des macrophages dans le muscle après la lésion et sa perturbation au cours de l'obésité associée à un DT2 pourrait entraîner l'altération de la régénération du muscle.

#### d) Les FAPs

Contrairement à une lésion aiguë, qui induit une expansion transitoire de la population de FAPs, les **muscles dystrophiques** du modèle murin *mdx* connaissent une augmentation persistante du nombre de FAPs trois fois supérieure aux proportions observées chez des animaux sauvages<sup>246,362-364</sup>. En revanche, en réponse à une lésion CTX chez des souris *mdx*, aucune augmentation du nombre de FAPs n'a été observée par rapport aux fortes proportions déjà présentes<sup>362</sup>. Il est envisageable que les changements observés dans l'évolution des FAPs soient attribuables au microenvironnement dégénératif des muscles dystrophiques même si cela n'a jamais réellement été démontré. Parmi les différentes molécules surexprimées dans le muscle dystrophique il est observé le TGF- $\beta$  (un régulateur clé du fonctionnement FAPs par action anti-apoptotique<sup>246</sup>). Une corrélation positive a été faite entre les taux de TGF- $\beta$  intramusculaire et le nombre de FAPs à la fois chez l'homme souffrant de DMD et la souris *mdx*<sup>365-367</sup>. Dans la DMD, nous avons déjà décrit une présence chronique de macrophages pro-inflammatoire, sécrétant à la fois du TNF- $\alpha$  et du TGF- $\beta$ . Il se pourrait alors que l'environnement musculaire DMD pro-inflammatoire perturbe fortement l'activité des FAPs en forçant leur accumulation dans le muscle par inhibition de leur apoptose.

Contrairement à la DMD, les muscles de souris âgées présentent un nombre réduit de FAPs (-50%)<sup>368</sup>. En réponse à la lésion musculaire le nombre de FAPs augmente moins rapidement chez la souris âgée que chez la jeune<sup>252</sup>. Récemment, Lukjanenko et al. (2019) ont montré que

les FAPs âgées ont une capacité proliférative réduite par rapport aux FAP jeunes<sup>368</sup>. Il semblerait que les capacités intrinsèques des FAPs âgés soient aussi altérées puisqu'ils ne sont pas capables de soutenir la différenciation des CS en culture directe ou par milieux conditionnés, en comparaison avec des FAPs jeunes<sup>368</sup>. La transplantation *in vivo* de FAPs jeunes a également permis d'améliorer les défauts de régénérations du muscle âgé en favorisant l'activité myogénique. Le fait que le soutien des FAPs aux CS soit transmis par l'intermédiaire d'un milieu conditionné suggère que des facteurs solubles régulent cette communication paracrine. Lukjanenko et al. (2019) ont montré que les FAPs âgés sécrètent moins de Wisp1, nécessaire à la prolifération et la différenciation des CS, au cours du vieillissement<sup>368</sup>. *In vivo*, l'injection de Wisp1 dans un muscle suite à une lésion aigue par injection de glycérol a augmenté la prolifération des CS âgées et l'engagement des CS dans la myogenèse par l'expression augmentée de MyoD. L'injection de Wisp1 a aussi permis d'améliorer la proportion de nouvelles myofibres centronuclées et donc favoriser la régénération du muscle.

Dans le cadre de l'**obésité**, les études montrent que le nombre de FAPs est 30% plus bas dans le muscle squelettique des souris obèses soumises à un régime HFD de 12 semaines par rapport à des souris soumises à un régime standard<sup>369</sup>. Après une blessure par injection de CTX les auteurs ont révélé différents défauts entre 3 et 14 jpl. Premièrement, la phase d'amplification des FAPs à 3 jpl est altérée (-15%) chez les animaux HFD traduisant probablement une baisse de la prolifération des FAPs<sup>369</sup>. Deuxièmement, ils ont observé un défaut de la phase de diminution des FAPs entre 7 et 14 jpl avec une persistance du nombre de FAPs 10% supérieur en condition HFD, expliqué par une perturbation des signaux apoptotiques des FAPs après blessure<sup>369</sup>. En corrélation avec ces observations, une étude menée chez l'homme a montré que les FAPs issus de biopsies musculaires d'individus obèses présentaient des capacités prolifératives diminuées par rapport à des individus sains non obèses<sup>36</sup>. En revanche, chez des patients présentant des stades plus sévères d'insulino-résistance l'activité proliférative et clonogénique des FAPs est paradoxalement accrue *in vitro*<sup>36</sup>. A ce jour, les mécanismes moléculaires qui contrôlent le comportement des FAPs dans le muscle en condition d'obésité ne sont pas compris<sup>270</sup>. Néanmoins, cette étude menée chez l'homme présentant divers degrés de sévérité d'insulinorésistance suggère que des paramètres extrinsèques aux FAPs sont dérégulés avec le DT2 (comme l'hyperglycémie, l'hyperlipémie, hyperinsulinémie...) ce qui perturberait l'activité des FAPs. Une étude chez la souris a d'ailleurs démontré que la restauration des taux sériques d'acide rétinoïque, perturbés par le régime HFD, permettait de restaurer le nombre de FAPs à l'état basal mais aussi leur cinétique correcte après blessure<sup>369</sup>.

Dans des situations de défaut de régénération que nous avons abordé (DMD, vieillissement et obésité), l'activité des différents acteurs de la régénération musculaire est perturbée mais de manière différente en fonction de chaque situation. Malgré ces différences, toutes ces situations aboutissent à une perte de la masse et de la force musculaire qui corrèle avec le

développement intramusculaire d'un tissu fibro-adipeux. Nous allons maintenant discuter l'origine de la formation de ce dépôt et son impact sur la régénération du muscle.

### 3) L'infiltrat fibro-adipeux associé aux dégénérescences musculaires

L'infiltration fibro-adipeuse est fréquemment observée dans les défauts de régénération ainsi que dans plusieurs types de dégénérescence musculaire. Elle est souvent associée à une inflammation persistante ou chronique<sup>370,371</sup> et est étroitement liée à la progression et à l'aggravation de la pathologie. Dans cette partie, nous allons d'abord définir l'infiltration fibro-adipeuse avec les modifications conséquentes du muscle et son impact dans la dégénérescence quand il est décrit. Ensuite nous nous intéresserons à l'origine de la formation ectopique de ce tissu et expliquerons pourquoi les FAPs représentent des acteurs centraux dans ce développement.

La **fibrose** est un phénomène dégénératif fréquent de plusieurs pathologies caractérisées par des lésions chroniques. La fibrose pathologique du muscle se caractérise par l'accumulation progressive et excessive de protéines de la MEC<sup>372,373</sup>. Cette accumulation entraîne la substitution des myofibres par du tissu cicatriciel et aboutit à la perte fonctionnelle du tissu<sup>374,375</sup>. En plus d'altérer les capacités contractiles du muscle, le développement excessif de matrice représente une barrière pour la thérapie cellulaire et génique<sup>376,377</sup>. En effet, l'épaississement du tissu conjonctif fibrotique constitue un obstacle réduisant l'accès aux particules de grandes tailles comme les nanoparticules et altère la migration des cellules après leur injection dans le muscle en thérapie cellulaire. Certaines modifications de la MEC semblent communes à l'établissement de la fibrose dans les situations dystrophiques DMD<sup>217,378,379</sup>, de vieillissement<sup>137,380,381</sup> et d'obésité<sup>137,382</sup>. En effet, il est rapporté pour ces 3 conditions, une accumulation des collagènes fibrillaires de type I et de type III à la fois chez l'homme et la souris. Les études chez la souris ont pu mettre en évidence une accumulation plus importante de cette MEC au niveau de l'endomysium et pérимysium musculaire par des approches d'imageries à microscopie électronique ou fluorescence<sup>326,383</sup>. Il a aussi été rapporté des modifications matricielles plus profondes, au niveau de la lame basale qui entoure chaque fibre musculaire avec une diminution de l'expression et une désorganisation des laminines qui la compose à la fois avec le vieillissement<sup>384</sup> et la dystrophie DMD<sup>379</sup>. En termes de conséquence directe sur les propriétés mécaniques de la MEC intramusculaire, une étude réalisée chez la souris a démontré une augmentation de la rigidité de la MEC d'un facteur 35 avec l'âge ou chez la souris *mdx*<sup>385</sup> (environ 12kPa chez les souris jeunes contre 418 kPa chez les souris âgées). La fibrose du muscle squelettique résulte de la balance entre la dégradation des protéines de la MEC et leur production, et donc un équilibre entre les MMP (métalloprotéases matricielles responsables de la dégradation de la matrice) et des TIMP (inhibiteur des MMP)<sup>386</sup>. Une dérégulation de cet équilibre entraîne la mise en place d'une fibrose<sup>387</sup>. Par exemple, les MMP2 et MMP9 dirigées contre les collagènes de type IV et V sont surexprimés dans les muscle du modèle *mdx*<sup>388</sup> dérégulant la balance collagène I et III / collagène IV et V et donc l'organisation matricielle. D'un point de vue fonctionnel, nous avons



déjà abordé le rôle des composants de la MEC et de la lame basale, notamment les collagène et les laminines dans le maintien des CS en quiescence. Une dérégulation de ce réseau matriciel en situation dystrophique DMD, de vieillissement et d'obésité perturbe alors l'activité proliférative et de différenciation des CS au cours de la myogénèse<sup>137,217</sup>. A ce jour, les mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine de la mise en place de la fibrose dans les cas de dégénérescence musculaire sont encore sujets à discussion et nous aborderons ce point dans la partie suivante.

L'**infiltration graisseuse ectopique**, également connue sous le nom dégénérescence adipeuse, est majoritairement considérée comme un phénomène délétère associé au développement de différentes pathologies musculaires liées à l'âge ou non, mais aussi à la mise en place d'une résistance à l'insuline et de diabète<sup>106,120,389,390</sup>. Les niveaux d'infiltration graisseuse corrént avec la sévérité de la pathologie, plus cette infiltration est importante moins le muscle se contracte efficacement<sup>391</sup>. Cette accumulation ectopique de lipides peut prendre deux formes distinctes non exclusives : des gouttelettes lipidiques logées à l'intérieur des fibres musculaires et de véritables cellules adipocytaires réparties entre les fibres musculaires. Ces deux formes de stockage sont exacerbées dans les situations de dégénérescence musculaire.

- Les gouttelettes lipidiques résultent de l'absorption des acides gras circulants et de leur estérification en triglycérides, ainsi que de la lipogenèse de novo, deux mécanismes biologiques bien documentés<sup>392-396</sup>. Les muscles sains chez l'homme contiennent environ 1,5% de lipides intramyocellulaires quantifiés par imagerie et marquage oil Red O<sup>397</sup>. Avec l'obésité ou le vieillissement, ce pourcentage triple et atteint environ 5%. Une étude réalisée chez l'homme démontre que l'augmentation du stockage des lipides intramyocellulaires n'est pas due à une augmentation du nombre de gouttelettes mais une augmentation du diamètre des gouttelettes existantes<sup>398</sup>. Chez les individus âgés ou obèses, il est fréquemment observé une disparité dans le stockage des lipides intramyocellulaires entre les fibres de type I (oxydatives à contraction lente) et les fibres de type II (glycolytiques à contractions rapides)<sup>399,400</sup>. Les fibres de type I tendent à accumuler davantage de lipides que leurs homologues de type II, et cette accumulation lipidique est associée à une atrophie plus prononcée des fibres de type I par rapport aux fibres de type II<sup>399,401</sup>. De plus, les fibres de type I présentent une vitesse de raccourcissement moins rapide. Ces constatations suggèrent que l'accumulation de lipides peut favoriser un switch phénotypique des fibres de type II vers le type I. Le rôle primaire donnée aux triglycérides contenu dans ces gouttelettes intramyocellulaires est une forme de stockage énergétique locale qui peut rapidement être oxydée au cours d'un exercice physique<sup>129,394</sup>. Néanmoins, l'inaccessibilité des gouttelettes lipidiques intramyocellulaires pour des études *ex vivo* représente un frein à la compréhension des mécanismes potentiels par lesquels cette forme de stockage lipidique pourrait influencer la régénération musculaire.
- Les adipocytes intramusculaires représentent une forme de stockage lipidique ectopique situées entre les fibres musculaires. Chez les individus âgés ou obèses, la proportion de cette forme de stockage des lipides double et atteint une valeur



d'environ 12% (contre environ 5-8% chez des individus jeunes normo-pondérés)<sup>123,402</sup>. Il a été montré par des approches de culture de myotubes humains exposés à un milieu conditionné par des adipocytes issus de progéniteurs CD56<sup>-</sup>/CD15<sup>+</sup> (contenant des FAPs mais aussi d'autres types cellulaires) issus du muscle, une diminution de la sensibilité à l'insuline des myotubes<sup>403</sup>. Il a donc été suggéré que la proximité *in vivo* de ces adipocytes avec les fibres musculaires puissent altérer la sensibilité à l'insuline par leurs sécrétions paracrines et ainsi participer au développement d'un DT2. Une autre étude propose une modélisation mathématique d'un muscle squelettique et de tous les composants cellulaires et matriciels qui le composent<sup>123</sup>. En jouant sur les proportions des adipocytes intramusculaires et en utilisant celles observées dans les cas d'obésité ou de vieillissement, les auteurs montrent que la présence accrue d'adipocytes musculaires entraîne une augmentation de la pression intramusculaire modifiant les paramètres de rigidité du tissu matriciel. Etant donné que les CS sont sensibles aux propriétés mécaniques de leur environnement<sup>404</sup>, on peut imaginer que la présence de ces adipocytes influence le processus de myogénèse. Le rôle véritable des adipocytes intramusculaires au cours du processus de dégénérescence ou dans les défauts de régénération musculaire n'est pas établi à ce jour. Leur origine fait également encore débat<sup>108,269,401</sup>. Aujourd'hui les FAPs représentent une origine cellulaire plausible que nous allons à présent examiner en détail.

#### 4) Les FAPs : cellules de choix pour expliquer la dégénérescence fibro-adipeuse

Les nombreuses études ayant pour objectif de définir l'origine cellulaire de l'infiltration ectopique fibro-adipeuse ont questionné le potentiel adipogénique de différentes populations cellulaires du muscle :

- **Les progéniteurs musculaires.** Initialement, plusieurs études ont suspecté les CS d'être responsables de cette double infiltration en se différenciant à la fois en fibroblastes<sup>26</sup> et en adipocytes<sup>27,28</sup>. Les méthodes expérimentales d'isolement des CS à cette époque reposaient sur l'utilisation de l'immunophénotype CD11<sup>-</sup>/CD31<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup> ainsi que la capacité d'adhésion des cellules sur fond plastique *in vitro*. Seulement, l'utilisation d'un nombre restreint de marqueurs ainsi qu'un tri cellulaire basé sur des marqueurs non exprimés à la surface des CS laisse penser que cette population cellulaire était en réalité mélangée à une autre population cellulaire d'origine mésenchymateuse également CD11<sup>-</sup>/CD31<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup> et qui possède aussi des capacités d'adhésion sur fond plastique. D'autres études qui ont questionné le potentiel adipogénique des CS ont placé en culture des fibres musculaires entières isolées depuis un muscle squelettique murin. Les CS étant positionnées sous la lame basale, cette approche permettrait de conserver uniquement cette population cellulaire, accrochée à la fibre musculaire. Après quatre jours de culture en milieu adipogénique, les auteurs ont observé la présence d'adipocytes marqués au Oil Red O. Néanmoins, il est possible que la digestion enzymatique nécessaire au retrait du tissu matriciel autour des fibres musculaires, dans

lequel reposent les autres types cellulaires n'ait en réalité pas été suffisante pour en dépléter la totalité. Les auteurs n'ayant pas vérifié la pureté des cellules une fois en culture, il est aussi possible d'imaginer une contamination par des cellules d'origine mésenchymateuse présentes dans le tissu matriciel très proches de la lame basale. A ce jour et depuis 2010, la découverte de nouveaux marqueurs permettant l'identification spécifique des progéniteurs musculaires que nous avons décrits dans le chapitre I avec notamment le CD56 chez l'homme et Pax-7 ou l' $\alpha 7$ -intégrin couplée à d'autres marqueurs de surface chez la souris a permis l'isolement de cellules capables de former des myotubes mais incapables de se différencier en adipocytes, même en milieu adipogénique<sup>29,30,32</sup>.

- **Les progéniteurs fibro-adipogéniques.** Comme présenté précédemment, les FAPs sont des MSCs douées de capacités de différenciation adipocytaire (à la fois *in vivo* et *in vitro*)<sup>252,269,405</sup>. Elles présentent également de fortes capacités sécrétoires de MEC<sup>171</sup> et forment des colonies de fibroblastes (FSP-1<sup>+</sup>/ $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>)<sup>31,32</sup>. Différents arguments expérimentaux ont permis de démontrer que ces cellules peuvent être à l'origine de la formation du dépôt fibro-adipeux observé dans les conditions pathologiques que nous avons énumérées. Le marqueur PDGFR $\alpha$  a été déterminant dans cette démonstration. En effet, un tri cellulaire basé sur l'immunophénotype PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD31<sup>-</sup> a mis en évidence une population cellulaire qui se différencie en adipocytes *in vitro* mais aussi capable de s'accumuler autour de zone fibrotique une fois réinjectée dans un muscle murin mdx et sécréter de fortes quantités de collagène I<sup>363</sup>. *In vivo*, des expériences de traçage de lignée utilisant des souris transgéniques PdgfraCreERT : Rosa26EYFP ont mis en évidence que les cellules PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> sont la principale source d'adipocytes dans le muscle squelettique<sup>406</sup> et le myocarde<sup>85</sup> dans des modèles murins pathologiques d'infiltration adipeuse.

Les mécanismes qui régissent la différenciation adipocytaire des FAPs ou leur sécrétion de protéines matricielles, qui se produisent simultanément chez les sujets atteints de dégénérescence fibro-adipeuse et qui participent à la dérégulation de l'homéostasie musculaire, pourraient être classés en deux groupes :

**Régulation extrinsèque des FAPs:** De nombreuses études montrent que différents types de molécules sécrétées dans l'environnement musculaire au cours de dégénérescence musculaire ou de la régénération physiologique du muscle influencent le comportement des FAPs. Le TGF- $\beta$  à l'effet pro-fibrotique, inhibe également l'adipogenèse, suggérant ainsi que le gradient de concentration de TGF- $\beta$  joue un rôle déterminant dans le destin des FAPs. Des études ont démontré que la sécrétion de TGF $\beta$  par les macrophages inhibe l'apoptose des FAPs et favorise leur sécrétion de MEC, mettant ainsi en évidence leur rôle pro-fibrotique dans le muscle dystrophique<sup>405</sup>. Le dialogue entre les macrophages et les FAPs via la sécrétion de TGF- $\beta$  semble jouer un rôle important dans ce processus de différenciation. En effet, le traitement des FAPs humains avec des milieux conditionnés provenant de macrophages polarisés vers un profil inflammatoire a été associé à une diminution de l'adipogenèse des FAPs grâce à la voie

de signalisation du TGF- $\beta$ <sup>407</sup>. En revanche, le milieu conditionné par les macrophages polarisés vers un profil anti-inflammatoire a réaugmenté la différenciation des FAPs en adipocytes<sup>407</sup>. Ces différents travaux montrent que la balance phénotypique des macrophages constitue un levier direct permettant une inhibition ou au contraire une activation de la différenciation adipogénique des FAPs dans le muscle dans ces situations pathologiques.

Outre le TGF- $\beta$ , la voie de signalisation du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) joue également un rôle crucial dans le destin des cellules stromales<sup>408</sup>. Les ligands PDGF, qui se lient aux récepteurs PDGF (PDGFR) liés à la membrane cellulaire, sont composés de cinq isoformes dimériques : PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-CC, PDGF-DD et PDGF-AB<sup>409,410</sup>. Ces ligands sont libérés principalement par les plaquettes, mais aussi par les macrophages inflammatoires et les fibroblastes qui peuvent également les exprimer et les sécréter<sup>411</sup>. Les ligands PDGF agissent comme de puissants chimio-attractants pour les cellules mésenchymateuse<sup>412</sup>. Le traitement des FAPs *in vitro* avec les ligands PDGF-AA et PDGF-BB induit l'activation et la prolifération des FAP<sup>43,413</sup>. Il a également été observé une augmentation de l'expression des gènes de la MEC au sein des FAP en réponse à un traitement par le PDGF-AA<sup>43,414</sup>. Des études utilisant des inhibiteurs pharmacologiques de la signalisation PDGFR ont démontré un rôle de cette voie dans le remodelage de la MEC musculaire tandis qu'une exposition prolongée au ligand PDGF entraîne la mise en place d'une fibrose musculaire pathologique<sup>415,416</sup>. En effet, il a été montré que le traitement au PDGF-AA augmente l'expression du collagène de type I dans les FAPs tout en réduisant leur différenciation adipogénique<sup>36</sup>. Ainsi, la signalisation du PDGF constitue un régulateur du devenir des FAPs dans le muscle squelettique et sa dérégulation dans les conditions pathologiques représente une des explications de la dégénérescence fibro-adipeuse<sup>269</sup>.

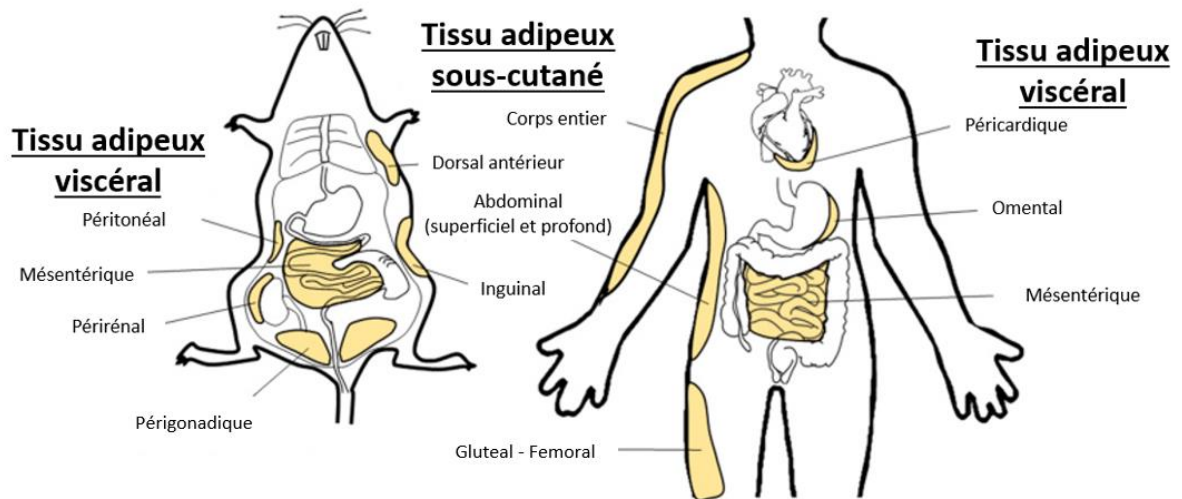
**Régulation intrinsèque des FAPs** : En plus des changements quantitatifs observés dans la population de FAPs, des altérations qualitatives ont été identifiées grâce à des analyses de cytométrie en flux et de séquençage en cellule unique au sein des muscles d'animaux dystrophiques. Deux sous-populations de FAPs, caractérisées en cytométrie par leurs niveaux d'expression des marqueurs sca-1 et cd34<sup>35</sup> sont présents dans les muscles des animaux dystrophiques. Un niveau de sca-1 élevé est associé à un état prolifératif tandis qu'un niveau faible plutôt un état pro-adipogénique<sup>35</sup>. Une étude récente menée sur un modèle murin *mdx* a mis en évidence par des approches de séquençage ARN en cellules uniques qu'il existait différentes sous-populations de FAPs<sup>417</sup>. Parmi ces populations on observe une population *Ly6c1<sup>hi</sup>P16<sup>hi</sup>* qui exprime majoritairement des gènes impliqués dans la dégradation de la MEC comme *timp2* et *timp3*, une population *Hsd11b1<sup>+</sup>* qui expriment plutôt des gènes impliqués dans la modulation de la MEC comme *mmp2* et *mmp14* et une population *Postn<sup>+</sup>* exprimant des gènes impliqués dans la sécrétion de collagène comme *Col1a1*, *Col1a2*, *Col3a1* et *col5a2*<sup>417</sup>. Même si les capacités fonctionnelles de chacune de ces populations n'ont pas été testées *ex vivo* dans cette étude, chaque population de FAPs posséderait une fonction précise dans la régulation de la MEC. La dérégulation de l'expression de chacun de ces gènes au sein des différentes populations de FAPs qui est observée dans le modèle *mdx* pourrait être une cause du déséquilibre de la balance sécrétion / dégradation de la MEC au cours de la mise en

place de la fibrose. Plus récemment, une étude a été réalisée chez l'homme par Fitzgerald et al. à partir de biopsies de patients ayant subi une arthroplastie de la hanche (THA), une condition également associée à une dégénérescence adipeuse des muscles à proximité. Les auteurs ont identifié et caractérisé fonctionnellement une population particulière de FAPs pro-adipogéniques exprimant le marqueur *mme* ainsi que d'autres gènes comme *ptgds*, *cxcl14* et *smoc2* impliqués dans l'immunorégulation et l'organisation de la MEC<sup>418</sup>. *In vitro*, la population de FAPs *mme*<sup>+</sup> possède des capacités de différenciation en adipocytes plus importante que la population de FAPs *mme*<sup>-</sup>. Ces résultats suggèrent qu'il existe deux populations de FAPs distinctes, chacune impliquée dans la dégénérescence adipeuse et fibreuse. En revanche, cette étude n'apporte pas de point de comparaison chez des sujets sains, qui aurait permis de mieux caractériser cette population et surtout de comprendre son évolution au cours de la mise en place de la pathologie. Tout comme pour les CS, les FAPs semblent exprimer différents gènes qui pourrait influencer leur devenir et/ou leur sécrétion dans le muscle.

À ce jour, les travaux de la littérature n'ont pas encore pu déterminer de manière définitive si la fibrose et/ou l'accumulation adipeuse observée dans des conditions physiopathologiques résulte de l'émergence d'une nouvelle population de FAPs dans le muscle ou de modifications quantitatives et/ou qualitatives d'une population déjà présente à l'état basal et qui est ensuite modifiée par le micro-environnement. Il convient de noter que les études qui utilisent le PDGFR $\alpha$  comme marqueur dans les modèles de déplétion et de traçage cellulaire ne peuvent pas attribuer les effets observés uniquement à la population de FAPs, car ce marqueur est également exprimé par d'autres populations cellulaires. Une de ces populations est particulièrement abondante dans le tissu adipeux (TA) et est connue sous le nom de cellules stromales adipeuses (ASCs). A ce titre, nous avons constaté dans nos travaux de fortes similitudes entre les FAPs et les ASCs en termes d'immunophénotype et de fonction, soulignant ainsi la nécessité de mieux comprendre les interactions et les contributions spécifiques de ces deux populations cellulaires dans les processus de régénération et de dégénérescence musculaires.

### **Le tissu musculaire pathologique :**

- Dans la majeure partie des cas, l'environnement de la CS est modifié et les dialogues cellulaires sont perturbés altérant le processus de régénération.
- Le développement de tissus fibro-adipeux exacerbé dans l'environnement de la CS est un point commun à différents types de dégénérescence musculaire et de défaut de régénération.
- L'origine de ces tissus non myogéniques est encore sujet de débats mais les FAPs PDGFR $\alpha^+$  semblent être de bons candidats pour expliquer leur développement.
- Une sous-population de FAPs pro-adipogéniques est retrouvée dans des muscles qui présentent une dégénérescence fibro-adipeuse.
- En situation pathologique, la démonstration du changement phénotypique d'une population de FAPs déjà présente ou bien l'apparition d'une nouvelle sous-population de FAPs n'ont jamais été démontrées.
- Les modèles murins de traçage et de déplétion cellulaire ne peuvent pas être spécifiques de la population de FAPs puisque leurs marqueurs sont aussi partagés par d'autres types cellulaires.



**Figure 11 : Répartition des différents dépôts adipeux chez l'homme et la souris.** Image adaptée de Kwok et al. (2019)

## IV/ Le tissu adipeux blanc : un réservoir de MSCs mobilisables

Le TA représente en moyenne environ 15 à 25% du poids corporel<sup>419</sup> chez l'homme adulte sain et entre 10 à 15% du poids corporel de la souris adulte. Il existe en réalité plusieurs types de TA, composés de types d'adipocytes distincts, et ayant des localisations anatomiques et des profils métaboliques uniques. On distingue le TA blanc (impliqué dans le stockage d'énergie) du TA brun (impliqué dans la thermogénèse)<sup>420</sup>. Le TA blanc est le plus abondant<sup>419</sup>, son rôle principal est de stocker l'énergie sous forme de triglycérides et, en situation de besoin énergétique d'hydrolyser les triglycérides par le processus de lipolyse<sup>421</sup>. Le TA blanc est réparti dans tout l'organisme, avec deux principales localisations chez l'homme : le TA sous-cutané (ScAT) qui compte pour 80% de la masse grasse corporelle totale (Figure 11) et le TA viscéral entourant les organes internes, sous le péritoine et qui représente 20% de cette même masse (Figure 11)<sup>419,422</sup>. Chez le rongeur, on observe une répartition similaire sous forme de dépôts adipeux<sup>423</sup>, mais on retrouve également un TA situé autour des organes génitaux, appelé TA périgonadique (PGAT).

Sur le plan cellulaire, le TA blanc comporte deux fractions principales. Son parenchyme, composé d'adipocytes blancs uniloculaires, et une fraction stroma-vasculaire (SVF) hétérogène<sup>424-426</sup>. Ces fractions cellulaires peuvent être isolées séparément de manière enzymatique<sup>427</sup>. En se basant sur ce protocole, les études ultérieures ont pu mettre en évidence, d'abord par cytométrie en flux puis plus récemment par des approches de séquençage ARN en cellule unique, les différentes populations cellulaires de la SVF du TA chez l'homme et la souris<sup>424,425,428,429</sup> :

- **Les cellules endothéliales vasculaires** identifiées à l'aide du marqueur CD31 (PECAM-1) comptent pour 15 à 20% des cellules de la SVF<sup>426</sup>. Les approches scRNAseq ont ensuite permis de clustériser les cellules endothéliales humaines et murines en cellules vasculaires sanguines, lymphatiques ainsi que les péricytes et les cellules musculaires lisses<sup>425</sup>. Les approches complémentaires d'imagerie ont souvent sous-estimé la présence du réseau vasculaire dans le TA. Cependant, cette faible vascularisation en apparence, est en réalité due à la grande taille des adipocytes. Une étude démontre chez la souris en période de jeûne, accompagné d'une réduction de la taille des adipocytes, qu'il est possible de mettre en évidence un réseau vasculaire important qui entoure chaque adipocyte<sup>430</sup>.
- **Les cellules immunitaires** résidentes du TA sont plus nombreuses que dans le muscle squelettique puisqu'elles représentent environ 30% à 40% des cellules de la SVF<sup>426</sup>. Ces cellules, identifiables à l'aide du marqueur CD45, sont majoritairement des macrophages/monocytes (CD14<sup>+</sup>) qui comptent pour 60% des leucocytes du TA et des cellules NK (CD96<sup>+</sup>) qui représentent environ 30% de cette fraction. Les lymphocytes B/T et les neutrophiles sont présents en plus petite proportion<sup>426</sup>. Le rôle principal décrit pour les cellules immunitaires résidentes du TA se trouve dans l'élimination des



corps étrangers et des cellules apoptotiques. Néanmoins, il est de mieux en mieux établi qu'elles ont des effets locaux et systémiques. Par exemple, les macrophages et leurs sécrétions modulent la fonction sécrétoire des adipocytes, leur métabolisme lipidique mais aussi la formation des adipocytes<sup>431,432</sup>.

- **Les cellules stromales adipeuses (ASCs)** représentent environ 30% de la SVF<sup>426</sup>. Les adipocytes ne possédant aucune capacité de prolifération, la genèse de nouveaux adipocytes provient forcément de la présence d'un précurseur présent dans la SVF. En effet, lorsque la SVF est cultivée en condition adipogénique il a été observé l'apparition d'adipocytes et les auteurs ont proposés le terme de « pré-adipocytes » pour définir cette population. Par la suite, les travaux pionnier de Patricia A. Zuk et al. (2001)<sup>424,433</sup> réalisés chez l'homme permettrons de définir par cytométrie en flux une population cellulaire CD34<sup>+</sup>/CD90<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup> ainsi que l'absence des marqueurs hématopoïétiques (CD45<sup>-</sup>) et endothéliaux (CD31<sup>-</sup>), capables de se différencier dans tous les lignages mésenchymateux (adipocytes, ostéocytes, chondrocytes) *in vitro*. Les auteurs proposeront alors le terme ASC pour nommer cette population cellulaire progénitrice. Les ASCs représentent donc la population de précurseurs adipocytaires permettant l'auto-renouveaulement du tissu adipeux à raison de 10% du TA total par an<sup>434</sup>.

Les ASCs du stroma adipeux partagent donc des caractéristiques communes avec les populations de FAPs du stroma musculaire et plus généralement avec les populations de MSCs de la MO. Dans la partie suivante, nous aborderons plus en détail en quoi les ASCs et les FAPs sont des populations cellulaires similaires en implémentant les descriptions qui ont été réalisées jusqu'à aujourd'hui.

### 1) Similitudes entre ASCs et FAPs

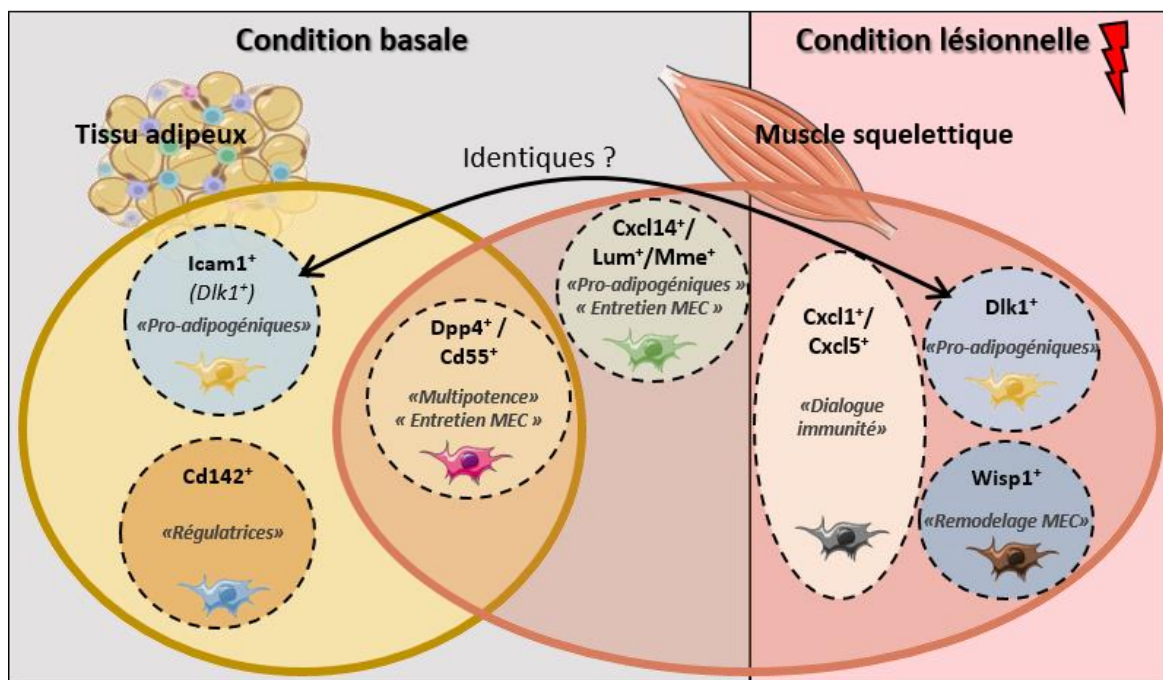
Au même titre que les FAPs, les ASCs font partie de la famille des MSCs et présentent des caractéristiques communes :

- **L'immunophénotype.** D'autres marqueurs sont venus s'ajouter à l'identification des ASCs parmi lesquels on observe la présence majeure du PDGFR $\alpha$  et CD73 chez l'homme et la souris tandis que Sca-1 est uniquement exprimé chez la souris<sup>425,435</sup>. Ces observations ont permis de dresser un immunophénotype complet des ASCs, avec des marqueurs de surfaces : PDGFR $\alpha$ , Sca-1 (murin uniquement), CD34, STRO-1, CD90, CD105, CD73. L'ensemble de ces marqueurs est partagé avec les populations de FAPs.
- **Capacité d'adhérence au plastique et activité clonogénique.** Après leur tri depuis le TA blanc chez l'homme et la souris par des approches de cytométrie en flux en utilisant les marqueurs cités plus haut, les ASCs ont démontré des capacités d'adhérence au plastique en culture ainsi que la capacité de former des clones lorsqu'elles sont ensemencées à faible densité<sup>93,436</sup>. Cette capacité a été comparée à celle des MSC de la MO qui possèdent une capacité clonogénique inférieure aux ASCs<sup>436</sup>. Il serait alors intéressant de savoir si l'activité clonogénique des ASCs est supérieure ou pas à celle observée pour les FAPs.

- **Capacités de différenciation** : Les ASCs murines et humaines ont démontré toutes les capacités de différenciation dans les différents lignages mésenchymateux (adipocytes, ostéocytes et chondrocytes) permettant de les définir comme de réelles MSCs<sup>436</sup>.
- **Localisation intra-tissulaire** : Une autre observation faite *in situ* sur du ScAT humain a permis de localiser les ASCs à proximité du réseau vasculaire, dans le tissu matriciel qui entoure les adipocytes<sup>93</sup>. Cette observation ne rentre pas dans la définition des MSCs, en revanche elle permet de faire un parallèle avec la population de FAPs musculaires aussi présente à proximité des vaisseaux sanguin dans le réseau matriciel.

Par des approches de séquençage ARN en cellule unique la population d'ASC du TA a pu être mieux définie chez l'homme et la souris. Dans les prochaines sections nous allons aborder les différentes études qui traitent de l'hétérogénéité de la population d'ASCs des différents TA (ScAT et PGAT) humains et murins. Si les ASCs ont été caractérisées bien avant les FAPs<sup>433</sup>, l'étude de leur hétérogénéité par des méthodes de séquençage de l'ARN en cellule unique n'est que plus récente. Les différents travaux ayant analysé les TA murins (sous-cutané -ScAT, et PGAT) avec cette technologie s'accordent tous sur la description de 3 sous-populations d'ASCs en condition basale chez la souris : i) une population de progéniteurs multipotents avec les marqueurs principaux *dpp4*, *cd55* ou *cd34* (Tableau 2) douée d'une forte activité proliférative, ii) une population de précurseurs engagés dans la voie adipogénique (avec marqueurs principaux *icam1*, *dlk1*, *pparg*) et iii) une population d'ASCs régulatrices (avec marqueurs principal *cd142*) capables de réprimer l'adipogénèse des autres ASCs via leur activité paracrine<sup>425,437-440</sup> (Figure 12). Chez l'homme ces populations sont également conservées<sup>418,437</sup> en condition basale et pathologique<sup>441</sup>.

Une étude récente menée chez l'homme a réalisé au sein de la même analyse une comparaison des populations d'ASCs du TA avec les FAPs des muscles fessiers. Dans un contexte de dégénérescence adipeuse des muscles fessiers associée à une arthroplastie de la hanche, les travaux de Fitzgerald et al.<sup>418</sup> proposent une comparaison de leurs données humaines de FAPs dans le muscle avec les résultats de Merrick et al.<sup>437</sup> sur les ASCs de TA, dans le but de faire émerger une population cellulaire à fort potentiel adipogénique à l'origine de la dégénérescence adipeuse. Ici, nous utiliserons cette étude dans un but comparatif entre les populations d'ASCs et de FAPs. Sur le plan transcriptionnel, une sous-population d'ASCs multipotentes du TA exprimant *dpp4* s'apparente fortement à la sous-population de FAPs *cd55*<sup>+</sup> du muscle en condition non lésionnelle (Figure 12). En revanche, la population d'ASCs du TA *icam*<sup>+</sup>/*dlk1*<sup>+</sup> pro-adipogénique semble transcriptionnellement distincte de la population de FAPs *mme*<sup>+</sup> douée pourtant, au sein du muscle, du même potentiel de différenciation. Néanmoins, il est intéressant de noter que cette population de précurseurs du TA engagés dans l'adipogénèse s'apparente fortement aux populations de FAPs respectivement *dlk1*<sup>+</sup> et *icam1*<sup>+</sup> décrites par Oprescu et al. et Merrick et al. dans le muscle post-lésion et qui seraient la source des adipocytes ectopiques en situation pathologique<sup>418,442</sup> soulevant ainsi la question de l'existence de sous-populations de MSCs communes à ces deux tissus en condition lésionnelle (Figure 12).



**Figure 12 :** Représentation des différentes sous-populations d'ASCs et FAPs identifiées par scRNAseq présentes dans le tissu adipeux et le muscle en condition basale et lésionnelle. Le tissu adipeux comporte 3 sous-populations d'ASCs : (1) *Icam1+* (2) *Cd124+* et (3) *Dpp4+* à l'état basal. Le muscle possède 2 sous-populations de FAPs : (1) *Cxcl14+* (2) *Dpp4+* à l'état basal. Les populations *Dpp4+* du TA et du muscle sont très similaires sur le plan génique et fonctionnel. A l'état lésionnel, le muscle comporte 3 sous-populations supplémentaires : (3) *Cxcl1+* (4) *Wisp1+* (5) *Dlk1+* et il semblerait que la population (5) *Dlk1+* soit très similaire à la population (1) *Icam1+* du TA décrits comme « pro-adipogéniques ».

Pour conclure cette partie, les ASCs présentent de fortes ressemblances avec les populations de FAPs musculaires tant sur le plan immunophénotypique que fonctionnel. Même si les analyses récentes de séquençage ARN en cellule unique ont fait ressortir des sous-populations cellulaires transcriptionnellement distinctes entre les deux tissus, une sous-population *dpp4+/cd55+* serait partagée entre ces deux tissus à l'état basal. En plus de leurs marqueurs, ces populations partagent aussi les mêmes capacités de multipotence. De manière intéressante, la population *Dlk1+* présente dans le muscle blessé possède des marqueurs et fonctions adipogéniques identiques à la population *Icam1+* du TA à l'état basal. Il se pourrait alors que ces deux populations cellulaires présentes dans des tissus différents dérivent de progéniteurs communs.

L'intérêt de l'utilisation du séquençage ARN en cellule unique serait aussi de pouvoir faire émerger des sous-populations d'ASCs pouvant présenter des fonction sécrétoires et/ou de différenciation plus importantes et qui présenteraient une efficacité supérieure en thérapie cellulaire. Dans les parties suivantes, nous allons faire un bref résumé de la façon dont les ASCs sont utilisées en médecine régénérative aujourd'hui, nous mettrons en avant les avantages et les limites de cette utilisation et proposerons une méthode alternative qui pourrait permettre de les contourner.

## 2) L'utilisation des ASCs en médecine régénérative

La puissance de l'utilisation des ASCs en thérapie cellulaire repose sur i) leur capacité à se différencier en diverses cellules spécialisées leur permettant de remplacer les cellules et les tissus endommagés dans certaines conditions pathologiques mais surtout ii) les ASCs sécrètent un ensemble de facteurs angiogéniques, anti-apoptotiques et immunomodulateurs qui facilitent la réparation et la régénération des tissus par des actions autocrines et paracrines. En effet, elles jouent un rôle crucial dans la régulation du système immunitaire, libérant des facteurs anti-inflammatoires ou immunosuppresseurs qui s'avèrent efficaces pour améliorer la réaction de l'hôte contre le greffon, des maladies auto-immunes et des maladies inflammatoires<sup>443,444</sup>. A ce jour, 469 essais cliniques utilisent ces cellules et visent à tester leur effet dans une variété de contextes pathologiques tels que la lipoatrophie, les dystrophies musculaires, la cirrhose du foie, l'infarctus du myocarde, les accidents vasculaires cérébraux, les lésions de la moelle épinière, les réactions de l'hôte contre le greffon, l'arthrose, la maladie de Crohn et le cancer (<https://clinicaltrials.gov/>)<sup>443,445</sup>.

Prenons l'exemple de l'utilisation des ASCs dans le contexte des dystrophies musculaires. Le potentiel thérapeutique des ASCs dans le traitement des dystrophies musculaires a été démontré lorsqu'elles ont été greffées chez des souris *mdx* atteintes de la dystrophie musculaire. En effet, la transplantation d'ASCs humaines non différenciées dans les muscles de souris *mdx*, qui présentent une déficience en dystrophine, a abouti à une restauration à long terme de l'expression de la dystrophine humaine dans les fibres musculaires murines<sup>446</sup>. Les mécanismes d'actions des ASCs dans ce cas précis ne sont pas encore réellement compris. On peut alors se questionner sur la capacité des ASCs à fusionner avec les fibres musculaires altérées pour pouvoir rapporter l'information génétique manquante<sup>447</sup> ? Aussi, puisque les

ASCs sécrètent des exosomes et d'autres vésicules extracellulaires contenant des cargaisons bioactives, tels que des protéines, de l'ADN, de l'ARNm, du micro-ARN, de l'ARNt et de l'ARN non codant<sup>448,449</sup>, serait-il possible d'envisager un apport de la protéine, du gène ou de l'ARNm de la dystrophine manquant permettant de restabiliser son expression dans le modèle *mdx* ?

Par ailleurs, en mars 2022, un essai clinique de phase I utilisant des greffes autologues d'ASCs a été démarré aux Etats-Unis avec le traitement de 9 patients présentant des myosites à inclusions (ClinicalTrials.gov ID : NCT04975841). A ce jour, les résultats obtenus n'ont pas encore été rendus publics, mais il est espéré que les capacités immunomodulatrices des ASCs entraînent une diminution stable de l'état inflammatoire présent dans les muscles des patients qui permettrait une restauration de la force de contraction musculaire. En effet, la myosite à inclusion est une maladie musculaire inflammatoire caractérisée par l'accumulation anormale de protéines à l'intérieur des cellules musculaires, formant des inclusions. Elle provoque généralement une faiblesse musculaire progressive et peut affecter différents groupes musculaires, plus particulièrement les extrémités (membres inférieurs et avant-bras).

#### a) Les avantages de l'utilisation des ASCs en thérapie

Avant l'utilisation des ASCs en thérapie, les MSCs dérivées de la MO ont fait l'objet des premières utilisations pour favoriser les prises de greffes intestinales dans les réactions de l'hôte contre le greffon grâce à leurs propriétés immunomodulatrices<sup>450,451</sup>. A ce jour, les stratégies de thérapie cellulaire sont fondées sur le prélèvement des MSCs / ASCs par ponction de MO ou de TA, leur isolement par digestion enzymatique, une étape d'amplification *in vitro* et leur réinjection. L'administration peut se faire selon différentes voies : sous-cutanée, intraveineuse ou au niveau du site lésé. Le plus souvent, des mécanismes de migration cellulaire sont mis en place afin que les MSCs puissent rejoindre le site d'intérêt après leur injection. Comparées aux MSCs de la MO, les ASCs présentent plusieurs avantages significatifs en thérapie. Tout d'abord leur **accessibilité** et le **rendement**, ainsi le prélèvement de TA est moins invasif et permet d'obtenir de plus grandes quantités de cellules<sup>452,453</sup>. De plus, les ASCs ont une capacité de prolifération plus élevée que les MSCs<sup>454</sup>. Ces cellules sont également **plus actives dans la production autocrine** de certains facteurs de croissance et de cytokines immunomodulatrices. Par exemple, les ASCs expriment des niveaux plus élevés d'ARNm pour plusieurs facteurs de croissance tels que le VEGF-D, l'IGF-1 et l'interleukine-8 (IL-8)<sup>455</sup>. Des études ont montré que les ASCs du TA étaient plus efficaces que les MSCs de la MO pour traiter les lésions de la moelle épinière chez les rats, ce qui a été attribué à une **plus grande activité de migration, prolifération et sécrétion** des ASCs<sup>456</sup>. En mars 2018, Alofisel a obtenu la première Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) en Europe pour l'utilisation allogénique des ASCs dans le traitement de la maladie de Crohn<sup>457</sup>, maladie inflammatoire de l'intestin pouvant provoquer dans les cas les plus graves des lésions tissulaires au niveau du rectum. Pourtant, on constate encore un faible ratio entre le faible nombre d'AMM et le nombre total d'essais cliniques utilisant des ASCs en médecine régénérative. Cette constatation témoigne

de limites dans l'utilisation des ASCs en thérapie que nous allons aborder dans la partie suivante.

## b) Limites de l'utilisation des ASCs en thérapie

Bien que l'intérêt de l'utilisation des ASCs, comme les MSCs, en thérapie soit largement démontrée, la faible maîtrise des étapes d'amplification en culture et des événements de migration de ces cellules vers le tissu d'intérêt suite à leur injection est un facteur limitant pour ces thérapies. Comme évoqué plus haut, les MSCs (dont les ASCs) se caractérisent par une adhérence au plastique. C'est de cette manière qu'elles sont isolées et mises en culture afin de les amplifier avant leur réinjection. Cependant, cette mise en culture n'est pas sans conséquences pour les MSCs et influence :

- Leur immunophénotype : plusieurs études montrent que l'immunophénotype des cellules fraîchement isolées est différent de celui des cellules en culture<sup>458</sup>. Plus particulièrement, les travaux de l'équipe ont montré que l'expression du marqueur de surface CD34, une glycoprotéine transmembranaire impliquée dans des mécanismes d'adhésion et de transduction du signal de la MEC, présent à la surface des ASCs isolées de ScAT humain était quasiment perdu après une semaine de culture<sup>93</sup>. De la même manière, d'autres études ont pu démontrer, chez le rat, que l'expression des marqueurs CD29 (intégrin  $\beta$ 1) et CD73 (ecto-5'-nucléotidase) décrits comme des acteurs clés de la régulation de l'activité de migration des MSCs, était réduite selon les méthodes de culture<sup>458</sup>. Les étapes de culture sont donc susceptibles de modifier le comportement migratoire des MSCs par le biais de la perte d'expression de marqueurs de surface impliqués dans des processus d'adhésion cellule/matrice et/ou cellule/cellule. Il a d'ailleurs été démontré que les MSCs murines fraîchement isolées possèdent de meilleures capacités à repeupler une MO de souris irradiée par rapport à des MSCs cultivées, et ce dès les 24 premières heures de culture<sup>459</sup>. Ce phénomène apparaît alors comme un facteur limitant majeur dans l'efficacité de la greffe suite à l'injection des MSCs après culture.
- Leur taille/morphologie : des études sur des ACSs humaines issues de culture primaire ont montré qu'après 4 jours de culture, les petites cellules rondes se transforment en grande cellules fusiformes<sup>460</sup> et leur diamètre passe de 10 à 20  $\mu$ m. Ce diamètre est en fait plus large que celui des micro-capillaires pulmonaires, chez l'Homme comme chez la souris, entraînant alors leur rétention non spécifique au niveau des poumons après transfusion<sup>460</sup>. De la même façon, plusieurs groupes ont observé la rétention non spécifique des MSCs post-culture dans le foie et les reins après leur injection par voie systémique<sup>461</sup>. Ces différents organes sont alors considérés comme une barrière à la transplantation cellulaire et constituent une autre limite à l'efficacité de la thérapie cellulaire.
- Leurs capacités de différenciation : une étude effectuée sur des MSCs isolées de MO de rat cultivées montre que les MSCs perdent progressivement leur potentiel de



différenciation en adipocytes et osteocytes<sup>462</sup>. Cela se traduit par une baisse d'expression des gènes impliqués dans la différenciation cellulaire.

La capacité de nichage et de rétention dans le tissu d'intérêt des ASCs et MSCs ne sont pas complètement maîtrisés à ce jour. Or la connaissance des mécanismes contrôlant la migration et le nichage (ou homing) des ASCs, comme celle des MSCs s'avère indispensable puisque directement reliée à leur statut d'outil de thérapie cellulaire. La plupart des ASCs ou MSCs injectées, que ce soit dans la circulation sanguine ou directement dans le tissu d'intérêt ne sont pas toutes retrouvées au niveau du tissu d'intérêt<sup>463-466</sup> mais peuvent aussi se loger au niveau d'autres organes comme les poumons ou le foie<sup>467</sup>.

L'ensemble de ces phénomènes constitue des freins importants au développement des thérapies cellulaires à partir de MSCs cultivées. La mobilisation endogène des MSCs, faisant référence au processus de migration *in vivo* des MSCs depuis un réservoir tissulaire vers un tissu d'intérêt, représenterait donc une alternative intéressante à l'apport exogène de MSCs dont les limites liées aux étapes de culture ont été présentées ici.

### 3) La mobilisation endogène des ASCs

Plusieurs études ont démontré que des MSC endogènes sont présentes dans la circulation sanguine de diverses espèces, bien que leur fréquence soit généralement faible, se situant entre 0 et 0,025 colonies par million de cellules mononucléaires dans le sang périphérique<sup>468</sup>. Cependant, il est important de noter que la circulation des MSCs endogènes augmente de manière significative en réaction à divers types de lésions. Par exemple, que ce soit en cas de traumatismes squelettiques<sup>469</sup>, de cardiomyopathies<sup>470,471</sup>, de syndrome coronarien<sup>472</sup>, de brûlures cutanées<sup>473</sup>, de lésions hépatiques<sup>474</sup>, ou de certains types de cancers<sup>475</sup>, ces situations cliniques sont autant d'exemples où l'augmentation de la circulation endogène des MSCs a été observée chez l'homme.

La compréhension actuelle de la façon dont circulent les MSCs dans le sang est limitée, principalement parce que ces connaissances reposent sur des études réalisées sur des MSCs en culture qui ont été réintroduites dans la circulation sanguine, dans le but d'extrapoler le comportement des MSC natives. Des recherches ont révélé une interaction étroite entre les MSCs et le microenvironnement sanguin. Par exemple, l'utilisation de la microscopie confocale *in vivo* a révélé que la plupart des MSCs intravasculaires sont en contact avec les plaquettes et/ou les neutrophiles<sup>476</sup>. Ce mécanisme implique la podoplanine, exprimée par les MSCs qui est le ligand endogène pour le récepteur de type lectine C2 (CLEC-2) exprimé à la surface des plaquettes et les leucocytes inflammatoires<sup>477,478</sup>. De plus, la réduction du nombre de plaquettes diminue la migration des MSCs vers les sites de lésion chez la souris<sup>476</sup>, témoin de l'intérêt fonctionnel de cette association.



La mobilisation endogène, en plus de la circulation endogène, fait intervenir la notion de « **recrutement** » des MSCs/ASCs depuis leur réservoir physiologique puis la notion de « **homing** » (nichage, ayant initialement été décrit pour la capacité des cellules souches hématopoïétiques à repeupler leur niche/MO après injection dans la circulation sanguine<sup>479</sup>) des cellules au terme de leur circulation<sup>480</sup>. Le phénomène de mobilisation endogène des ASCs/MSCs est très peu documenté dans la littérature et reste sujet à débat. A ce jour, il n'existe pas de marqueurs des MSCs qui soit tissu spécifique et qui permettrait de suivre leur mobilisation d'un réservoir vers un tissu d'intérêt. De ce fait, des stratégies expérimentales alternatives ont vu le jour avec objectif de repeupler un réservoir physiologique (MO ou TA) de ASCs//MSCs fluorescentes. Ces travaux ont été résumés dans une revue de l'équipe<sup>480</sup>.

La première étude qui a étudié la possibilité d'une mobilisation endogène a été menée par MG. Kolonin en 2009 et avait pour hypothèse de travail que la croissance tumorale accélérée observée en situation d'obésité pouvait être favorisée par le recrutement d'ASCs depuis le TA et leur adressage au niveau de la tumeur (Figure 13)<sup>481</sup>. Pour suivre la mobilisation endogène des ASCs, leur modèle consistait à greffer un dépôt de TA, depuis une souris exprimant constitutivement la GFP au sein d'une souris sauvage non fluorescente. Leur étude rapporte suite à la greffe d'un fragment de ScAT fluorescent en sous cutané puis celle d'une tumeur, la présence de cellules GFP<sup>+</sup> au niveau de la tumeur qui participent à la croissance tumorale<sup>481</sup>. En injectant des ASCs fluorescentes, isolées de la SVF du TA par tri cellulaire, directement dans la circulation sanguine ces mêmes auteurs ont observé que les ASCs migraient en masse vers la tumeur et participaient à la croissance tumorale en favorisant la néovascularisation de la tumeur par sécrétion de facteurs trophiques (Figure 13). On ne peut cependant pas affirmer que les cellules qui ont quitté le greffon soient des ASCs étant donné que ce tissu provient d'une souris exprimant la GFP de manière ubiquitaire. En plus, les contre marquages utilisés dans leur approche IHC sur coupe de tumeur n'utilisaient que le CD31 sans se servir du CD45 ni d'un marqueur positif connu des ASCs comme Sca-1 ou PDGFR- $\alpha$ . Les cellules GFP<sup>+</sup> observées au sein de la tumeur peuvent donc être des cellules immunitaires (CD45<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup>). Ces travaux suggèrent mais ne permettent pas formellement de démontrer l'existence d'une mobilisation endogène des ASCs.

Dans le cas de la MO, une étape préliminaire consiste à injecter des MSCs exprimant la GFP dans la circulation sanguine de souris irradiées. L'irradiation permet de dépléter les MSCs présentes dans leur réservoir physiologique, la MO, afin de permettre aux MSCs fluorescentes fraîchement injectées de repeupler la MO efficacement. Ensuite, il est possible de suivre les mouvements de ces cellules par microscopie à fluorescence ou par imagerie intravitale. Il a été montré que ces cellules étaient capables de quitter la MO pour rejoindre la peau suite à une brûlure<sup>482</sup> ou le foie après lésion<sup>474</sup> chez la souris. Même s'il est possible d'imaginer que la présence de MSCs fluorescentes soit due à de la rétention non spécifique de ces cellules au niveau de la peau ou du foie suite à leur injection après irradiation, les auteurs observent une plus forte présence de cellules fluorescentes sur des temps plus tardifs (7ième jour) après lésion que sur les temps précoces (1er jour), reflétant soit une arrivée de MSCs soit leur prolifération au cours du temps. En plus, lorsque les MSCs sont injectées directement dans la

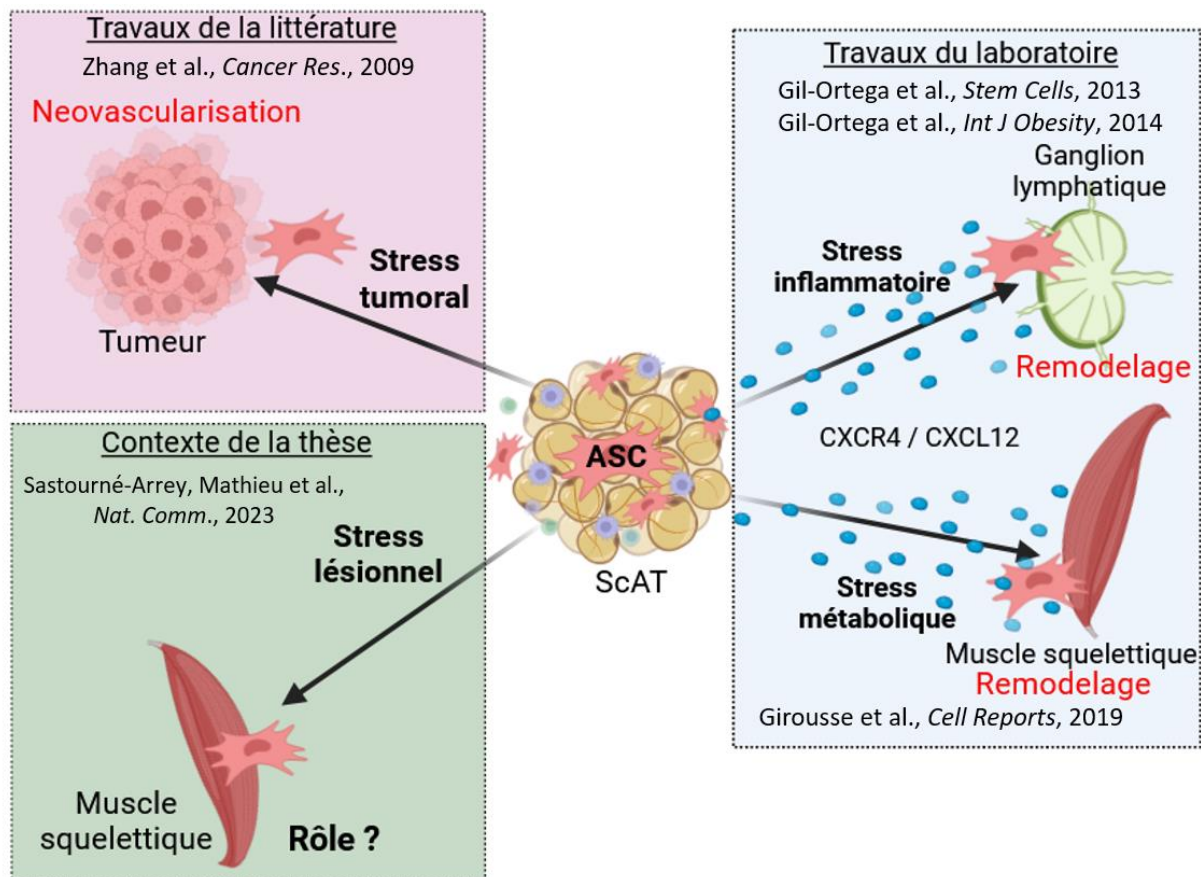
MO, aucune cellule fluorescente n'est retrouvée au niveau du foie des souris non traitées au CCL4 (agent chimique de lésion hépatique), démontrant alors l'efficacité de l'injection cellulaire au sein de la MO.

Les premiers travaux visant à mobiliser des MSCs depuis la MO chez l'homme ont employé du G-CSF (granulocyte colony stimulating factor)<sup>483</sup>, d'abord décrit comme entraînant une libération *in vivo* des HSCs dans la circulation sanguine. Les mécanismes impliqués dans la libération des HSCs dans la circulation impliquent la chimiokine CXCL12 sécrétée par les cellules endothéliales des capillaires sanguins qui bordent la niche hématopoïétique, et son action via le récepteur CXCR4<sup>483</sup>. La perturbation de cet axe par un changement de gradient tissulaire avec une diminution de la concentration dans la MO ou l'utilisation d'un agent pharmacologique perturbant cet axe permet la libération des HSCs dans la circulation sanguine. En plus d'entraîner la libération des HSCs, le G-CSF entraîne aussi celle des MSCs de la MO dans le sang suite à son administration selon des mécanismes similaires à ceux décrits pour les HSCs<sup>484</sup>. L'utilisation de l'AMD3100, un antagoniste du récepteur CXCR4 entraîne également une mobilisation des MSCs de la MO.

Sachant que les ASCs humaines natives exprimaient des niveaux importants de CXCR4<sup>485</sup>, les travaux initiaux du laboratoire ont alors imaginé qu'elles puissent être mobilisées selon les mêmes mécanismes que les MSCs de la MO. Pour provoquer la mobilisation endogène des ASCs et leur sortie du TA, l'utilisation d'un agent pharmacologique perturbant l'axe CXCL12/CXCR4 a été testée. Le modèle de perfusion *ex-vivo* d'un dépôt adipeux murin (TA mésentérique) mis en place au laboratoire a permis de montrer que l'utilisation de l'antagoniste du CXCR4 (AMD3100) entraîne la sortie massive des ASCs du TA à partir des 90 premières minutes du traitement<sup>486</sup>. Aussi, l'administration *in vivo* de l'AMD3100 conduit à une diminution du contenu en ASCs du ScAT et du TA mésentérique sur les mêmes temps. L'axe CXCL12/CXCR4 est également impliqué dans la libération des MSCs de la MO puisque l'administration d'AMD3100 entraîne une augmentation de la présence des MSCs dans la circulation sanguine<sup>487</sup>. D'autres travaux montrent que l'axe CXCL12/CXCR4 est aussi nécessaire dans le processus de nichage (homing) des ASCs<sup>488</sup> et des MSCs<sup>489</sup>. En effet, l'utilisation d'anticorps bloquant CXCR4 diminue la capacité de ces cellules à atteindre le tissu d'intérêt suite à leur mobilisation pharmacologique chez la souris, dans un contexte de pathologie cérébrale<sup>464</sup> (maladie d'Alzheimer). Ces résultats complètent alors ceux observés *in vitro* et mettent en évidence l'implication majeure de l'axe CXCL12/CXCR4 dans la rétention des MSCs/ASCs dans leur tissu d'origine mais aussi dans leur guidage vers un tissu lésé.

Sur la base de ces observations, les travaux suivants de l'équipe ont cherché à mettre en évidence une mobilisation endogène des ASCs *in vivo*, dans une situation physiologique. Ayant démontré que des ASCs murines injectées dans la circulation étaient capables de se nicher au sein des ganglions lymphatiques (GL), l'hypothèse que l'activation du GL puisse déclencher la mobilisation des ASCs des TAs environnant a été posée. L'inflammation caractérisée par l'activation des GL de la patte arrière, déclenchée par vaccination à l'ovalbumine, entraîne une diminution du nombre d'ASCs dans le ScAT et une accumulation de ces cellules au niveau des GL (Figure 13). Suite à l'injection d'ASCs fluorescentes dans la patte arrière, ces cellules ont été observées par microscopie au niveau du GL et décrites pour participer au remodelage du ganglion<sup>486,490</sup>, démontrant ainsi pour la première fois que le TA est un réservoir physiologique d'ASCs mobilisables et capables d'infiltrer un tissu à distance en réponse à un stress inflammatoire.

Plus récemment, l'équipe a travaillé la question de la mobilisation endogène des ASCs dans un autre contexte physiopathologique, celui de l'obésité. Ayant démontré que le TA était capable de libérer des ASCs dans la circulation en situation de stress inflammatoire<sup>486</sup> et sachant que l'obésité était associée avec une augmentation de la circulation des MSCs<sup>491</sup>, ils ont émis l'hypothèse que la formation des adipocytes ectopiques (notamment dans les muscles squelettiques) qui se forment progressivement au cours de l'obésité pouvaient résulter d'ASCs libérées par le TA et infiltrés dans les tissus suite à un régime enrichi en graisses (HFD). Dans ce contexte, ils ont pu observer chez les animaux soumis à un régime HFD de 8 semaines une diminution de la proportion des ASCs CXCR4<sup>+</sup> spécifiquement dans le ScAT, avec une corrélation inverse entre le nombre d'ASCs et le poids du ScAT. Ainsi qu'une augmentation de l'expression des ARNm CXCL12 dans le muscle quadriceps. Afin d'observer cette libération d'ASCs et leur relocalisation musculaire en contexte d'obésité, l'équipe a mis en place un modèle de greffe de ScAT d'une souris exprimant la protéine fluorescente ZsGreen sous le contrôle du promoteur de l'adiponectine (Ad- exprimée par les adipocytes matures)<sup>492</sup>. Ils ont observé chez les souris greffées avec du ScAT des animaux Ad-ZsGreen soumises à un régime gras de manière chronique, la présence d'adipocytes ZsGreen positifs dans les muscles squelettiques corrélée avec la mise en place d'une l'insulino-résistance. Ces adipocytes fluorescents ne peuvent être issus que de la différenciation de précurseurs (ie. ASCs) issus du greffon et ayant infiltré le muscle. Ces travaux ont donc démontré formellement la mobilisation endogène des ASCs du ScAT et leur participation à la formation des dépôts adipeux ectopiques au cours de l'obésité (Figure 13). Ils ont ensuite démontré que la libération provoquée et répétée d'ASCs par l'utilisation chronique de l'AMD3100 chez des animaux nourris en régime normal permettait de reproduire les observations faites en HFD. L'augmentation de la circulation des ASCs peut à elle seule favoriser la formation d'adipocytes ectopiques, sans aucun signal alimentaire/énergétique, les ASC circulantes étant attirées vers les sites ectopiques et étant capables de s'y différencier selon les conditions du microenvironnement<sup>492</sup>. Ces observations proposent également pour la première fois une origine extra-musculaire de la formation de l'IMAT.



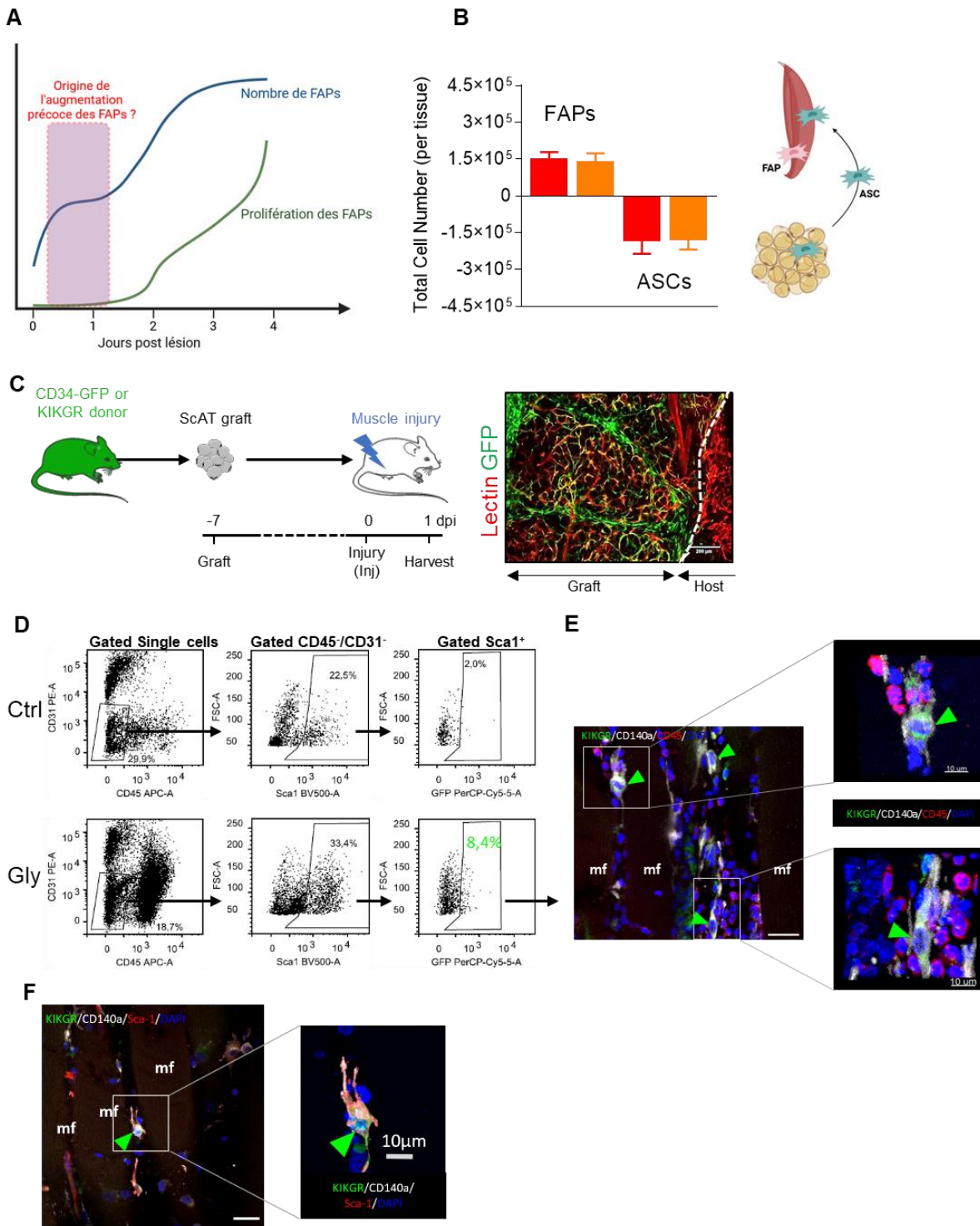
**Figure 13 : Mobilisation endogène des ASCs en réponse à différents stress aigus ou chroniques.** Les travaux de la littérature (en haut à gauche, en violet) ont démontré de manière indirecte une mobilisation des ASCs du ScAT vers la tumeur favorisant la néovascularisation et la croissance tumorale. Les travaux précédents de l'équipe (à droite, en bleu) ont démontré de manière directe la mobilisation endogène des ASCs du ScAT vers le ganglion lymphatique en réponse à une inflammation puis au sein du muscle squelettique en cas de surcharge calorique. Mon projet de thèse se situe dans le cadre d'un stress lésionnel aigu : la lésion musculaire (en bas à gauche, en vert).

Notre laboratoire s'est ensuite intéressé à la question de la mobilisation endogène des ASCs dans un autre contexte de stress tissulaire, à savoir la lésion musculaire aigue, qui constitue le cadre de mon projet de thèse (Figure 13).

En situation de lésion musculaire, différentes observations dans le muscle lésé nous avaient permis de postuler qu'une mobilisation endogène des ASCs pouvait avoir lieu :

- L'augmentation du nombre de FAPs (PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>/Sca1<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup>) observée à 1 jpl par des approches de cytométrie en flux<sup>31,32,246</sup>, malgré l'absence de prolifération de ces cellules à ce stade. L'origine de cette augmentation précoce de FAPs n'était pas expliquée.
- Les études ayant quantifié cette augmentation par cytométrie en flux utilisaient un immunophénotype partagé entre les FAPs et les ASCs, il était donc possible d'envisager que l'augmentation du nombre de FAPs précoce soit en réalité explicable par une infiltration d'ASCs depuis le TA.
- Les études de scRNAseq ont fait état d'une hétérogénéité de la population de FAPs dans le muscle post-lésion (dès 0.5 jpl) avec apparition d'une sous-population de FAPs dite « activée ». Cette hétérogénéité était attribuée aux changements d'expression génique induites par le micro-environnement lésionnel permettant aux cellules d'acquérir temporairement un profil transcriptionnel nécessaire pour assurer leurs différentes fonctions au cours de la régénération musculaire<sup>50-53,55</sup> mais pouvait aussi correspondre à l'arrivée d'une sous-population d'origine extra-musculaire.





**Figure 14 : La lésion musculaire déclenche une sortie massive des ASCs du ScAT suivi de leur infiltration dans le muscle.** A Représentation de l'évolution du nombre et de la prolifération des FAPs post lésion musculaire, adapté de Lemos et al. (2015) B Nombres de FAPs ou d'ASCs dans le muscle lésé et le tissu adipeux sous-cutané (ScAT) 1 jour post-lésion. n=15 (Gly) et n=9 (CTX) animaux pour le muscle, et n=10 (Gly) et n=10 (CTX) animaux pour le ScAT, sur trois expériences indépendantes. C Modèle de greffe de tissu adipeux sous-cutané (ScAT) provenant d'une souris CD34-GFP ou KikGR fluorescent dans des souris C57Bl/6 de type sauvage (partie gauche). Image d'immunohistofluorescence du ScAT 7 jours après la chirurgie de greffe (partie droite, barre d'échelle 200  $\mu$ m). D Analyse en cytométrie de flux de la SVF provenant du muscle lésé par Gly (1 jour après l'injection) des souris greffées. E-F Analyse immunohistologique in situ du quadriceps lésé par Gly (1 jour après l'injection) chez les souris greffées avec le ScAT KikGR (les flèches vertes pointent vers les cellules KikGR<sup>+</sup>/CD140 $\alpha$ <sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> (E), ou KikGR<sup>+</sup>/CD140 $\alpha$ <sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup> (F)). Barre d'échelle 10  $\mu$ m. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart type standard ; \*p < 0,05.

Ayant antérieurement démontré que les ASCs pouvaient être mobilisées depuis le ScAT durant diverses situations de stress, l'équipe a émis l'hypothèse que suite à la lésion musculaire le ScAT pouvait libérer des ASCs qui infiltreraient le muscle lésé pour participer, avec le pool de FAPs, à la régénération musculaire (Figure 13).

Au moment de mon arrivée dans l'équipe, les travaux entamés par Quentin Sastourné-Arrey (ancien doctorant de l'équipe) avaient démontré :

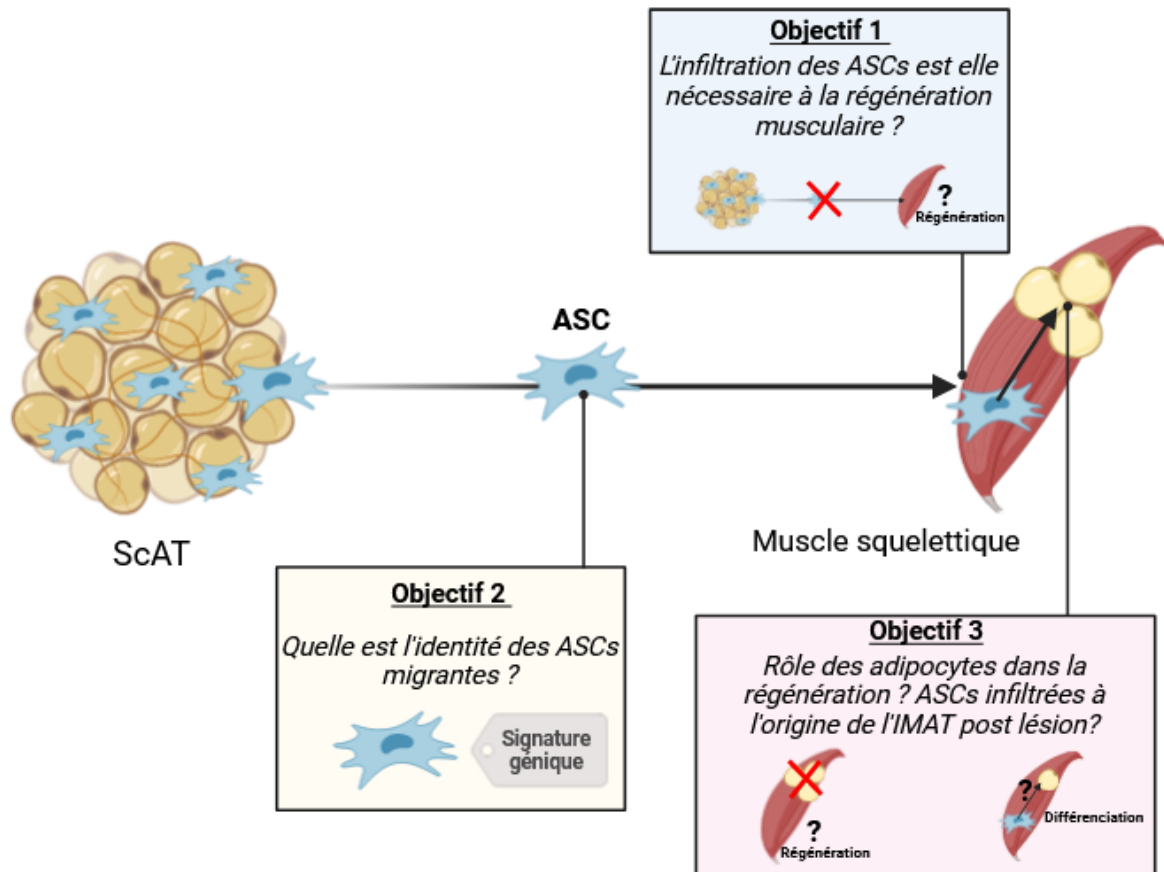
- Une diminution rapide (dès 1 jpl) du nombre d'ASCs dans le ScAT concomitante à l'augmentation du nombre de FAPs dans le muscle quadriceps lésé par des approches de cytométrie en flux (Figure 14B).
- La présence d'ASCs indifférenciées ( $GFP^+/PDGFR\alpha^+/Sca1^+/CD31^-/CD45^-$ ) dans le muscle quadriceps lésé à 1 jpl<sup>493</sup> en utilisant le modèle de greffe de ScAT fluorescent (Figure 14C) développé par l'équipe couplé à des méthodes de cytométrie en flux (Figure 14D) et d'immunofluorescence (Figure 14E-F).

Ces premiers résultats avaient permis d'assoir l'hypothèse posée en amont et de démontrer l'existence de la mobilisation endogène des ASCs en contexte de lésion musculaire. Néanmoins, le rôle de cette infiltration précoce d'ASCs dans le muscle sur le phénomène de régénération musculaire ainsi que les mécanismes régulant cette mobilisation endogène n'avaient pas été démontrés et c'est autour de ces questions que se sont inscrits les différents objectifs de mon projet de thèse.

#### **Le tissu adipeux blanc :**

- Le TA représente un réservoir majeur de MSCs appelées ASCs.
- Les ASCs présentent de fortes similitudes phénotypiques et fonctionnelles avec les FAPs.
- Ces cellules sont très utilisées en thérapies pour leurs capacités sécrétoires immunomodulatrices et/ou de différenciation.
- Les travaux de l'équipe ont démontré que le TA pouvait libérer des ASCs qui infiltrent d'autres organes en réponse à des stress inflammatoires ou métaboliques.
- En situation de lésion musculaire les ASCs du ScAT infiltrent rapidement le muscle lésé.
- Déterminer le rôle fonctionnel de cette infiltration dans la régénération musculaire constitue le contexte de ce projet de thèse.





**Figure 15 :** Plan expérimental et objectifs du projet de thèse.

## OBJECTIFS

Après un traumatisme musculaire, la capacité du muscle à se régénérer repose sur la présence des CS, qui sont les seules cellules capables de former de nouvelles fibres musculaires lorsqu'elles sont activées. Il est maintenant largement accepté que d'autres types de cellules, dépourvus d'activité myogénique, soutiennent les CS pendant la régénération. Parmi elles les FAPs, MSCs résidentes du muscle, favorisent la prolifération des CS et leur différenciation en myoblastes, puis en myocytes, grâce à leur activité paracrine. Récemment, l'équipe a montré que les ASCs, MSCs résidentes du ScAT, infiltrent le muscle lésé dès le 1er jpl. Par conséquent, ces données impliquent qu'après une lésion musculaire, la population de FAPs est composée de FAP résidents et d'ASCs infiltrées. Mon travail de thèse a porté sur la compréhension du devenir et du rôle joué par les ASCs infiltrées dans le processus de régénération musculaire. Il a été décrit dans la littérature que des adipocytes intramusculaires (IMAT) peuvent apparaître transitoirement après une lésion musculaire autour de 10 jpl sans que ce dernier n'entrave le processus de régénération<sup>110,116,178</sup>. En considérant que (1) les ASCs/FAPs sont des précurseurs d'adipocytes, (2) que les lipides sont des acteurs essentiels dans les processus de régénération tissulaires<sup>494-497</sup> et que (3) l'équipe a démontré que dans un contexte physiopathologique de surcharge métabolique, les ASCs infiltrées dans un muscle sont capables de se différencier en adipocytes, **l'objectif général de mon travail de thèse a été de démontrer que les ASCs infiltrées dans le muscle lésé jouent un rôle clef dans le processus de régénération et en partie par leur capacité de différenciation adipocytaire.**

Dans ce contexte, mon projet s'est articulé autour de plusieurs objectifs spécifiques :

- **Objectif 1 : Définir le rôle de l'infiltration des ASCs dans le processus de régénération musculaire chez la souris.**

Les travaux du laboratoire chez la souris avaient démontré que dans les premières 24h suivant une lésion musculaire, le ScAT libère des ASCs qui infiltrent le muscle lésé. Pour déterminer le rôle de cet événement lors du processus de régénération musculaire (Figure 15), nous avons cherché à perturber l'infiltration précoce des ASCs du ScAT vers le muscle lésé et évalué par analyse histologique et fonctionnelle l'impact sur la régénération musculaire (Figure 15). Ensuite, nous avons évalué l'effet d'un apport exogène d'ASCs dans un muscle lésé, dont l'infiltration des ASCs avait été perturbée, sur le processus de régénération musculaire *in vivo*.

- **Objectif 2 : Caractériser l'identité des ASCs qui infiltrent le muscle après la lésion.**

Notre second objectif a été de caractériser la population d'ASCs libérée par le ScAT et qui infiltre le muscle suite à la lésion<sup>493</sup>. Nous pensons que l'augmentation de l'hétérogénéité des FAPs dans le muscle suite à la lésion décrite dans la littérature<sup>49-51,53</sup>, peut en partie résulter de cette infiltration d'ASCs (Figure 15). A partir de tissu adipeux et musculaire murins, nous avons utilisé des approches de cytométrie en flux, de séquençage ARN sur groupes de cellules triées et en cellule unique, à la fois sur la population d'ASCs et de FAPs. L'analyse bio-informatique de ces données en collaboration avec le Dr Xavier Contreras et sa doctorante

Margaux Labrosse, a eu pour ambition de faire émerger un marqueur ou une signature génique spécifique de la population d'ASCs infiltrées. L'identification de tels marqueurs pouvant permettre d'isoler spécifiquement la population d'ASCs migrantes afin de mieux en étudier ses propriétés régénératrices *in vitro* dans un autre temps.

- **Objectif 3 : Evaluer l'origine cellulaire et l'importance fonctionnelle du dépôt transitoire d'adipocytes dans la régénération musculaire**

Nous avons émis l'hypothèse que la formation transitoire d'IMAT post-lésion pouvait jouer un rôle favorable dans le mécanisme de régénération (Figure 15), d'autant plus que sa présence est concomitante avec les phases tardives de la régénération musculaire, c'est à dire de fusion des myoblastes et maturation des myofibres néoformées. Ainsi l'origine et la cinétique précise d'apparition et disparition de l'IMAT post-lésion a été étudié. Cet objectif a été décomposé en plusieurs sous-parties :

- *Sous-partie 1 : Déterminer précisément la cinétique des adipocytes post-lésion.*

Déterminer cette cinétique et la comparer avec celles des autres types cellulaires présents dans l'environnement musculaire pourrait nous informer des possibles interactions des adipocytes avec leur environnement et ainsi proposer des rôles joués par cette population cellulaire au cours de la régénération.

- *Sous-partie 2 : Est ce que les ASCs infiltrées participent à la formation des adipocytes intramusculaires ?*

Pour cela, nous avons re-exploité le modèle de greffe de ScAT fluorescent ainsi que l'apport exogène d'ASCs fluorescentes triées pour travailler la question du devenir des ASCs infiltrées. Notre intention était aussi de phénotyper ces éventuels adipocytes (blancs vs. bruns/beiges) afin de mieux comprendre leur fonction dans la régénération musculaire.

- *Sous-partie 3 : Déterminer le rôle fonctionnel des adipocytes sur le processus de régénération musculaire par des approches in vitro.*

L'objectif suivant a été de déterminer si les adipocytes avaient un effet bénéfique ou délétère sur la formation de nouvelles fibres musculaires au cours de la régénération. Par des approches de co-culture entre les adipocytes dérivés des ASCs ou de FAPs avec des CS, nous avons étudié les dialogues entre ces types cellulaires et l'impact sur le processus de différenciation myogénique *in vitro*. Pour ne pas exclure un rôle des ASCs sous leur forme indifférenciée, nous avons aussi réalisé des approches de co-culture entre des ASCs/FAPs et des CS et évalué l'efficacité du programme myogénique *in vitro*.

- *Sous-partie 4 : Conséquences fonctionnelles in vivo de la déplétion de l'IMAT post-lésion.*

Enfin, notre dernier objectif a été de tester *in vivo* si la perturbation de la formation de l'IMAT transitoire post-lésion avait une conséquence sur l'efficacité de la régénération musculaire. Nous avons utilisé d'une part un modèle de souris incapables de former des adipocytes matures et d'autre part un modèle de mort inductible des adipocytes dans le muscle afin d'étudier les conséquences de la perturbation de l'adipogénèse post-lésion sur l'efficacité de la régénération musculaire.

## RESULTATS

- 1) Définir le rôle de l'infiltration des ASCs dans le processus de régénération musculaire chez la souris.

*Les résultats présentés dans ce chapitre sont intégralement publiés dans l'article suivant :*

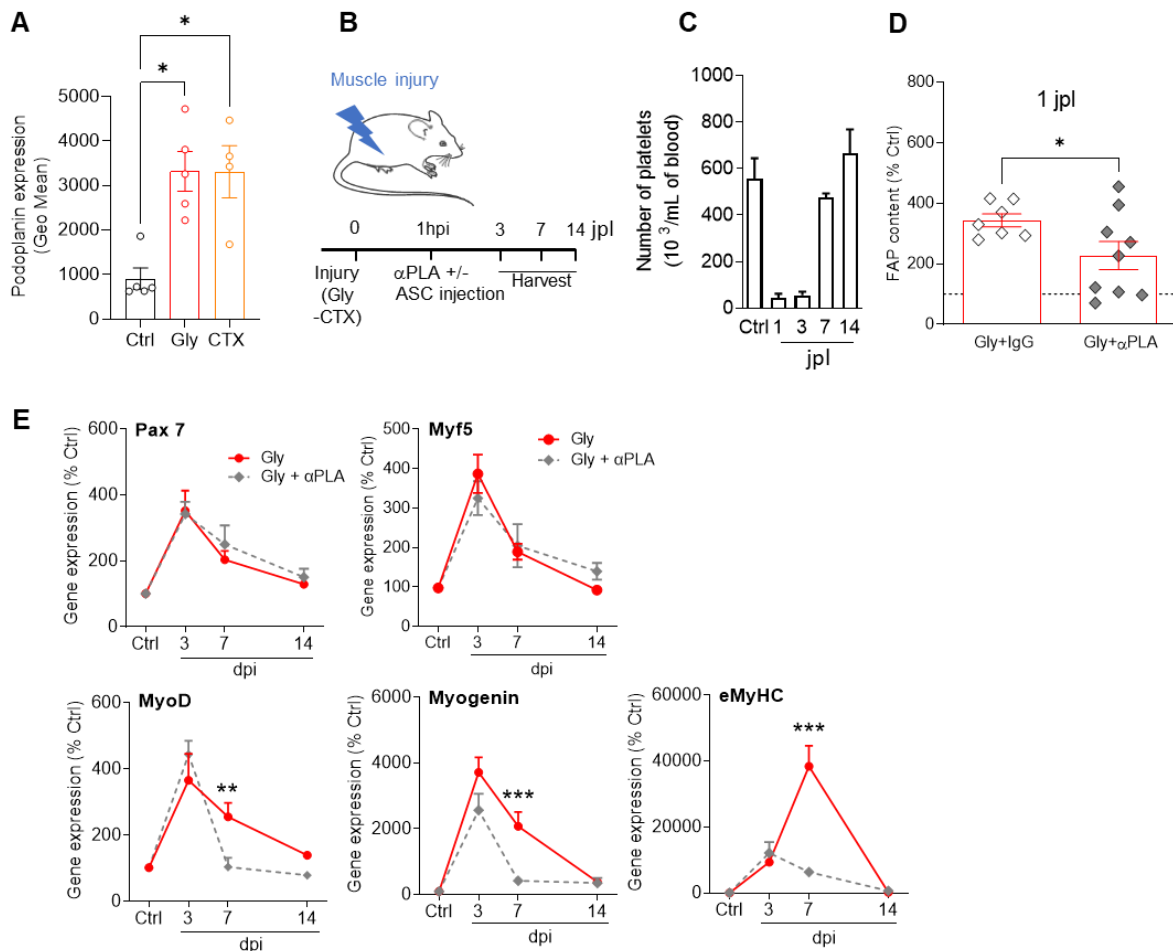
**[Adipose tissue is a source of regenerative cells that augment the repair of skeletal muscle after injury.](#)**

Sastourné-Arrey Q\*, Mathieu M\*, Contreras X, Monferran S, Bourlier V, Gil-Ortega M, Murphy E, Laurens C, Varin A, Guissard C, Barreau C, André M, Juin N, Marquès M, Chaput B, Moro C, O'Gorman D, Casteilla L, Grousse A, Sengenès C. \*contribution équivalente  
Nat Commun. 2023 Jan 5;14(1):80. doi: 10.1038

La première partie de cet article démontre que la lésion musculaire déclenche une libération rapide (dès 1 jpl) d'ASCs depuis le ScAT suivie de leur infiltration dans le muscle lésé. Mon objectif était d'observer si cette infiltration était nécessaire à la régénération musculaire. Pour répondre à cette question, nous avons eu pour stratégie de perturber l'infiltration précoce des ASCs dans le muscle après la lésion et d'évaluer l'efficacité de la régénération musculaire. La difficulté de cette question reposait sur le fait qu'il n'existait pas de marqueurs spécifiques permettant de cibler, pharmacologiquement ou génétiquement, les ASCs du ScAT sans perturber d'autres types cellulaires équivalents comme les ASCs d'autres dépôts adipeux ou les FAPs résidents du muscle par exemple. Pour perturber l'infiltration des ASCs nous avons alors utilisé deux modèles relevant de stratégies différentes mais complémentaires. Le premier modèle que nous avons utilisé avait pour objectif de perturber le trafic des ASCs entre leur compartiment d'origine, le ScAT, et leur tissu cible, le muscle quadriceps lésé. Le second modèle avait pour principe de dépléter le réservoir d'ASCs, c'est-à-dire le ScAT, par un modèle de lipectomie bilatérale.

Le premier modèle que nous avons utilisé visait à diminuer l'infiltration des ASCs dans le muscle en perturbant leur migration entre le ScAT et le muscle lésé. Même si notre compréhension actuelle du trafic *in vivo* des ASCs/MSCs natives est encore très incomplète<sup>480</sup>, certaines études indiquent que les plaquettes contrôlent le trafic et/ou le recrutement des MSCs sur les sites de lésions<sup>476,477,498,499</sup>. Nous avons constaté par ailleurs que les ASCs dérivées du ScAT d'animaux lésés par injection de glycérol (Gly) ou CTX surexpriment à leur surface la podoplanine par rapport aux ASCs d'animaux non lésés (Fig. 1A). La podoplanine est un ligand endogène du récepteur 2 de type lectine (CLEC-2) qui est un récepteur essentiel activant les plaquettes<sup>498</sup>. Les études antérieures de l'équipe avaient démontré *in vitro* une interaction plus forte des ASCs du ScAT issus d'animaux lésés avec les plaquettes par rapport aux ASCs issues d'animaux non lésés<sup>493</sup>. Par ailleurs, l'utilisation d'un anticorps dirigé contre la podoplanine a permis de réduire l'interaction des ASCs avec les plaquettes *in vitro*<sup>493</sup>. En accord avec ce

résultat, plusieurs études rapportent que la majorité des MSCs injectées peuvent être trouvées dans la circulation en association avec les plaquettes pour faciliter leur homing vers les tissus

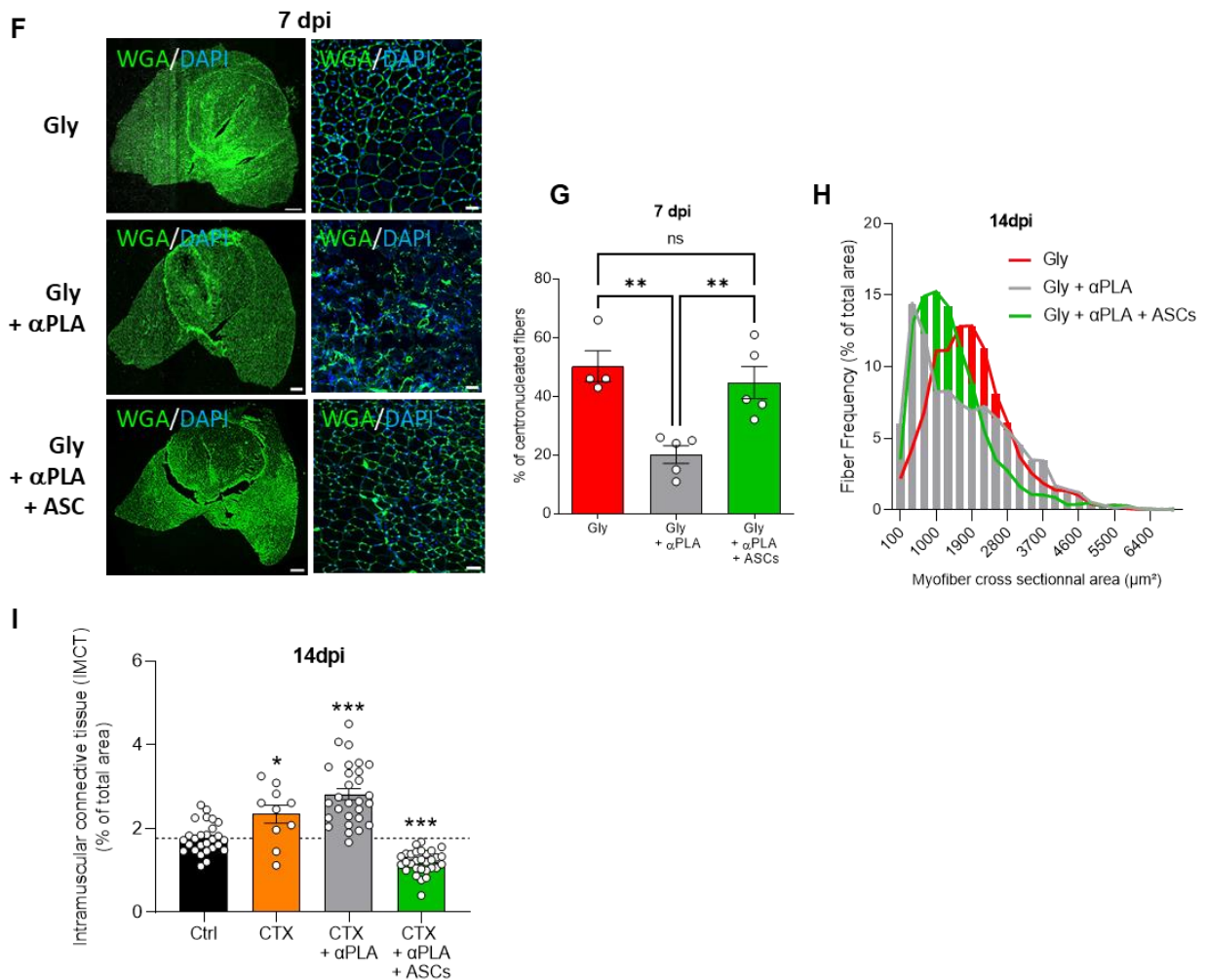


**Figure 1 :** L'interaction des ASCs avec les plaquettes est nécessaire à leur infiltration et à la régénération musculaire.

**A** Expression de la podoplanine à la surface des ASCs dérivées du tissu adipeux sous-cutané (ScAT) d'animaux blessés (Gly et CTX) ou de contrôle (non lésés) par cytométrie en flux à 1 jour post-lésion. n = 5 (Témoin), 5 (Gly), et 4 (CTX) animaux répartis sur trois expériences indépendantes. **B** Modèle de déplétion plaquettaire et d'injection d'ASCs triées selon l'immunophénotype Sca-1<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup> depuis la SVF de ScAT d'animaux contrôles. La figure a été partiellement générée à l'aide de Servier Medical Art, sous licence Creative Commons Attribution 3.0. **C** Évolution temporelle du nombre de plaquettes chez les animaux contrôles lésés au Gly de 1 à 14 jpl. n = 15 (Ctrl) et trois animaux pour chaque autre point temporel sur deux expériences indépendantes. **D** Contenu en FAPs déterminé par cytométrie de flux dans les muscles lésés d'animaux témoins (+IgG) ou déplétés en plaquettes (+αPLA). n = 7 (Gly+IgG) et 9 (Gly + αPLA) animaux sur deux expériences indépendantes. **E** Évolution temporelle de l'expression de l'ARNm des gènes du programme myogéniques dans le muscle quadriceps d'animaux témoins et blessés par Gly, avec et sans déplétion plaquettaire. n = 12-16 (Ctrl) et 5-8 à 3 dpi, 6-8 à 7 dpi, et 6-9 à 14 dpi animaux au cours de quatre expériences indépendantes.

enflammés<sup>476</sup>. Par conséquent, nous avons imaginé que **l'interaction entre les ASCs et les plaquettes était nécessaire pour le recrutement des ASCs dans le muscle lésé et qu'en perturbant cette interaction nous altérerions *in fine* le processus de régénération musculaire**. Le schéma expérimental que nous avons utilisé (présenté en Fig. 1B) consistait à réaliser une déplétion plaquettaire par injection intrapéritonéale d'anticorps anti-plaquettes ( $\alpha$ -Pla) 1 heure après la réalisation des lésions musculaires (Gly ou CTX). Dans un premier temps nous nous sommes assurés de la validation de la déplétion plaquettaire, qui a été maximale 1 jour après l'injection de l'anticorps  $\alpha$ -Pla (Fig. 1C), cinétique pour laquelle l'équipe avait décrit l'infiltration des ASCs dans le muscle lésé, puis un retour à au niveau basal autour du 7<sup>ème</sup> jour après l'injection (Fig. 1C) permettant ainsi d'éviter les effets secondaires de la déplétion plaquettaire à long terme. Après avoir validé la déplétion en plaquettes, nous nous sommes aussi assurés que ce modèle permettait de freiner l'augmentation précoce du nombre de FAPs/ASCs dans le muscle post-lésion. Pour cela, nous avons vérifié par cytométrie en flux sur la Fraction Vasculaire Stromale (SVF) du muscle à 1jpl, que l'augmentation du nombre de cellules Sca-1<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup> était atténué (d'un facteur deux) suite à la déplétion plaquettaire à 1jpl (Fig. 1D). Ces résultats suggèrent que l'infiltration des ASCs dans le muscle implique leur interaction avec les plaquettes et que le modèle de déplétion plaquettaire constitue un premier modèle de perturbation de cette infiltration.

Nous avons ensuite évalué au sein de ce modèle si la perturbation de l'infiltration des ASCs du ScAT dans le muscle entraînait une altération de la régénération musculaire. Pour cela, nous avons évalué l'expression des gènes impliqués dans le programme moléculaire de la différenciation myogénique jusqu'à 14 jpl après lésion au Gly (Fig. 1B). Nous avons constaté que l'expression des marqueurs précoces du programme myogénique (Pax-7 et Myf5) n'était pas altérée alors que celle des marqueurs plus tardifs (MyoD, Myogenin, eMyHC) a été nettement diminuée à partir de 7 jpl suite à la déplétion plaquettaire par rapport au groupe lésé mais n'ayant pas reçu d'injection  $\alpha$ -Pla (Fig. 1E). Ainsi, ces observations indiquent que l'infiltration des ASCs est nécessaire aux étapes tardives de la régénération comme la différenciation et la fusion des progéniteurs myogéniques. Pour renforcer cette observation, nous avons évalué par des approches histologiques la présence des fibres musculaires centronucléées, caractéristique d'évènement de fusion, ainsi que leur taille, deux indicateurs de l'efficacité de la régénération largement acceptés. Nous avons constaté que la proportion de fibres centronucléées à 7 jpl ainsi que la distribution de la taille des fibres en régénération à 14 jpl étaient significativement réduites chez les animaux « déplétion plaquettaire » (Figure 1F-H) indiquant un défaut de régénération. Outre la formation de nouvelles myofibres, la régénération musculaire implique également la restauration du tissu conjonctif par la sécrétion et l'organisation de la MEC<sup>500</sup> alors que le dépôt excessif et persistant de tissu conjonctif intramusculaire (IMCT) est caractéristique de la fibrose<sup>364</sup>. Étant donné que le modèle de lésion CTX est décrit comme davantage pro-fibrotique par rapport au modèle de lésion Gly, nous avons examiné les conséquences de la déplétion plaquettaire dans le contexte CTX<sup>178</sup>. À 14 jpl nous avons observé un dépôt important d'IMCT qui s'aggrave en cas de déplétion plaquettaire (Figure 1I) suggérant que l'infiltration d'ASCs est nécessaire pour une



**Figure 1 (suite) : L'interaction des ASCs avec les plaquettes est nécessaire à leur infiltration et à la régénération musculaire.**

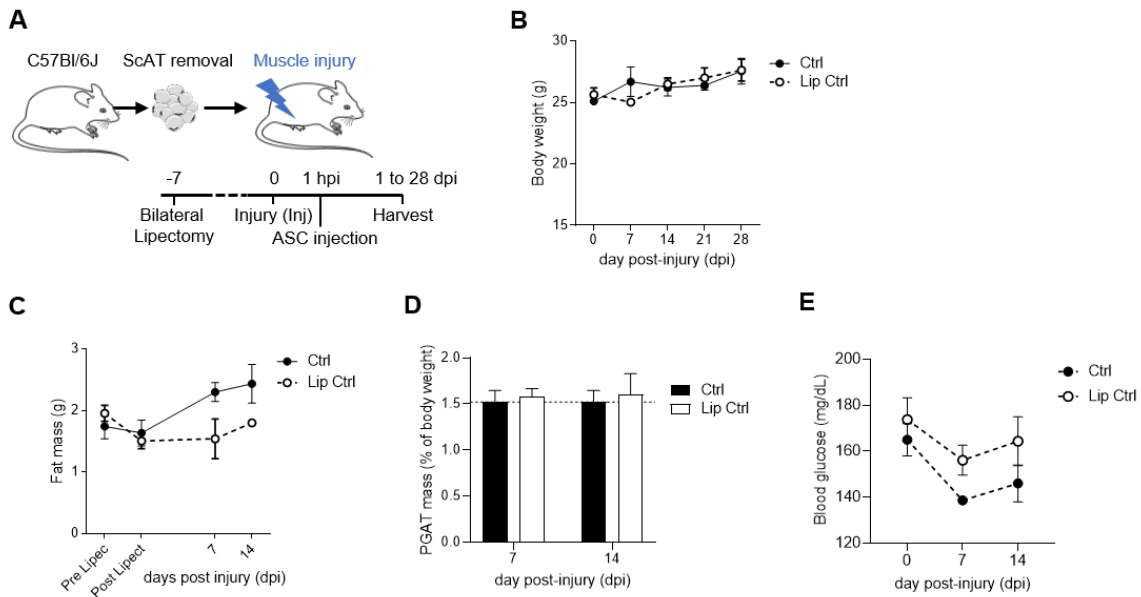
**F** Images de microscopie confocale des muscles quadriceps à 7 jpl (Gly +/- déplétion plaquettaire). Barres d'échelles 500 μm (à gauche) et 50 μm (à droite). **G** Quantification immunohistologique des fibres musculaires néoformées (fibres centronucléées WGA) à 7 jours. n = 5 (Gly), 5 (Gly + αPLA) et 4 (Gly + αPLA + ASCs) animaux sur quatre expériences indépendantes. **H** Distribution de la taille des fibres musculaires en régénération chez les animaux lésés au Gly (rouge), déplétés en plaquettes (gris) et supplémentés en ASCs (vert) à 14 jpl. n = 4 (Gly), 6 (Gly + αPLA), et 5 (Gly + αPLA + ASCs) animaux au cours de quatre expériences indépendantes. **I** Quantification immunohistologique du dépôt d'IMCT dans le muscle quadriceps d'animaux témoins et d'animaux lésés par CTX avec et sans déplétion plaquettaire à 14 jpl. n = 27 (Ctrl), 10 (CTX), 28 (CTX + αPLA), et 30 (CTX + αPLA + ASCs) images de 4, 3, 4, et 4 animaux dans chaque groupe, respectivement, au cours de trois expériences indépendantes. Les résultats sont exprimés en pourcentage des animaux témoins avec une moyenne ± SEM ; \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001.



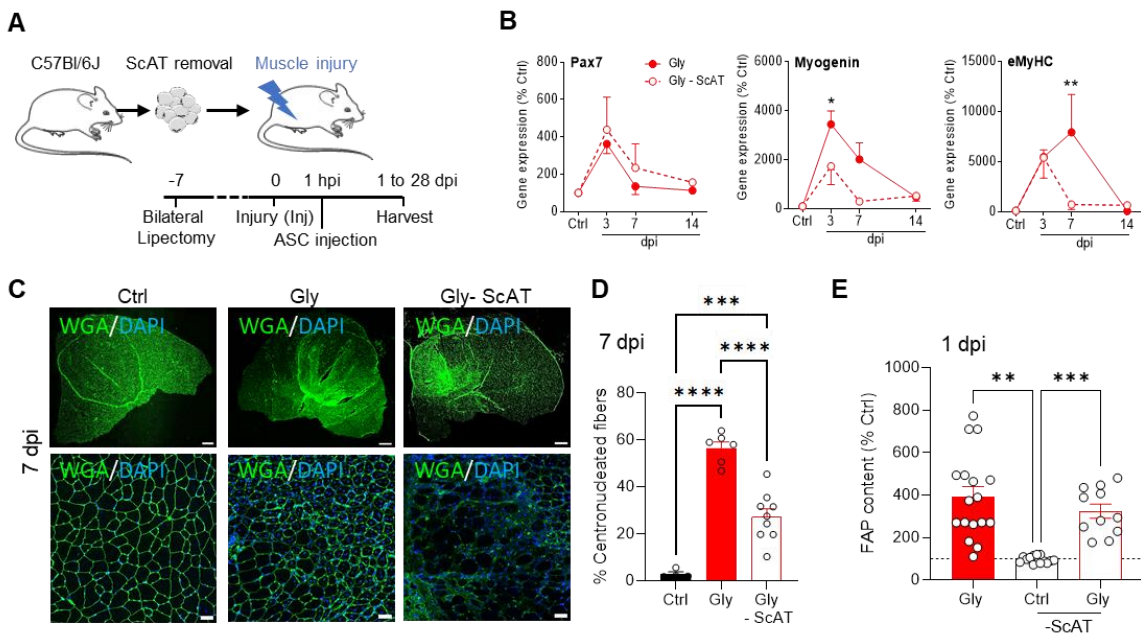
restauration adéquate (quantitative et certainement qualitative) de l'IMCT pour une régénération optimale.

Dans ce contexte, nous voulions savoir si les altérations observées pouvaient être spécifiquement attribuables à l'altération de l'infiltration des ASCs dans le muscle. Pour cela, nous avons réalisé des injections d'ASCs triées de SVF du ScAT dans un muscle lésé Gly ou CTX en même temps que la déplétion plaquettaire (Fig. 1B) afin de mimer/restaurer l'infiltration d'ASCs. Le nombre d'ASCs injectées a été déterminé à partir des quantités d'ASCs disparues dans le ScAT et de celles de FAPs augmentées à 1 jpl, soit environ  $2,5 \cdot 10^5$  ASCs. De manière remarquable, l'injection d'ASCs dans le muscle a permis de complètement restaurer le nombre de fibres musculaires centronuclées dans le modèle de déplétion plaquettaire à 7 jpl (Fig. 1F-G). Sur une cinétique plus tardive, à 14 jpl, l'injection d'ASCs dans ce même modèle a permis de partiellement restaurer la taille des fibres musculaires en améliorant leur répartition vers un profil identique à celui observé dans un modèle de lésion Gly témoin (sans déplétion plaquettaire) (Fig. 1H). Dans le contexte de la restauration du tissu conjonctif après lésion, l'injection intramusculaire d'ASCs a amélioré les niveaux d'IMCT, suggérant un rôle pro-régénérateur des ASCs infiltrées après la lésion musculaire (Figure 1I).

En résumé, ce modèle nous a permis de démontrer que l'infiltration des ASCs dans le muscle après la lésion est un processus bénéfique pour la régénération puisque sa perturbation entraîne des effets délétères sur la régénération musculaire. Ces effets peuvent être attribués à la population d'ASCs étant donné que leur injection intramusculaire dans ce modèle permet de restaurer une régénération musculaire efficace.



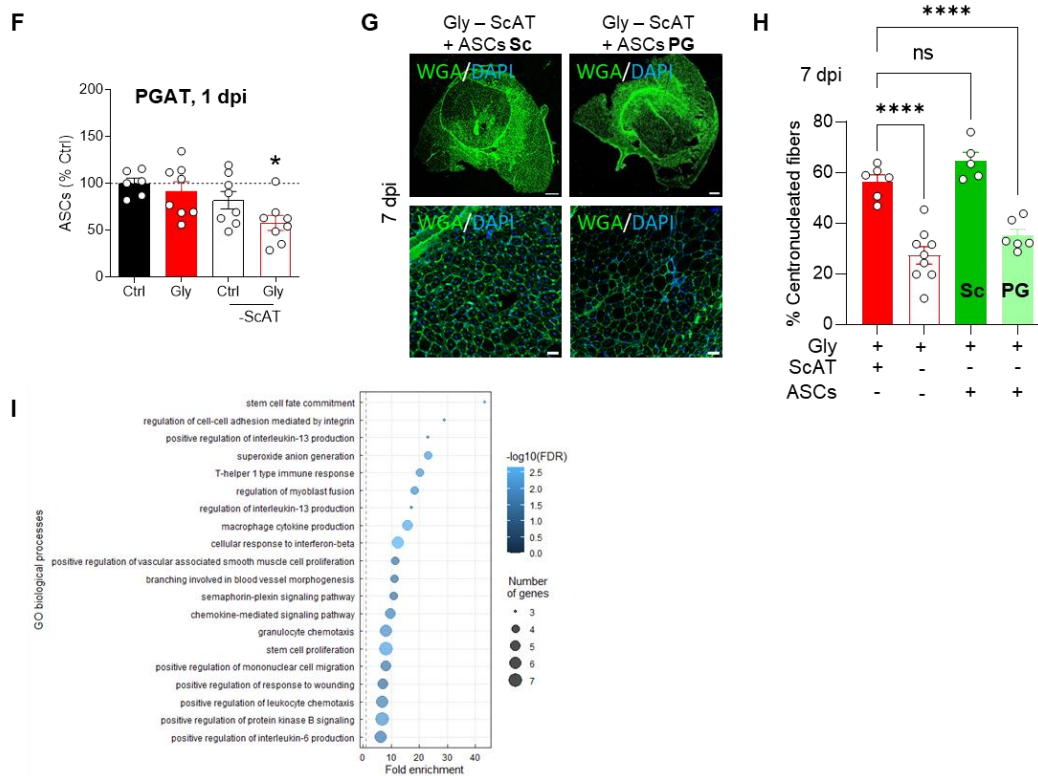
**Figure 2:** Le modèle de lipectomie bilatérale n'influence pas les paramètres morphométriques et métaboliques. A Modèle de lipectomie bilatérale et d'injection d'ASCs. La figure a été partiellement générée à l'aide de Servier Medical Art, sous licence Creative Commons Attribution 3.0. Pour B-E, n = 3-5 (Ctrl), 3-9 (Ctrl-ScAT) animaux sur 3 expériences indépendantes.



**Figure 3:** L'origine tissulaire des ASCs qui infiltrent le muscle est déterminante pour maintenir l'efficacité de régénération du muscle. A Modèle de lipectomie bilatérale et d'injection d'ASCs. Figure partiellement générée à l'aide de Servier Medical Art. B Évolution temporelle de l'expression de l'ARNm des gènes myogéniques dans le muscle quadriceps d'animaux contrôles et blessés au Gly avec et sans lipectomie. n = 4 (Ctrl) et 3-4 à 3 jpl, 3-4 à 7 jpl, 3-4 à 14 jpl animaux au cours de trois expériences indépendantes. C Images en microscopie confocale des muscles quadriceps à 7 jpl (Gly +/- lipectomie). Barres d'échelles 500 µm (en haut) et 50 µm (en bas). D Quantification immunohistologique des fibres musculaires néoformées (centronucléées WGA) à 7 jpl. n = 4 (Ctrl), 6 (Gly), et 9 (Gly-ScAT) animaux sur trois expériences indépendantes. E Nombre de FAPs dans le muscle lésé par Gly ou le muscle témoin avec ou sans lipectomie ScAT. n = 17 (Gly), 13 (Ctrl-ScAT) et 11 (Gly-ScAT) animaux au cours de cinq expériences indépendantes.

Le second modèle que nous avons mis en place avait pour objectif de supprimer la réserve d'ASCs pour bloquer leur migration vers le muscle. Ce modèle consiste en **l'ablation bilatérale des ScAT (double lipectomie) de l'animal afin d'éliminer le réservoir d'ASCs** (Fig. 2A). Nous avons d'abord vérifié l'impact de la lipectomie bilatérale sur les paramètres morphométriques et métaboliques de l'animal pour s'assurer que les effets observés sur la régénération musculaire ne soient pas confondants avec ces paramètres. Le poids corporel et la masse grasse totale n'ont pas été modifiés de manière significative (Fig. 2B-C). Le poids des PGAT, l'autre principal dépôt adipeux, n'a pas augmenté pour compenser l'ablation des ScAT (Fig. 2C). Ensuite, la glycémie n'a pas montré de changements significatifs après la lipectomie bilatérale (Fig. 2D). Le modèle de lipectomie n'entraîne donc pas de variations des paramètres métaboliques majeurs qui avaient pu être associés à la perturbation de la régénération musculaire dans les modèles d'obésité par exemple. Nous avons donc réalisé des lésions musculaires Gly dans ce modèle de lipectomie dans le but d'évaluer les critères quantitatifs et qualitatifs de la régénération musculaire.

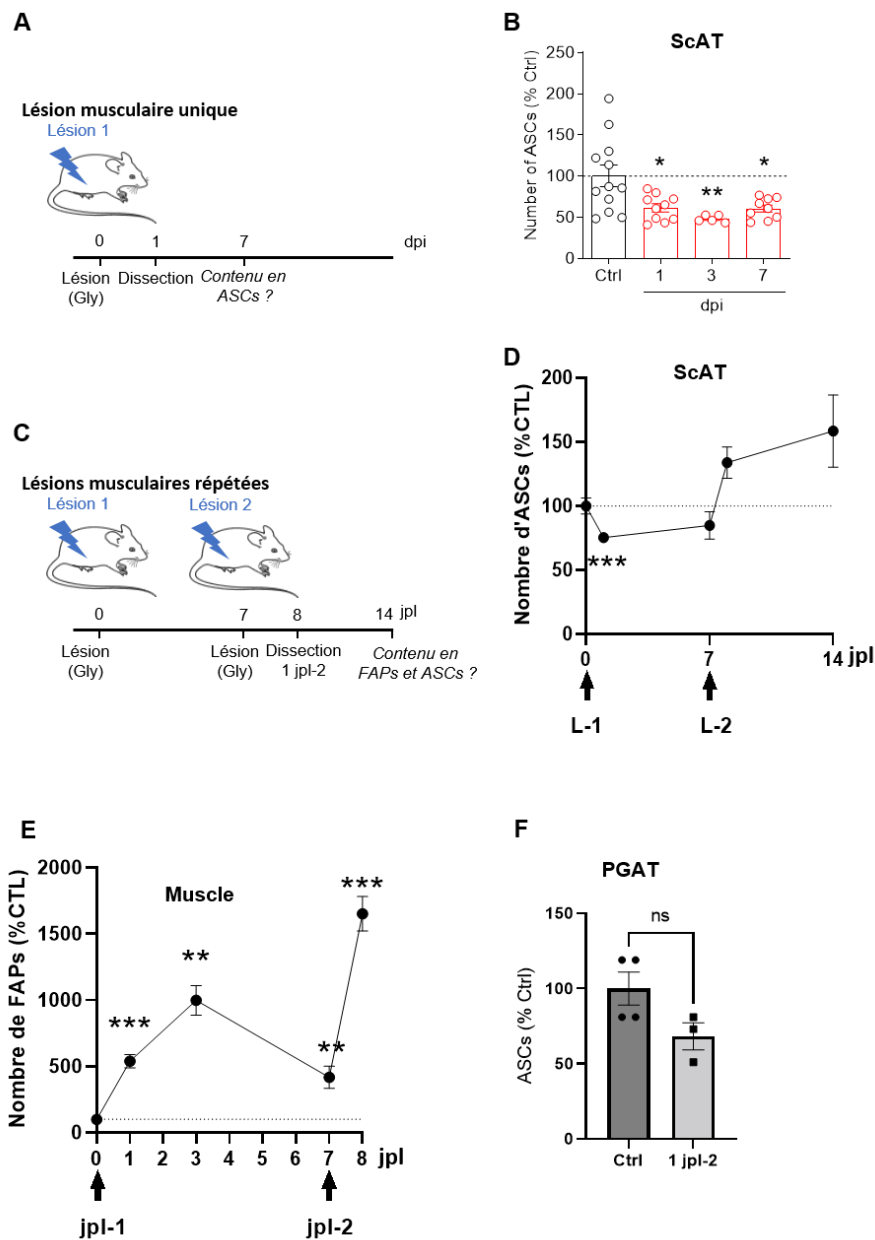
Après la lésion musculaire nous avons dans un premier temps examiné les profils d'expression génique liés à la régénération musculaire (Fig. 3A). Bien que les premières étapes du programme moléculaire de régénération musculaire, illustrée par le marqueur précoce Pax-7, n'aient pas été affectées (Fig. 3B), les marqueurs tardifs de myogenèse, Myog et eMyHC, ont présenté des altérations significatives (Fig. 3B) indiquant de la même manière que pour le modèle de déplétion plaquettaire ( $\alpha$ -Pla), une implication des ASCs dans les phases tardives du processus de régénération musculaire. De la même manière que pour le modèle  $\alpha$ -Pla, nous avons observé une diminution du nombre de fibres nouvellement synthétisées, centronucléées, chez les animaux dépourvus de ScAT (Fig. 3 C-D), démontrant une altération de la régénération du muscle. Par ailleurs, nous avons été surpris de constater la persistance de l'augmentation du nombre de FAPs après la lésion dans les muscles des animaux lipectomiés (Fig. 3E), suggérant la mise en place de processus de compensation permettant de maintenir l'infiltration d'ASCs depuis d'autres réservoirs tissulaires. Nous avons donc quantifié le nombre d'ASCs/MSCs dans d'autres réservoirs (respectivement PGAT et MO) et avons remarqué une diminution du nombre d'ASCs Sca-1<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD31<sup>-</sup> dans le PGAT à 1 jpl chez les animaux dépourvus de ScAT (Fig. 3F). Cette observation laisse penser qu'en l'absence de ScAT, le PGAT prend le relais et fournit au muscle des cellules de type FAPs mais sans pour autant garantir une régénération musculaire efficace puisque la régénération est altérée quand le réservoir ScAT est absent (Fig. 3 C-D). Ces résultats suggèrent aussi que les ASCs, selon leur dépôt adipeux d'origine, possèdent un potentiel de régénération différent. Nous avons donc comparé les conséquences fonctionnelles de l'apport exogène d'ASCs provenant du ScAT ou du PGAT sur l'efficacité de la régénération musculaire chez des animaux dépourvus de ScAT. Dans ce contexte, l'injection d'ASCs issues du ScAT a permis de rétablir le niveau de fibres centronucléées, contrairement aux ASCs dérivées du PGAT (Fig. 3G-H), démontrant ainsi une capacité pro-régénérative supérieure. Enfin, nous nous sommes demandé si les ASCs dérivées du ScAT présentaient un profil transcriptionnel pro-régénératif spécifique, favorisant la



**Figure 3 (suite) : L'origine tissulaire des ASCs qui infiltrent le muscle est déterminante pour maintenir l'efficacité de régénération du muscle.** **F** Quantification du nombre d'ASCs dans le PGAT en condition contrôle ou lésionnelle avec ou sans lipectomie du ScAT. n = 6 (Ctrl), 8 (Gly), 8 (Ctrl-ScAT), et 8 (Gly-ScAT) animaux sur quatre expériences indépendantes. **G** Images en microscopie confocale sur muscles quadriceps lésés Gly et témoins à 7 jpl avec ou sans lipectomie. Barres d'échelles 500 μm (en haut) et 50 μm (en bas). **H** Quantification immunohistologique des fibres musculaires néoformées (fibres centronucléées WGA) à 7 jpl. n = 6 (Gly), 9 (Gly-ScAT), 6 (Gly-ScAT+ASC(ScAT)), et 5 (Gly-ScAT+ASC(PGAT)) animaux sur cinq expériences indépendantes. **I** Analyse des termes de GO entre les ASCs dérivées du ScAT et du PGAT. Les résultats sont exprimés en pourcentage des animaux témoins avec une moyenne ± SEM ; \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001 vs Ctrl.

régénération musculaire. L'analyse fonctionnelle par l'ontologie des gènes (GO) a révélé des profils d'expression génique spécifiques dans les ASCs du ScAT par rapport aux ASCs du PGAT avec un enrichissement des fonctions biologiques liées à la coordination de l'inflammation, à la prolifération et au devenir des cellules souches ainsi que la fusion des myoblastes (Fig. 31), qui sont toutes des voies essentielles pour permettre une régénération musculaire efficace.

En résumé, ce modèle nous a permis de montrer que l'infiltration spécifique des ASCs du ScAT promeut la régénération musculaire puisque l'ablation de leur réservoir conduit à l'altération du processus de régénération musculaire tandis que leur injection intramusculaire permet de la rétablir. Ce modèle nous permet aussi de mettre en lumière la mise en place d'une mobilisation d'ASCs compensatoire depuis d'autres sources cellulaires comme le PGAT lorsque les ASCs ne peuvent pas être mobilisés du ScAT sans pour autant parvenir à soutenir la régénération musculaire. Lorsque les ASC dérivées du PGAT ont été directement injectées dans le muscle lésé, elles n'ont pas pu restaurer la régénération musculaire contrairement à leurs homologues du ScAT.



**Figure 4 : Le ScAT ne semble pas intervenir de la même manière en réponse à une deuxième lésion musculaire qu'à la première.**

**A** Modèle expérimental d'une lésion unique induite par glycérol. **B** Quantification du nombre d'ASCs du ScAT à 1, 3 et 7 jpl. n=11 (Ctrl), n=10 (1 jpl), n=5 (3 jpl), n=9 (7 jpl). **C** Modèle expérimentale de deux lésions induites au glycérol répétées à 7 jours d'intervalle. **D** Evolution du nombre d'ASCs du ScAT dans un modèle de lésions répétées, les flèches indiquent les temps auxquels les lésions ont été effectuées. n=16 (Ctrl), n=10 (1 jpl-1), n=15 (7 jpl-1), n=7 (1jpl-2) et n=4 (7 jpl-2) **E** Evolution du nombre de FAPs quantifié par cytométrie en flux après une lésion unique (jpl-1) ou après une seconde lésion (jpl-2), les flèches indiquent les temps auxquels les lésions ont été effectuées. n=62 (Ctrl), n=29 (1 jpl-1), n=2 (3 jpl-1), n=7 (7 jpl-1) et n=4 (1 jpl-2) **F** Evolution du nombre d'ASC du PGAT quantifié par cytométrie en flux 1 jour après la deuxième lésion (1 jpl-2). n=4 (Ctrl) et n=3 (1 jpl-2). Les résultats sont exprimés en pourcentage des animaux témoins avec une moyenne  $\pm$  SEM ; \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001 vs Ctrl.

*Les résultats présentés dans la section suivante n'ont pas été publiés :*

Pour approfondir notre compréhension de la mobilisation endogène des ASCs du ScAT vers le muscle lésé, nous avons examiné comment la dynamique de ces cellules évolue en condition de lésions répétées (Gly). Nous avons dans un premier temps quantifié le nombre d'ASCs dans le ScAT pendant 7 jpl dans le but de déterminer quand la population d'ASCs retrouvait son niveau basal. Suite à une lésion musculaire unique induite par Gly (Fig. 4A), nous avons noté une diminution du nombre d'ASCs dans le ScAT dès le premier jour, qui persiste jusqu'à 7 jpl (Fig. 4B). Nous avons alors cherché à déterminer si la réalisation d'une seconde lésion (lésion 2 ; l-2) 7 jours après la première (lésion 1 ; l-1) (Fig. 4C) influençait la mobilisation des ASCs depuis le ScAT ainsi que leur infiltration dans le muscle. De manière surprenante, 24h après la seconde lésion (1 jpl-2), la quantité d'ASCs du ScAT n'a pas diminué comme après la première lésion (diminution d'environ 20% à 1 jpl-1) mais a eu tendance à augmenter jusqu'à 7 jpl-2 (Fig. 4D). Dans le muscle, alors que la dynamique transitoire de l'augmentation du nombre de FAPs après une première lésion est largement documentée<sup>31,32,246</sup>, peu d'informations sont disponibles concernant l'évolution de leur nombre après plusieurs lésions. Nous avons observé une augmentation transitoire du nombre de FAPs, débutant à 1 jpl-1 avec un pic à 3 jpl-1 et un retour à la quantité initiale à 7 jpl-1 (Fig. 4E) en accord avec la littérature. La seconde lésion musculaire, pratiquée à 7 jpl-1 a entraîné une augmentation forte et rapide du nombre de FAPs intramusculaire 13 fois supérieure à 1 jpl-2 dépassant même le nombre de FAPs observés après la première lésion (Fig. 4E). Ces résultats pourraient suggérer qu'après une seconde lésion musculaire i) il se met en place une infiltration d'ASCs (ou plus généralement de MSCs) bien plus importante que pour une lésion unique et qui pourrait être soutenue par d'autres réservoirs d'ASCs/MSCs en plus du ScAT ; ii) il y aurait une prolifération des ASCs infiltrées lors de la première lésion. Pour mieux comprendre cette forte augmentation, nous avons imaginé que le PGAT puisse servir de réservoir secondaire en réponse à la seconde lésion musculaire, de la même manière que ce que nous avons observé dans le modèle de lipectomie bilatérale. En réponse à la deuxième lésion, le nombre d'ASCs dans le PGAT a diminué (non significatif en raison du petit nombre d'animaux utilisé) (Fig. 4F) mais cette diminution ne peut pas expliquer à elle seule l'augmentation du nombre de FAPs intramusculaire. L'évaluation de la prolifération des FAPs intramusculaire serait nécessaire pour comprendre si elle participe à l'augmentation de leur nombre après la seconde lésion et en quelle proportion. De manière identique, la prolifération des ASCs devrait être mesurée pour expliquer l'absence de leur diminution dans le ScAT après la seconde lésion musculaire.

Ces expériences préliminaires nous ont permis de suggérer que les mécanismes cellulaires mis en place au cours d'une deuxième lésion musculaire, ne sont pas identiques à ceux observés au cours de la première lésion. L'augmentation du nombre de FAPs 1 jour après la deuxième lésion est plus importante que celle observée 1 jour après la première lésion. Pour autant, au moment de la deuxième lésion le ScAT ne s'est pas encore repeuplé de sa population d'ASCs. Alors qu'on pourrait s'attendre à une plus forte diminution de la population d'ASCs post deuxième lésion, celle-ci augmente et semble montrer que le ScAT n'est plus un réservoir



répondeur à la seconde lésion. Il semblerait alors que l'organisme mette en place des mécanismes compensatoires pour contourner l'absence d'ASCs au sein du ScAT au moment de la deuxième lésion. Il reste néanmoins à vérifier si ces mécanismes reposent sur une mobilisation endogène depuis d'autres réservoirs physiologiques ou bien si la prolifération rapide des ASCs du ScAT et des FAPs au sein du muscle est un élément à prendre en compte 1 jour après la deuxième lésion alors que celle-ci n'a pas lieu à 1 jours après la première.

## Discussion

Ces travaux permettent d'introduire le concept d'une communication tissulaire endogène qui s'effectue entre le ScAT et le muscle lésé par l'intermédiaire d'une mobilisation cellulaire. En effet, nous démontrons que le ScAT agit comme un réservoir d'ASCs capable de rapidement infiltrer le muscle lésé et ainsi participer à l'augmentation du nombre de FAPs précoce, non soutenue par la prolifération de ces cellules à ce stade. Au-delà de leur infiltration, nous démontrons par l'utilisation de deux modèles murins, que la perturbation de l'infiltration des ASCs dans le muscle lésé est suivie d'une régénération musculaire altérée. Ces travaux mettent alors en évidence un rôle clef des ASCs du ScAT dans la régénération du muscle.

Le premier modèle que nous avons utilisé repose sur l'injection d'un anticorps  $\alpha$ -Pla afin de perturber l'association des ASCs avec les plaquettes lors de leur migration. Une étude récente se plaçant également dans un contexte de régénération musculaire après une lésion CTX démontre que la déplétion plaquettaire par injection d'anticorps  $\alpha$ -Pla entraîne une diminution du recrutement des neutrophiles dans le muscle lésé qui aboutit à une réponse inflammatoire anormale et une régénération musculaire retardée<sup>501</sup>. Dans cette étude, les auteurs démontrent que le recrutement des neutrophiles est dépendant de la sécrétion des chimiokines CXCL5 et CXCL7 par les plaquettes. Nous pourrions alors penser que notre modèle de déplétion plaquettaire visant à perturber la migration des ASCs soit confondant avec les effets sécrétoires des plaquettes agissant sur d'autres types cellulaires comme les neutrophiles. Néanmoins, nous montrons que l'injection d'une quantité restreinte d'ASCs (250.000) permet de restaurer la régénération du muscle alors que l'injection de neutrophiles ou un retour de la signalisation CXCL5 / CXCL7 n'a pas été démontré sur l'efficacité de la régénération du muscle dans cette étude. Ces observations permettent de soutenir le rôle important joué par les ASCs au cours de la régénération du muscle.

Pour exclure l'effet confondant de la déplétion plaquettaire via leur sécrétion, nous avons aussi mis en place un second modèle d'ablation bilatérale des ScAT. Ce modèle avait pour objectif de supprimer le réservoir des ASCs et ainsi bloquer leur migration vers le muscle. Lorsque nous avons quantifié la population de FAPs intramusculaires 24 heures après lésion dans le modèle de lipectomie, nous avons été surpris de constater un maintien de leur augmentation ne pouvant pourtant plus être soutenue par l'infiltration des ASCs du ScAT. Les MSCs sont décrites comme résidentes au sein de plusieurs tissus pouvant potentiellement représenter des réservoirs cellulaires en réponse à la lésion. Nous avons donc évalué les variations des quantités de ces cellules dans le PGAT, un tissu relativement proche du muscle lésé. De façon surprenante, nous avons ainsi observé que ce tissu non répondeur à une lésion musculaire en présence des ScAT, présente une diminution de son contenu en ASCs en condition de lipectomie et de lésions répétées. Ces résultats suggèrent alors l'existence d'un système de compensation permettant le maintien de l'augmentation des ASCs au cours des 24 heures post-lésion. Néanmoins, bien que le PGAT réagisse à la lésion et participe au maintien de l'augmentation des FAPs intramusculaires post-lésion, celui-ci ne permet pas de garantir l'efficacité de la régénération du muscle. En effet, en condition lipectomie nous avons démontré que la régénération du muscle était altérée et l'injection d'ASCs triées depuis le PGAT ne

permettait pas de rétablir la régénération du muscle alors que les ASCs du ScAT injectées en même proportion le permettait. Cette observation soulève alors des questions sur le potentiel pro-régénérant et les fonctions des ASCs, et plus généralement des MSCs, en fonction de leur origine tissulaire. Une revue de la littérature discute une idée comparable, en démontrant que les MSCs présentes au sein de différents organes participent selon des mécanismes différents à l'établissement de la fibrose de leur tissu d'origine en condition pathologique<sup>502</sup>. Selon les tissus, il est alors observé des MSCs possédant des capacités de différenciation en myofibroblastes et des capacités sécrétoires de MEC différents. Cette revue met donc en avant le fait que selon l'organe d'origine, les fonctions des MSCs diffèrent. Ainsi, on pourrait imaginer que malgré la mise en place par l'organisme d'un système compensatoire en absence des ASCs du ScAT, les cellules recrutées au niveau du muscle lésé depuis d'autres sources ne possèdent pas les capacités suffisantes pour permettre une régénération musculaire identique à celle observée en présence des ASCs du ScAT.

Cette observation fait également écho à nos résultats obtenus en condition de lésions répétées. En effet, par ce modèle nous cherchions à appauvrir le ScAT en ASCs afin d'en observer les conséquences sur les variations des quantités de FAPs intramusculaires post-lésion. Nos résultats montrent qu'après une deuxième lésion, l'augmentation du nombre de FAPs est bien plus importante et rapide qu'après une lésion unique. Il semblerait alors que l'organisme soit capable de mettre en place un système d'adaptation de façon à se pré-conditionner pour préparer d'éventuelles futures lésions. Néanmoins, le ScAT ne semble pas répondre de manière identique lors de la deuxième lésion laissant ici aussi sous-entendre des mécanismes compensatoires permettant de mobiliser des cellules depuis des réservoirs secondaires lorsque le réservoir primaire, le ScAT, est appauvri. Il serait alors intéressant d'évaluer l'efficacité de la régénération musculaire lors de la deuxième lésion et comparer si elle est identique ou pas à la première lésion. Dans le cas où elle ne le serait pas ces résultats s'accorderaient alors avec ceux obtenus dans le modèle de lipectomie montrant que la mobilisation depuis d'autres réservoirs ne permet pas de maintenir une régénération musculaire efficace. En revanche, dans le cas où elle le serait on pourrait imaginer que les quantités plus importantes de FAPs, et donc de MSCs recrutées, observées 1 jour après la deuxième lésion permettent de compenser les capacités pro-régénérantes intrinsèques plus faibles de ces cellules par rapport aux ASCs du ScAT. On pourrait ainsi se demander si une injection d'un nombre plus important d'ASCs du PGAT que celui que nous avons utilisé dans le modèle de lipectomie du ScAT permet de rétablir ou pas la régénération du muscle dans ce modèle.

## 2) Caractérisation de l'identité des ASCs qui infiltrent le muscle après la lésion.

Les résultats présentés dans ce chapitre sont en partie publiés dans l'article ci-après. Les résultats non publiés seront identifiés.

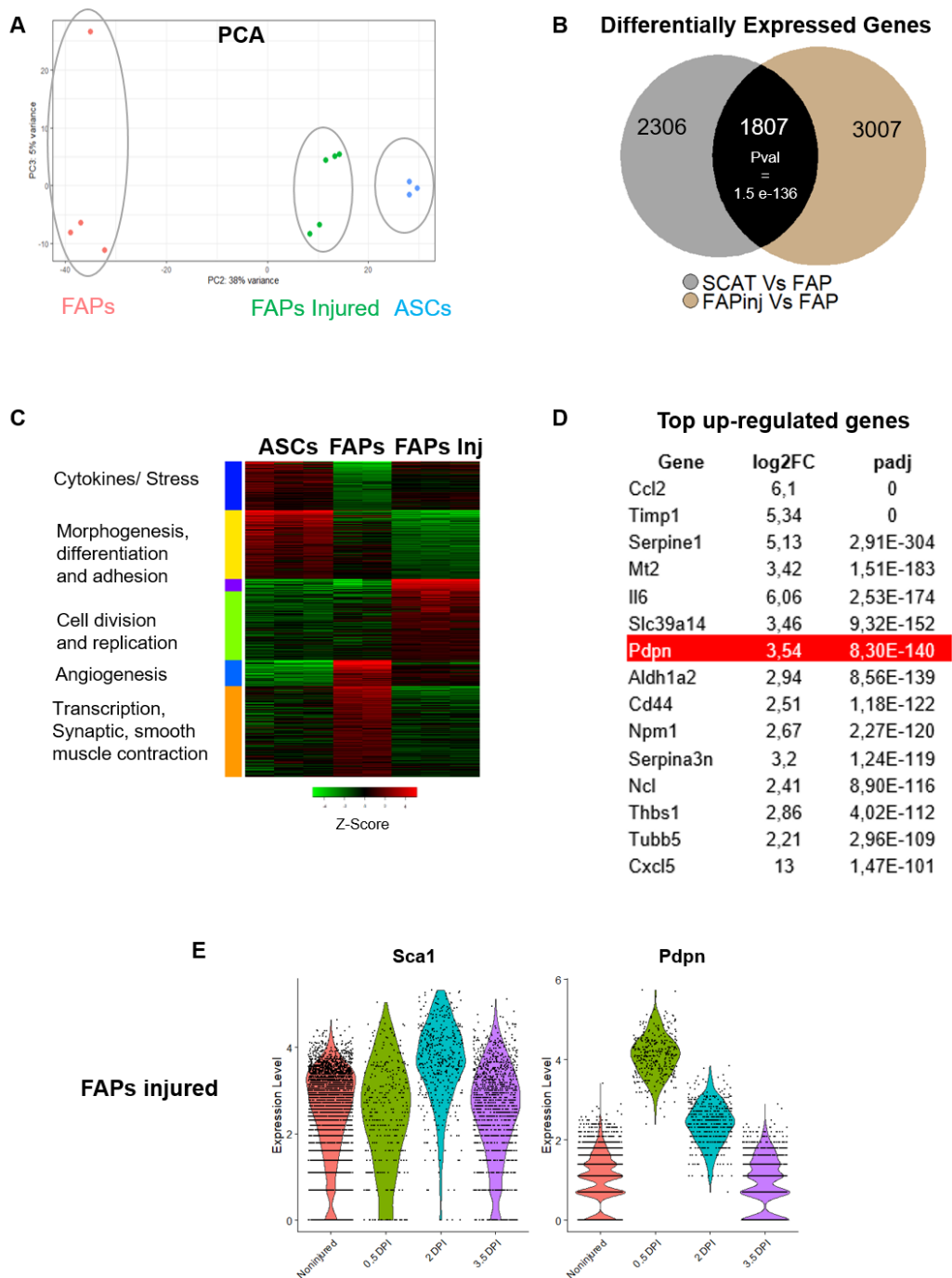
### [Adipose tissue is a source of regenerative cells that augment the repair of skeletal muscle after injury.](#)

Sastourné-Arrey Q\*, Mathieu M\*, Contreras X, Monferran S, Bourlier V, Gil-Ortega M, Murphy E, Laurens C, Varin A, Guissard C, Barreau C, André M, Juin N, Marquès M, Chaput B, Moro C, O'Gorman D, Casteilla L, Gironde A, Sengenès C. \*contribution équivalente  
Nat Commun. 2023 Jan 5;14(1):80. doi: 10.1038

Plusieurs travaux font état d'une hétérogénéité cellulaire au sein de la population des ASCs<sup>437,438,440,503</sup>. Cette hétérogénéité est également démontrée pour les FAPs, et lorsqu'une lésion musculaire est réalisée, plusieurs études rapportent l'apparition d'une population de FAPs "activées"<sup>50,51,53</sup>. Cependant, ces études ne caractérisent cette "activation" sur le plan biologique suite à une blessure musculaire. À notre connaissance, nous sommes la seule équipe à travailler sur l'infiltration d'ASCs entre les compartiments adipeux et musculaire, et nous pensons que les ASCs infiltrées pourraient contribuer à l'hétérogénéité cellulaire observée dans un muscle lésé et potentiellement représenter la population de FAPs "activées" identifiée par d'autres groupes. D'autant plus que les cinétiques sur lesquelles sont observées ces nouvelles populations de FAPs, entre 0,5 et 1,5 jpl, correspondent parfaitement à la cinétique d'infiltration des ASCs dans le muscle, dès 1 jpl.

Pour démontrer notre hypothèse, nous avons combiné des approches de cytométrie en flux, de RNAseq sur populations totales et en cellule unique afin de faire émerger des ressemblances entre les populations d'ASCs et de FAPs post-lésion et ainsi pouvoir potentiellement caractériser un marqueur ou une signature génique des ASCs infiltrées. Ce marqueur ou cette signature serait un moyen de distinguer les ASCs des FAPs lorsqu'elles coexistent dans le muscle. Également, cette caractérisation faciliterait l'isolement *ex vivo* de la population d'ASCs "migrantes", ce qui permettrait une meilleure compréhension de leur biologie *in vitro*. En outre, cela ouvrirait la voie à l'étude de leur potentiel pro-régénérant par réinjection *in vivo*, contribuant ainsi à une meilleure compréhension du rôle des ASCs dans le processus de régénération musculaire.

Pour répondre à cette hypothèse, nous avons réalisé une première approche de séquençage ARN sur des populations d'ASCs ou de FAPs entières triées selon l'immunophénotype Sca1<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD31<sup>-</sup> depuis le ScAT et le muscle en condition contrôle (CTL) ou lésionnelle (Inj). Nous avons obtenu un séquençage sur 3 populations cellulaires : ASCs, FAPs CTL et FAPs Inj. Notre objectif était d'identifier les gènes coexprimés dans les populations d'ASCs et de FAPs Inj (qui représentent un mélange de FAPs et d'ASCs infiltrées) mais non exprimés par la population de FAPs CTL. L'analyse bio-informatique de nos données a été réalisée en collaboration avec le Dr X. Contreras de notre équipe. Pour implémenter notre jeu de données



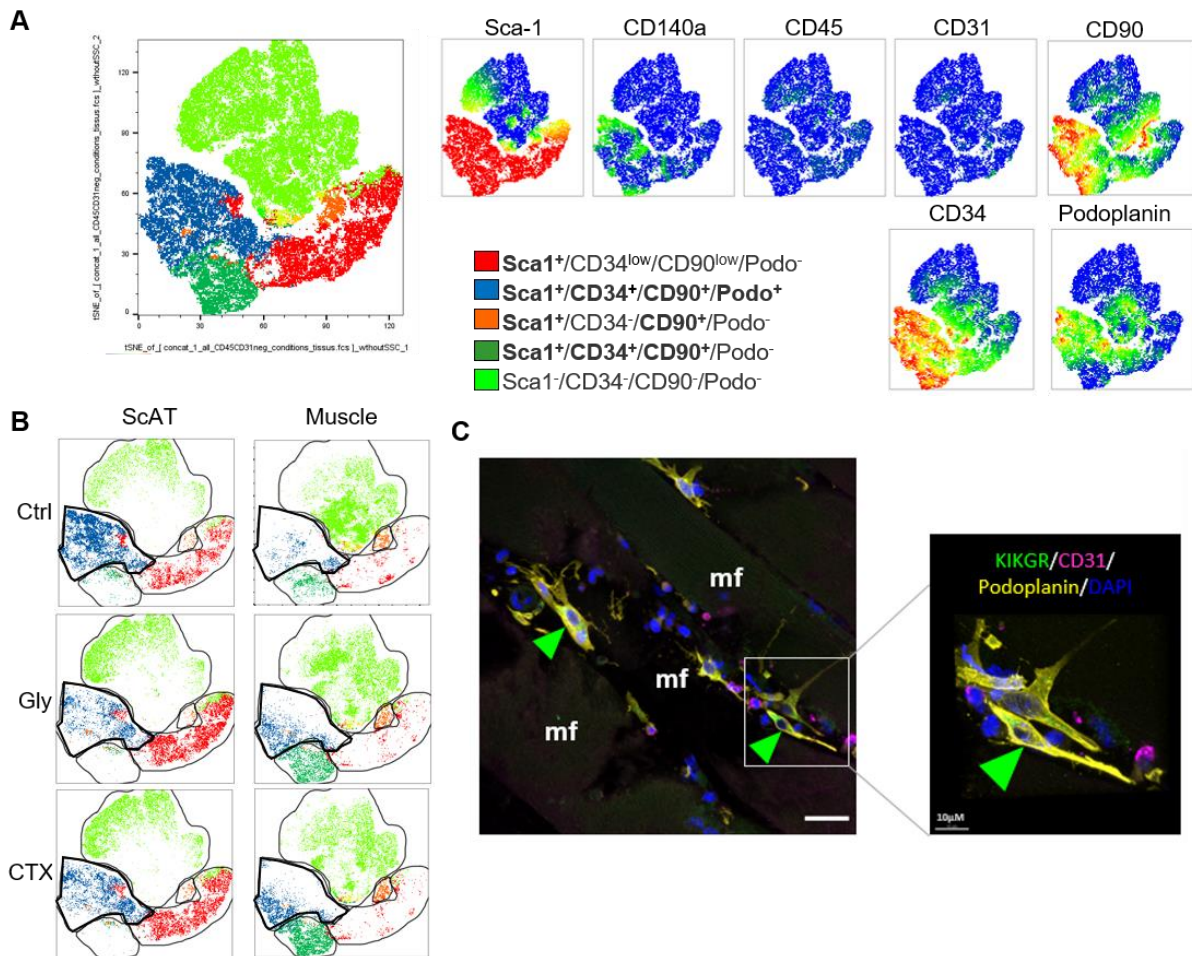
**Figure 5 : Les FAPs issus d'un muscle lésé ressemblent aux ASCs du ScAT.**

**A** Analyse en composantes principales (ACP, PC2 vs PC3) des valeurs d'expression RNAseq des FAPs et des ASCs isolées à partir d'animaux lésés (1 jpl) et d'animaux contrôles. **B** Diagramme de Venn montrant le chevauchement des gènes différentiellement exprimés dans les ASCs du ScAT et les FAPs de muscles lésés (FAPInj) par rapport aux FAPs d'animaux non lésés (FAP). LOG2FC > 0,58 et p<0,05. **C** Représentation en Heat-map de l'expression des gènes différentiellement exprimés (exprimés en score Z) dans les groupes de FAPs (contrôle et lésé) comparés aux ASCs avec les termes correspondants de la Gene Ontology. **D** Tableau des gènes les plus exprimés dans les ASCs par rapport aux FAPs, classés par valeur p ajustée. La signification a été obtenue à l'aide du logiciel DESeq2 réglé sur les paramètres par défaut, qui utilise le test de Wald pour calculer les valeurs p. **E** Représentation en Violin-plot l'expression de Sca-1 et Podoplanin (pdpn) depuis une analyse RNAseq en cellule unique des FAPs isolés à partir d'animaux lésés (0,5, 2 et 3,5 jpl) et d'animaux contrôles en utilisant les ensembles de données d'Oprescu et al.

dans le muscle et renforcer l'analyse statistique, nous avons inclus les données des travaux de Malecova et al.<sup>49</sup> qui se plaçaient dans les mêmes conditions expérimentales que les nôtres. En comparant les profils d'expression génique des différentes populations cellulaires à l'aide de l'analyse en composante principale (ACP) présentée dans la Figure 5A nous avons été en mesure de différencier les populations cellulaires de manière distinctes (ASCs, FAPs CTL et FAPs Inj). Ainsi, pour la première fois nous montrons que les ASCs et les FAPs sont des populations cellulaires qui peuvent se différencier par leur expression génique. Ensuite, l'ACP montre que la population de FAPs Inj est transcriptionnellement plus proche de la population d'ASCs que des FAPs CTL le long de la composante principale 2 qui compte pour 38% de la variance (Fig. 5A). L'expression d'un total de 1807 gènes est partagée entre les ASCs et les FAPs Inj, expliquant ainsi la similarité transcriptionnelle entre ces deux populations ( $P_{val} = 1,56 \times 10^{-136}$ , Fig. 5B). Ces résultats soutiennent donc fortement nos résultats de cytométrie et d'IHC montrant que le pool de FAPs à 1 jpl est composé de FAPs résidents du muscle et d'ASCs infiltrées depuis le ScAT.

L'étude par ontologie génique a permis de révéler que les gènes partagés entre les ASCs et les FAPs Inj sont impliqués dans les voies de la réponse au stress, la sécrétion de cytokines, l'angiogenèse et la contraction musculaire (Fig. 5C). Parmi eux, nous avons constaté que la podoplanine, qui a récemment été associée à un phénotype pro-migratoire chez les MSCs dérivées de la moelle osseuse<sup>478</sup>, était le septième gène le plus régulé (Fig. 5D). Pour confirmer l'augmentation de l'expression de la podoplanine dans les FAPs de muscle lésé, nous avons exploité un ensemble de données de séquençage en cellule unique (sc RNAseq) publié par Oprescu et al.<sup>50</sup>, qui a examiné la dynamique transcriptionnelle de diverses sous-populations cellulaires lors du processus de régénération du muscle squelettique, dans les stades précoces après la lésion. Notre analyse des données d'Oprescu et al. a montré que les FAPs, définies par leur positivité pour Sca-1 (Ly6a), présentaient une expression de la podoplanine augmentée à un stade précoce post-lésion (0,5 jpl) avant de revenir à un niveau basal à 3,5 jpl (Fig. 5E) corroborant ainsi nos résultats.

En conséquence, nos données de RNAseq, montrent que les FAPs après lésion musculaire présentent des similitudes transcriptionnelles avec les ASCs du ScAT. Dans le but de valider l'infiltration d'une sous-population particulière d'ASCs nous avons utilisé des approches permettant l'étude des différentes sous-populations dans les compartiments adipeux et musculaire en conditions CTL et Inj.



**Figure 6 : Une population d'ASC caractérisée par l'expression de la podoplanine disparaît dans le ScAT et apparaît dans le muscle après la lésion.**

**A** Analyse phénotypique des ASCs et des FAPs par cytométrie de flux. Graphique tSNE fusionné pour toutes les cellules CD45<sup>-</sup>/CD31<sup>-</sup> dérivées de la SVF de ScAT et de muscle d'animaux contrôles et lésés au Gly. L'identité de chaque groupe en fonction du niveau d'expression de plusieurs marqueurs combinés est codée en couleur dans le graphique tSNE. Les graphiques des niveaux d'expression des marqueurs cytométriques sont présentés dans la partie droite. **B** Comparaison des diagrammes tSNE du ScAT et du muscle dans les conditions contrôles et lésionnelles (Gly et CTX) à 1 jpl ; les groupes identifiés en (A) sont entourés en noir. **C** Analyse immunohistologique de quadriceps lésés au Gly (1 jpl) chez des souris greffées avec du ScAT KikGR (les flèches vertes pointent les cellules KikGR<sup>+</sup>/Podoplanine<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup>). Barre d'échelle 10 µm.



En parallèle et dans le but d'affiner l'immunophénotype de la population d'ASCs migrante nous avons réalisé une analyse approfondie par cytométrie en flux de la SVF fraîchement isolée du ScAT et du muscle provenant d'animaux lésés ou non. Nous avons utilisé l'algorithme de réduction de la dimensionnalité, t-distributed stochastic neighbor embedding (tSNE), pour évaluer qualitativement la diversité des sous-populations cellulaires dans le sous-ensemble de cellules CD45<sup>-</sup>/CD31<sup>-</sup>. Dans cet ensemble, cinq sous-populations cellulaires distinctes ont été identifiées dans le ScAT en fonction de l'expression des marqueurs de surface Sca-1, CD34, CD90, CD140a (PDGFR  $\alpha$ ) et podoplanine (Fig. 6A). Ensuite, nous avons étudié l'impact de la lésion musculaire (Gly et CTX, 1 jpl) sur la proportion de ces cinq sous-ensembles cellulaires dans le muscle et le ScAT. Parmi les cinq sous-ensembles cellulaires identifiés par l'analyse tSNE, la population de cellules Sca-1<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD90<sup>+</sup>/Podoplanine<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup> a augmenté dans le muscle lésé alors qu'elle a disparu dans la ScAT à 1 jpl (Gly ou CTX) (Fig. 6B). Cette observation soutient l'infiltration musculaire d'une sous-population cellulaire d'ASCs présente dans le ScAT caractérisée par l'expression de la podoplanine en réponse à la lésion.

Pour valider l'infiltration dans le muscle lésé d'une population d'ASCs exprimant la podoplanine, nous avons utilisé le modèle de greffe de tissu adipeux depuis des animaux CAG::KikGR et nous avons remarqué par des approches IHC que les cellules KikGR<sup>+</sup> qui infiltrèrent le muscle lésé, en plus de présenter l'immunophénotype Sca-1<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD140a<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup> correspondant à celui d'une ASC, expriment également la podoplanine (Fig. 6C).

*Les résultats présentés dans la section suivante n'ont pas été publiés :*

Enfin, pour parvenir à une identification précise des ASCs migrantes entre le ScAT et le muscle lésé, nous avons conjugué l'utilisation du modèle de greffe de ScAT CAG::KikGR avec des approches de séquençage de l'ARN en cellule unique (scRNAseq). Après avoir réalisé les greffes de ScAT CAG::KikGR des lésions musculaires ont été effectuées par injection de Gly. Cette approche avait pour objectif de permettre l'identification des ASCs migrantes parmi les FAPs du muscle lésé, par la séquence du gène KikGR, et l'étude de leur spécificité transcriptionnelle par rapport aux autres sous-populations de FAPs intramusculaires. Pour cela, nous avons isolé les SVF des ScAT et muscles des animaux greffés en condition non lésionnelle (CTL) et lésionnelle (Inj, 1 jpl). Nous avons ensuite isolé par tri magnétique la population d'ASCs ou de FAPs Sca1<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD31<sup>-</sup> de chaque SVF puis procédé au scRNAseq de ces populations.

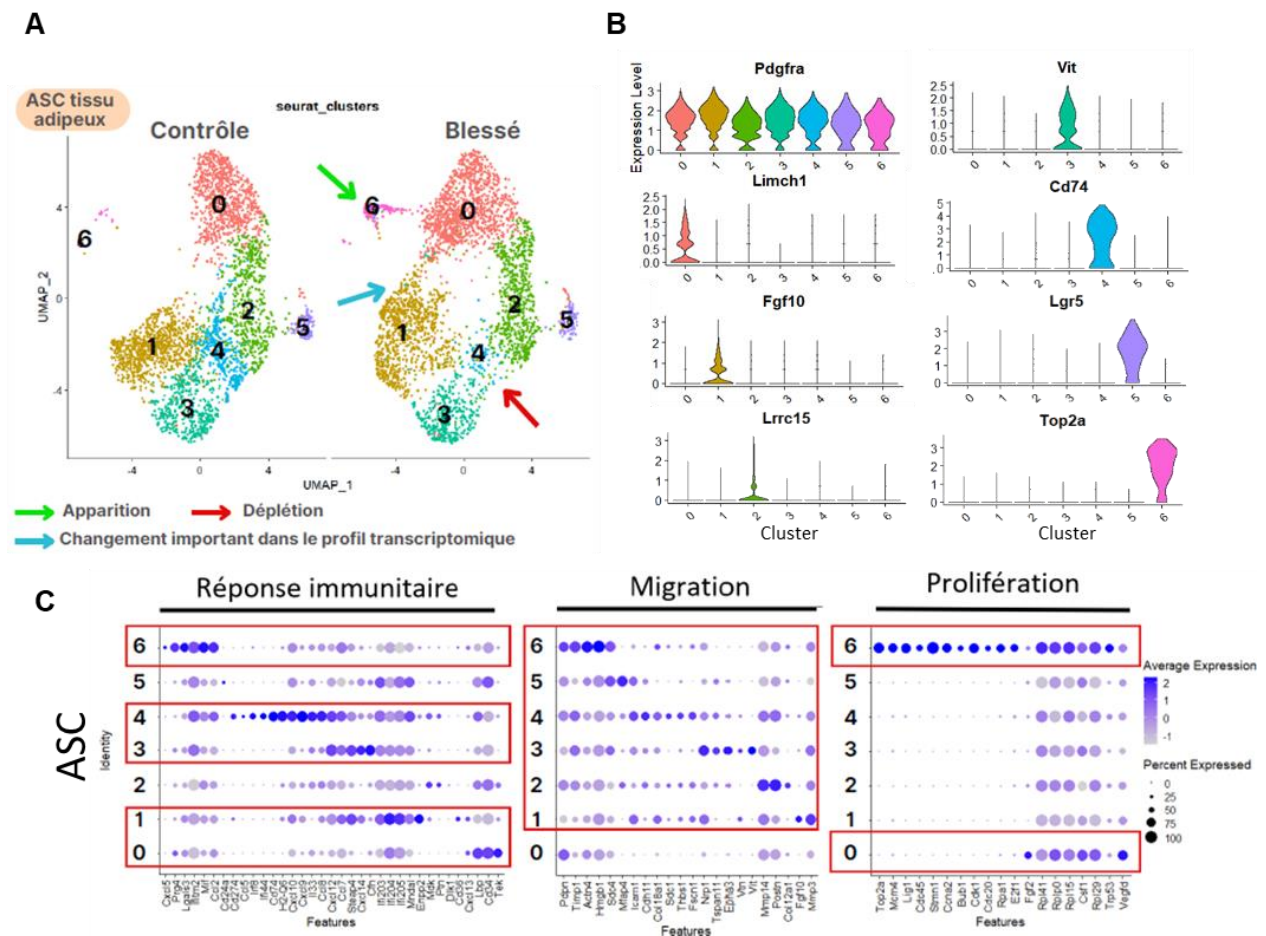
L'analyse bioinformatique de nos données a été réalisée en collaboration avec le Dr X. Contreras de notre équipe et sa doctorante M. Labrosse. Dans un premier temps, nous avons réalisé un contrôle qualité des échantillons en s'assurant : (1) d'exclure les cellules CD31<sup>+</sup> et CD45<sup>+</sup> restantes pour s'assurer de la pureté de l'échantillon, (2) que le nombre de cellules était suffisant pour le séquençage (compris entre 4243 et 6300 cellules en fonction de l'échantillon), (3) que le nombre de gènes détectés par cellules (profondeur de séquençage) était suffisant pour l'analyse nous permettant de détecter entre 4000 et 5000 gènes par cellules en fonction de l'échantillon (et qui sont des valeurs supérieures à celles observées dans les autres études

de la littérature<sup>50,437,438,503</sup>) et enfin (4) d'exclure les cellules mortes en sélectionnant les cellules exprimant un pourcentage de gènes mitochondriaux inférieure à 10%.

L'analyse a d'abord révélé la présence d'ASCs KikGR<sup>+</sup> dans le ScAT des animaux CTL et Inj, un résultat attendu permettant de valider la détection du gène KikGR dans nos échantillons. Bien que de bonne qualité, nos données ont présenté une limite majeure : le trop faible niveau d'expression de la KikGR au sein de la population de FAPs Inj (et certainement associé à la rareté de l'événement d'infiltration) ne nous a pas permis de détecter les ASCs infiltrées KikGR<sup>+</sup>. Deux contraintes expérimentales pourraient potentiellement expliquer ce résultat. La première concerne la profondeur de séquençage que nous avons adoptée, se concentrant sur les 5000 gènes les plus exprimés dans chaque cellule. L'expression de KikGR ne figurerait pas parmi ces 5000 premiers gènes. La seconde limite pourrait être attribuée à l'utilisation de Sca-1 dans le tri des FAPs à partir de la FVS du muscle en condition de lésion. En effet, nous avons ciblé les FAPs en fonction de leur immunophénotype Sca-1<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD31<sup>-</sup>, cependant, nous avons par ailleurs constaté que la population d'ASCs infiltrant le muscle lésé est plutôt caractérisée par une faible expression de Sca-1 (Sca-1<sup>low</sup>). Il se peut donc que le tri magnétique des cellules favorise la capture de cellules exprimant fortement Sca-1 et que notre population d'intérêt soit sous-représentée dans l'analyse par scRNAseq.

Dans le but de résoudre cette problématique, nous sommes en train de procéder à l'amplification du gène KikGR au sein de nos échantillons de FAPs Inj, afin de faire figurer l'expression de la KikGR parmi les 5000 premiers gènes lors de la phase de séquençage. Si cette approche ne s'avère pas concluante, nous envisageons alors d'effectuer un nouveau tri cellulaire en évitant l'utilisation de l'anticorps anti Sca-1.



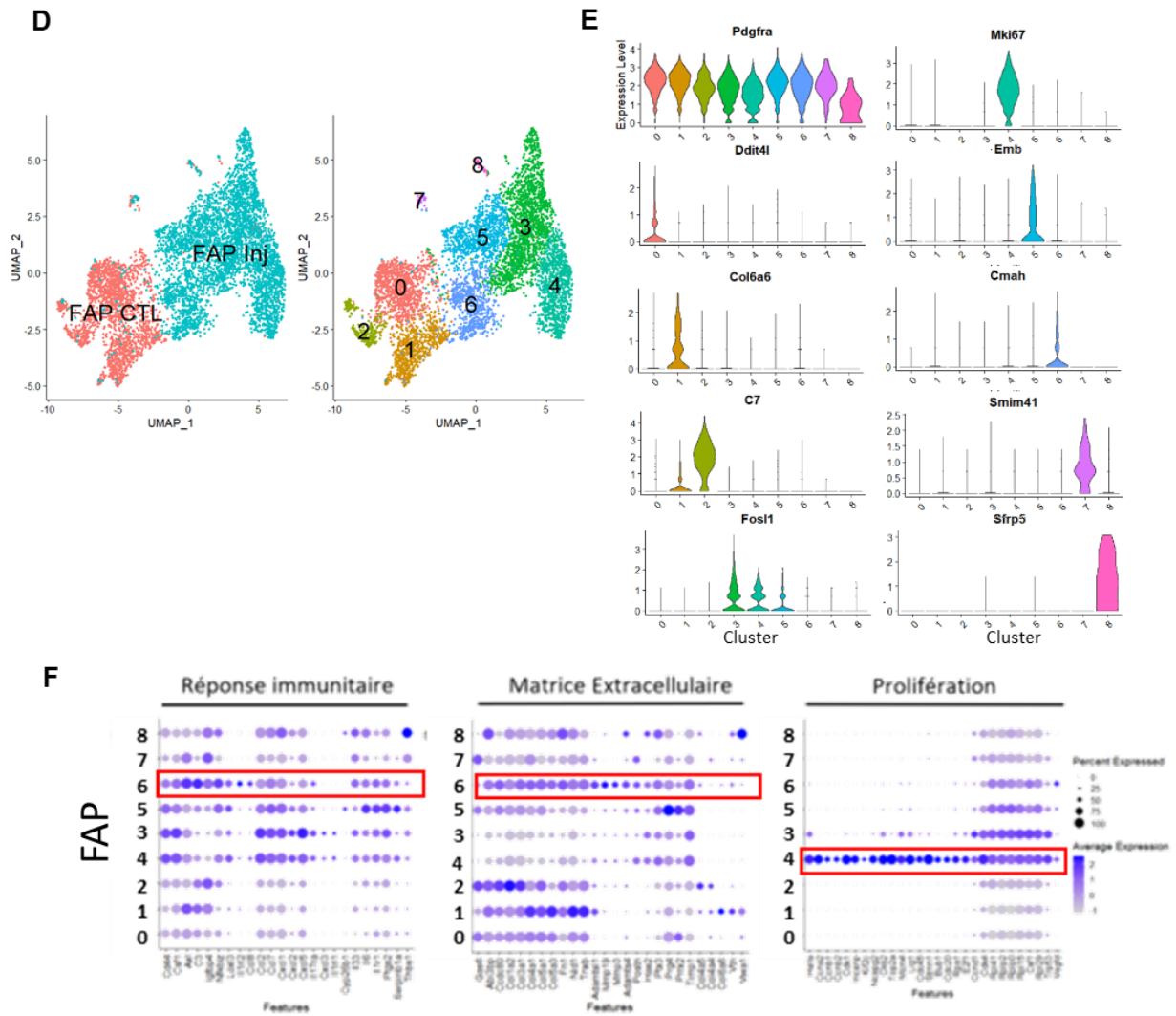


**Figure 7 : Le ScAT et le muscle renferment des sous-populations d'ASCs/FAPs distinctes et certaines sous-populations d'ASCs semblent répondre spécifiquement à la lésion. A** Représentation des atlas UMAP des données transcriptomiques en cellules uniques issues des ASCs triées Sca-1<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup> depuis la SVF de ScAT en condition contrôles et après lésion musculaire Gly (1 µl). **B** Violin plots qui montrent le niveau d'expression et la distribution de gènes marqueurs représentatifs de chaque sous-populations d'ASCs du ScAT. L'axe des y est le compte normalisé des reads. **C** Dotplot de gènes impliqués dans différentes fonctions intéressantes pour la régénération et up-régulés chez certaines sous-populations d'ASCs déterminés par Gene Ontology (GO).

L'analyse de notre jeu de données sans l'utilisation de la séquence KikGR nous a tout de même permis d'obtenir des informations intéressantes. Notre stratégie d'analyse s'est déroulée en deux temps. Un premier temps où l'objectif a été d'identifier séparément chaque sous-populations d'ASCs dans le ScAT puis de FAPs du muscle en condition CTL et Inj et d'observer l'impact de la lésion sur chacun des clusters (Apparition, déplétion/diminution, changement de profil transcriptomique) pouvant éventuellement traduire des mouvements de populations cellulaires. Le second temps avait pour principe d'analyser en même temps à la fois les populations de FAPs Inj et d'ASCs afin de faire émerger des ressemblances transcriptionnelles entre certains clusters cellulaires d'ASCs et de FAPs pouvant être représentatif de l'infiltration d'une population d'ASCs au sein des FAPs du muscle.

Dans le premier temps d'analyse :

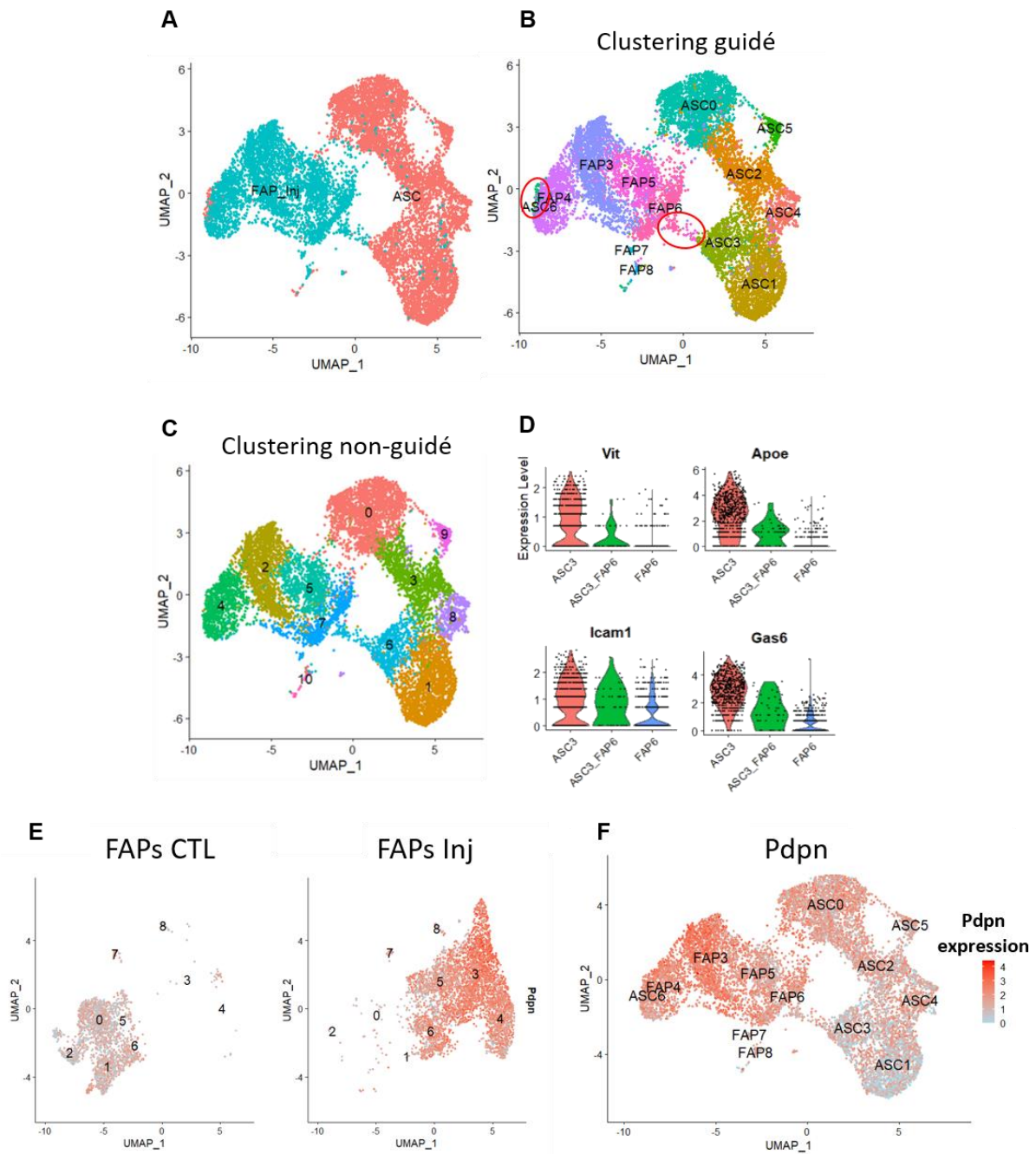
- Au niveau du ScAT, nous avons pu identifier 7 sous-populations d'ASCs (clusters ASC0 à 6, Fig. 7A) au sein de la population  $Sca1^+/CD31^-/CD45^-$  isolée depuis la SVF du ScAT tous défini par l'expression de PDGFR $\alpha$  (Fig. 7B), un marqueur connu comme étant exprimé par les populations de ASCs/FAPs. Chaque cluster est défini par l'expression de certains gènes qui leur sont propre permettant d'identifier les sous-population d'ASC0 à ASC6 par des marqueurs exclusifs respectifs : *Limch1*, *Fgf10*, *Lrrc15*, *Vit*, *Cd74*, *Lgr5* et *Top2a* (Fig. 7B). Après la lésion musculaire (Gly, 1 jpl) nous avons observé des variations importantes dans les clusters ASC1 (*Limch1*<sup>+</sup>), ASC4 (*Cd74*<sup>+</sup>) et ASC6 (*Top2a*<sup>+</sup>) illustrant une réponse transcriptionnelle spécifique des ASCs du ScAT en réponse à la lésion musculaire. Le cluster d'ASC1, que nous avons identifié comme une sous-population progénitrice par analyse d'ontologie génique (GO), présentait un changement important dans le profil transcriptomique se traduisant par un déplacement du cluster sur la représentation de réduction de dimensionnalité UMAP (Fig. 7A). Le cluster d'ASC4 exprimait majoritairement des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire (Fig. 7C, analyse GO). En réponse à la lésion musculaire, nous avons observé une augmentation du nombre de cellules présentes dans ce cluster (Fig. 7A). Au contraire, le cluster d'ASC6 caractérisé par des gènes de la prolifération cellulaire (Fig. 7C, analyse GO) a partiellement disparu après la lésion musculaire. Ces observations suggèrent que les populations d'ASC4 et ASC6 pourraient représenter des populations d'intérêt dans notre contexte avec une population qui pourrait proliférer avant de migrer (ASC6) ou une population quittant directement le ScAT (ASC4) après la lésion musculaire.



**Figure 7 (suite):** Le ScAT et le muscle renferment des sous-populations d'ASCs/FAPs distinctes et certaines sous-populations d'ASCs semblent répondre spécifiquement à la lésion. **D** Représentation des atlas UMAP des données transcriptomiques en cellules uniques issues des FAPs triées Sca-1<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> depuis la SVF de muscle contrôles ou lésés Gly. **E** Violin plots qui montrent le niveau d'expression et la distribution de gènes marqueurs représentatifs de chaque sous-populations de FAPs du muscle. L'axe des y est le compte normalisé des reads. **F** Dotplot de gènes impliqués dans différentes fonctions intéressantes pour la régénération et up-régulés chez certaines sous-populations de FAPs déterminés par Gene Ontology (GO).

- Au niveau du muscle, nous avons identifié trois sous-populations de FAPs à l'état basal (sans lésion musculaire, CTL) caractérisées également par l'expression de PDGFR $\alpha$  (Fig. 7D-E). Ces trois clusters sont chacun identifiable par l'expression de marqueurs qui leur sont propre : FAP0 (*Ddit4l*<sup>+</sup>), FAP1 (*Col6a6*<sup>+</sup>) et FAP2 (*C7*<sup>+</sup>) majoritairement connu pour être impliqués dans le remodelage matriciel (Fig. 7F, analyse GO), des fonctions également observées au sein des sous- populations de FAPs CTL dans la littérature<sup>49-51,53</sup>. Contrairement au ScAT, dans le muscle après la lésion nous avons observé une apparition de 6 nouvelles sous-populations de FAPs qui expriment respectivement : *Fosl1*, *Mki67*, *Emb*, *Cmah*, *Smim41* et *Sfrp5*. De manière intéressante, la population FAP4 (*Mki67*<sup>+</sup>) est majoritairement représentée par des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire tout comme la population d'ASC6 (*Top2a*<sup>+</sup>) du ScAT (Fig. 7C et 7F) tandis que les autres populations sont représentées par des gènes contrôlant le remodelage matriciel et la réponse immunitaire (Fig. 7C et 7F) comme pour la population d'ASC4 (*Cd74*<sup>+</sup>).





**Figure 8 : Des sous-populations de FAPs s'apparentent à des sous-populations d'ASCs et pourraient représenter des populations candidates d'ASCs migrantes.**

**A** Représentation des atlas UMAP des données transcriptomiques en cellules uniques combinés entre les ASCs et les FAPs en condition lésionnelle Gly. **B** UMAP de l'intégration des sous-populations de FAPs et ASCs préalablement identifié. **C** UMAP de l'intégration des différents clusters déterminés sans identification préalable des ASCs et des FAPs. **D** Violin plots des gènes exprimés par la sous-population d'ASC3 mais pas par les FAPs et exprimés par la sous-population présente à l'interface entre les ASCs et les FAPs après la lésion. **E-F** Intensité d'expression de la podoplanine au sein des populations de FAPs contrôles (CTL) et lésées (Inj) (G) et des ASCs et FAPs en condition lésionnelle (H)

Dans un second temps d'analyse, nous avons cherché à approfondir notre compréhension des corrélations existantes entre les populations de FAPs et d'ASCs. Mettre en avant une sous-population d'ASCs génétiquement proche d'une sous-population de FAPs pourrait potentiellement permettre l'identification de la sous-population d'ASCs infiltrée au sein des populations de FAPs résidentes, d'intérêt pour notre étude. Nous avons donc incorporé simultanément les données des populations d'ASCs et de FAPs dans une même représentation de réduction de dimension UMAP (Fig. 8A-B). En fusionnant les deux représentations UMAP définies pour les ASCs et les FAPs Inj décrites précédemment (Fig. 7A, C) au sein d'une même représentation UMAP nous avons obtenu une représentation que nous avons appelée « guidée » (Fig. 8A-B) puisque les populations d'ASCs et de FAPs étaient déjà caractérisées séparément. En utilisant cette représentation, il est clairement observable que les sous-populations d'ASCs et de FAPs se séparent distinctement, à l'exception de la sous-population d'ASC6 (*Top2a*<sup>+</sup>) qui montre une proximité plus marquée avec les populations de FAPs et particulièrement la population FAP4 (*Mki67*<sup>+</sup>), deux populations caractérisées par des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (Fig. 7E-F). Parallèlement, nous avons observé un prolongement de la population de FAP6 (*Cmah*<sup>+</sup>) se situant à l'interface avec la population d'ASC3 (*Vit*<sup>+</sup>). De manière intéressante, lorsque nous avons choisi de représenter ces données de manière « non-guidée », c'est-à-dire sans préalablement définir quelles populations étaient des ASCs ou des FAPs, nous avons observé 10 clusters cellulaires différents parmi lesquels se dégagent deux évènements d'intérêt : (1) le prolongement de la population FAP6 (*Cmah*<sup>+</sup>) est considéré comme appartenant à la population d'ASC3 (*Vit*<sup>+</sup>) (regroupés dans le cluster 6 sur la représentation Fig. 8C). Cet évènement signifie que le prolongement de la population FAP6 (*Cmah*<sup>+</sup>) isolé initialement depuis la SVF de muscle lésé est considéré comme apparenté transcriptionnellement avec la sous-population d'ASC3 (*Vit*<sup>+</sup>) par l'algorithme. Ce cluster pourrait alors représenter la population d'ASCs infiltrée dans le muscle et s'étant mélangée avec les populations de FAPs. Quand nous avons caractérisé les gènes représentatifs de cet état intermédiaire du prolongement de la population de FAP6 (*Cmah*<sup>+</sup>) avec ASC3 (*Vit*<sup>+</sup>) nous avons observé que les gènes *Vit*, *Apoe*, *Icam1* et *Gas6* étaient majoritairement exprimés par la population d'ASC3 et faiblement dans la population FAP6 (Fig. 8D). En revanche, l'expression de ces gènes au sein des cellules présentes uniquement dans le prolongement entre ASC3 et FAP6 était intermédiaire entre les niveaux d'expression dans ASC3 et FAP6 (Fig. 8D), appuyant l'hypothèse d'une infiltration des cellules ASC3 dans la population de FAPs. Le second évènement (2) que nous avons observé se situe au niveau de la population d'ASC6 (*Top2a*<sup>+</sup>) qui est considérée comme appartenant au cluster de FAP4 (*Mki67*<sup>+</sup>) (regroupés dans le cluster 4 sur la représentation Fig. 8C). Cet évènement signifie que la population d'ASC6 (*Top2a*<sup>+</sup>) isolée depuis la SVF du ScAT et considérée par l'algorithme comme transcriptionnellement identique à la population de FAP4 (*Mki67*<sup>+</sup>) isolée depuis la SVF du muscle post-lésion. Contrairement au premier évènement, il ne traduit pas un état intermédiaire entre deux sous-populations d'ASCs et de FAPs. En revanche, cette observation pourrait signifier que la population de FAP4 (*Mki67*<sup>+</sup>) qui n'est pas présente dans un muscle à l'état basal mais qui apparaît à 1 jpl est en réalité la résultante d'une infiltration d'ASC6 (*Top2a*<sup>+</sup>), deux populations caractérisées par leur

capacité proliférative par GO (Fig. 7E-F). La visualisation de l'expression de la KikGR combinée à l'étude des trajectoires cellulaires dans les différents clusters de FAPs Inj et d'ASCs nous permettra par la suite de mieux comprendre quelles sont les sous-populations d'ASCs infiltrées à l'origine de l'apparition de nouvelle(s) population(s) de FAP(s).

Enfin, nous avons constaté un faible niveau d'expression de la *podoplanine* dans la population de FAPs en condition contrôle qui augmente drastiquement dans toutes les sous-populations de FAPs en réponse à la lésion, à 1 jpl (Fig. 8E), en accord avec notre analyse des données d'Opreescu et al. présentée en Figure 5E. Néanmoins, la *podoplanine* est exprimée par la totalité des sous-populations de FAPs et non par une sous-population cellulaire particulière même si nous avons constaté un gradient d'expression de la *podoplanine* fortement exprimé du côté des populations ASC0 (*Limch1<sup>+</sup>*) et plus faiblement exprimé au sein des populations ASC1 (*Fgf10<sup>+</sup>*) (Fig. 8F). La *podoplanine* ne semble donc pas spécifique d'une sous-population particulière d'ASCs mais pourrait être utilisé dans l'identification des ASCs infiltrées en complément avec d'autres marqueurs afin d'identifier spécifiquement la sous-population d'ASC migrante.

## Discussion

Le rôle des FAPs en tant que cellules de soutien aux CS au cours de la régénération musculaire a largement été décrit dans la littérature<sup>269,364</sup>. L'augmentation du nombre de FAPs post-lésion se fait de manière rapide et transitoire. De plus, diverses études récentes ont abordé la question de l'hétérogénéité des cellules résidentes du muscle en conditions d'homéostasie et de régénération en utilisant l'analyse scRNAseq. Ces études ont pu mettre en évidence la présence de diverses sous-populations de FAPs à l'état basal et l'apparition de nouvelles populations au cours de la régénération<sup>49-51,53</sup> en accord avec nos résultats. Les résultats présentés ici fournissent un mécanisme qui pourrait expliquer à la fois l'augmentation rapide du nombre de FAP observée 24 heures post-lésion musculaire sans prolifération mais aussi participer à l'hétérogénéité des FAPs. Nos données de RNAseq montrent que la population globale de FAPs post-lésion s'apparente transcriptionnellement à la population globale des ASCs du ScAT. Nos données de scRNAseq montrent qu'en réalité certaines sous-populations d'ASCs du ScAT respectivement *Vit*<sup>+</sup> et *Top2a*<sup>+</sup> s'apparentent fortement à certaines sous-populations de FAPs et pourraient représenter les sous-populations de FAPs décrites comme « activés » post-lésion dans la littérature<sup>50,53</sup>. A ce jour, nous sommes dans l'attente des résultats de l'amplification du gène « traceur » KikGR des ASCs du ScAT pour réellement déterminer quelle(s) population(s) de FAPs expriment ce gène suite à la greffe de ScAT KikGR.

Nos données de cytométrie, de RNAseq et de scRNAseq montrent qu'en réponse à une lésion musculaire, les ASCs du ScAT surexpriment la podoplanine, qui est un ligand pour le récepteur plaquettaire CLEC-2 (C-type lectin-like receptor 2). Nous avons remarqué en analysant nos données et en reprenant celles publiées dans la littérature par Oprescu et al.<sup>50</sup> que la podoplanine est faiblement exprimée par les FAPs à l'état basal et est exprimée transitoirement par les FAPs post-lésion. Il a été montré que la podoplanine confère un phénotype pro-migratoire aux MSCs, facilitant leur migration à travers la paroi vasculaire et leur interaction avec les plaquettes circulantes<sup>478</sup>. La podoplanine étant exprimée à la surface cellulaire, ce marqueur représente donc un intérêt pour suivre le trafic endogène des ASCs en réponse à la lésion. Néanmoins, la podoplanine n'est pas exprimée par une sous-population particulière d'ASCs et est également exprimée de manière homogène dans toutes les populations de FAPs qui apparaissent après la lésion. Ce marqueur ne permet donc pas de tracer une sous-population particulière d'ASCs. On pourrait aussi imaginer que les FAPs résidentes du muscle puissent induire leur propre expression de podoplanine en réponse à la lésion musculaire. Néanmoins, ces cellules étant déjà présentes dans le muscle, induire l'expression de la podoplanine ne représenterait pas un réel intérêt de migration. Il est plus probable que l'augmentation de l'expression de la podoplanine observée dans la population de FAPs post-lésion soit due à une infiltration d'ASCs *Podoplanine*<sup>+</sup> plutôt qu'une induction de son expression au sein de FAPs résidentes. Pour valider cette hypothèse il serait intéressant d'observer les variations de l'expression de la podoplanine dans les FAPs intramusculaires post-lésion dans un modèle de lipectomie bilatérale des ScAT ou d'injection d'anticorps  $\alpha$ -Pla dans le but de démontrer que la perturbation de l'infiltration des ASCs perturbe également l'expression de la podoplanine qui ne pourrait pas être compensé par une induction d'expression par les FAPs résidentes. Pour savoir si les FAPs sont capables ou non d'induire l'expression de la podoplanine, il serait intéressant de les isoler *in vitro* en culture avec du

milieu contenant du sérum d'un animal lésé afin de reproduire le stimulus chimique auquel ils sont exposés au cours de la lésion. Par des approches de RT-qPCR ou de cytométrie, on pourrait alors déterminer l'expression moyenne de la podoplanine par cellule avant et après exposition au sérum. Dans le cas où les FAPs ne seraient pas capables d'induire l'expression de la podoplanine, ce marqueur de surface représenterait un grand intérêt et permettrait de distinguer pour la première fois les ASCs des FAPs par leur niveau d'expression de podoplanine.

Nos données de scRNAseq nous ont permis de faire émerger une sous-population d'ASCs (ASC3) possédant une signature génique spécifique (*Vit*<sup>+</sup>, *ApoE*<sup>+</sup>, *Icam1*<sup>+</sup> et *Gas6*<sup>+</sup>) et qui semble mélangée au sein des populations de FAPs post-lésion. Cette sous-population cellulaire représente donc une population candidate de choix dans la détermination de la sous-population d'ASCs migrante qui participe à la régénération musculaire. Il serait alors très tentant d'isoler spécifiquement cette population cellulaire par l'intermédiaire de ces marqueurs, *Icam1* étant un récepteur exprimé à la surface cellulaire<sup>504</sup>, et de tester les capacités *in vitro* et *in vivo* de ces cellules par rapport à la population totale d'ASCs du ScAT. Est-ce que l'isolement d'une population d'ASCs Sca-1<sup>+</sup>/Icam-1<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD31<sup>-</sup> conduit à des capacités migratoires, prolifératives, sécrétoires et de différenciation *in vitro* plus importante qu'une population d'ASCs totale Sca-1<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD31<sup>-</sup> ? Est-ce que la réinjection *in vivo* d'une population d'ASCs Sca-1<sup>+</sup>/Icam-1<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD31<sup>-</sup> améliore davantage l'efficacité de la régénération musculaire que ne le fait déjà la population totale d'ASCs Sca-1<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD31<sup>-</sup> ? De manière intéressante, le gène *Vit* code pour une protéine appelée Vitrin composant la MEC et impliquée dans son remodelage et le gène *Gas6* code pour une protéine sécrétée impliquée dans la régulation et l'arrêt du cycle cellulaire et de la phagocytose des cellules apoptotiques, un processus important dans la réponse immunitaire<sup>505</sup>. Ces deux fonctions respectives ont déjà été décrites dans la littérature comme étant des processus clés joués par les FAPs intramusculaires post-lésion<sup>54,250,506</sup>. Enfin *ApoE* code une protéine exprimée à la surface de la monocouche phospholipidique des gouttelettes lipidiques des adipocytes<sup>507</sup> et est décrit comme régulateur du métabolisme en permettant le transport des lipides au sein des gouttelettes. D'un autre côté, la littérature décrit l'apparition d'adipocytes intramusculaires après une lésion, même si l'origine et le rôle de ces adipocytes ne sont à ce jour pas réellement démontrés, la découverte de ces marqueurs d'intérêts impliqués dans des fonctions biologiques déjà décrite dans la régénération musculaire ouvre des questions quant au rôle et au devenir des ASCs infiltrées dans le muscle lésé par rapport à celui des FAPs résidents.

### 3) Détermination de l'origine cellulaire et de l'importance fonctionnelle du dépôt transitoire d'adipocytes dans la régénération musculaire

*Les résultats présentés dans la section suivante n'ont pas été publiés :*

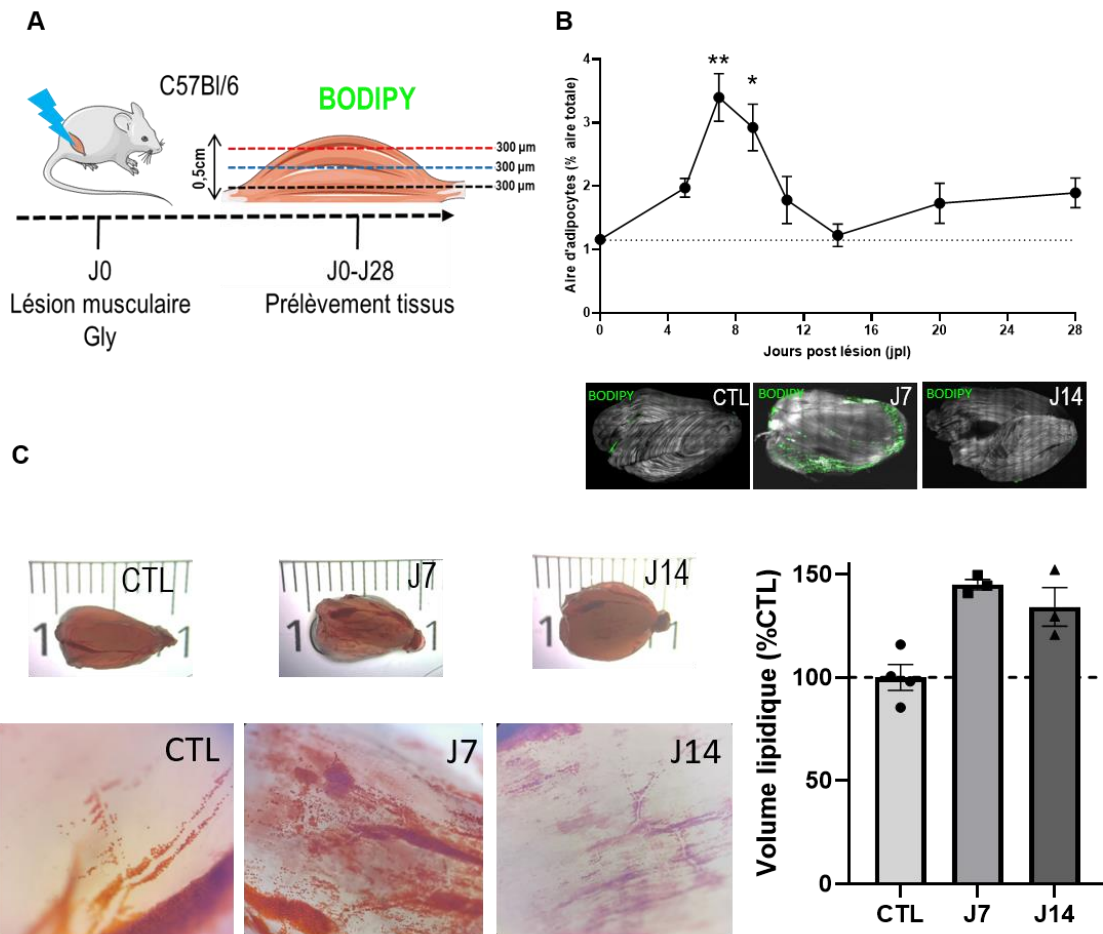
Nos données montrent qu'en réponse à la lésion musculaire le ScAT libère rapidement des ASCs qui infiltrent le muscle. La perturbation de leur infiltration dans le muscle a démontré l'importance de ces progéniteurs dans le processus de régénération musculaire. Par ailleurs, l'observation originale dans la littérature de la présence d'un dépôt adipeux intramusculaire

au cours du processus de régénération a permis de soulever de nouvelles questions quant au rôle et l'origine des adipocytes dans le muscle lésé. Bien que la présence d'adipocytes intramusculaires soit majoritairement associée à des phénomènes de dégénérescence musculaire, il semblerait ici que leur présence n'affecte pas le processus de régénération du muscle. D'autant plus que dans d'autres contextes de lésions tissulaires et régénération, la formation d'adipocytes et la présence de lipides a été montré comme favorisant les processus de réparations tissulaires. En effet, la formation d'adipocytes et/ou la présence de lipides ont déjà été démontré comme jouant des rôles importants dans la signalisation permettant le recrutement de cellules immunitaires nécessaire au processus de réparation cutanée par exemple<sup>494,496</sup>. La présence de lipides au cours du processus de réparation tissulaire permet également de servir de substrat métabolique au système immunitaire<sup>495</sup> ou même de molécules précurseurs permettant de reconstituer les membranes plasmiques cellulaires<sup>497</sup>. Il nous a donc paru nécessaire de comprendre si la formation d'adipocytes intramusculaires était bénéfique au processus de régénération post-lésion mais aussi quels étaient les mécanismes contrôlant cette formation. Pour répondre à ces questions, nous avons d'abord déterminé la cinétique précise d'apparition et disparition des adipocytes intramusculaires post-lésion. Comparer la cinétique des adipocytes intramusculaires avec celles des autres cellules de la niche permettrait de proposer des dialogues entre ces différents types cellulaires et ainsi déterminer si ces interactions sont bénéfiques au processus de myogenèse. Ensuite, notre objectif a été de déterminer si l'infiltration d'ASCs depuis le ScAT post-lésion pouvait représenter une source de cellules à l'origine de la formation d'adipocytes post-lésion. Sachant que l'infiltration des ASCs est nécessaire pour la régénération il se pourrait que leur rôle passe par une forme différenciée en adipocyte. Nous avons donc cherché à déterminer l'importance des adipocytes intramusculaires dans la régénération musculaire par des approches *in vitro* de co-culture entre des adipocytes et les progéniteurs musculaires complétées par des modèles *in vivo* de déplétion ou perturbation de la formation des adipocytes intramusculaires pour proposer des fonctions de cette population cellulaire au cours de la régénération.

### **Sous-partie 1 : Cinétique de la formation des adipocytes intramusculaires.**

Bien que quelques études démontrent l'apparition d'adipocytes intramusculaire post-lésion<sup>110,116,182</sup>, leur méthode de quantification reste incomplète. Ces travaux ont utilisé un modèle de lésion musculaire par injection de Gly et quantifié la présence d'adipocytes sur coupes fines (8µm). Bien que cette méthode permette l'observation d'adipocytes par l'intermédiaire d'un marquage PLIN1, protéine exprimée à la surface des gouttelettes lipidiques des adipocytes, elle reste limitée quant à la représentation globale des événements d'un muscle entier, pouvant mesurer jusqu'à 1cm pour les muscles quadriceps. Ces études se sont concentrées sur les étapes tardives post-lésion avec des quantifications réalisées autour de 10 jpl, temps pour lequel sont observés des adipocytes, et une absence d'adipocyte





**Figure 9 : Augmentation transitoire des quantités d'adipocytes intramusculaires entre 5 et 14 jours post-lésion.**

**A** Modèle de lésion musculaire induite par Glycérol et stratégie de prélèvement et de quantification des adipocytes intramusculaires par marquage Bodipy post-lésion **B** Aire de Bodipy<sup>+</sup> (en pixel<sup>2</sup>) exprimée en % de la surface totale de la section musculaire imagée en microscopie confocale. n=5 (Ctrl, à 0 jpl), n=3 à 5 jpl, n=7 à 7 jpl, n=7 à 9 jpl, n=4 à 11 jpl, n=4 à 14 jpl, n=5 à 20 jpl et n=4 à 28 jpl. **C** Images réalisées à la loupe binoculaire des muscles entiers transparentés au SDS et marqués par coloration à l'huile rouge (Oil Red O) et estimation du volume de lipides par extraction de la coloration Oil Red O dans le muscle entier, n=3-4 pour chaque groupe. Les résultats sont exprimés en pourcentage des animaux témoins avec une moyenne ± SEM ; \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001 vs Ctrl.



caractérisée autour de 21 jpl. Elles ne décrivent donc pas les phases plus précoces et le moment précis auquel apparaissent puis disparaissent les adipocytes intramusculaires, ce qui nous permettrait de déterminer la fenêtre temporelle sur laquelle les adipocytes pourraient influencer leur environnement et permettraient de soutenir le processus de régénération musculaire.

Pour quantifier la présence d'adipocytes musculaires nous avons développé une méthode de quantification sur coupe épaisse de muscle (300  $\mu\text{m}$ ). Nous avons sélectionné 3 coupes par muscles à des profondeurs différentes pour être représentatif de l'ensemble du muscle (Fig. 9A). Nous avons réalisé un marquage Bodipy afin de marquer les lipides neutres contenus dans les gouttelettes lipidiques des adipocytes et avons rapporté l'aire occupée par ce marquage à l'aire totale de chaque coupe de muscle, que nous traduirons par la suite comme une quantité d'adipocytes. La quantification que nous avons réalisée témoigne donc d'une surface occupée par les adipocytes et dont la variation pourrait être attribuée à des modifications de leur nombre et/ou de leur taille. Cette méthode de quantification des adipocytes intramusculaire a donné lieu à la rédaction d'une note d'information pour *Campden Instrument* dans laquelle nous détaillons précisément le protocole de coupe et de marquage<sup>508</sup>.

Nous avons quantifié la présence du marquage Bodipy par approche immunohistologique sur des coupes transversales de muscle quadriceps lésées au Gly de 0 à 28 jpl (Fig. 9A-B). Nos résultats montrent la présence d'adipocytes intramusculaires chez la souris à l'état basal (1,16%  $\pm$  0,08% de la surface totale du muscle occupée par le marquage Bodipy) contrairement aux études de la littérature qui n'en observaient pas<sup>110,116,182</sup>. En réponse à la lésion, nous avons observé une augmentation de la proportion d'adipocytes dans le muscle dès 5 jpl (1,97%  $\pm$  0,25% Bodipy<sup>+</sup> de la surface totale du muscle), bien que cela ne soit pas statistiquement significatif à ce stade. À 7 jpl, la surface occupée par les adipocytes a triplé par rapport aux animaux témoins non lésés (3,40  $\pm$  0,92 %) pour atteindre un pic (Fig. 9B) avant de revenir au niveau basal à 14 jpl. De manière surprenante, la quantité d'adipocytes semble réaugmenter à 20-28 jpl.

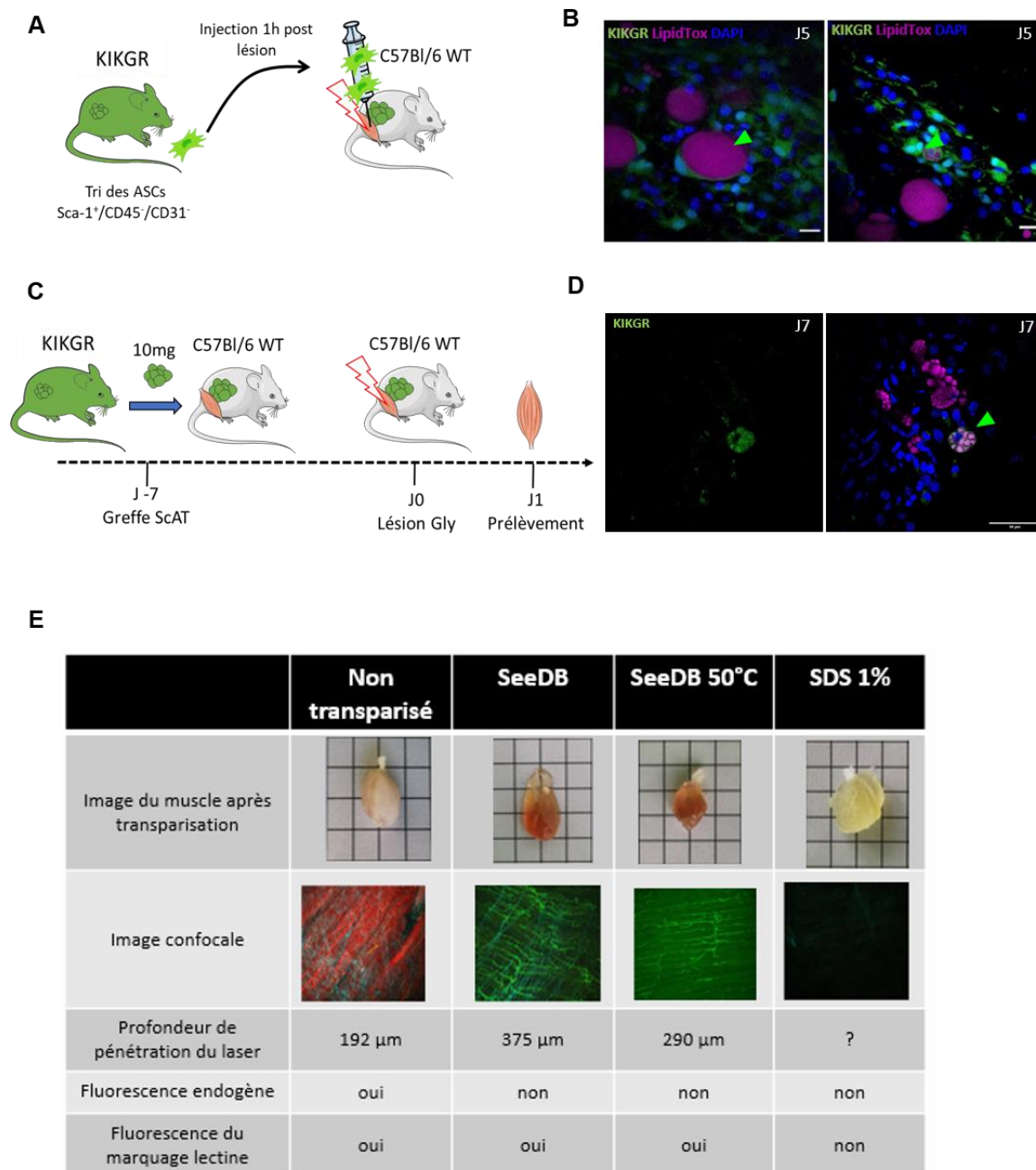
Nous avons pu confirmer ces résultats par une autre approche sur muscle entier. Après transparisation au SDS pdt 72 heures de muscles quadriceps lésés, nous avons réalisé un marquage des lipides neutres à l'Oil Red O puis une extraction du colorant afin d'estimer la teneur en lipides du muscle entier (Fig. 9C). De cette manière, nous avons observé une augmentation de 50% du contenu en lipides 7 jpl et une tendance à la diminution à 14 jpl (Fig. 9C) en accord avec nos résultats précédents obtenus avec le marquage Bodipy sur coupes de muscles.

De manière générale, nous avons constaté dans tous les muscles, que ce soit sur muscle entier et marquage Oil Red O ou sur coupe de muscle et marquage Bodipy, que les adipocytes formaient des clusters localisés entre les fibres musculaires préférentiellement localisés en périphérie du muscle plutôt qu'au centre.

Nos données montrent que le muscle de souris, à l'état basal, renferme une quantité d'adipocytes non négligeable. Ensuite, en accord avec la littérature, nous montrons l'apparition

transitoire d'adipocytes post-lésion musculaire entre 5 et 14 jpl dans le cadre d'une régénération dite « normale », mais nous proposons aujourd'hui une description plus précise de ce phénomène avec, avec un pic d'adipocyte à 7 jpl environ 3,5 fois supérieur aux quantités basales. Notre objectif était de déterminer une cinétique précise afin de pouvoir en déduire des dialogues entre les adipocytes et les types cellulaires présents dans l'environnement musculaire sur la même séquence temporelle de régénération. Le pic d'adipocytes est concomitant avec les étapes de différenciation et de fusion des progéniteurs musculaires lors de la régénération musculaire décrit dans la littérature<sup>509</sup> alors que les quantités de FAPs/ASCs ont retrouvé un niveau basal<sup>246</sup>. Il serait alors tentant de savoir s'il existe un dialogue entre les adipocytes et les progéniteurs musculaires permettant de soutenir la myogenèse. Dans les parties suivantes nous nous intéresserons à savoir si les ASCs infiltrées participent à l'apparition des adipocytes intramusculaires et nous étudierons ensuite le rôle de ces adipocytes et leur dialogue avec les progéniteurs musculaires.





**Figure 10: Les ASCs infiltrées participent à l'apparition transitoire des adipocytes intramusculaires post-lésion.**

**A** Modèle d'injection d'ASCs triées Sca-1<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup> depuis la SVF de ScAT d'animaux CAG::KikGR et réinjectées au sein d'animaux C57Bl/6 1 heure après la lésion Gly. **B** Images en microscopie confocale dans des muscles de souris 5 jours après la lésion Gly et injectées avec des ASCs KikGR. Les flèches vertes pointent la présence d'adipocytes fluorescents KikGR (vert) contenant des gouttelettes lipidiques (marquage LipidTOX, magenta). **C** Modèle de greffe de ScAT d'un animal CAG::KikGR à des souris WT C57Bl/6. **D** Images en microscopie confocale dans des muscles de souris 7 jours après la lésion Gly et greffées avec du ScAT KikGR. Les flèches vertes pointent la présence d'adipocytes fluorescents KikGR (vert) contenant des gouttelettes lipidiques (marquage LipidTOX, magenta). **E** Tableau des différents protocoles de transparation testés et leur impacte pour la microscopie confocale. Une injection lectine biotinylée puis d'un anticorps anti biotine fluorescent (vert) a été réalisé 20 minutes avant l'euthanasie des animaux Rosa26-mT/mG pour se servir du marquage comme témoin de profondeur de transparation du tissu à l'imagerie et de la fluorescence endogène comme témoin de conservation de cette fluorescence par les agents transparisants.

## **Sous-partie 2: Les ASCs infiltrées participent elles à la formation des adipocytes intramusculaires ?**

Afin de déterminer si les ASCs issues du ScAT et ayant infiltré le muscle suite à la lésion participent à la formation du dépôt transitoire d'adipocytes nous avons exploité deux modèles complémentaires. Le premier modèle reposait sur l'apport d'ASCs exogènes dans un muscle lésé permettant d'évaluer si une ASC est capable de se différencier en adipocyte dans un muscle lésé (Fig. 10A). L'injection d'ASCs Sca1+/CD45-/CD31- triées depuis la SVF de ScAT d'un animal fluorescent KikGR 1 heure après la lésion musculaire Gly nous a permis de suivre l'évolution des ASCs par des approches d'IHC. A partir de 5 jpl, nous avons observé la présence d'adipocytes fluorescents dans le muscle lésé (Fig. 10B), la fluorescence verte (KikGR) est bien localisée dans le cytoplasme de l'adipocyte, entourant le noyau (DAPI, bleu) et la/les gouttelette/s lipidique/s (LipidTox, magenta). Nous avons observé des adipocytes soit uniloculaires (Fig. 10B, image de gauche), soit multiloculaires (Fig. 10B, image de droite). Le phénotype multiloculaire est couramment associé à un type d'adipocyte brun/beige, bien que nous ne puissions pas exclure la possibilité d'un adipocyte blanc encore dans le processus de différenciation/maturation. Cette expérience démontre la capacité de différenciation des ASCs exogènes en adipocytes dans un muscle lésé.

Le second modèle tirait profit de la greffe de ScAT fluorescent KikGR (Fig. 10C), comme utilisé dans les parties précédentes, permettant ainsi d'évaluer les capacités de différenciation des ASCs après leur mobilisation depuis le ScAT puis leur infiltration dans le muscle lésé. Chez les animaux greffés puis lésés, nous avons aussi constaté la présence d'adipocytes fluorescents verts, présentant plusieurs gouttelettes lipidiques, à partir de 7 jpl (Fig. 10D). Nous avons donc démontré pour la première fois que suite à la lésion musculaire, les ASCs issues du ScAT et ayant infiltré le muscle lésé sont capables de se différencier en adipocyte.

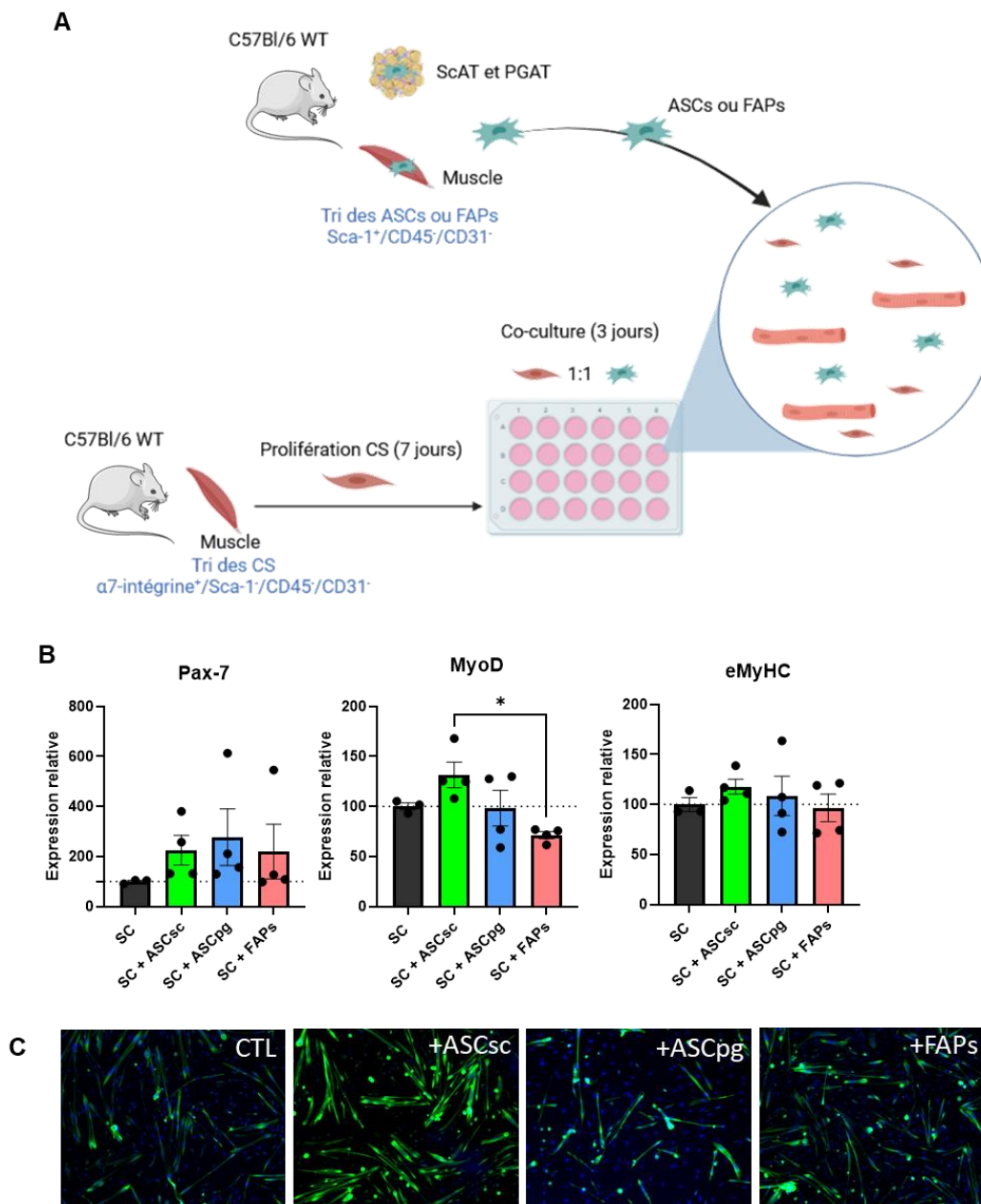
Enfin, nous avons essayé de déterminer la proportion des adipocytes formés post-lésion qui dérivait de la différenciation des ASCs infiltrées. Pour y répondre nous avons utilisé notre modèle de greffe de ScAT KikGR couplé à des méthodes de transparençation tissulaire sur muscle entier dans le but de déterminer la proportion de ces adipocytes exprimant la fluorescence KikGR parmi l'ensemble des adipocytes intramusculaires. Il existe à ce jour de nombreuses méthodes utilisant différents types d'agents déterçants dans le but de transparençer un tissu. Néanmoins, peu d'entre elles permettent de conserver l'expression de la fluorescence des protéines endogènes et beaucoup éliminent les lipides intratissulaires, tous deux nécessaires dans notre cas. Une méthodologie de transparençation appelé SeeDB, initialement développée pour la transparençation du cerveau<sup>510</sup>, permet de conserver la fluorescence endogène dans ce tissu. Nous avons donc décidé de l'utiliser pour la transparençation du muscle à température ambiante (RT) ou 50°C (pour accélérer le processus ; Fig. 10E). Avant l'euthanasie de l'animal, nous avons injecté une lectine fluorescente dans le réseau vasculaire des animaux afin de marquer ce réseau nous permettant ensuite d'avoir un repère pour mesurer la profondeur de transparençation du tissu. La méthode SeeDB nous a permis d'imager le muscle par une approche de microscopie confocale à une profondeur plus importante qu'un muscle non transparençé (375 µm à RT et 290 µm à 50°C contre 192 µm en condition non transparençée ; Fig.

10E), sans pour autant nous permettre d'imager le muscle entier. En revanche, cette approche ne nous a pas permis de conserver l'expression de la fluorescence de la protéine endogène KikGR freinant notre analyse. Une autre approche publiée récemment utilise du SDS afin de transpariser rapidement un muscle EDL (*Extensor Digitorum Longus*) pour quantifier le contenu lipidique intramusculaire<sup>442</sup>. Nous avons testé cette méthode sur les muscles quadriceps. Cette approche SDS nous a permis de transpariser le muscle quadriceps en entier mais sans conservation de la protéine KikGR endogène (Fig. 10E).

Par cette double approche d'injection d'ASCs et du modèle de greffe de ScAT KikGR nous avons pu montrer que les ASCs infiltrées participaient à la formation des adipocytes observés post-lésion. Les limites des protocoles de transparisation tissulaire dans la conservation des protéines fluorescentes endogènes et des lipides ne nous ont pas permis d'estimer en quelle proportion les ASCs infiltrées participent à la formation des adipocytes. Maintenant que nous avons démontré que la cinétique d'apparition des adipocytes intramusculaires s'effectue de manière transitoire et que les ASCs infiltrées participent à cette apparition nous allons nous intéresser au rôle joué par les adipocytes intramusculaires dans la régénération musculaire, d'abord par des approches *in vitro* puis *in vivo*.







**Figure 11 :** Les ASCs ne semblent pas favoriser la myogénèse plus que les FAPs dans leur format indifférencié. **A** Représentation schématique du protocole expérimental de co-culture directe entre des ASCs ou des FAPs avec des CS. **B** Evolution de l'expression des ARNm des gènes du programme myogénique (Pax-7, MyoD, eMyHC) sur des CS en culture avec des ASCs du ScAT, du PGAT ou des FAPs. n=4 de 2 expériences indépendantes pour chaque condition. **C** Images de microscopie à fluorescence de cellules satellites différenciées en co-culture directe avec des ASCs du ScAT ou du PGAT ou des FAPs isolées du muscle quadriceps selon l'immunophénotype Sca-1<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup> marquées desmin (vert) et dapi (bleu).

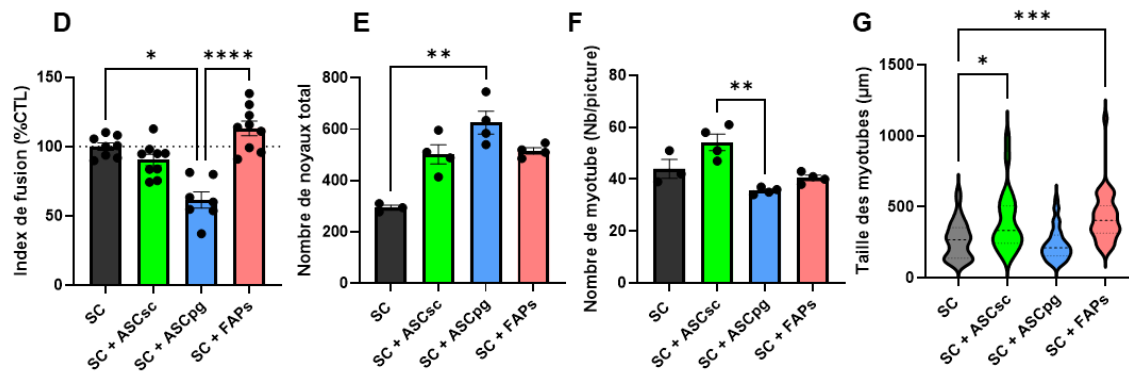
### **Sous-partie 3: Déterminer le rôle fonctionnel des adipocytes sur le processus de régénération par des approches *in vitro*.**

Après une lésion musculaire, les ASCs du ScAT pénètrent rapidement le muscle dès 1 jpl. Cependant, l'apparition transitoire des adipocytes n'est observée qu'à partir de 5 jpl, et la différenciation des ASCs infiltrées n'est détectée qu'à 7 jpl. Cette observation suggère un possible double rôle des ASCs : d'abord en tant que cellules indifférenciées durant les premiers jours suivant la lésion, puis en tant qu'adipocytes différenciés à des stades plus avancés. Pour mieux comprendre l'influence des ASCs sous format indifférenciées ou différenciées en adipocytes sur le processus de régénération, nous avons employé une approche de co-culture cellulaire *in vitro*, associant des ASCs fraîchement isolées de la SVF de ScAT à des cellules satellites (CS) natives. Étant donné les différences observées dans les effets pro-régénératifs suite à l'injection *in vivo* d'ASCs en fonction de leur origine tissulaire (cf. objectif 1), nous avons réalisé une comparaison *in vitro* de l'efficacité des ASCs dérivées du ScAT ou du PGAT, ainsi que des FAPs issus du muscle, à la fois dans leur état indifférencié mais aussi sous forme différenciée en adipocyte. Nous avons évalué si ces cellules interagissent avec les CS et leur impact sur la formation des myotubes.

Pour évaluer les capacités myogéniques des CS en culture nous les avons isolées par tri magnétique d'un muscle témoin non lésé selon l'immunophénotype  $\alpha 7$ -intégrine<sup>+</sup>/Sca-1<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD31<sup>-</sup> de la même façon que publié dans l'étude de Marinkovic et al.<sup>511</sup>. Nous avons ensuite ensemencé les CS à faible densité en milieu de prolifération 20% sérum pendant 7 jours puis les avons passés en milieu de différenciation en co-culture avec les différents types d'ASCs ou de FAPs (Fig. 11A). Nous avons choisi d'ensemencer les différents types cellulaires avec un ratio de 1:1 en raison d'une étude déjà réalisée par Joe et al. (2010) testant plusieurs ratios cellulaires et qui observait une plus forte influence des FAPs sur la fusion des progéniteurs musculaires avec ce ratio<sup>32</sup>. Notre objectif était ici de comparer l'impact des ASCs, mimant l'infiltration des ASCs décrite *in vivo*, par rapport aux FAPs locales sur l'activité des CS.

Dans un premier temps, nous avons quantifié sur les cellules en co-culture l'expression des différents gènes exprimés au cours du programme myogénique. Nous avons observé que les gènes très précoces du programme comme Pax-7 exprimé par les CS quiescentes (Fig. 11B) n'est pas influencé par la co-culture avec les ASCs par rapport aux FAPs tout comme les gènes tardifs comme eMyHC caractéristique de la présence de myotubes. En revanche, les gènes intermédiaires comme MyoD, caractéristique de la sortie des CS de l'état quiescent, étaient augmentés en co-culture avec les ASCs du ScAT par rapport aux FAPs. Ces résultats suggèrent alors que les ASCs infiltrées pourraient favoriser l'engagement des CS dans le processus de différenciation par rapport aux FAPs locales.

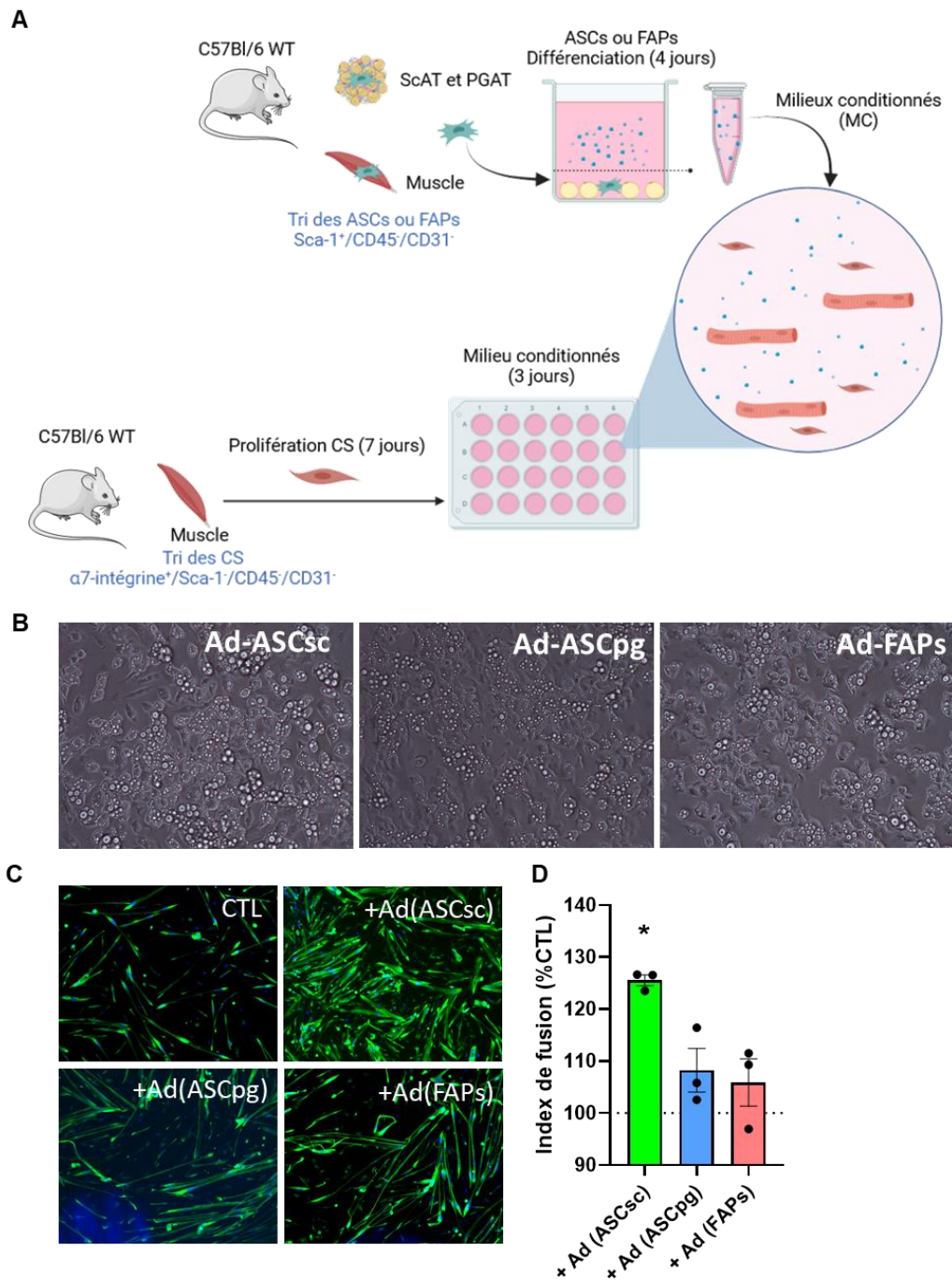
Pour compléter ces résultats, nous avons réalisé une analyse d'images effectuées à partir d'un double marquage Desmin (afin de visualiser les myotubes) et DAPI (pour les noyaux cellulaires) en culture (Fig. 11C). A partir de ces images, nous avons ensuite utilisé un programme semi-



**Figure 11 (suite) : Les ASCs ne semblent pas favoriser la myogénèse plus que les FAPs dans leur format indifférencié.** D Quantification de l'index de fusion à l'aide du Logiciel proposé par Noë et al.<sup>512</sup>. n=8 pour CS seule (Ctrl), n=9 pour les CS en co-culture avec les ASC du ScAT (ASCsc), n=7 pour les CS en co-culture avec les ASC du PGAT (ASCpg) et n=9 pour les CS en co-culture avec les FAPs. E-G Quantification du nombre de noyaux (E) de myotubes (F) par images à l'aide du logiciel proposé par Noë et al.<sup>512</sup>. La répartition de la taille de chaque myotube est représentée sous forme de Violin plot (G) a été déterminée à l'aide du logiciel d'analyse d'images Fiji. n=3 pour CS seule (Ctrl), n=4 pour les CS en co-culture avec les ASC du ScAT (ASCsc), n=4 pour les CS en co-culture avec les ASC du PGAT (ASCpg) et n=4 pour les CS en co-culture avec les FAPs de deux expériences indépendantes. Les résultats sont exprimés en pourcentage des animaux témoins avec une moyenne  $\pm$  SEM ; \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001 vs Ctrl.

automatisé publié récemment<sup>512</sup> permettant de mesurer plusieurs critères afin d'évaluer la myogénèse : (1) l'index de fusion des myoblastes qui correspond au rapport entre le nombre de noyaux présent à l'intérieur des myotubes et le nombre total de noyaux sur l'image traduisant une capacité des myoblastes à fusionner, (2) le nombre de myotubes sur l'image qui traduit une capacité des progéniteurs à s'engager dans la différenciation et (3) la taille des myotubes formés en culture qui traduit la maturation des myotubes<sup>512</sup>. Cette analyse nous a permis d'observer que lorsque les CS sont cultivées en présence des ASCs provenant ScAT, la capacité de fusion des progéniteurs musculaires reste inchangée (Fig. 11D). En revanche, en co-culture avec les ASCs provenant PGAT nous avons observé une inhibition d'environ 60% de la capacité de fusion des myoblastes. De manière étonnante, la co-culture des CS avec les FAPs n'augmente pas les capacités de fusions des myoblastes dans nos conditions de culture, contrairement à ce qui est décrit dans la littérature<sup>31,32</sup> (Fig. 11D). Dans notre situation, l'index de fusion est un rapport entre le nombre de noyaux présent dans les myotubes et le nombre de noyaux total (c'est-à-dire dans les myotubes, dans les progéniteurs n'ayant pas fusionnés et les ASCs/FAPs). Cet index est donc diminué par la co-culture directe avec les ASCs ou FAPs qui ne fusionnent pas avec les cellules musculaires<sup>32</sup>. En effet, lorsqu'on s'intéresse au nombre de noyaux total par image celui-ci est deux fois supérieur en co-culture avec des ASCs ou des FAPs que lorsque les CS sont cultivées seule (Fig. 11E), un résultat attendu en raison de la co-culture en ratio 1:1. Ce nombre de noyaux entraîne une diminution de l'index de fusion en co-culture potentiellement d'un facteur 2 et nous sommes en train de réaliser des co-cultures avec des ASCs/FAPs fluorescents dans le but de s'affranchir de ce biais. En revanche, la co-culture directe entre les CS et les ASCs/FAPs a permis de montrer que les ASCs du ScAT semblent permettre la formation d'un plus grand nombre de myotubes ( $54,24 \pm 5,54$  myotubes / image) par rapport à la condition contrôle CS seules ( $44 \pm 5,09$  myotubes / image) (Fig. 11F). De manière intéressante, la taille des myotubes formés est supérieure lorsque les CS sont placées en co-culture avec les ASCs du ScAT ( $398 \pm 210 \mu\text{m}$ ) et les FAPs ( $425 \pm 171 \mu\text{m}$ ) en comparaison avec la condition contrôle ( $267 \pm 131 \mu\text{m}$ ) (Fig. 11G).

Bien que préliminaire, cette comparaison suggère que les ASCs sous leur forme indifférenciée ne favorisent pas plus que les FAPs locales les étapes tardives du programme myogénique des CS comme la fusion ou la maturation des progéniteurs myogéniques. Il se pourrait donc que le rôle des ASCs sous format indifférenciées intervienne sur des étapes plus précoces du programme myogénique comme la prolifération des CS que nous n'avons pas évalué ici ou bien sous une forme différenciée en adipocyte que nous allons aborder dans la partie suivante.

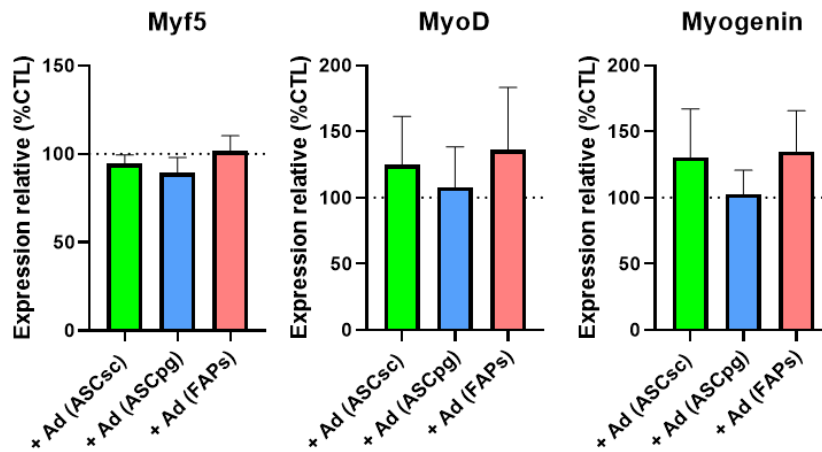


**Figure 12 : Les adipocytes issus de la différenciation des ASCs favorisent les étapes intermédiaires de la régénération musculaire.**

**A** Représentation schématique du protocole expérimental de culture des CS avec les milieux conditionnés par des adipocytes issus de la différenciation des ASCs du ScAT ou du PGAT ou des FAPs du muscle. **B** Etat de différenciation en adipocytes des ASCs du ScAT ou du PGAT ou des FAPs au moment de la récupération des milieux conditionnés. **C** Images de microscopie a fluorescence de cellules satellites différenciées en co-culture avec des milieux conditionnés par des adipocytes issus de la différenciation d'ASCs du ScAT (Ad-ASCsc) ou du PGAT (Ad-ASCpg) et des FAPs (Ad-FAPs) isolées du muscle quadriceps selon l'immunophénotype  $Sca-1^+/CD31^-/CD45^-$  marquées desmin (vert) et dapi (bleu). **D** Quantification de l'index de fusion à l'aide du Logiciel proposé par Noë et al.<sup>512</sup>. n=3 pour CS seule (Ctrl), n=3 pour les CS en co-culture avec les ASC du ScAT (ASCsc), n=3 pour les CS en co-culture avec les ASC du PGAT (ASCpg) et n=3 pour les CS en co-culture avec les FAPs de trois expériences indépendantes.

Nous avons donc ensuite évalué l'impact du dialogue entre des adipocytes issus de la différenciation d'ASCs provenant ScAT ou du PGAT ainsi que des FAPs sur la capacité des CS à former des myotubes. Toujours sur le même principe, nous visions à comparer l'influence des adipocytes issus de la différenciation d'ASCs infiltrées du ScAT par rapport à ceux issu de la différenciation de FAPs locales sur le programme de différenciation myogénique. Les dialogues entre les adipocytes et les progéniteurs myogéniques n'ont jamais été décrits dans la littérature. Pour les étudier, nous avons adopté une première approche *in vitro* par milieux conditionnés (MC) par les différents types d'adipocytes afin de limiter l'impact du milieu de différenciation adipocytaires sur les CS (Fig. 12A). Nous avons procédé au tri magnétique des CS comme précédemment et après 7 jours de prolifération des CS nous les avons cultivées en présence des différents MC pendant 3 jours (Fig. 12A). Pour obtenir les MC nous avons trié les ASCs ou les FAPs depuis les ScAT ou PGAT et les muscles quadriceps que nous avons ensuite placé en culture pendant 3 jours pour atteindre 100% de confluence. Une fois la confluence atteinte, nous avons cultivé les ASCs/FAPs en milieu de différenciation adipocytaire pendant 4 jours supplémentaires, stade auquel nous observons des adipocytes chargés de plusieurs gouttelettes lipidiques (Fig. 12B). A ce stade, nous avons collecté les MC pour pouvoir les utiliser sur les CS. De manière intéressante, lorsque les CS sont cultivées en présence d'un MC par des adipocytes différenciés à partir des ASCs du ScAT (Ad-ASCsc) la capacité de fusion des myoblastes est augmentée de 25% par rapport à la condition contrôle (Fig. 12C-D) alors qu'elle n'est pas significativement modifiée par les MC par des adipocytes issus des ASC du PGAT (Ad-ASCpg) ou des FAPs (Ad-FAPs). Dans le cadre de l'utilisation de MC, le calcul de l'index de fusion n'est pas influencé par l'ajout de cellules dont les noyaux pourraient rentrer en compte dans le rapport entre les noyaux présents dans les myotubes et les noyaux totaux présents sur l'image (Fig. 12C).

E



**Figure 12 (suite) : Les adipocytes issus de la différenciation des ASCs favorisent les étapes intermédiaires de la régénération musculaire.** E Evolution de l'expression des ARNm des gènes du programme myogénique (Myf5, MyoD, Myogenin) sur des CS en culture avec des milieux conditionnés par des adipocytes issus de la différenciation d'ASC du ScAT, du PGAT ou des FAPs. n=2 pour chaque condition de deux expériences indépendantes. Les résultats sont exprimés en pourcentage des animaux témoins avec une moyenne  $\pm$  SEM ; \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001 vs Ctrl.



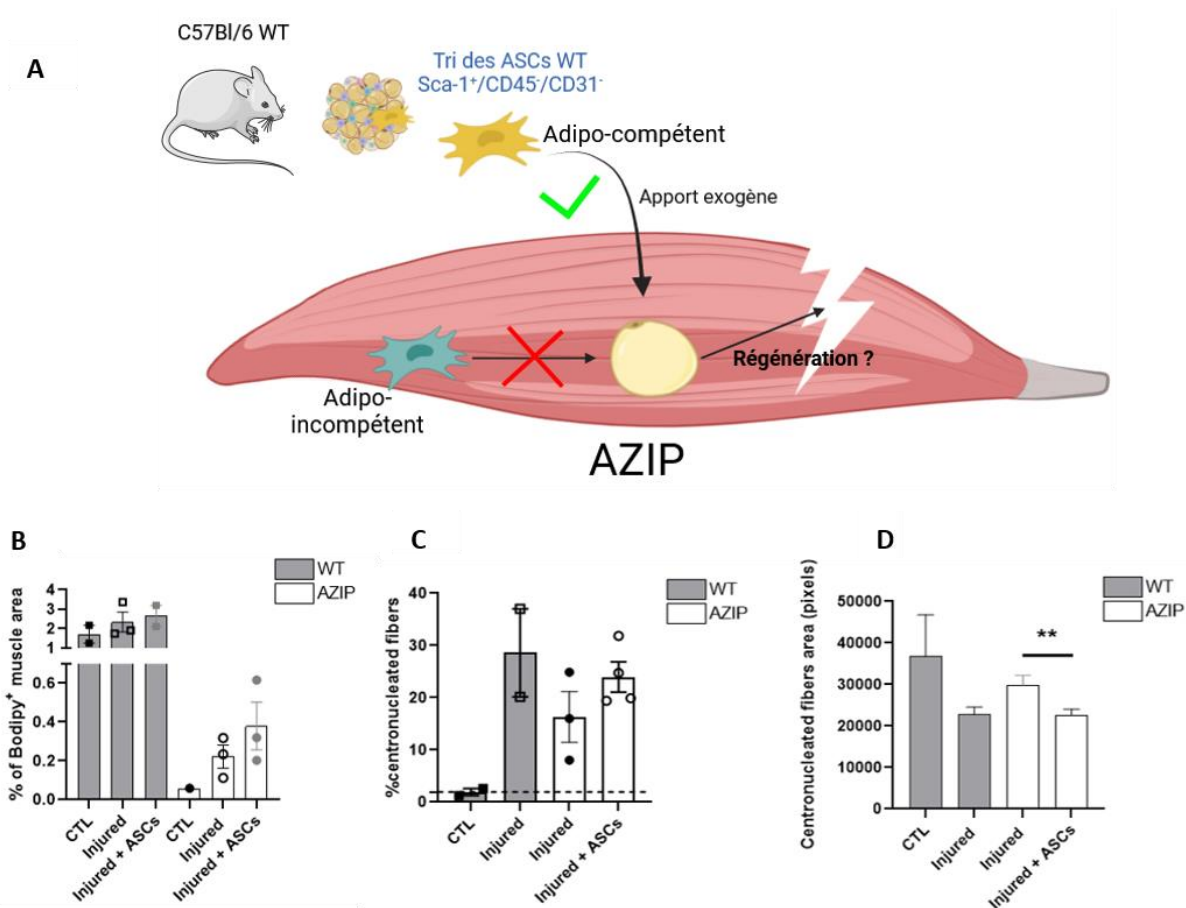
Nous avons également mesuré le profil d'expression des marqueurs du programme myogénique et nous avons observé que les marqueurs précoces (Myf5) restent inchangés quel que soit le MC (Fig. 12E). En revanche, les marqueurs intermédiaires et plus tardifs du programme myogénique (MyoD et Myogenin) semblent être augmentés par les MC par des Ad-ASCs et des Ad-FAPs, bien que les résultats ne soient pas significatifs (Fig. 12E). Ces résultats, bien que préliminaires, suggèrent pour la première fois, non seulement que le dialogue entre les CS et les adipocytes améliore la capacité des CS à former des myotubes mais aussi que l'origine cellulaire des adipocytes pourrait conditionner le processus de régénération musculaire, plus particulièrement en favorisant la fusion des myoblastes. Ainsi les ASCs infiltrées dans le muscle post-lésion pourraient influencer l'activité des CS sous leur format différencié en adipocyte mature.

En conclusion, ces différentes approches de co-culture cellulaires nous ont permis de montrer que les ASCs dans leur forme indifférenciée ne semblent pas jouer un rôle plus important que les FAPs sur le processus de fusion des progéniteurs musculaires. En revanche les ASCs dans leur forme différenciée en adipocytes permettent davantage de promouvoir les phases intermédiaires de la régénération comme la fusion des progéniteurs musculaires. Nous ne pouvons néanmoins pas exclure que les ASCs sous leur forme indifférenciée puissent favoriser les phases très précoces du programme de régénération comme la prolifération et l'activation des CS. Après avoir étudié le rôle *in vitro* des adipocytes dérivés des ASCs ou des FAPs sur le processus de myogénèse, nous allons maintenant aborder cette question par des approches *in vivo*.

#### **Sous-partie 4 : Conséquences fonctionnelles *in vivo* de la déplétion de l'IMAT post-lésion.**

Les données de la littérature ainsi que nos résultats ont décrit l'apparition d'un dépôt transitoire d'adipocytes ectopiques pendant la régénération musculaire dite « normale »<sup>116,178,513</sup>. Cependant, l'implication de cette population cellulaire dans la régénération musculaire physiologique n'a jamais été démontrée. Sachant que les lipides jouent un rôle important dans les processus de régénération tissulaire (en tant que molécules de signalisation intercellulaire, substrats énergétiques pour les cellules immunitaires, précurseurs des membranes biologiques ou même régulateurs de l'activité des cellules souches du tissu lésé), nous avons donc émis l'hypothèse que la formation des adipocytes intramusculaires post-lésion joue un rôle bénéfique dans la régénération musculaire.

Nous avons précédemment observé que les ASCs infiltrées dans le muscle lésé participent à la formation des adipocytes intramusculaires au cours de la régénération. Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure que les FAPs résidentes du muscle puissent aussi se différencier en adipocytes. A ce jour, il n'existe pas d'outils moléculaires ou de modèles *in vivo* permettant de distinguer les adipocytes issus de la différenciation d'une ASC ou d'une FAP. De plus, aucune preuve n'a été apportée démontrant des rôles différents des adipocytes en fonction de ces deux origines cellulaires. Nous avons donc dans un premier temps traité la question de l'importance du dépôt d'adipocytes transitoires de manière globale, indépendamment de leur origine cellulaire. Pour aborder cette question, nous avons trouvé intéressant de se placer dans



**Figure 13 : L'efficacité de la régénération musculaire in vivo semble dépendante de la présence d'adipocytes intramusculaires.**

**A** Représentation schématique du protocole d'injection d'ASCs adipo-compétentes dans un modèle in vivo AZIP dépourvu d'adipocytes. **B** Pourcentage de l'aire Bodipy<sup>+</sup> interprétée comme une quantité d'adipocytes intramusculaires. **C-D** Pourcentage (C) et aire (D) des fibres musculaires des muscles AZIP ou WT 14j après lésion induite par Gly. n= 2-4 dans chacun des groupes. Les résultats sont exprimés en moyenne ou en pourcentage des animaux témoins avec une moyenne  $\pm$  SEM ; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  vs Ctrl.

un contexte musculaire dépourvu d'adipocytes. Afin de reproduire ce contexte, nous avons utilisé un premier modèle murin appelé A-ZIP/F1 (AZIP), dans lequel le promoteur Fabp4 (aP2) dirige l'expression d'une protéine dominante négative du facteur de transcription C/EBP $\alpha$ , empêchant sa liaison avec l'ADN<sup>514</sup>. Au sein de ce modèle, les ASCs et plus généralement les MSCs sont incapables de former des adipocytes matures<sup>514</sup> (et que nous appellerons « adipo-incompétents » par la suite, Fig. 13A). Le modèle AZIP est un modèle de choix pour répondre à notre question. En effet, les données préliminaires de l'équipe ont démontré que suite à une lésion musculaire, l'augmentation du nombre de FAPs intramusculaire n'est pas modifiée post-lésion laissant sous-entendre que le recrutement des ASCs n'est pas non plus affecté. En revanche, l'expression des marqueurs moléculaires du programme myogénique (MyoD, MyoG et MRF4) étaient significativement réduite dans le modèle AZIP suggérant une altération de la régénération musculaire. A partir de ces résultats, le modèle AZIP nous permettait aussi de contrôler l'adipogénèse intramusculaire par l'apport exogène d'ASCs adipo-compétentes triées depuis le ScAT d'un animal sauvage (WT). Dans ce contexte de lésion musculaire du modèle AZIP, nous avons évalué si l'apport exogène d'ASCs adipo-compétentes pouvaient (1) se différencier en adipocytes et (2) améliorer la régénération musculaire.

Après avoir trié les ASCs selon l'immunophénotype Sca1+/CD45-/CD31- nous les avons réinjectées (250.000 ASCs) dans le muscle quadriceps 1 heure après la lésion musculaire induite par Gly. Nous avons séparé les groupes de souris AZIP et WT lésées, avec ou sans apport de cellules adipo-compétentes exogènes et nous avons évalué différents critères de régénération musculaire à 14 jpl :

- 1) La quantification des fibres musculaires en régénération (centronucléées) par coloration à l'hématoxyline et à l'éosine sur des sections musculaires de 8  $\mu$ m obtenues par cryoséction, comme décrit précédemment.
- 2) La taille des fibres musculaires en cours de régénération comme indicateur d'un retour morphologique des fibres à leur état initial.

D'autre part, nous nous sommes intéressés au potentiel adipogénique des ASCs injectées au sein du modèle AZIP. Nous avons donc recherché, par une approche IHC, la présence d'adipocytes dans les muscles lésés, résultant nécessairement de la différenciation des cellules adipo-compétentes injectées. Pour ce faire, nous avons réalisé des sections musculaires de 300  $\mu$ m puis nous avons estimé la présence des adipocytes à l'aide du marquage avec Bodipy, comme décrit dans la sous-partie 1. Malgré un faible nombre d'animaux par groupe, le groupe AZIP possède une quantité d'adipocytes intramusculaire 30 fois inférieure aux animaux WT, confirmant le modèle de lipodystrophie (Fig. 13B). Nous avons observé une accumulation d'adipocytes intramusculaires plus importante chez les animaux lésés que les animaux non lésés avec une augmentation de 1,5 et 3,7 fois pour les animaux WT et AZIP, respectivement. Ce résultat confirme l'infiltration adipocytaire après une lésion musculaire mais est également un résultat inattendu pour le groupe AZIP car le contexte lipodystrophique n'aurait pas dû permettre la formation d'adipocytes matures. Suite à l'injection d'ASCs, nous avons observé une augmentation de 1,7 fois de la quantité d'adipocytes chez les animaux AZIP (Fig. 13B). Bien que statistiquement non significatif en raison du faible nombre d'individus par groupe, cette

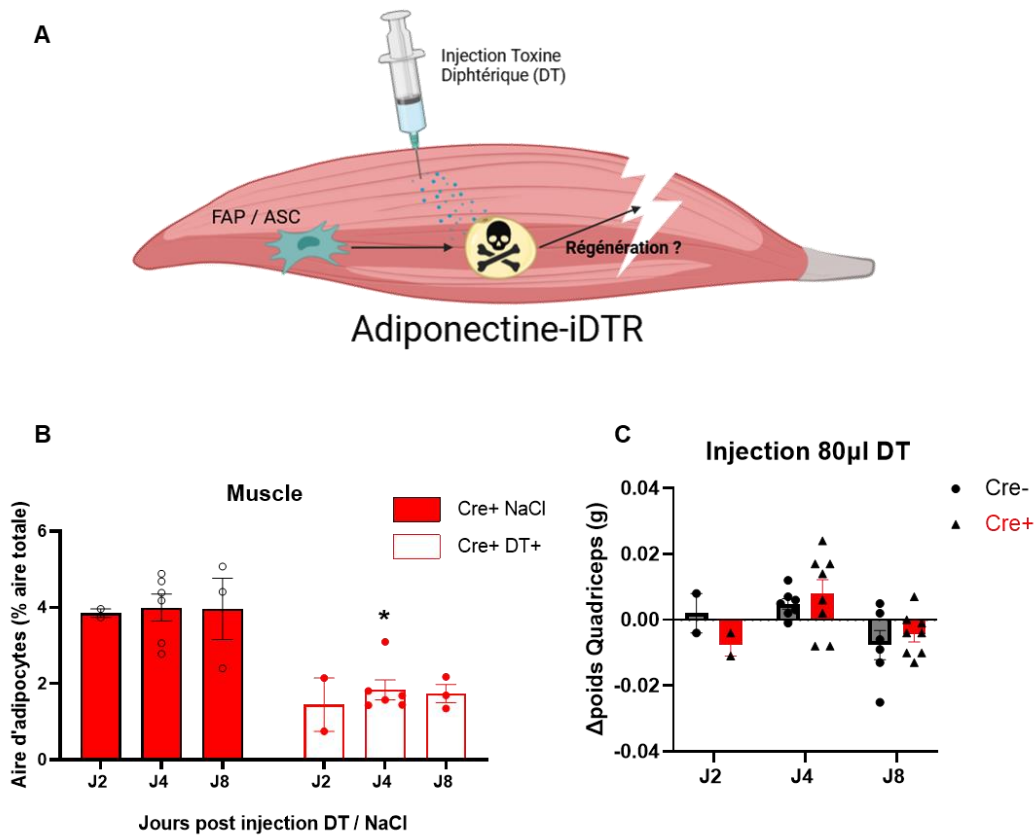
observation nous permet de penser que les ASCs injectées ont pu se différencier en adipocytes.

En ce qui concerne les différents critères de régénération musculaire, nous avons observé :

- 1) Que la lésion musculaire entraîne une augmentation massive des fibres centronucléées (x13,2) reflétant une régénération musculaire efficace chez les WT lésés en comparaison aux WT contrôles non lésés (Fig. 13C). Le groupe AZIP lésé présentait un pourcentage de fibres centronucléées qui semblait diminué par rapport aux animaux WT lésés (Fig. 13C), reflétant une altération globale de la régénération musculaire. Dans le groupe AZIP lésé ayant reçu une injection d'ASCs WT adipo-compétentes, bien qu'il n'y ait pas de différences statistiquement significatives, plus d'animaux ont tendance à avoir un pourcentage élevé de fibres centronucléées (Fig. 13C). Cela peut refléter un effet des ASCs exogènes WT sur l'amélioration de la régénération en augmentant le nombre de fibres s'engageant dans le processus de régénération.
- 2) Nous avons utilisé le paramètre de la surface des fibres musculaires centronucléées comme indicateur de l'efficacité de la régénération (Fig. 13D). Les fibres avec de plus grandes surfaces correspondent aux plus matures. Dans le groupe WT, la lésion musculaire a entraîné une diminution de la surface des fibres musculaires centronucléées, un résultat attendu, car la maturation et l'agrandissement des fibres se poursuivent jusqu'à 28 jpl. Cependant, les souris AZIP blessées qui ont reçu des ASCs exogènes WT présentaient des fibres significativement plus petites que celles qui n'en avaient pas (x1,3).

Dans l'ensemble, les résultats préliminaires obtenus à partir du modèle AZIP suggèrent que la présence d'adipocytes intramusculaires joue un rôle bénéfique dans le cadre de la régénération musculaire. En effet, au sein de ce modèle dépourvu de capacité à former des adipocytes matures, la régénération musculaire semble largement perturbée tandis que l'apport exogène d'ASCs de type WT favorise la formation d'adipocytes intramusculaires associés à une amélioration du processus de régénération musculaire. Par la suite, des études supplémentaires devront être réalisées pour valider ces observations sur un plus grand nombre d'animaux permettant de réaliser des études statistiques plus robustes. Il serait aussi intéressant d'élargir la fenêtre temporelle d'analyse, en prenant en compte les temps de cinétique de régénération plus précoce comme 7 jpl. En effet, nous avons précédemment décrit que le pic d'adipocytes intramusculaires post-lésion se situait autour de 7 jpl avant de retrouver un niveau basal à 14 jpl. Il serait alors intéressant de quantifier les adipocytes intramusculaires dans le modèle AZIP après injection d'ASCs adipo-compétentes à 7jpl. En se plaçant à 14 jpl, il est possible que nous n'ayons pas pu quantifier la totalité des adipocytes formés pendant la régénération.





**Figure 14 : Caractérisation du modèle Adipoq-iDTR.**

**A** Représentation du schéma expérimental d'injection de la toxine diphtérique (DT) au sein du modèle Adipoq-iDTR. **B** Pourcentage de l'aire Bodipy<sup>+</sup> interprétée comme une quantité d'adipocytes intramusculaires chez les animaux Cre<sup>+</sup> en régime normal en fonction du temps après injection DT ou NaCl. n=2 (J2), n=6 (J4), n= 3 (J8). **C** Evolution de la différence de poids entre le quadriceps droit (injecté DT) et le quadriceps gauche (injecté NaCl) chez les animaux Cre<sup>-</sup> et Cre<sup>+</sup> (Δpoids) en fonction du temps post injection. n=2 (J2), n=7 (J4), n= 6 (J8) pour les animaux Cre<sup>-</sup> et n=2 (J2), n=8 (J4), n= 8 (J8) pour les animaux Cre<sup>+</sup>.

Nous avons ensuite développé un second modèle en collaboration avec le Dr Virginie Bourlier de l'équipe du Dr Cédric Moro à l'Institut des Maladies Métaboliques et Cardiaques (I2MC) de Toulouse dans l'objectif de perturber la formation du dépôt transitoire au cours de la régénération. Ce modèle repose sur le croisement de deux lignées murines Rosa26-iDTR avec Adipoq-CreERT2. Cette approche nous a permis de générer une lignée transgénique dans laquelle le traitement tamoxifène par gavage pendant 5 jours permet l'activation de la Cre recombinase spécifiquement dans les adipocytes matures entraînant l'excision d'une cassette STOP rendant les adipocytes sensibles à la toxine diphtérique (DT). L'injection de DT dans le muscle quadriceps permet alors de dépléter la population d'adipocytes spécifiquement dans ce tissu et d'en étudier les conséquences sur la régénération musculaire (Fig. 14A). Contrairement au modèle AZIP qui nous a permis d'induire l'adipogénèse par injection de cellules adipo-compétentes, le modèle Adipoq-iDTR nous permet de dépléter les adipocytes matures formés dans le muscle post-lésion.

Avant de procéder à l'étude des conséquences de cette déplétion sur la régénération musculaire, nous avons caractérisé ce modèle murin et étudié les conséquences de l'injection de DT sur les quantités d'adipocytes intramusculaires. L'objectif était d'abord de déterminer en combien de temps et en quelle proportion l'injection de DT entraînait la déplétion des adipocytes intramusculaires. Pour cela, nous avons réalisé une injection de 20 ng de DT diluée dans 80µl de NaCl dans le quadriceps droit ainsi que 80µl de NaCl dans le quadriceps gauche du même animal pour servir de contrôle, en se basant sur les quantités déjà utilisées dans la littérature pour des injections dans le muscle *tibialis anterior*<sup>515</sup>. Nous avons ensuite prélevé les muscles quadriceps entre 2 jours et 8 jours après injection de la DT et avons quantifié les adipocytes intramusculaires par des approches IHC sur coupes épaisses comme décrit précédemment.

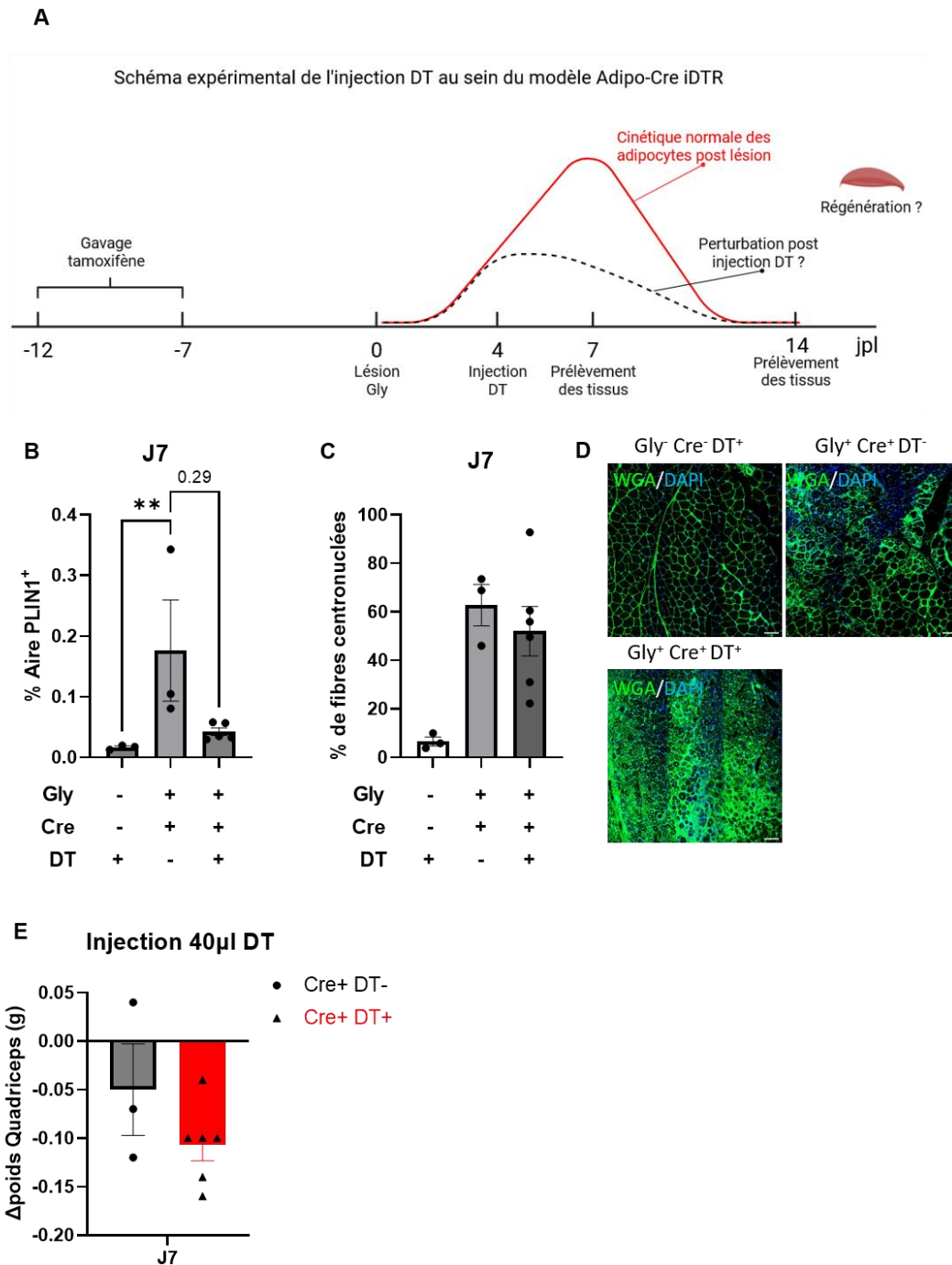
Nous avons observé au sein de la cohorte d'animaux exprimant la Cre recombinase (Cre<sup>+</sup>) sous le contrôle du promoteur *adipoq* (Adiponectine) une déplétion d'environ 60% de la quantité d'adipocytes dans le muscle injecté par la DT par rapport aux muscles injectés NaCl de la même cohorte (Fig. 14B). La diminution de la quantité d'adipocytes a eu lieu dès le deuxième jour après l'injection DT et a été maintenue jusqu'à 8 jours. Ensuite, nous n'avons pas observé de diminution des quantités d'adipocytes intramusculaires au sein de la cohorte d'animaux n'exprimant pas la Cre recombinase (Cre<sup>-</sup>) après injection de la DT (données non présentées sur la figure 14), un résultat attendu nous permettant d'affirmer que l'injection DT n'entraîne pas de mort cellulaire à elle seule. Nous avons également évalué la différence de poids ( $\Delta$ poids quadriceps) entre le quadriceps droit injecté avec la DT et le quadriceps gauche injecté NaCl du même animal dans le but de s'assurer que l'injection de la DT n'induit pas de variations du poids musculaire. L'injection de la DT suivi de la déplétion de 60% des adipocytes intramusculaires chez les animaux Cre<sup>+</sup> n'a pas entraîné de variations du poids des muscles par rapport aux animaux Cre<sup>-</sup> quelle que soit la cinétique post injection DT (Fig. 14C). De manière inattendue, nous avons remarqué des variations de poids des ScAT suite à l'injection





DT intramusculaire chez les animaux Cre<sup>+</sup>. De la même manière que pour le muscle, nous avons réalisé une différence de poids du ScAT droit (côté injecté par la DT dans le muscle) par rapport au ScAT gauche (côté injecté NaCl) (Fig. 14D). Plus cette valeur est faible, plus la différence de poids entre le ScAT droit et le ScAT gauche est importante. Alors que les poids des ScAT ne varient pas au cours du temps après injection de la DT au sein de la cohorte Cre<sup>-</sup> ainsi que durant les 4 premiers jours après l'injection de la DT au sein de la cohorte Cre<sup>+</sup> (Fig. 14D) nous avons remarqué une diminution d'environ 0,15 g du poids des ScAT droits à partir du 8<sup>ième</sup> jours après l'injection et d'environ 0,32 g au 15<sup>ième</sup> jour (Fig. 14D). Ces résultats laissent penser que l'injection de 80µl de DT dans le muscle diffuse vers le ScAT entraînant alors la mort des adipocytes au sein du ScAT. Pour tenter de mieux comprendre la diminution de poids des ScAT post injection musculaire de DT nous avons réalisé un marquage CD68 sur des coupes de ScAT d'animaux Cre<sup>-</sup> et Cre<sup>+</sup> afin de visualiser la présence de macrophages et leur répartition dans le ScAT. Il a déjà été décrit dans la littérature que les macrophages s'organisent en forme de « Crown like structures » autour des adipocytes lorsque ceux-ci entrent en apoptose<sup>516</sup>. Nous avons donc cherché à visualiser l'accumulation de macrophages CD68<sup>+</sup> autour des adipocytes dans les ScAT d'animaux injectés DT. Au sein des ScAT d'animaux Cre<sup>-</sup> dont les muscles ont été injecté avec la DT nous avons observé une faible présence de macrophages CD68<sup>+</sup> (magenta) entre les adipocytes bodipy<sup>+</sup> (vert) (Fig. 14E, images de gauche). En revanche, au sein des ScAT d'animaux Cre<sup>+</sup> nous avons observé une forte accumulation de marquage CD68<sup>+</sup> autour des adipocytes (Fig. 14E, images de gauche). Ce résultat à lui seul ne permet pas de démontrer une mort par apoptose des adipocytes qui devrait être complété par un essai TUNEL afin de visualiser les extrémités des brins d'ADN libres détruits au cours de l'apoptose. Néanmoins, suite à l'injection intramusculaire de DT, nous observons une accumulation de macrophages caractéristique d'une inflammation locale au sein du ScAT, certainement provoquée par la mort cellulaire des adipocytes. Pour tenter de limiter ce phénomène de diffusion, nous avons cherché à diminuer par deux le volume dans lequel était dilué la DT tout en conservant la quantité de DT injectée par muscle (20ng). Nous avons alors réalisé des injections de 40 µl de DT et avons observé la variation du poids des ScATs. Durant les 7 premiers jours, l'injection de DT n'a pas influencé le poids des ScATs (Fig. 14F). En revanche, sur des temps plus tardifs à 14 jours post injection DT nous avons observé une diminution d'environ 0,33g du poids de ScAT (Fig. 14F) tout comme avec l'injection de 80 µl sur une cinétique similaire (15 jours post DT). L'injection d'un volume plus petit de DT nous a donc permis de ralentir l'effet observé sur la diminution du poids des ScAT même si cela n'a pas complètement permis de l'empêcher. La caractérisation du modèle *Adipoq-iDTR* nous a permis de déterminer des critères importants pour la réalisation du protocole visant à évaluer l'impact de la déplétion des adipocytes intramusculaire sur la régénération musculaire :

- L'injection de 20ng de DT intramusculaire permet une déplétion de 60% d'adipocytes dès 2j post injection, maintenue jusqu'à 8j.
- Le ScAT ne semble pas impacté par l'injection intramusculaire de DT pendant les 7 premiers jours post injection.



**Figure 15 :** La déplétion des adipocytes formés après la lésion musculaire semble perturber la morphologie et la régénération du muscle.

**A** Représentation du schéma expérimental d'injection de la toxine diphtérique (DT) au sein du modèle Adipoq-iDTR en fonction du temps **B** Pourcentage de l'aire PLIN1<sup>+</sup> sur coupe de muscle fine (8µm) interprétée comme une quantité d'adipocytes intramusculaires chez les animaux Cre<sup>+</sup> ou Cre<sup>-</sup> ayant reçu ou non une lésion musculaire Gly. **C** Pourcentage de fibres musculaires centronucléées 7 jpl Gly chez les animaux injectés ou pas avec la DT. **D** Images en microscopie confocale sur muscles quadriceps lésés Gly et témoins à 7 jpl avec ou sans injection DT. Barres d'échelles 100 µm. **E** Différence de poids entre le quadriceps droit (injecté DT à 4 jpl) et le quadriceps gauche (injecté NaCl à 4 jpl) chez les animaux Cre<sup>-</sup> et Cre<sup>+</sup> (Δpoids) en fonction du temps post-lésion. n=3 (7 jpl) pour les animaux Cre<sup>-</sup> et n=6 (J7) pour les animaux Cre<sup>+</sup>. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM ; \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, vs Ctrl.

Nous avons ensuite mis en place un protocole permettant de dépléter les adipocytes intramusculaires formés au cours du temps post-lésion dans l'objectif de mesurer l'influence de cette déplétion adipocytaire sur l'efficacité de la régénération musculaire (Fig. 15A). Sachant que l'augmentation des adipocytes post-lésion est transitoire, débute à 5 jpl avec un pic à 7 jpl et un retour au niveau basal à 14 jpl, nous avons choisi de réaliser l'injection de la DT 4 jours après la lésion Gly (Fig. 15A) pour prévenir la formation du pic d'adipocytes post-lésion. L'action de la DT ayant lieu pendant 6 jours après son injection, celle-ci nous permet d'agir sur la fenêtre temporelle sur laquelle les adipocytes sont les plus présents post-lésion. Nous avons ensuite prélevé les muscles quadriceps à 7 jpl et 14 jpl dans le but de mesurer les critères permettant d'évaluer l'efficacité de la régénération musculaire :

- Le pourcentage de fibres musculaire régénératives (centronucléées)
- L'expression des gènes du programme moléculaire de la myogénèse
- La taille des fibres musculaires néo-formées

La mise en place de ce protocole a démarré en juillet 2023, nous avons prélevé tous les tissus des différentes cohortes Cre<sup>+</sup> et Cre<sup>-</sup> et avons pu réaliser à ce jour l'analyse des fibres en régénération par approche IHC à 7 jpl. Dans un premier temps, nous nous sommes assurés de la déplétion des adipocytes intramusculaires post-lésion Gly suite à l'injection de DT. Pour cela nous avons réalisé un marquage PLIN1 sur les cryosections de muscle en condition lésionnelle à 7 jpl, temps pour lequel nous avons déterminé le pic de présence des adipocytes. PLIN1 est une protéine exprimée à la surface de la gouttelette lipidique des adipocytes blancs et nous avons rapporté l'aire occupée par le marquage PLIN1 à l'aire totale de la coupe de muscle afin d'obtenir un pourcentage d'aire occupée par le marquage PLIN1 (Fig. 15B). Comme attendu, la lésion Gly a entraîné une augmentation d'un facteur 10 de la présence d'adipocytes intramusculaires à 7jpl (Fig. 15B). L'injection de la DT à 4 jpl a permis une diminution d'environ 70% du marquage PLIN1 à 7 jpl chez les animaux Cre<sup>+</sup> (Fig. 15B). Nous avons alors cherché à déterminer l'efficacité de la régénération après déplétion des adipocytes intramusculaires par l'intermédiaire de la quantification des fibres centronucléées. De manière inattendue par rapport à notre hypothèse, nous avons constaté que la proportion de fibres centronucléées à 7 jpl n'était pas significativement réduite chez les animaux ayant subi une déplétion d'adipocytes (Fig. 15C), signifiant probablement une efficacité de régénération identique avec le groupe d'animaux n'ayant pas subi cette déplétion sur la base de ce critère. Néanmoins, nous avons remarqué sur les images IHC des animaux lésés ayant subi une déplétion adipocytaire un élargissement des zones lésées du muscle avec une organisation des fibres musculaires plus anarchique que les animaux lésés n'ayant pas reçu l'injection DT (Fig. 15D). Cette perturbation de l'organisation des fibres musculaires pourrait signifier un retard de régénération musculaire qui ne se traduit pas par une perturbation des fibres musculaires centronucléées, caractéristique d'évènements de fusion, à 7 jpl et 3 jours post injection DT. Il serait également intéressant de réaliser cette quantification sur la coupe entière de muscle afin de ne pas être influencé dans l'analyse par la taille de la zone lésée du muscle, plus importante chez les animaux lésés et injectés DT. Il se pourrait aussi que le temps entre la

déplétion adipocytaire (4jpl) et le moment de prélèvement des muscles (7jpl) ne soit pas suffisant pour observer une conséquence sur l'efficacité de régénération musculaire. Néanmoins, nous avons évalué l'évolution des poids des muscles à 7 jpl. Pour ce faire, nous avons utilisé la différence de poids entre le muscle lésé et le muscle controlatéral non lésé de la même souris ( $\Delta$ poids), que nous avons interprété comme un indicateur de la progression de la régénération musculaire. Si cette valeur est proche de 0, cela signifie que le muscle a retrouvé son poids initial après la dégénérescence induite par la lésion Gly. Cette observation peut être interprétée comme une régénération efficace. En revanche, si cette valeur est éloignée de 0, cela signifie que le muscle ne s'est pas régénéré correctement ou que le processus de régénération est encore en cours. Nous avons observé de faibles valeurs de  $\Delta$ poids pour les quadriceps des animaux lésés non injectés DT pouvant être interprété comme une régénération musculaire efficace. Bien que l'écart ne soit pas significatif, les valeurs de  $\Delta$ poids semblent être augmentées d'un facteur 2 après déplétion des adipocytes intramusculaires (Fig. 15E). Cet écart n'est pas attribuable à la déplétion d'adipocytes en elle-même puisque la déplétion d'adipocytes intramusculaire n'entraîne pas de variations des poids des muscles (Fig. 14C), même lorsque les animaux étaient soumis à un régime HFD, une condition connue comme induisant une adipogénèse intramusculaire<sup>492</sup> (données non montrées sur la figure). Nous prévoyons d'effectuer une analyse des mêmes paramètres histologiques ainsi que l'expression des gènes de la myogénèse sur une cinétique plus tardive, à 14 jpl, pour tenter de mieux comprendre le rôle de l'IMAT sur les phases plus tardives de la régénération musculaire. La mise en place du protocole a été effectué et les tissus ont été prélevés. Une partie des tissus ont été congelés pour l'analyse histologique et les ARNs ont été extraits sur la deuxième partie pour l'analyse des gènes.

En conclusion, ce modèle Adipoq-iDTR nous a permis de démontrer que l'injection DT à 4jpl nous permet de dépléter les adipocytes intramusculaires formés au cours du processus de régénération. Cette cinétique d'injection de la DT est donc pertinente pour poursuivre notre étude de l'impact de l'adipogénèse sur la régénération musculaire. Bien que préliminaires et nécessitant des analyses complémentaires, nos résultats démontrent que la récupération morphologique du muscle post-lésion semble retardée par la déplétion adipocytaire indiquant une perturbation du processus de régénération.

## Discussion

Dans l'ensemble, nos résultats démontrent qu'une lésion musculaire entraîne l'apparition transitoire d'adipocytes intramusculaires entre 5 et 14 jpl avec un pic autour de 7 jpl. Nous proposons pour la première fois, pour expliquer la formation des adipocytes intramusculaires, que les ASCs du ScAT différenciées participeraient à ce pool cellulaire. Enfin, nous montrons que les adipocytes issus de la différenciation d'ASCs provenant du ScAT *in vitro* favorisent davantage la fusion des progéniteurs musculaires que les adipocytes issus de la différenciation des FAPs résidents. *In vivo*, nos résultats préliminaires soutiennent l'idée que l'absence d'adipocytes dans le muscle conduit à une perte d'efficacité de la régénération musculaire tandis que l'ajout de cellules suivi de leur différenciation en adipocytes permet d'améliorer ce processus. Enfin, la déplétion *in vivo* des adipocytes formés au cours de la régénération semble aboutir à une perturbation de la régénération musculaire bien que le modèle nécessite d'être affiné afin de pouvoir analyser la régénération musculaire de manière optimale. Ce travail semble alors de mettre en avant un rôle bénéfique des adipocytes intramusculaires dans cette fenêtre de temps précise au cours du processus de régénération alors qu'ils étaient jusque-là considérés comme délétères pour la physiologie musculaire et associés à de nombreuses dégénérescences et maladies métaboliques comme le diabète de type 2.

L'ensemble de ces résultats permet de poser de nouvelles questions quant aux mécanismes de contrôle de l'apparition et disparition des adipocytes intramusculaires. Les dégénérescences musculaires et maladies métaboliques comme le DT2 sont associées à une accumulation d'adipocytes intramusculaires forte et permanente tandis que nous démontrons ici une apparition transitoire de ce type cellulaire au cours de la régénération. On pourrait alors imaginer que le contrôle de la formation/disparition des adipocytes joue un rôle clé dans la balance entre leurs effets bénéfiques et délétères pour garantir les fonctions contractiles et métaboliques du muscle. On pourrait ainsi réaliser un parallèle avec les études effectuées sur les FAPs, précurseurs des adipocytes, qui possèdent eux aussi une augmentation transitoire de leur nombre au cours de la régénération musculaire et dont les quantités intramusculaires rapportées dans des cas pathologiques comme la myopathie de Duchenne sont étonnamment élevées. Il a été démontré que la phase de diminution du nombre de FAPs au cours de la régénération est associée à une apoptose de cette population cellulaire médiée par les macrophages<sup>246</sup>. En bloquant l'activité des macrophages, le nombre de FAPs intramusculaires post-lésion est maintenu élevé et conduit au développement d'une fibrose musculaire caractéristique de nombreuses myopathies. Une étude intéressante menée par l'équipe du Dr. Chopard a démontré que la suppression des contraintes mécaniques sur les muscles par suspension caudale, entraîne une réduction drastique de la présence des adipocytes intramusculaires<sup>517,518</sup>, quantifiés par imagerie et expression génique. Cette constatation ouvre la voie à une exploration plus approfondie pour déterminer si cette quasi-élimination des adipocytes intramusculaires dans ce modèle a un impact sur la régénération musculaire. Pour ce faire, il serait pertinent de provoquer des lésions musculaires contrôlées, par injection de CTX ou de glycérol, afin d'évaluer si la déplétion des adipocytes affecte le processus de

régénération. Cette démarche pourrait fournir des informations complémentaires sur les interactions entre les adipocytes intramusculaires et la capacité de régénération des muscles.

A ce jour, nous n'avons pas déterminé les mécanismes qui contrôlent la disparition des adipocytes intramusculaires. Notre méthode de quantification des adipocytes par marquage Bodipy ne nous permet pas de savoir si leur disparition est associée à une apoptose cellulaire ou bien à une lipolyse massive de leur contenu lipidique. Récemment, une étude se plaçant dans un contexte de cicatrisation cutanée chez la souris, montre qu'une lésion profonde du derme atteignant les adipocytes sous-cutanés entraîne une lipolyse massive de ces adipocytes, suivie d'une dé-différenciation des adipocytes en fibroblastes, nécessaire au recrutement des macrophages et la cicatrisation de la peau<sup>496</sup>. En bloquant pharmacologiquement et génétiquement l'activité de la lipase ATGL nécessaire à la lipolyse les auteurs montrent un défaut de recrutement des macrophages associé à une inefficacité de la cicatrisation. Dans notre contexte, il serait intéressant de déterminer si la diminution des adipocytes intramusculaire est due à la lipolyse de leur contenu en triglycérides. Pour cela, la détermination du nombre d'adipocytes intramusculaires par approche IHC sur coupe de muscle associée à la taille moyenne des adipocytes intramusculaires pourrait être un bon index de ce phénomène. Si le nombre d'adipocytes ne varie pas entre 7 et 11/jpl alors que la taille des adipocytes diminue, alors nous pourrions proposer que la diminution des quantités d'adipocytes intramusculaires que nous observons est en réalité une diminution de leur taille provoquée par la lipolyse de leur contenu lipidique. Comprendre ce mécanisme permettrait de mieux comprendre l'accumulation d'adipocytes ectopiques observée dans de nombreuses dégénérescences musculaires. Ceci permettrait d'identifier des cibles thérapeutiques pouvant rétablir les niveaux d'adipocytes intramusculaires. Par exemple, il est largement démontré que le vieillissement, chez l'homme comme chez le rongeur, est associé à une accumulation massive d'adipocytes intramusculaires et à une perte de fonction musculaire<sup>340,519</sup>. Par ailleurs, il est également démontré que la lipolyse adipocytaire est, elle aussi, impactée avec l'âge<sup>520</sup>. Elle est diminuée chez l'homme et le rongeur âgé et s'explique par une diminution de stimulation de la voie  $\beta$ -adrénergique (activatrice de la lipolyse)<sup>520</sup>. On pourrait alors émettre l'hypothèse que la perte de fonction de la lipolyse conduit à l'accumulation d'adipocytes intramusculaires et à une perte d'efficacité de régénération. Il serait alors intéressant de tester si l'inhibition d'ATGL dans le muscle au cours de la régénération conduit à une accumulation lipidique sous forme d'adipocytes et à un défaut de régénération musculaire.

Si la cinétique de formation/disparition est un élément décisif de leur effet sur la régénération musculaire, on pourrait également penser que la nature même de ces adipocytes et les types de lipides qu'ils renferment puisse intervenir. Nos données démontrent que les ASCs infiltrées dans le muscle lésé à partir du ScAT participent à la formation des adipocytes intramusculaires, proposant pour la première fois une origine cellulaire originale des adipocytes intramusculaires. Nous avons observé que les adipocytes fluorescents dérivés de la différenciation des ASCs infiltrées pouvaient contenir une gouttelette lipidique uniloculaire mais aussi plusieurs gouttelettes lipidiques. Même si ce seul critère ne permet pas de



déterminer le phénotype d'un adipocyte, la présence de plusieurs gouttelettes est généralement associée à un phénotype d'adipocytes bruns/beiges. Déterminer le phénotype des adipocytes formés au cours de la régénération pourrait également nous permettre proposer des hypothèses quant à leur fonction dans la régénération du muscle. Alors que la présence d'adipocytes blancs nécessaire aux processus de réparation d'autres tissus a été rapportée, le rôle des adipocytes bruns/beiges est lui beaucoup moins décrit. En revanche, ces adipocytes bruns/beiges sont décrits dans d'autres contextes comme étant consommateurs de lactate, un métabolite produit lorsque le flux glycolytique dépasse les capacités oxydatives mitochondriales<sup>521</sup>. Dans le cadre d'une lésion tissulaire la perte locale du système vasculaire génère une hypoxie qui conduit à une forte accumulation de lactate dans le tissu<sup>522</sup>. Lorsque le lactate s'accumule dans les tissus, il peut contribuer à l'acidification du milieu, abaissant ainsi le pH. Une acidité accrue peut être néfaste pour les cellules impliquées dans le processus de régénération, en favorisant l'accumulation de cellules immunitaires pro-inflammatoires<sup>523</sup> ou en régulant les phénomènes de prolifération ou de mort cellulaires<sup>524</sup>, des phénomènes clés de la régénération musculaire. On pourrait alors imaginer que l'apparition d'adipocytes bruns/beiges dans le muscle post-lésion puisse réguler l'acidité intramusculaire en contrôlant l'accumulation de lactate ce qui conduirait à contrôler les phénomènes inflammatoires, prolifératifs et de mort cellulaire nécessaires au processus de régénération du muscle.

Dans le but de mieux caractériser le phénotype des adipocytes observés post-lésion, nous envisageons par la suite d'affiner nos marquages par l'utilisation d'anticorps additionnels dirigés contre la protéine découplante UCP1 (un marqueur spécifique de l'adipocyte brun/beige), de la membrane plasmique (laminine), des gouttelettes lipidiques (Perilipin1, spécifique des adipocytes blancs) ainsi qu'un marquage mitotracker permettant d'évaluer les quantités mitochondriales présente en plus grandes quantités au sein des adipocytes bruns/beiges. Se pose alors la question de l'existence d'un progéniteur commun ou distinct entre les adipocytes blancs et les adipocytes bruns/beiges puisque l'observation de ces événements dans le muscle dérivent de l'infiltration de progéniteurs depuis un TA blanc. Alors que l'origine des adipocytes blancs dérivant de progéniteurs présents au sein même du TA blanc est largement démontrée<sup>420,447</sup> la question de l'origine des adipocytes bruns/beiges demeure plus complexe. Quelles pourraient alors être les sources d'adipocytes bruns/beiges intramusculaires ?

- **Un progéniteur commun entre adipocytes brun/beige et cellules musculaires ?** En effet, une étude de 2008 démontre de façon surprenante que les adipocytes bruns possèdent un progéniteur commun avec le tissu musculaire<sup>525</sup>. Dans cette étude les auteurs ont réalisé des expériences de suivi des lignages cellulaires chez la souris en utilisant des souris génétiquement modifiées (souris Myf5-Cre *knock-in* croisées avec des souris R26R3-YFP, exprimant la *yellow fluorescent protein* à partir du locus Rosa26) permettant de suivre l'expression du facteur myogénique MYF5. Au cours du développement de ces souris, la fluorescence associée à MYF5 est observée au sein des cellules musculaires des muscles squelettiques mais aussi au sein des tissus

adipeux bruns mais pas le tissu adipeux blanc. L'étude ne permet toutefois pas de conclure si adipocytes et cellules myogéniques émergent de progéniteurs distincts ou d'un progéniteur commun. Cette étude démontre néanmoins que les voies contrôlant la détermination des lignages adipocytaires bruns et blancs divergent avant la spécification en tissu adipeux brun ou muscle squelettique. Ces résultats renforcent aussi le concept émergent de lien entre tissu adipeux brun et muscle squelettique.

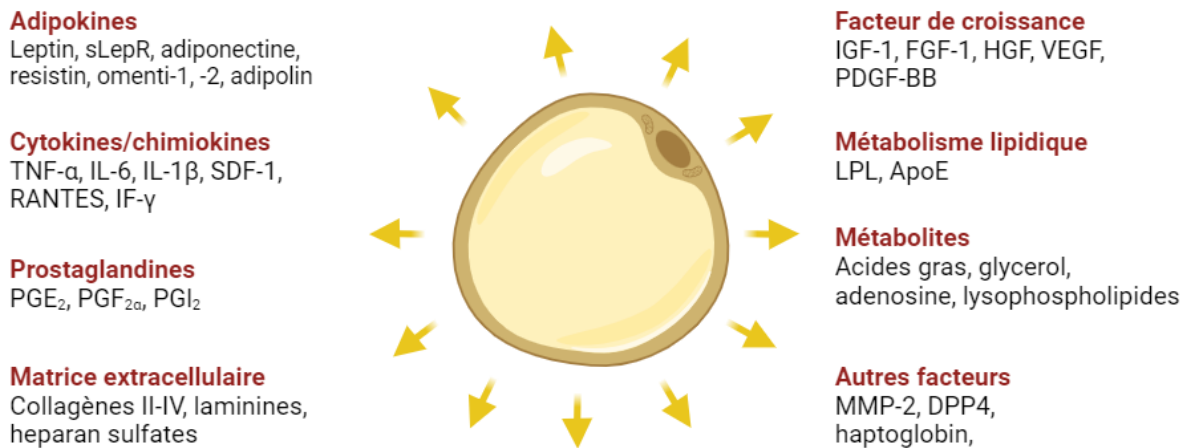
- **Un progéniteur du TA blanc capable de « brunir » au sein du muscle ?** Plus récemment en 2016, les travaux du laboratoire ont démontré une organisation du ScAT hétérogène avec la présence de deux zones distinctes : une zone centrale autour du ganglion lymphatique appelée « lobulisable » car organisée en forme de lobules d'adipocytes détournés de faisceaux de MEC comportant la vascularisation, et une zone « non-lobulisable » présente en périphérie du tissu avec une organisation plus stochastique<sup>526</sup>. De manière intéressante, les travaux du laboratoire démontrent aussi que les progéniteurs présents seulement au sein de la zone lobulisable, sont doués de capacités de brunissement en formant des adipocytes beiges exprimant UCP1<sup>526,527</sup>, appuyant l'idée de la présence de progéniteurs hétérogènes au sein du ScAT. *In vitro*, la littérature démontre aussi qu'il est possible d'obtenir des adipocytes de types bruns/beiges à partir de précurseur provenant de TA blanc<sup>528</sup> par stimulation  $\beta$ 3-adrenergic, Rosiglitazone (agoniste PPAR $\gamma$ ) et BMP-7<sup>529</sup>. Les agonistes des récepteurs  $\beta$ 3-adrénergiques sont principalement associés au système nerveux sympathique, qui régule la réponse au stress, la dépense énergétique et qui est activé et démontré comme participant à la régénération musculaire post-lésion<sup>530</sup>. D'un autre côté les BMP (Bone Morphogenetic Proteins), qui sont une famille de protéines de signalisation impliquées dans la régulation de la croissance et de la différenciation cellulaires, sont sécrétés pendant le processus de régénération musculaire<sup>531</sup>. L'environnement musculaire post-lésion représente donc peut-être un environnement permissif à la différenciation en adipocytes bruns/beiges au cours de la régénération musculaire. Au vu de toutes ces observations il est alors légitime de penser que des adipocytes bruns/beiges observés au sein du muscle post-lésion puissent dériver de progéniteurs présents dans le ScAT.

Ensuite, nos données *in vitro* de culture des CS par milieux conditionnés par des adipocytes issus de la différenciation d'ASCs issus du ScAT ou de co-culture directe entre des ASCs ou des FAPs avec les CS démontrent que les adipocytes peuvent influencer les étapes intermédiaires du processus de myogénèse en favorisant la fusion des progéniteurs musculaires et ainsi participer à la régénération tandis que les ASCs indifférenciées ne semblent pas dans nos résultats préliminaires impacter ce processus davantage que les FAPs locales. Cette approche visait à reproduire l'infiltration *in vivo* des ASCs 24 heures après la lésion musculaire puis leur différenciation en adipocyte autour de 7 jpl afin de mieux comprendre leur influence précoce sur la myogénèse sous leur forme indifférenciée et leur influence plutôt tardive/intermédiaire sous leur forme différenciée en adipocytes. Néanmoins, il est établi que le processus de myogénèse s'établit de manière séquentielle avec des étapes de prolifération des CS et leur

activation durant les 24 à 72 heures post-lésion suivi des étapes de différenciation et de fusion des progéniteurs musculaires autour de 4 - 7 jpl<sup>532</sup>. Il serait alors intéressant de comprendre l'influence des ASCs qui infiltrent le muscle dès les premières 24 heures après la lésion sur l'activation et la prolifération des CS pouvant aussi expliquer le fait qu'elles ne puissent pas avoir plus d'influence que les FAPs résidentes sur les étapes intermédiaires et tardives de la régénération. Pour cela, nous envisageons par la suite de réaliser des co-cultures en transwell entre les ASCs et les CS, pour éviter les effets confondants de la co-culture directe sur la quantification du nombre de cellules en culture, et ensuite mesurer la prolifération des CS. Vient ensuite la question du rôle fonctionnel de l'ASC sous sa forme adipocytaire dans le processus de myogénèse. Comment un adipocyte pourrait-il être capable de favoriser la myogénèse et la régénération ? A ce jour, aucune étude ne décrit ce phénomène ni les liens qu'il pourrait y avoir entre la présence d'adipocytes intramusculaires et la régénération du muscle. Les adipocytes sont néanmoins décrits comme des cellules possédant d'importantes capacités sécrétoires<sup>533,534</sup>. Parmi ces sécrétions, il a été référencé de nombreuses cyto/chimio-kines comme TNF- $\alpha$ , IL6 ou IL-1 $\beta$  mais aussi de facteurs de croissance comme les FGF et les PDGF-BB et des protéines de la MEC comme les collagènes II et IV, les laminines ou WISP1 (Figure A) dont les rôles dans la myogénèse favorisant les différentes étapes de prolifération, différenciation ou fusion des progéniteurs musculaires ont tous déjà été démontré. Néanmoins, se pose ici la question de la raison d'un développement d'adipocytes intramusculaires dans le but de sécréter ce type de facteurs pour favoriser la régénération alors que d'autres types cellulaires, déjà en place au sein du muscle, sont aussi capables de les sécréter.

Les adipocytes sont connus pour leur capacité à stocker des lipides ce qui les distingue des autres types cellulaires. Il a récemment été démontré que les lipides sont utilisés au cours du processus de régénération musculaire par les CS<sup>535</sup>. Ces dernières sont capables d'accumuler de petites quantités de lipides sous formes de micro-gouttelettes intracellulaires qui conditionne leur devenir post-lésion. Les cellules accumulant le plus de lipides sont celles qui s'engagent dans un processus de différenciation tandis que celle qui n'en accumulent pas conserve leur état quiescent. On peut alors imaginer un dialogue métabolique entre les CS et les adipocytes intramusculaires post-lésion dans lequel les adipocytes agiraient comme des régulateurs en contrôlant la gestion et la redistribution des lipides intramusculaires nécessaires à la régénération. Il a d'ailleurs été démontré que les adipocytes peuvent sécréter des vésicules extracellulaires chargées de lipides dans leur environnement<sup>536</sup>. On pourrait aussi imaginer un dialogue des adipocytes avec leur environnement en tant que fournisseur de précurseur nécessaires à la formation des membranes plasmiques cellulaires au cours de la régénération. Le contenu de la gouttelette lipidique des adipocytes repose majoritairement sur la présence de triglycérides. La structure chimique d'un triglycéride est relativement simple, elle est composée de trois chaînes d'acides gras liés à une molécule de glycérol. Les membranes plasmiques des cellules, y compris celle des myotubes, sont composées d'une bicouche de phospholipides. La structure d'un phospholipide repose sur la présence d'une molécule de glycérol estérifiée par deux acides gras et un acide phosphorique. Ainsi, la lipolyse

des triglycérides contenu dans la gouttelette des adipocytes permettrait de libérer des acides gras nécessaires à la synthèse des phospholipides<sup>497</sup>. Ce phénomène de lipolyse massive pourrait ainsi expliquer la diminution de l'aire occupée par le marquage Bodipy sur les coupes de muscle que nous observons à partir de 7 jpl et que nous avons discuté précédemment.



**Figure A : Capacités sécrétoires d'un adipocyte blanc.** Adapté de Gerst et al. <sup>534</sup>

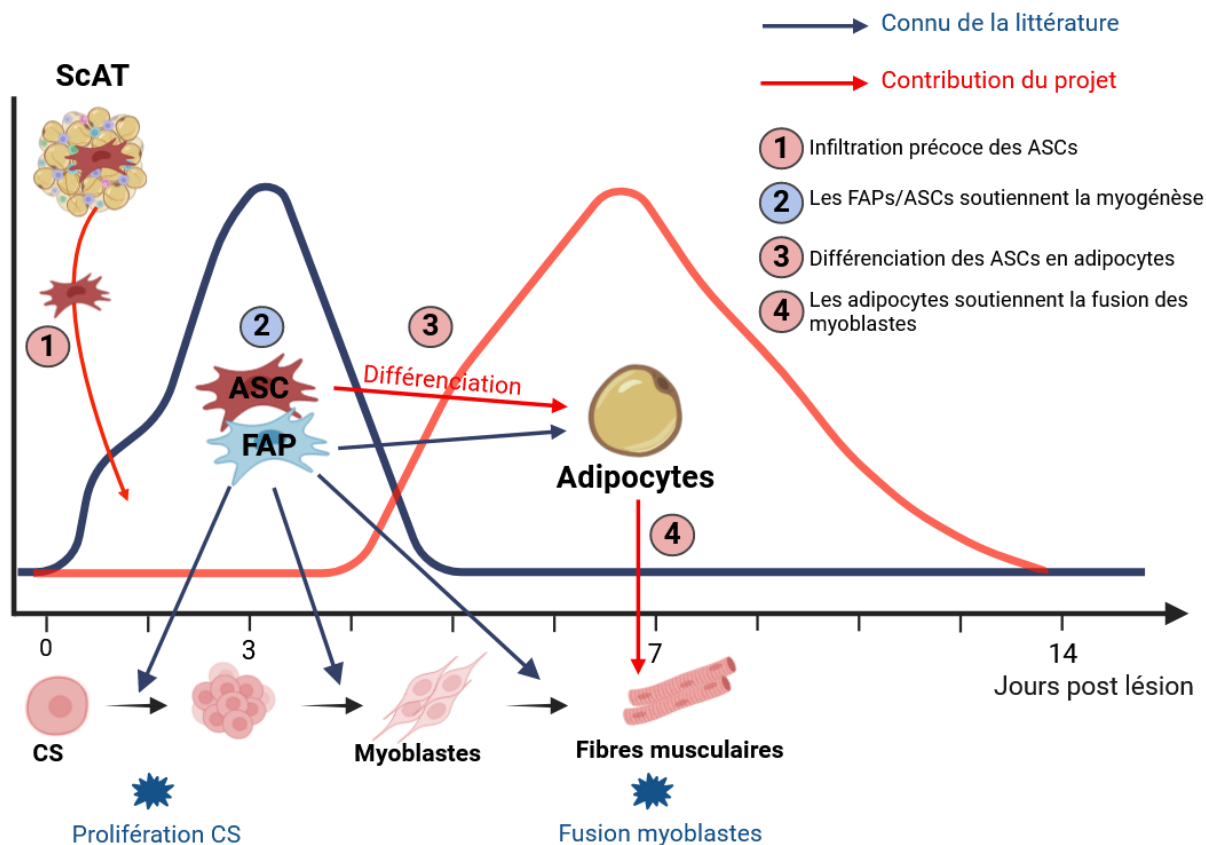
Nos résultats obtenus à partir du modèle AZIP dans lequel toutes les ASCs/FAPs sont dépourvues de capacités de différenciation en adipocyte semblent montrer que la présence de adipocytes intramusculaires est nécessaire à la régénération puisque l'injection de cellules adipo-compétentes améliore le processus de régénération normalement perturbé au sein de ce modèle. En ce qui concerne la réduction de l'aire des fibres en régénération au sein du modèle AZIP après réinjection d'ASCs adipo-compétentes (Fig. 13D), ce résultat inattendu suggérerait un retard dans la maturation des fibres, et pourrait être expliqué par les désordres métaboliques observés chez les animaux AZIP. Les animaux AZIP présentent une hyperglycémie ainsi qu'une hyperinsulinémie associées au développement d'un DT2<sup>514</sup>. Le DT2 est largement décrit dans la littérature comme une pathologie qui impacte fortement les capacités de régénération musculaire<sup>300</sup> en limitant les capacités prolifératives de progéniteurs musculaires et altérant le switch pro-inflammatoire/anti-inflammatoire de la réponse immunitaire. Pour surmonter ces limitations, il serait intéressant de rétablir les paramètres métaboliques dans le modèle AZIP. Pour cela, il est possible de réaliser des injections de leptine, une hormone sécrétée par les adipocytes (absents dans le modèle AZIP) et dont le rôle de régulateur de l'homéostasie énergétique a été établi. Les animaux AZIP présentent des taux de leptine 10 fois inférieurs aux animaux WT<sup>514</sup> et certaines études ont démontré la normalisation rapide de la glycémie chez des souris AZIP après injection de leptine<sup>537</sup>. Il est également possible de réaliser des greffes de TA au niveau dorsal chez la souris AZIP permettant de complètement restaurer les paramètres métaboliques chez ces animaux<sup>538</sup>. Dans ce modèle AZIP greffé avec du TA blanc au niveau sous-cutané, une étude se plaçant en contexte de lésion cutanée a démontré que la cicatrisation et la repousse du follicule pileux ne s'effectue seulement au niveau de la zone greffée par le TA, appuyant ainsi l'importance des

adipocytes dans les processus de réparation tissulaire. Néanmoins, dans notre cas, la greffe de TA apporterait une source d'ASCs qui pourraient potentiellement migrer au sein du muscle après la lésion. La migration de ces cellules dans notre modèle apporterait de l'hétérogénéité dans nos résultats en permettant la formation d'adipocytes intramusculaires au sein du groupe contrôle, AZIP non-injecté avec les ASCs adipo-compétentes.

Le modèle AZIP étant dépourvu d'adipocytes, il représente un modèle de choix pour étudier l'importance de l'origine des adipocytes dans le processus de régénération musculaire. Il serait alors intéressant de réaliser des injections de FAPs adipo-compétents au sein du modèle AZIP post-lésion afin de comparer leur pouvoir pro-régénérant par rapport à celui des ASCs. Cette analyse permettrait de déterminer si *in vivo* les capacités adipogéniques des FAPs sont différentes ou non de celles des ASCs et aboutissent ou pas aux mêmes effets sur la régénération musculaire. A ce jour, aucune étude ne compare les rôles fonctionnels des adipocytes issus de la différenciation des ASCs ou des FAPs. Cette observation permettrait alors de soulever de nouvelles questions quant à l'importance de l'origine cellulaire des adipocytes intramusculaires pour soutenir efficacement le programme myogénique et ainsi mieux comprendre les dérégulations mise en place dans certaines dégénérescences musculaires.

Enfin, l'utilisation du modèle Adipoq-iDTR représente aussi un modèle intéressant pour répondre à notre question. L'injection de DT à 4 jpl nous permettant de dépléter les adipocytes intramusculaires formés au cours de la lésion ce modèle nous permettrait de démontrer que la perturbation de l'adipogénèse est un élément clé du processus de régénération. Les résultats histologiques que nous avons obtenus à 7 jpl ne nous ont pas permis de faire ressortir une différence significative sur le nombre de fibres régénératives bien que l'organisation et la morphologie des fibres sur les images semblaient plus anarchiques post injection DT. Il semblerait alors que l'anarchie présente dans les muscles injectés DT ne permette pas l'identification des fibres lésées. Il semble alors plus pertinent d'analyser des cinétiques plus tardives au sein de ce modèle pour permettre au muscle de retrouver une morphologie nécessaire à l'identification des fibres centronucléées et compléter cette analyse par la quantification des gènes impliqués dans la myogénèse. A ce jour, nous avons mis en place une cohorte d'animaux Adipoq-iDTR injectés DT ou non et avons prélevé les muscles à 14 jpl. Avec cette cohorte, nous espérons montrer que la déplétion des adipocytes perturbe la formation des fibres centronucléées régénératives ainsi que l'expression des gènes du programme myogénique.





**Figure B : Les adipocytes intramusculaires dérivés de la différenciation des ASCs infiltrées contribuent à la régénération musculaire.** La courbe bleue correspond à l'évolution du nombre de FAPs intramusculaires post-lésion d'après l'étude de Lemos et al. (2015). La courbe rouge correspond à l'évolution des quantités d'adipocytes intramusculaires d'après notre étude.



## CONCLUSION

En conclusion, ce travail de thèse a permis de mettre en évidence que le ScAT constitue une source inattendue de MSCs soutenant la régénération musculaire. Nos résultats montrent que la réaction du muscle à la lésion déclenche, à distance, une libération massive d'ASCs depuis le ScAT capables d'infiltrer rapidement le muscle (Etape 1, Figure B). Une fois infiltrées les ASCs se mélangent à une autre population de MSCs résidentes, les FAPs, expliquant l'augmentation précoce de leur nombre non soutenue par leur prolifération et participe à l'hétérogénéité de cette population décrite dans la littérature<sup>31,32,50,51,53,246</sup>. Nous montrons par ailleurs que l'infiltration des ASCs est une étape clé de la régénération musculaire puisque la perturber entraîne des défauts de régénération musculaire. La littérature fait état du rôle des FAPs résidents dans différentes étapes de la myogenèse (prolifération et différenciation des CS vers 1-5 jpl, fusion des myoblastes vers 5-10 jpl) ; nos résultats démontrent que les ASCs pourraient aussi jouer un rôle dans ces mêmes étapes (Etape 2, Figure B). Nous avons également décrit de manière précise la cinétique de formation d'adipocytes ectopiques intramusculaires (5-14 jpl, avec un pic vers 7 jpl) post-lésion, et confirmé le caractère transitoire de cet événement<sup>110,116,178</sup>. La formation de ces adipocytes est concomitante avec la disparition des FAPs/ASCs intramusculaires et nous proposons pour la première fois qu'une partie de ces adipocytes dérive de la différenciation des ASCs infiltrées (Etape 3, Figure B). Enfin, bien que préliminaires, nos résultats montrent par l'utilisation de différents modèles animaux combinés à l'utilisation de co-culture cellulaires *in vitro* que l'adipogénèse intramusculaire post-lésion favoriserait la régénération musculaire (fusion des progéniteurs musculaires) (Etape 4, Figure B). Ainsi, ce travail propose pour la première fois d'établir une association bénéfique entre le développement d'adipocytes ectopiques et le muscle, et avec une meilleure compréhension du phénotype des adipocytes et des mécanismes moléculaires qui contrôlent cette formation nous pourrions découvrir de nouvelles cibles pour le traitement de pathologies myodégénératives.

## DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Le maintien de l'homéostasie d'un organisme repose sur une régulation précise de la communication entre les organes<sup>539</sup>. Pour ce faire, les organes ont développé des systèmes pour communiquer leurs états les uns aux autres. Ce réseau de communication inter-organes est constitué de facteurs solubles tels que des peptides, des protéines et des métabolites qui agissent pour coordonner des processus cellulaires essentiels dans le maintien de l'homéostasie et la réponse au stress<sup>540</sup>.

Ce projet nous permet de proposer un nouveau moyen de communication inter-organes dans le cadre d'une réponse tissulaire à un stress lésionnel par la mobilisation endogène de MSCs. Le tissu adipeux intervient alors comme un réservoir de cellules capables d'infiltrer le muscle lésé rapidement après la lésion afin de soutenir sa régénération. Comprendre les mécanismes qui contrôlent cette mobilisation ainsi que son évolution dans des cas physiopathologiques de dégénérescences musculaires fibro-adipeuses telles qu'observées dans le vieillissement, la myopathie de Duchenne ou l'obésité par exemple, permettrait de révéler des cibles thérapeutiques pour le traitement de ces pathologies. Ce projet soulève plusieurs questions essentielles quant au contrôle de la mobilisation des ASCs entre le ScAT et le muscle :

### ***Quelle est la quantité d'ASCs qui infiltrent réellement le muscle lésé ?***

Le modèle de greffe de ScAT fluorescent nous a permis de montrer qu'une partie de l'augmentation des FAPs du muscle peut être expliquée par l'infiltration des ASCs qui quittent le ScAT. A ce jour, notre modèle ne nous permet pas d'affirmer que l'augmentation du nombre de FAPs est uniquement due à l'infiltration des ASCs. En effet, la limite de la greffe de TA réside dans le fait que nous greffons deux morceaux de 10 mg chacun proche du ganglion lymphatique du ScAT receveur non fluorescent. Ainsi, quand nous observons la présence d'environ 9% des FAPs GFP<sup>+</sup> dans le muscle lésé (Figure 14D, introduction), cette proportion est sous-estimée par rapport à la quantité totale des ASCs pouvant aussi migrer depuis le ScAT non fluorescent et dont l'absence de marqueur spécifique empêche leur identification. Il devient alors intéressant de réaliser une estimation du nombre total d'ASCs qui migrent entre le ScAT total et le muscle lésé. Un jour après la lésion, nous avons quantifié par cytométrie en flux la présence d'environ 280.000 FAPs Sca1<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD31<sup>-</sup> et 9% d'entre elles, c'est-à-dire 25.000, étaient des ASCs fluorescentes provenant du ScAT. Notre modèle de greffe nous permet d'introduire un total de 20 mg de ScAT fluorescent dans un ScAT non fluorescent d'environ 200 mg, donc 10% de la masse total du ScAT. Si on considère que la mobilisation des ASCs est homogène dans tout le tissu, cela voudrait dire que pour 1 ASC qui migre depuis le ScAT fluorescent 9 ASCs migrent depuis le ScAT non fluorescent. Ainsi, cela correspondrait à 25.000 x 10 = 250.000 ASCs au total qui migreraient réellement entre le ScAT et le muscle. De manière intéressante, ce nombre correspond sensiblement au nombre d'ASCs qui diminue dans le ScAT total et qui augmente dans le muscle à 1 jpl, il est donc tentant de spéculer que l'intégralité de l'augmentation du nombre de FAPs intramusculaires serait due à l'infiltration des ASCs depuis le ScAT. Il est néanmoins rapporté en thérapie cellulaire utilisant des MSCs que suite à leur injection dans la circulation, peu d'entre-elles sont retenues au niveau du site d'intérêt mais sont retrouvées dans des sites non spécifiques comme les poumons, le foie ou

la rate<sup>541</sup>. Il semblerait alors que la compréhension des signaux qui contrôlent la mobilisation endogène de ces cellules puisse aboutir à améliorer l'utilisation de ces cellules en thérapie en dirigeant leur migration vers le site lésé/pathologique.

### ***Quels sont les signaux qui déclenchent la migration des ASCs entre le ScAT et le muscle ?***

S'interroger sur la nature du(es) signal(aux) entraînant une baisse du nombre d'ASCs au sein du ScAT suivi de leur infiltration dans le muscle est une question clé. Nous pourrions ainsi envisager plusieurs types de signaux émis par le muscle lésé responsables de cette mobilisation.

**Les signaux chimiques.** Nous avons observé une augmentation immédiate et spécifique du nombre de leucocytes CD45<sup>+</sup> sur des temps précoces au sein du muscle quadriceps injecté Gly et CTX que l'on n'observe pas au sein du ScAT. L'augmentation du nombre de ces cellules est synonyme de mise en place d'une réponse inflammatoire. Ce résultat atteste donc de l'efficacité de la lésion musculaire et pourrait être considéré comme un contrôle positif de l'injection spécifiquement dans le muscle. Les leucocytes sont capables de sécréter un grand nombre de cytokines et chimiokines dont l'IL-6, IL1- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , CCL1, CXCL12, participant à la mise en place de l'inflammation. Comme nous l'avons évoqué plus tôt dans ce manuscrit, l'axe CXCR4/CXCL12 possède un rôle important à la fois dans la rétention des MSCs dans leur tissu d'origine mais aussi dans leur chimiotactisme vers un tissu présentant une inflammation. Il est donc envisageable de penser que la baisse du nombre d'ASCs du ScAT serait due à une migration de ces cellules vers le muscle quadriceps, lieu de l'inflammation, sous l'effet de l'augmentation locale du CXCL12.

**Les signaux mécaniques.** D'un autre côté, différentes études mettent en évidence que les changements de rigidité tissulaire jouent des rôles importants dans les capacités migratoires des cellules<sup>542</sup>. En outre, il a été montré *in vitro* que la rigidité du substrat contrôle la migration des cellules fibroblastiques NIH 3T3 qui se déplacent selon un gradient de rigidité croissant, du moins dense vers le plus dense. Ces cellules sont donc capables de détecter les modifications mécaniques de leur environnement et adaptent leurs déplacements en fonction. Au sein de notre modèle de lésion musculaire nous observons, dès la troisième heure, la formation d'un œdème au niveau du muscle qui conduit à l'augmentation du niveau de pression intra-tissulaire. Ceci pourrait donc avoir un impact majeur sur les propriétés biomécaniques du muscle et de l'environnement musculaire dans lequel se trouve le ScAT, par compression du tissu entre le muscle et la peau. Ces modifications pourraient alors contribuer à la migration des ASCs présentes au sein du ScAT, vers un muscle rigidifié par la mise en place rapide de l'œdème.

**Les signaux nerveux.** Enfin, il existe une littérature assez importante sur le rôle du système nerveux autonome dans le contrôle de la mobilisation d'un autre type de cellules progénitrices, les cellules souches hématopoïétiques (CSH), présentes dans la MO<sup>543</sup>. Cette littérature décrit l'activation du système nerveux sympathique selon un rythme circadien responsable de la sortie des CSH de la MO vers la circulation sanguine. Ainsi, les signaux noradrénergiques provenant du système nerveux sympathique, plus actif le jour, entraînent la

sortie des CSH, tandis que la nuit, les CSH retournent au sein de leur niche dans la MO. Nous pourrions ainsi réaliser un parallèle avec la mobilisation des ASCs au sein du ScAT qui, suite à l'activation du système nerveux sensoriel provoquée par la lésion, remonterait l'information au système nerveux central et déclencherait la sortie des ASCs dans la circulation sanguine suivie de leur rétention au sein du muscle lésé sous l'effet attractant des signaux chimiques.

### **Quels sont les voies de migrations possiblement empruntées par les ASCs migrantes ?**

Bien que nos travaux, inspirés de ceux de la littérature, démontrent que **la voie sanguine** et l'association conjointe des ASCs avec les plaquettes constitue une voie importante de migration des ASCs vers le muscle lésé, nous ne pouvons pas exclure que les ASCs puissent aussi emprunter d'autres voies de migration :

**La voie lymphatique.** Dans un autre contexte inflammatoire, provoqué par vaccination par injection d'ovoalbumine dans la pâte arrière chez la souris, les travaux du laboratoire ont montré que les ASCs du ScAT quittent le tissu via la lymphe pour rejoindre le ganglion lymphatique<sup>486</sup>. Il est aussi décrit dans des contextes tumoraux et de formation métastatiques que certaines cellules cancéreuses partagent l'expression de certains marqueurs avec les ASCs comme la podoplanine, le CXCR4 ou le PDGFR $\alpha$  et sont capables d'emprunter le système lymphatique afin de rejoindre d'autres sites tissulaires favorables à leur implantation et favorisant la formation de métastases<sup>544</sup>. Il est donc envisageable que les ASCs puissent utiliser ce réseau vasculaire au niveau du ScAT pour infiltrer le muscle lésé, qui comporte également un réseau vasculaire lymphatique<sup>10</sup>. Il est cependant difficile d'imaginer que, si cet événement se produit, aucun événement ne soit observé dans la circulation sanguine. En effet, la circulation lymphatique se jette dans la circulation sanguine au niveau de la veine sous-clavière<sup>545</sup> reliant alors ces 2 circulations. Nous pouvons d'abord supposer que les ASCs, au même titre que les MSCs, n'empruntent qu'une partie du réseau lymphatique et en sortent avant de rejoindre la circulation sanguine. Nous pouvons aussi émettre l'idée que si les ASCs/MSCs arrivent jusqu'à la circulation sanguine, elles s'associent alors aux plaquettes et neutrophiles comme décrit précédemment.

**Les fibres de collagènes qui composent la MEC.** Que ce soit au niveau du tissu adipeux ou du muscle squelettique, la localisation anatomique des ASCs<sup>93</sup> ou des FAPs<sup>31,32</sup> a été décrite au sein du tissu matriciel qui entoure la fraction parenchymateuse du tissu à l'état physiologique, démontrant l'affinité de ces cellules pour cette matrice. Anatomiquement, chez la souris mais aussi chez l'homme, il existe un tissu matriciel dense en collagène présent à l'interface du ScAT et du muscle quadriceps appelé *fascia lata* (Figure C). De manière générale, les fascias sont décrits comme des membranes conjonctives riches en eau entourant tous les organes permettant (1) le maintien structurel des tissus, (2) le glissement sans frictions entre les différentes couches d'organes et (3) la transmission des forces mécaniques<sup>546,547</sup>. Plusieurs études décrivent le fascia comme « un organe » à part entière, composé de multiples couches matricielles réparties dans tout l'organisme permettant de connecter chaque cellule au niveau de leur cytosquelette<sup>548</sup>. Le *fascia lata* correspond à celui qui entoure le muscle quadriceps (Figure C), pouvant ainsi être assimilé à l'épimysium ou situé sur l'épimysium. Des

études montrent que les MSCs sont capables de migrer *in vitro* sur des fibres de collagène<sup>549</sup>. Plus récemment, des études ont démontré la présence d'un nombre important de cellules de type fibroblastiques au sein du fascia sous cutané<sup>550,551</sup>. En contexte de lésion cutanée, ces mêmes études démontrent l'importance de la migration de ces cellules au sein du fascia permettant son invagination au sein de la plaie indispensable à la cicatrisation. Il ne semble donc pas absurde d'imaginer que les ASCs puissent utiliser ce support de migration *in vivo* pour rejoindre le muscle lésé. Pour valider cette hypothèse, il serait intéressant de savoir si des ASCs fluorescentes sont observées au sein de ce tissu matriciel avec l'utilisation de notre modèle de greffe de ScAT fluorescent.

### ***La mobilisation endogène des ASCs : un nouvel outil thérapeutique ?***

Dans l'ensemble, ce travail décrit un rôle nouveau du ScAT en tant que réservoir de cellules à fort potentiel régénératif mobilisables en situation de lésion musculaire. Cette mobilisation cellulaire prend place très précocement après la lésion, il serait intéressant de déterminer si les mêmes mécanismes ont lieu après la lésion d'un muscle plus éloigné du ScAT comme le *Tibialis anterior* ou le *Gastrocnemius* qui permettrait de mieux généraliser le processus. Nous avons montré qu'un autre TA, le PGAT, est aussi capable de libérer des ASCs lorsque le ScAT n'est plus en mesure d'en fournir. Il semblerait donc que l'ensemble des dépôts adipeux répartis dans l'organisme (Figure 11) soient dotés de cette capacité à fournir des cellules au potentiel de régénération en fonction des besoins. Néanmoins, les ASCs du PGAT n'ont pas la même capacité à soutenir la régénération musculaire que celles du ScAT. Cette observation soulève alors la question de la spécificité de l'origine des ASCs à soutenir un type de lésion particulier. Pourrait-on envisager que les ASCs du PGAT, un tissu adipeux viscéral, soient plus prônes à soutenir des lésions tissulaires intrapéritonéales tandis que les ScAT interviendraient pour les lésions extra-péritonéales ? Notre projet a permis de commencer la démonstration de la présence de sous-populations particulières présentes au sein du ScAT, identifiables par des marqueurs spécifiques, impliquées dans la régénération du muscle. D'un autre côté, une littérature s'accorde aujourd'hui sur l'existence de sous-populations distinctes au sein des tissus adipeux viscéraux<sup>439</sup>. Ces marqueurs permettraient ainsi de cibler des types cellulaires spécifiques en thérapie au niveau de leur tissu source et la compréhension des mécanismes de mobilisation endogène de ces cellules permettrait de contourner les limites actuelles des thérapies cellulaires par des moyens moins invasifs pour le patient.

### ***Est-ce que la nature de l'adipocyte influence ses capacités pro-régénératives ?***

Une fois le muscle lésé infiltré, certaines de ces cellules peuvent participer à la formation d'adipocytes intramusculaires qui, de manière inattendue, pourraient soutenir la régénération musculaire. On pourrait imaginer que la dérégulation de la cinétique transitoire de formation de ces adipocytes post-lésion puisse favoriser les défauts de régénération musculaires ou participer aux mécanismes cellulaires des dégénérescences musculaires. A ce jour, aucune étude ne décrit la nature des lipides accumulés au cours du processus de régénération musculaire. Serait-il possible d'envisager qu'un type de lipide particulier puisse favoriser la régénération musculaire ? Ou au contraire participer à la mise en place de la dégénérescence ? Il semblerait que la nature de l'adipocyte et sa localisation anatomique puisse influencer le

type de lipides qu'il contient. Plusieurs études démontrent chez l'homme et la souris que selon l'origine du dépôt adipeux (viscéral vs. sous-cutané), la nature des lipides contenus dans les adipocytes diffère, avec une accumulation d'acide gras saturés préférentielle dans le TA viscéral<sup>552,553</sup>. L'accumulation de ce type de lipides corrèle avec les désordres métaboliques (hyperinsulinémie, hyperglycémie etc...) et les taux de cytokines pro-inflammatoires circulantes de mauvais pronostic pour les patients. Il serait ainsi intéressant de déterminer la nature des lipides accumulés spécifiquement dans les adipocytes intramusculaires, par des approches de lipidomics spatiales, afin de mettre en avant une signature lipidique « pro-régénérante » et suivre son évolution dans des cas de dégénérescence musculaire adipeuse qui pourrait faire émerger de nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement de ce type de myodégénérescences.

Dans l'ensemble, ce travail de thèse a permis de mettre à jour un moyen de contourner les limites de l'utilisation des MSCs en thérapie liées aux étapes de culture. Le contrôle de la mobilisation endogène de ces cellules pourrait alors devenir un outil thérapeutique puissant en médecine régénérative dans les années à venir. Nous montrons également que la présence contrôlée de lipides contenus au sein d'adipocytes semblent bénéfique pour la régénération du tissu musculaire tandis qu'une forte littérature fait état d'une présence incontrôlée associée à une dégénérescence musculaire. S'il s'avérait exact que l'état pro-régénérant soit distinguable de l'état dégénératif par l'intermédiaire d'une signature lipidique spécifique, nous pourrions envisager des traitements dans l'objectif de faire tendre la signature « dégénérante » vers un état « pro-régénérant ».

## Matériel et Méthodes

### Expérimentation Animale

#### a) Animaux

Ce travail a été soumis à l'approbation du Comité d'Éthique Régional et enregistré auprès du Ministère de la Recherche français. Des souris mâles C57BL/6J de sept à huit semaines (Janvier), des souris CAG :: KikGR appelées KiKGR, des souris C57BL/6J-Tg(Adipoq-cre/ERT2)1Soff/J, appelées Adiponectin-Cre (Jackson Laboratories) et des souris A-ZIP/F-1 (FVB) ont été maintenues dans des conditions de lumière contrôlée (cycles de 12 heures lumière/obscurité ; de 07h00 à 19h00), à une température de 20°C à 22°C, avec une humidité relative de 40% ± 20%, et nourries à volonté avec un régime standard (CD ; 8,4 % de matières grasses, Safe® A04, Safe lab) ou un régime alimentaire riche en graisses (HFD ; 45 % de calories provenant des graisses, Research Diets).

#### b) Lésions musculaires

Pour réaliser la lésion musculaire, les souris sont anesthésiées par voie gazeuse (isoflurane 2,5%) et 80 µL de Glycérol (à 50% vol/vol en solution saline (NaCl 0,9%) ou 80 µL de 10 µM de cardiotoxine (Sigma, C9759) sont injectés dans le quadriceps droit.

#### c) Greffe de ScAT

Deux modèles de souris transgéniques fluorescentes ont été utilisés en tant que donneurs de ScAT : les souris Tg(Cd34-EGFP)MF6Gsat/Mmcd (MMRRC) et les souris CAG::KikGR, respectivement désignées sous les noms de souris CD34-GFP et KikGR. Les souris C57Bl/6J receveuses non fluorescentes ont reçu des greffons de ScAT (10 mg) provenant des modèles susmentionnés dans leur ScAT, tandis que les souris témoins sham ont simplement subi une incision cutanée. Après 7 jours (qu'il s'agisse de souris greffées ou témoins sham), les souris ont reçu ou pas une lésion musculaire.

#### d) Déplétion plaquettaire

Les souris ont été injectées par voie intrapéritonéale avec un anticorps de déplétion plaquettaire (anti-GPIb, EMFRET, #R300) dilué dans 200 µL une solution saline à une concentration de 2 mg/kg. Les animaux témoins ont été injectés avec un mélange d'IgG de rat non immunisées, qui n'ont aucun effet cytotoxique sur les plaquettes chez les souris (EMFRET, #C301, 2 mg/kg). L'efficacité de la déplétion plaquettaire a été vérifiée sur 20 µL de sang total des animaux (du jour 0 au jour 14) à l'aide du Micros 60 (HORIBA Medical).

#### e) Lipectomie bilatérale

Les souris ont été anesthésiées à l'isoflurane, puis une incision cutanée a été pratiquée au-dessus du ganglion lymphatique du ScAT. Le ScAT a été retiré à l'aide de pinces pour rompre les adhérences au tissu conjonctif, et les vaisseaux sanguins situés aux extrémités ont été cautérisés. La plaie a été suturée, et les animaux ont été surveillés quotidiennement pendant 7 jours. Les résultats de la lésion musculaire ont été comparés à ceux des animaux lipectomiés non lésés.

#### f) Injection d'ASCs dans le muscle

Pour les expériences chez les animaux soumis à une déplétion plaquettaire ou à une lipectomie bilatérale, nous avons réalisé des injections de 250 000 à 300 000 ASCs fraîchement isolées



(ScAT ou PGAT) dans un volume de 80  $\mu\text{L}$  à l'aide d'une aiguille G25, et diluées dans une solution saline à 0,9 %. Les injections ont été réalisées sur des animaux anesthésiés 1 heure après la lésion musculaire.

## **Isolement des fractions vasculaire stromale (SVF) des tissus**

### **a. Quadriceps**

La rotule et le ligament rotulien sont d'abord retirés des quadriceps. Les muscles sont émincés aux ciseaux pour faciliter la digestion enzymatique dans une solution HBSS (Hank's Balanced Saline Solution) + 2,5mM  $\text{Ca}^{2+}$  (Sigma, Allemagne) additionnée de 0,5 U/mL de Collagénase B (Sigma, Allemagne) et 2,4 U/ml de Dispase II pendant 2 fois 30 minutes, à 37°C sous agitation, intercalé d'une dissociation mécanique par 10 passages à travers une aiguille G18. La digestion enzymatique est stoppée par ajout de milieu alpha-MEM ( $\alpha\text{MEM}$ ). La suspension cellulaire est ensuite filtrée à l'aide d'une seringue avec filtre de 34  $\mu\text{m}$ . Le filtrat est centrifugé pendant 10 minutes à 300 g. Après centrifugation, le culot de cellules est repris dans 0,25 mL de milieu MACS (Miltenyi Biotec SAS) et les cellules de la SVF comptées à l'aide d'un compteur Z2 Coulter® (Beckman Coulter, Etats-Unis).

### **b. Tissu adipeux sous-cutané (ScAT)**

Le ganglion lymphatique est retiré à l'aide de pinces fines. Les ScAT sont ensuite émincés aux ciseaux pour faciliter la digestion enzymatique dans du milieu de culture  $\alpha\text{MEM}$  (Gibco, Etats-Unis) additionné de Collagénase NB4 0,4 U/ml (Coger) ainsi que de DNase (1%, Roche) à 37°C pendant 60 minutes sous agitation. Après arrêt de la digestion par ajout d' $\alpha\text{MEM}$  et centrifugation (300 g, 10 min) le surnageant (comprenant les adipocytes matures) est éliminé et le culot cellulaire est resuspendu dans du tampon de lyse (ELB ; 155mmol/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ; 5,7 mmol/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ; 0,1 mmol/L EDTA, pH 7,3). La suspension cellulaire est alors filtrée à l'aide d'une seringue avec un filtre de 34  $\mu\text{m}$  puis re-centrifugée. Le culot cellulaire est enfin repris dans du tampon MACS (Miltenyi Biotec SAS) et compté, comme précédemment décrit.

## **Isolement des ASCs, des FAPs ou des cellules satellites (CS)**

Les SVF dérivées du ScAT, du PGAT ou du muscle ont été déplétées des cellules  $\text{CD}45^+$  et  $\text{CD}31^+$  en utilisant des anticorps anti- $\text{CD}45\text{-FITC}$  (Miltenyi, 130-116-535) et anti- $\text{CD}31\text{-FITC}$  (Miltenyi, 130-123-675), suivis d'un ajout de microbilles magnétiques anti-FITC (Miltenyi, 130-048-701) permettant leur séparation à l'aide de l'autoMACS® Pro (Séparation cellulaire MACS, Miltenyi Biotec SAS). Les cellules  $\text{CD}45^-/\text{CD}31^-$  ont ensuite été incubées avec un anticorps pour Sca-1 couplé avec des microbilles magnétiques (Miltenyi, 130-106-641) et triées de la même manière que précédemment. Les ASCs ou les FAPs isolées ont été utilisées pour les expériences de séquençage ARN, pour l'injection musculaire chez les animaux soumis à une déplétion plaquettaire ou à une lipectomie (voir méthodes), ou pour les expériences d'interaction *in vitro* entre avec les cellules satellites (voir méthodes). Ensuite, pour le tri des CS, la fraction cellulaire  $\text{Sca-1}^-$  a été incubée avec un anticorps anti  $\alpha 7$ -integrine couplé avec des microbilles magnétiques (Miltenyi, 130-104-261) et triées de la même manière que précédemment. La fraction  $\alpha 7$ -integrine<sup>+</sup> composée de CS a ensuite été utilisée pour les expériences *in vitro*.

## Analyse de cytométrie en flux

Pour analyser la composition cellulaire des VF fraîchement prélevées dans les TA ou musculaires 300.000 cellules de la SVF sont reprises dans du tampon autoMACS Running buffer (Miltenyi, Biotec SAS) et incubées 20 minutes à 4°C avec un anticorps anti-CD16/CD32 dilué au 1/100ème, pour bloquer les récepteurs Fcγ. Les cellules sont ensuite incubées 25 minutes à 4°C avec un mix d'anticorps Phycoérythrine (PE) CD31 (BD Biosciences #553373), CD45 (BD Biosciences #553081), Allophycocyanine (APC)-Podoplanine (Biolegend #127410) ou CD140α (Biolegend #135908), Fluorescéine Isothiocyanate (FITC)-CD31 (BD Biosciences #553372), CD45 (BD Biosciences #553080), CD34 (BD Biosciences #553733) ou Sca-1 (BD Biosciences #553335), V500- Sca-1 (BD Biosciences #561228) ou leurs isotypes contrôles (Rat Isotype PE IgG2a, BD Biosciences #553930 ; Isotype APC, Biolegend, #402012 ; Rat Isotype APC IgG2a, BD Biosciences, #553932 ; Rat Isotype FITC IgG2a, BD Biosciences, #554688 ; Rat Isotype BV500 IgG2a, BD Biosciences, #560786) tous dilués au 1/100ème. Après ajout de 400 µL de PBS pour arrêter la réaction, les cellules sont centrifugées (10 min ; 300g). Les culots cellulaires sont ensuite remis en suspension dans du tampon autoMACS Running buffer (Miltenyi, Biotec SAS) pour l'analyse par cytométrie en flux (BD LSR Fortessa, BD Biosciences, Etats-Unis). L'acquisition et analyse des données sont réalisées grâce au logiciel BD FACSDiva (BD Biosciences).

Pour la caractérisation phénotypique des ASCs et des FAPs associée à une représentation tSNE, les SVF ont été incubées avec des anticorps humains anti-souris REA (PerCP-Vio700-CD45, PE-CD31, FITC-CD34, PE-Vio770-Sca-1, APC-Vio770-CD140α de chez Miltenyi), anti-souris classique VioBlue-CD90.2 (Miltenyi), Viobility™ 405/520 Fixable Dye (Miltenyi) et anti-souris APC-Podoplanine (Biolegend), ainsi que les témoins isotypiques appropriés (Isotype PerCP-Vio700, Miltenyi ; Isotype PE, Miltenyi ; Isotype FITC, Miltenyi ; Isotype PE-Vio770, Miltenyi ; Isotype APC-Vio770, Miltenyi ; Rat Isotype VioBlue IgG2b, Miltenyi), le tout dilué à 1:100. Les cellules ont été quantifiées à l'aide d'un cytomètre en flux LSR Fortessa et analysées à l'aide du logiciel Flowjo™ v10.6, en utilisant l'outil tSNE.

## Immunohistochimie

### a. Immunohistochimie des ASCs et des FAPs *in situ*

Les muscles et le ScAT sont fixés dans du paraformaldéhyde (PFA) à 4 % pendant 24 heures et inclus dans de l'agarose à 2% (ScAT) ou 3% (Muscle) puis découpés en sections de 300 µm d'épaisseur à l'aide d'un Vibroslicer® 5100 mz (Campden instruments). Les échantillons ont été perméabilisés avec du Triton X100 (0,2 % dans PBS) avant une saturation des antigènes non spécifiques avec de la BSA à 3 % dans du PBS. Les sections de tissu ont été incubées avec des anticorps primaires de différentes espèces : chèvre anti-souris CD140α (R&D AF1063, 1:100), lapin anti-souris CD45 (orb 10328 ou sc-53665, 1:100), rat anti-souris CD31 (BD 550274, 1:100), rat anti-souris Sca-1 (BD 557403, 1:250), hamster anti-souris podoplanine (Abcam 11936, 1:250) et l'anti-GFP (Abcam ab1218 1:200) pendant 24 heures à 4°C sous agitation constante. Après plusieurs lavages avec PBS, les sections ont été incubées avec des anticorps secondaires (âne anti-chèvre 488nm ou 647nm, âne anti-lapin 594nm, chèvre anti-

lapin 647nm, âne anti-rat 594nm, poulet anti-rat 647nm, chèvre anti-hamster 488nm ou 568nm, tous provenant d'Invitrogen par Thermofisher Scientific, références respectives A11058, A21447, A21207, A21245, A21209, A21472, A21110, A21112, utilisés à une dilution de 1:250) pendant 8 heures à température ambiante. Après plusieurs lavages, les noyaux ont été colorés avec du DAPI (1:10000, Invitrogen), et les images ont été obtenues à l'aide d'un microscope confocal ZEISS LSM780 (Zen Blue v2.3-2) et analysées avec les logiciels Zen Blue v2.3-2, Fiji v2.1.0-1 et IMARIS® v8 et 9.9.1 (Bitplane).

#### **b. Évaluation de la régénération *in situ***

Après dissection, les muscles de souris ont été cryopréservés dans de l'OCT refroidi dans de l'isopentane grâce à l'azote liquide. Les échantillons ont ensuite été sectionnés à 10 µm sur un cryostat et fixés à 4 % de PFA pendant 10 minutes à température ambiante. Après l'étape de récupération de l'antigène, les lames ont été incubées dans du PBS contenant du Triton à 0,5 % (10 minutes, température ambiante), puis perméabilisées davantage (TBS, glycine à 100 mM, 0,1 % de Triton X100, 10 minutes, température ambiante). Elles ont été bloquées avec de la BSA à 2 % (1 heure, température ambiante), rincées avec du TBS, et colorées avec du WGA 488nm (Thermofisher, W11261, 1:500) (4°C, en chambre humide) pendant la nuit. Après un lavage au TBS, les sections ont été incubées pendant 10 minutes dans une solution de DAPI (1:10000, Invitrogen), puis lavées une fois avec du TBST et du TBS avant d'être montées avec un milieu de montage fluorescent. Les images ont été obtenues à l'aide d'un microscope confocal ZEISS LSM780 et analysées avec les logiciels Fiji v2.1.0-1 et IMARIS® v8 et v9.9.1 (Bitplane). La taille et la distribution des myofibrilles avec des noyaux centronucléés ont été calculées à partir de la coloration WGA–DAPI sur l'ensemble des fibres de la section, et la détermination de la surface a été réalisée sur l'ensemble des sections à l'aide d'un algorithme de traitement d'image automatisé (Fiji v2.1.0-1).

#### **c. Quantification de l'IMCT (Intramuscular Connective Tissue) *in situ***

Les muscles de souris ont été soigneusement disséqués à 14 jours post-lésion et fixés pendant 24 heures en PFA (4 %). Les muscles ont ensuite été inclus dans de l'agarose à 3 % pendant 1 heure et tranchés longitudinalement à l'aide d'un Vibroslicer® 5100 mHz (Campden instruments) (300 µm d'épaisseur). L'imagerie par génération de second harmonique (SHG) des fibres de collagène a été réalisée sur des sections musculaires avec un microscope à balayage laser (LSM880 ; Carl Zeiss GmbH, Jena, Allemagne) associé à un laser au saphir de titane pulsé (Coherent, visionII). Les images en piles xyz ont été acquises avec un objectif ×2.5 (N.A0.12, Carl Zeiss, GmbH) en mode de mosaïque pour couvrir l'ensemble de la section musculaire. Le signal SHG des fibres de collagène, ainsi que les signaux d'autofluorescence, ont été détectés à une longueur d'onde d'excitation de 830 nm et détectés respectivement dans une plage de 408-420 et 446-695 nm. L'IMCT a été évalué en déterminant la superficie relative des pixels présentant un signal SHG significatif par rapport à l'ensemble de la section musculaire à l'aide d'un processus de semi-segmentation en utilisant la distribution Fiji (<http://pacific.mpi-cbg.de/wiki/index.php/Fiji> ; ImageJ-win64, Fiji v 2.1.0-1). De 5 à 9 sections musculaires ont été analysées par animal afin de d'évaluer l'IMCT dans l'ensemble du muscle quadriceps.

#### **d. Quantification des adipocytes intramusculaires *in situ***

La caractérisation quantitative du dépôt total d'adipocytes intramusculaires après une lésion musculaire induite par injection de glycérol a été entièrement développée. Les souris lésées et les souris témoins ont été euthanasiées à 5, 7, 9, 11, 14, 21 ou 28 jours après la lésion. Après fixation pendant 24 heures PFA 4%, les muscles quadriceps ont été inclus dans de l'agarose 3% et coupés longitudinalement avec un vibroslicer 5100mz (Campden instruments). Pour révéler les adipocytes intramusculaires, les sections longitudinales de 300 µm d'épaisseur ont été colorées avec du BODIPY 493/503 nm (Invitrogen, 1:500 dans du PBS), un marqueur de lipides neutres, et avec du DAPI (1:10000, Invitrogen) pour visualiser les noyaux. À l'aide du microscope confocal LSM880, des acquisitions en mosaïque à un grossissement de 10X ont été réalisées afin d'observer les adipocytes dont les GL ont été révélées par la coloration BODIPY dans l'ensemble des sections musculaires. Nous avons sélectionné 3 sections de chaque muscle blessé à différentes profondeurs comme représentatives de l'ensemble du muscle. Ensuite, en utilisant le logiciel d'analyse d'images Fiji, la surface occupée par les adipocytes (Bodipy+) a été rapportée à celle de la section musculaire totale. Nous avons exclu de la quantification les adipocytes situés à l'extérieur de la section musculaire. Afin de quantifier ces observations sur l'ensemble du muscle, nous avons aussi utilisé un protocole de transparisation des muscles avec 1 % de SDS dilué dans du PBS pendant 24 heures. Nous avons ensuite marqué les lipides neutres avec de l'huile rouge (Oil Red O) et quantifié le marquage extrait par densité optique. Des sections musculaires longitudinales issues d'animaux greffés avec du ScAT CAG::KikGR ont été colorées au LipidTox (Invitrogen, Thermofisher) et imagées avec le LSM880. Une attention particulière a été portée à l'expression fluorescente KikGR (longueur d'onde verte, 488 nm). Les événements doublement KikGR<sup>+</sup>/LipidTox<sup>+</sup> (ASCs différenciées issues de la greffe de ScAT) ont été observés.

#### **e. Evaluation de la myogénèse *in vitro***

Après 9 à 10 jours de culture, les cellules ont été fixées en PFA à 4 % (Sigma-Aldrich) pendant 10 minutes. Les membranes cellulaires ont été perméabilisées avec du Triton X-100 (15 minutes, 0,1 %, température ambiante - RT) (Sigma-Aldrich), et les antigènes non spécifiques ont été bloqués pendant 30 minutes en incubant avec du sérum de cheval (NHS 10 % dans PBS). Les dilutions appropriées des anticorps primaires ont été préparées dans une solution de blocage (anti-desmine 1:100 (Sigma-Aldrich) et incubées pendant la nuit à 4°C. Après 3 lavages avec du PBS les cellules ont été incubées avec un anticorps secondaire anti-rabbit IgG 488 nm dilué à 1:200 (Invitrogen, Thermofisher scientific). Une solution DAPI (1:10000, Invitrogen) a été utilisée pour visualiser les noyaux. Les images ont été obtenues à l'aide d'un vidéomicroscope WF ZEISS et analysée avec un logiciel semi-automatisée développée par Noë et al. (2022) <https://github.com/SimonNoe/myotube-analyzer-app>

## **Culture cellulaire**

#### **a. Culture des ASCs/FAPs et différenciation adipocytaire**

Après digestion des tissus, les ASCs ou les FAPs ont été triés depuis les SVF de la manière décrite précédemment et les cellules ont étéensemencés dans des plaques de 12 puits à une

densité de 80 000 cellules/cm<sup>2</sup> dans de l' $\alpha$ MEM + ASP supplémenté de 10 % de sérum de veau nouveau-né (NCS) jusqu'à atteindre la confluence. Les cellules ont été soumises à une différenciation adipogénique en utilisant un mélange contenant du  $\alpha$ MEM, 2% NCS, Dexaméthazone 33 nM, Insuline 5 mg/mL, Rosiglitazone 1  $\mu$ M, T3 10  $\mu$ M et Transferrin 10  $\mu$ g/mL) pendant 4 jours à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>.

#### **b. Collecte des milieux conditionnés**

Après différenciation des ASCs et des FAPs en adipocytes, les milieux de cultures ont été remplacés par du milieu neutre DMEM Glutamax 1g/L glucose (50%) + HAMF10 (50%) pendant 24 heures. Ensuite, les milieux ont été récupérés et centrifugés à 5000 rpm pendant 10 minutes. Les surnageants ont été stockés à -80°C.

#### **c. Culture des cellules satellites**

Après digestion des muscles, les CS ont été triées depuis la SVF puisensemencées en plaque 24 puits coatées en collagène à une densité de 20 000 cellules/cm<sup>2</sup> dans du DMEM Glutamax 1g/L glucose (40%) + HAMF10 (40%) + SVF (20%) + bFGF (2.5ng/mL) pendant 7 jours en changeant le milieu tous les 2 jours. Ensuite, les cellules sont passées en plaques coatées matrigel puis placées en milieu de différenciation DMEM Glutamax 1g/L glucose (49%) + HAMF10 (49%) + SVF (2%) neutre ou collectés depuis les milieux de cultures conditionnés par les adipocytes décrit plus haut.

## **Analyses de l'expression génique**

#### **a. RT-qPCR**

L'extraction a été réalisée sur des cellules ou des tissus entiers congelés en utilisant le kit d'extraction d'ARN Mini (QiaGEN) selon les instructions du fabricant. En bref, les échantillons ont été décongelés dans du RLT et lysés avec un tissue lyser<sup>®</sup> (QIAGEN). Les échantillons ont été passés à travers des colonnes avec des étapes de lavage pour purifier les ARNs. L'éluat a été effectué avec de l'eau sans RNase, et la concentration des ARNs a été évaluée avec un Nanodrop<sup>®</sup> 2000c (Thermo Scientific). L'ADN génomique a été obtenu avec le kit QiaAmp DNA Minikit (QiaGEN) en suivant les instructions du fabricant. Les cellules ont été lysées et passées à travers une colonne pour lier l'ADN, et après deux étapes de lavage, le matériel génomique a été élué dans un tampon d'éluion. La concentration de l'ADN génomique a été mesurée à l'aide d'un Nanodrop<sup>®</sup> 2000c puis a été stocké à -20°C. Pour la qPCR, les ARNs ont été rétro-transcrits en utilisant une reverse transcriptase (Invitrogen) et dilués à 50 ng/ $\mu$ L dans de l'eau sans RNase. Ensuite, la qPCR a été réalisée en utilisant le mélange Fast SYBR<sup>®</sup> Green (Applied Biosystems) sur une plaque de 96/384 puits, les résultats ont été acquis avec les appareils StepOne v2.3-3 et Viia7 (Life Technologies), et les données ont été analysées avec Real-Time qPCR Studio (Life Technologies) en utilisant la méthode  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  par rapport à la condition de contrôle.

## **b. RNAseq**

L'extraction totale d'ARN a été réalisée en utilisant le kit Zymo microprep (Ozyme) selon les instructions du fabricant. Le séquençage d'ARN (pair-end, 125 pb) a été réalisé par BGI Genomic Services en utilisant des triplicats pour chaque condition. Les données brutes ont été traitées comme suit : tout d'abord, les lectures de séquençage ont été filtrées à l'aide de fastq\_illumina\_filter v 0.1, et un contrôle de qualité des lectures filtrées a été effectué à l'aide de FastQC v 0.11.9. Les lectures filtrées ont ensuite été alignées sur le génome de la souris mm10 en utilisant HISAT2 v 2.2.1 et les comptages par gène ont été quantifiés à l'aide de featureCounts du package Subread v 2.0.1 sur l'annotation des transcrits mm10 obtenue à partir du UCSC genome browser. Les analyses de l'expression différentielle et statistique ont été réalisées à l'aide de DESeq2 v 1.34.0. Pour comparer les expressions géniques, nous avons utilisé les seuils suivants :  $\text{LOG}_2\text{FC} > 0,58$  et valeur  $p < 0,05$ . Pour générer le heatmap, nous avons sélectionné les 3000 gènes les plus variables en utilisant idep version 0.96. Les données de RNAseq ont été déposées sous le numéro d'accès GSE214883.

## **c. Analyse de RNAseq en cellule unique**

Après digestion des tissus et tri des ASCs et des FAPs, les cellules ont été préparées pour le scRNAseq immédiatement après le tri cellulaire. La séparation et le barcoding par cellule unique a été réalisée à l'aide du Chromium Controller (Chromium Single Cell 3', Reagent Kit V3, 10X Genomics). L'isolation par cellule unique est réalisée grâce à un système de microfluidique permettant l'association d'une cellule avec une bille au barcode unique dans une gouttelette (GEM) qui permet par la suite d'associer chaque ARN à une cellule. L'amplification des ARN, la préparation des bibliothèques en suivant le protocole de 10x Genomics et le séquençage par le NextSeq 550 (Illumina) ont été réalisés sur la plateforme "Genome and Transcriptome" (GeT) (Genotoul, Toulouse). Le nombre maximum de reads par run du NextSeq 550 étant de 400 millions, nous avons déterminé la profondeur de séquençage désirée, soit 25 000 reads/cellule pour 16 000 cellules et donc 4 000 cellules par condition. Le taux de capture du Chromium Controller étant d'environ 50% pour les ASCs, nous avons utilisé un nombre de 10 000 cellules dans chaque condition. Pour chaque point (ASC\_Ctl, ASC\_Inj, FAP\_Ctl et FAP\_Inj) une bibliothèque a été réalisée, ces bibliothèques ont été poolées sur une flowcell pour le séquençage. Les reads obtenus par le séquençage de la bibliothèque ont été traités à l'aide de Cell Ranger en utilisant le transcriptome de souris de référence : mm10. Les reads ont été alignés, le transcriptome a été annoté et on a récupéré le nombre d'identificateurs moléculaires uniques (UMI) c'est-à-dire le nombre de molécules uniques d'ARN. Par la suite, un contrôle de la qualité du séquençage a été réalisé et a été fourni sous forme de page web afin d'accéder à un ensemble de paramètres témoignant de cette qualité (Q30, nombre de cellules, nombre de reads, nombre de reads moyen par cellule, saturation de séquençage, ...) mais également d'avoir un aperçu des résultats clusterisés en projection t-SNE et de leur différentiel d'expression. A partir de la matrice d'expression, l'analyse a été réalisée sur R version 4.2.0 (2022-04-22). Le contrôle qualité (QC), le tri, la normalisation, le clustering et la visualisation, ainsi que l'analyse de différentiel d'expression ont été effectués en utilisant le package Seurat version 4.1.1 sur R avec quelques modifications du pipeline standard. Les



datasets (ASC\_Ctl avec ASC\_Inj, FAP\_Ctl et FAP\_Inj) ont été analysés séparément dans un premier temps afin de réaliser un tri adapté à chacun, excepté pour les ASCs qui avaient des paramètres semblables, avant d'être combinés ensemble selon l'analyse souhaitée. En effet, il s'agit de deux sous- types cellulaires dans des conditions différentes. Pour chaque dataset une première analyse sans tri a été réalisée pour pouvoir étudier la répartition du nombre de gènes, d'UMI et du pourcentage d'UMI mitochondriaux dans les clusters afin d'identifier la présence de clusters indésirables de par le mauvais séquençage ou la mauvaise qualité de leurs cellules. Pour chaque condition, des paramètres de tri adaptés ont été appliqués pour sélectionner les cellules à étudier :

- ASC\_Ctl et ASC\_Inj : > 4000 UMIs, > 2000 gènes et < 5% d'UMI alignés sur des gènes mitochondriaux.
- FAP\_Ctl : > 4050 UMIs, > 1500 gènes et < 10% d'UMI alignés sur des gènes mitochondriaux.
- FAP\_Inj : > 4500 UMIs, > 1800 gènes et < 7% d'UMI alignés sur des gènes mitochondriaux.

Les cellules ne respectant pas ces paramètres ont été retirées de la matrice d'expression, tout comme les gènes exprimés dans moins de 3 cellules. Les cellules positives à la KikGR ont été identifiées et marquées par l'ajout de metadata avant de retirer ce gène pour s'assurer qu'il ne biaise pas l'analyse. Les counts ont été normalisés en utilisant SCTransform (Hafemeister and Satija, 2019) et ont été régressés sur le pourcentage d'UMI mitochondriaux pour obtenir les 3000 gènes les plus variables. L'Analyse en Composantes Principales (ACP) sur la matrice d'expression, puis le clustering, et la visualisation ont été faites sur les 40 premières composantes principales (PCs). La normalisation par SCTransform permet d'utiliser un plus grand nombre de PCs comparée à la log-normalisation standard, les plus hautes permettant de révéler des sources d'hétérogénéité biologiquement pertinentes. Le clustering non-supervisé par shared nearest neighbor (SNN) a été réalisé à une résolution de 0.4 et la visualisation a été faite par uniform manifold approximation and projection (UMAP). Le choix de la résolution a été réalisée après avoir fait un clustering sur une gamme de résolution (0-0.7) afin de réaliser un arbre de clustering (clustree) montrant la relation entre les clusters à différentes résolutions. L'analyse d'expression différentielle a été réalisée en utilisant la fonction FindAllMarkers() de Seurat basée sur un test non-paramétrique de la somme de rangs de Wilcoxon avec une p-value ajustée en utilisant une correction de Bonferroni et en considérant uniquement les gènes avec >  $\log_2(0.25)$  fold-change et exprimés dans au moins 10% des cellules du cluster. Une première visualisation du top10 des gènes up-régulés dans chaque cluster a été réalisée par une heatmap et des volcano plots ont permis une visualisation plus précise des gènes up et down régulés par clusters ou par conditions. Les clusters ont été évalués sur la base de la distinction de leurs marqueurs pour confirmer la résolution choisie. L'identification de marqueurs a été réalisée entre conditions (Inj et Ctl) d'une même population et entre clusters d'une même population. Les différents clusters ont été annotés en se basant sur un marqueur permettant de les distinguer des autres clusters. Pour cela, le meilleur marqueur a été sélectionné sur la base :  $\log_2FC > 2$  ( $\log_2(0.58)$  FC), pct.2



$< 0.1$ ,  $\text{pct.1-pct.2} > 40$  et  $\text{p-val}_{\text{adj}} > 0,05$ . La visualisation des marqueurs s'est faite à l'aide des fonctions `VlnPlot()`, `FeaturePlot()` et `DotPlot()`. L'analyse des processus biologiques up-régulés à partir des gènes différentiellement exprimés par clusters ou conditions a été réalisée en utilisant EnrichR version 3.0. Les marqueurs avec un  $\log_2\text{FC} > 2$  ont été sélectionnés pour générer la liste des gènes analysés pour enrichissement à partir des processus biologiques de Gene Ontology (GO). Un barplot des processus up-régulés a été généré avec en paramètres le nombre de gènes contribuant aux différents processus et la p-value, cela pour chaque clusters et conditions d'une même population.

Les données d'Oprescu et al.<sup>50</sup> et de Malecova et al.<sup>49</sup> ont été re-analysées à l'aide du package Seurat v 4.1.1.

### **Analyse statistique**

Les données sont exprimées sous forme de moyenne  $\pm$  écart type. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test t de Student (bilatéral apparié ou non apparié) ou de l'ANOVA à un facteur non paramétrique suivi du test post hoc de Dunnett et de Tukey avec le logiciel GraphPad Prism v9 (GraphPad Software). Les valeurs de p inférieures à \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  et \*\*\* $p < 0,001$  sont considérées comme statistiquement significatives.

# Annexes

## Annexe n°1

### Adipose tissue is a source of regenerative cells that augment the repair of skeletal muscle after injury.

Sastourné-Arrey Q\*, Mathieu M\*, Contreras X, Monferran S, Bourlier V, Gil-Ortega M, Murphy E, Laurens C, Varin A, Guissard C, Barreau C, André M, Juin N, Marquès M, Chaput B, Moro C, O'Gorman D, Casteilla L, Girousse A, Sengenès C. \*contribution équivalente

Nat Commun. 2023 Jan 5;14(1):80. doi: 10.1038



# Adipose tissue is a source of regenerative cells that augment the repair of skeletal muscle after injury

Received: 27 July 2021

Accepted: 8 December 2022

Published online: 05 January 2023

Check for updates

Quentin Sastourné-Arrey<sup>1,7</sup>, Maxime Mathieu<sup>1,7</sup>, Xavier Contreras<sup>1</sup>, Sylvie Monferran<sup>1</sup>, Virginie Bourlier<sup>2</sup>, Marta Gil-Ortega<sup>1</sup>, Enda Murphy<sup>3</sup>, Claire Laurens<sup>2</sup>, Audrey Varin<sup>4</sup>, Christophe Guissard<sup>5</sup>, Corinne Barreau<sup>1</sup>, Mireille André<sup>1</sup>, Noémie Juin<sup>1</sup>, Marie Marquès<sup>2</sup>, Benoit Chaput<sup>6</sup>, Cédric Moro<sup>2</sup>, Donal O’Gorman<sup>3</sup>, Louis Casteilla<sup>5</sup>, Amandine Gironse<sup>1,7</sup> & Coralie Sengenès<sup>1,7</sup> ✉

Fibro-adipogenic progenitors (FAPs) play a crucial role in skeletal muscle regeneration, as they generate a favorable niche that allows satellite cells to perform efficient muscle regeneration. After muscle injury, FAP content increases rapidly within the injured muscle, the origin of which has been attributed to their proliferation within the muscle itself. However, recent single-cell RNAseq approaches have revealed phenotype and functional heterogeneity in FAPs, raising the question of how this differentiation of regenerative subtypes occurs. Here we report that FAP-like cells residing in subcutaneous adipose tissue (ScAT), the adipose stromal cells (ASCs), are rapidly released from ScAT in response to muscle injury. Additionally, we find that released ASCs infiltrate the damaged muscle, via a platelet-dependent mechanism and thus contribute to the FAP heterogeneity. Moreover, we show that either blocking ASCs infiltration or removing ASCs tissue source impair muscle regeneration. Collectively, our data reveal that ScAT is an unsuspected physiological reservoir of regenerative cells that support skeletal muscle regeneration, underlining a beneficial relationship between muscle and fat.

Skeletal muscle exhibits a remarkable regenerative capacity in adult mammals and a large effort is underway to better characterize and understand the underlying mechanisms controlling this process. The regenerative potential of skeletal muscle relies on a pool of resident adult stem cells, the satellite cells which proliferate and differentiate to allow muscle growth and remodeling in response to exercise or following trauma<sup>1–3</sup>. In the past decade,

studies have identified mesenchymal progenitors, termed “fibroadipogenic progenitors” (FAPs), providing key functional support to satellite cells<sup>4–7</sup>. Besides their supportive role, the regulation of FAP content is also crucial since their absence leads to regeneration impairment, whereas FAP maintenance in the late phase of regeneration leads to fibrosis and/or fatty degeneration of the injured muscle<sup>8–10</sup>.

<sup>1</sup>RESTORE, Research Center, Team 1 STROMAGICS, Université de Toulouse, INSERM, CNRS, EFS, ENVT, Université P. Sabatier, Toulouse, France. <sup>2</sup>Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, INSERM/Paul Sabatier University UMR 1297, Team MetaDiab, Toulouse, France. <sup>3</sup>School of Health and Human Performance, Dublin City University, Dublin, Ireland. <sup>4</sup>RESTORE, Research Center, Team 2 FLAMES, Université de Toulouse, INSERM, CNRS, EFS, ENVT, Université P. Sabatier, Toulouse, France. <sup>5</sup>RESTORE, Research Center, Team 4 GOT-IT, Université de Toulouse, INSERM, CNRS, EFS, ENVT, Université P. Sabatier, Toulouse, France. <sup>6</sup>Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Toulouse University Hospital, 31100 Toulouse, France. <sup>7</sup>These authors contributed equally: Quentin Sastourné-Arrey, Maxime Mathieu, Amandine Gironse, Coralie Sengenès. ✉e-mail: [coralie.sengenès@inserm.fr](mailto:coralie.sengenès@inserm.fr)



However, the early evolution of FAP number upon injury is less well characterized. Intriguingly, this process exhibits distinct waves, a first one occurring 1-day post-injury (dpi), when FAP proliferation has not started yet, followed by a second one at 3 dpi, due to FAP proliferation<sup>4,9,11–14</sup>. Without being supported by FAP proliferation, the first wave of FAP content increase is not well understood and raises the question that different FAP subpopulations coming from different sources. In support of this hypothesis, single-cell analysis technology has revealed the heterogeneity of FAPs cell populations<sup>11,15–17</sup> and also indirectly described the first wave of FAP. Indeed, Oprescu et al. elegantly reported the presence of a subpopulation of “activated” FAPs in the very early phases following muscle injury (0.5 dpi)<sup>17</sup>. These activated FAPs are transcriptionally distinct from the non-injured FAP populations and were considered by the authors to be muscle resident, although direct demonstration was not demonstrated.

White adipose tissue (AT) houses a mesenchymal cell population, which resembles FAPs, the adipose stromal cells (ASCs). Various studies, including ours, show that ASCs exhibit similar cell surface antigen combination, same clonogenic activity, and differentiation potentials<sup>18–20</sup>. ASCs attract a lot of interest due to their high regenerative potential and represent very promising tools for cell-based therapies<sup>21,22</sup>. Whether FAPs and ASCs are distinct cell types remains unclear<sup>23–25</sup>. We previously demonstrated that subcutaneous AT (ScAT) releases ASCs in response to inflammatory stimuli<sup>18,26</sup> or to high-fat diet<sup>27</sup>. Moreover, we and others showed that intramuscular adipocytes partly arise from these circulating ASCs, particularly upon weight gain<sup>27–29</sup>. Consequently, we questioned here whether the first wave of FAP number increase in response to acute muscle injury is the result of ASCs release from ScAT followed by their further infiltration into the damaged muscle to support its regeneration.

In the present study, we report that ScAT releases ASCs in response to acute muscle damage and that released ASCs infiltrate the injured muscle via a platelet-dependent mechanism. We also show that blunting the infiltration of ASCs impairs muscle regeneration suggesting that ScAT is an unexpected partner of muscle regeneration.

## Results

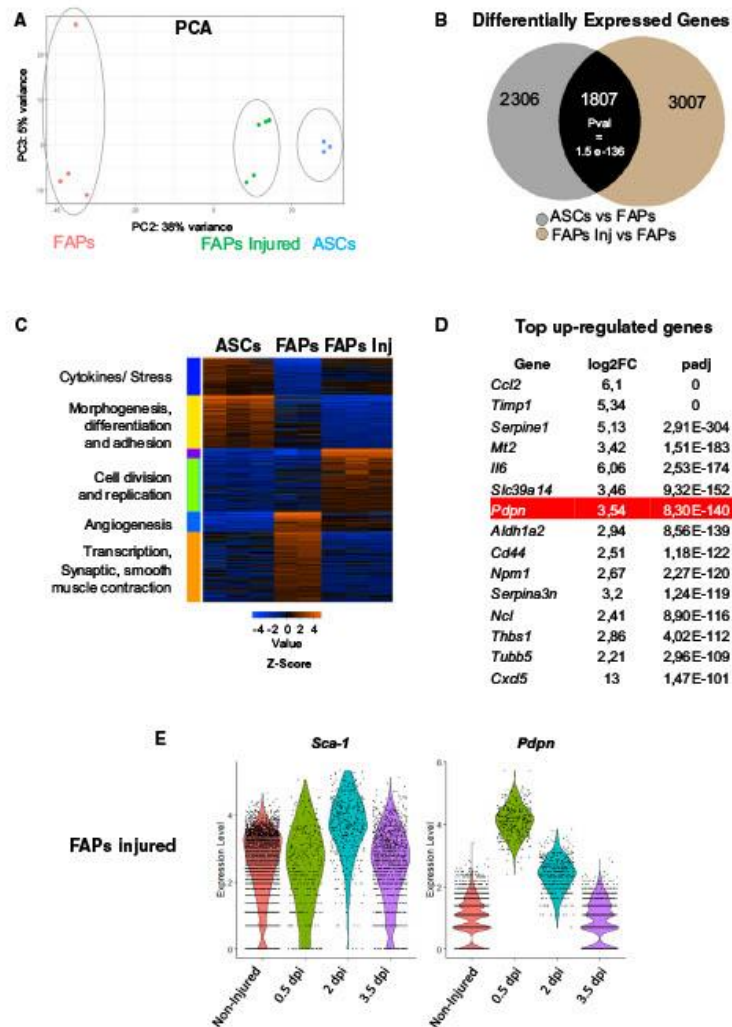
**FAPs transcriptomic profile resembles ASCs after muscle injury**  
We first compared the transcriptomic profiles of ScAT-derived ASCs to the one of non-injured or injured FAPs (1 day post-injury, dpi) using RNAseq analysis. To strengthen our data, we included data from Malcova et al.<sup>15</sup> for FAPs and injured FAPs on day 1. Principal-component analysis (PCA) showed that replicates for each condition were gathered in distinct groups (Figure S1A). Injured FAPs (1 dpi) were further separated from ASCs along PC1 (54% of variance). Interestingly, however, they were much closer to ASCs rather than with non-injured FAPs along the PC2 component that accounts for 38% variance (Fig. 1A). Moreover, analysis of differentially expressed genes, compared to uninjured FAPs, showed convergence towards largely overlapping transcriptional landscapes between injured FAPs and ASCs at 1 dpi ( $P_{\text{val}} = 1.56 \times 10^{-136}$ , Figs. 1B, 1C). This similarity in the composition of transcriptomes could be due to the convergence of the function of activated FAPs and ASCs. It also raises the possibility that ASCs from adjacent ScAT could infiltrate muscle. To potentially identify a selective marker of this FAP population, we analyzed top-up-regulated genes at 1 dpi and found that Podoplanin, recently shown to impart a pro-migratory phenotype in bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (MSCs)<sup>30</sup>, was the seventh-most up-regulated gene (Fig. 1D). Then we used a published scRNA seq dataset to monitor the dynamics of Podoplanin expression in the FAP cell populations during muscle regeneration, particularly in the early stages following injury. We used the dataset from the Oprescu et al.<sup>17</sup> study, which explored the transcriptional dynamics of various cellular subpopulations during the skeletal muscle regeneration process and particularly in the very early phases following injury. FAPs, defined as Sca-1 (Ly6a)-positive cells,

were marked by the expression of Podoplanin at an early regeneration stage (0.5 dpi) before a transition back to basal levels at 3.5 dpi (Fig. 1E). Importantly, it has been recently reported in bone marrow MSCs that Podoplanin expression confers a pro-migratory phenotype facilitating their intravasation across the vessel wall and interaction with circulating platelets<sup>30</sup>. Consequently, these data show that a subpopulation of FAPs following muscle injury resembles ASCs, thus suggesting that they may originate from AT.

## Muscle injury causes a FAP rise mirrored by a ScAT ASC decrease

To investigate whether migrating ASCs may account for the pool of FAPs in the early steps following muscle injury, we first analyzed the number of FAPs in the quadriceps muscle 24 h following damage using glycerol (Gly) and myotoxin (cardiotoxin, CTX). Both Gly- and CTX-induced damages are well-characterized murine models of muscle injury at the functional, histological and inflammatory levels (Figures S1B, C)<sup>31,32</sup>. The cell composition of the whole muscle-derived stroma-vascular fraction (SVF) was analyzed by flow cytometry and FAPs content (identified as Sca-1<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD140α<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> cells was measured from 1 to 9 dpi (Fig. 2A). As previously reported<sup>4,5,33</sup> and with either muscle-injury model, muscle FAP number peaked at 3 dpi and returned to basal value at 9 dpi (Fig. 2A). Also in accordance with previous studies, FAP number drastically increased by 1 dpi in the injured muscle (>5-fold, Fig. 2A, without being affected in the contralateral non-injured side, Fig. 2B). The rise in FAPs at 1 dpi was not due to their proliferation, since no differences in EdU (a nucleotide analog) incorporation between FAPs from injured and control mice were detected (Figs. 2C, S1D), whereas other cell population, such as leukocytes, start proliferating by 1 dpi (Figure S1E). The FAP increase evidenced by flow cytometry at 1 dpi was then confirmed *in situ*, by immunohistochemistry of the damaged muscle (Fig. 2D). In accordance with our transcriptomic results, the majority of FAP cells were podoplanin<sup>+</sup> at 1 dpi (Fig. 2D). To functionally demonstrate the presence of increased FAP number at 1 dpi, we tested colony-forming unit-fibroblast (CFU-f) activity of muscle-derived SVF from injured (Gly or CTX) or non-injured animals at 1 dpi. As expected, the early rise in FAP number following muscle injury was associated with a rise in the CFU-f activity (Fig. 2E). Moreover, given that FAPs are the only cell type expressing adipogenic potential in the muscle<sup>3,25,33,34</sup>, *in vitro* adipogenesis of whole muscle-derived SVF from control or 1 dpi animals was tested. Upon adipogenic induction, muscle-derived SVF originating from injured animals clearly accumulated more lipids and expressed higher levels of adipogenic markers (Figs. 2F, G, H) confirming the rise in FAP content in the injured muscle at 1 dpi.

In parallel, we studied ASCs content in ScAT following muscle injury. ASCs were identified as Sca-1<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> cells as previously reported<sup>18,19</sup>. Concomitant with the increase in FAP number in the injured muscle, the number of ASCs significantly decreased by 20–25% in the ScAT at 1 dpi (Fig. 3A), both following Gly or CTX damage. Importantly, the gain in muscle FAP number was found equivalent to the loss in ScAT-ASCs, whatever the injury model used (Fig. 3B). To verify that muscle injury specifically triggered the decrease in ASCs, and to rule out any impact of the injury procedure on the cell content of ScAT, NaCl was injected into the quadriceps muscle. NaCl neither induced muscle damage (Figure S2A, B) nor modified ASC and/or leukocyte content in ScAT (Figures S2C, D), demonstrating that muscle injury per se triggers the fall in ASCs content observed in the ScAT at 1 dpi. Moreover, the ScAT was specifically impacted by muscle damage since neither perigonadic AT (PGAT) nor the bone marrow (BM), another tissue source of MSCs, were affected at 1 dpi (Fig. 3C). Whether all ASCs or subpopulations of ASCs were injury-responsive was then addressed. Based on our transcriptomic analysis, extensive flow cytometry analysis of AT and muscle-derived freshly harvested SVF originating from injured or non-injured animals was performed. We used the dimensionality reduction algorithm, t-distributed



**Fig. 1 | Muscle injured derived FAPs resemble ASCs from ScAT.** **A** Principal-component analysis (PCA, PC2 vs PC3) of RNAseq expression values of FAPs and ASCs isolated from injured (1 dpi) and control animals. **B** Venn diagram showing overlap of differentially expressed genes in ASCs from ScAT (SCAT) and FAPs from injured muscle (FAPInj) as compared with FAPs in non-injured animals (FAP). LOG2FC > 0.58 and *p* value < 0.05. **C** Expression heatmap of K-mean clustering of differentially expressed genes (expressed in Z score) in FAPs groups (control and

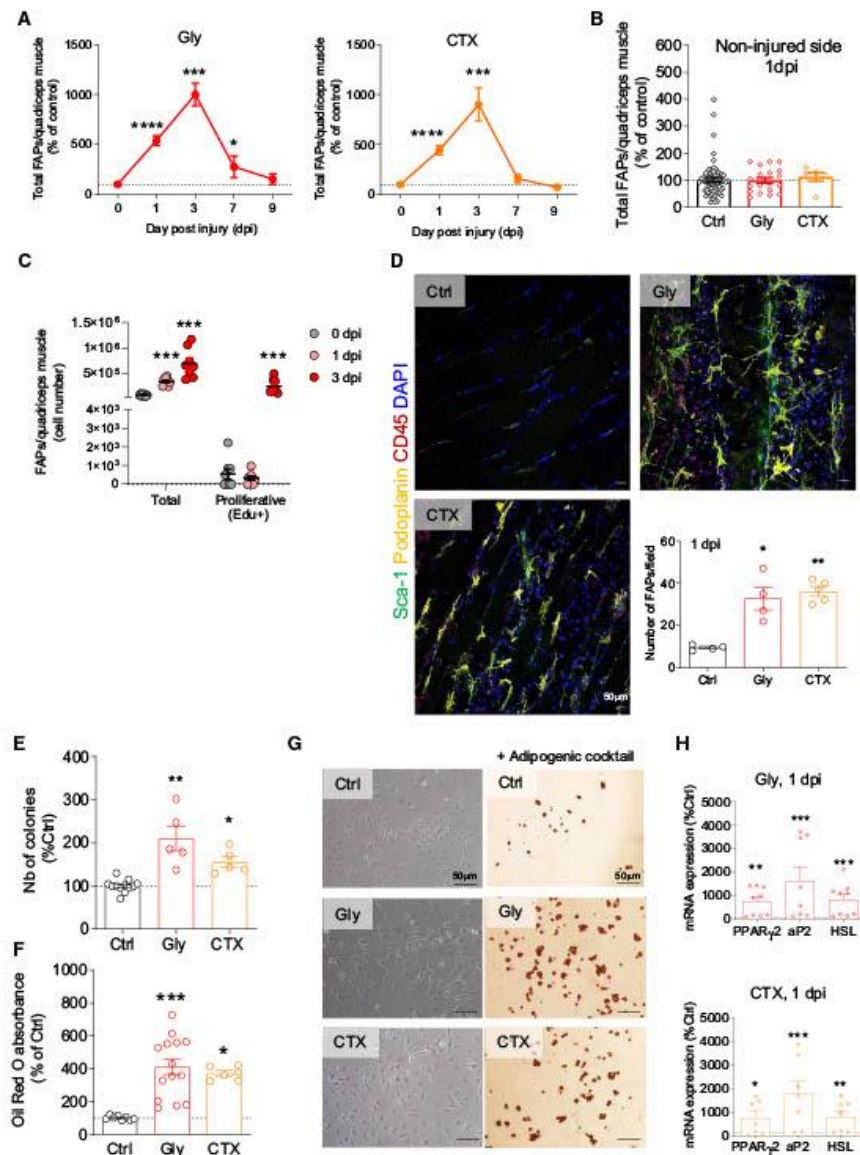
injured) compared with ASCs and corresponding Gene Ontology terms. **D** Table list of the top upregulated genes in ASCs compared with FAPs ranked by adjusted *p* value. Significance was obtained using DESeq2 package set to default parameters which uses the Wald test to calculate *p* values. **E** Violin plots of *Sca-1* and *Podoplanin* (*pdpn*) of single-cell RNAseq expression of FAPs isolated from injured (0.5, 2, and 3.5 dpi) and control animals using datasets from Oprescu et al.<sup>17</sup>.

stochastic neighbor embedding (tSNE), to qualitatively assess cell population diversity and heterogeneity<sup>35,36</sup> in the CD45<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup> cell subset. In contrast to conventional sequential biaxial plot-based analysis, tSNE analysis generated a single map in which the complex multi-dimensional geometric relationships between single cells were represented in a two-dimensional space. In the CD45<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup> cell populations, five distinct cell subsets were deciphered on the tSNE map based on the expression of *Sca-1*, CD34, CD90, CD140α and podoplanin (Fig. 3D). Next, we investigated the impact of muscle injury (Gly and

CTX, 1 dpi) on the proportion of these five cell subsets in both the muscle and the ScAT. Among the five cell subsets identified by tSNE analysis, the *Sca-1*<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD90<sup>+</sup>/Podoplanin<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup> cell population was increased in the injured muscle while it disappeared in the ScAT at 1 dpi (Gly or CTX) (Fig. 3E).

To examine whether programmed cell death could be responsible for the drop in ASCs content in the ScAT, we measured DNA fragmentation (TUNEL) after Gly or CTX muscle damage at 1 dpi. Frequencies of TUNEL-positive ASCs were not modified in the ScAT (Fig. 3F). As for the





muscle, ASCs are the only cell population in AT-derived SVF capable of adipogenic potential<sup>37</sup>. Therefore, *in vitro* adipogenesis of whole ScAT-derived SVF from control or injured animals was tested and compared (Fig. 3G) to functionally assess ASC content. In agreement with flow cytometry results, the drop in ASCs content was associated with a decrease in lipid accumulation and expression of adipogenic markers in ScAT-derived SVF originating from injured animals (Fig. 3H). To rule out putative effects of CTX or Gly on the metabolic status of the animals, and thus on the biology of AT, body weight and plasmatic glucose levels of the animals was monitored during 28 days following

muscle injury. Neither the body weights of the animals nor their glycaemia was modified by muscle lesion (Figure S2E, F).

Collectively our data show that the early rise in FAPs content following muscle injury is associated with a decline in ASCs content and that Podoplanin may be a selective marker of this cell population.

#### Muscle injury or exercise triggers ASC chemotaxis in humans and mice

Given these results, we hypothesized that the drop in ASCs in response to muscle injury resulted from their egress from the ScAT.



**Fig. 2 | FAPs content increases within 24 h after muscle injury.** **A, B** Myofiber damage was induced by intramuscular injection of glycerol (Gly) or cardiotoxin (CTX) into the quadriceps. FAP number was quantified in quadriceps-derived SVF by flow cytometry (with the markers CD31, CD45, Sca-1, CD34, CD140 $\alpha$ , and podoplanin) from 1 to 9 dpi and compared between control (uninjured, Ctrl), Gly or CTX injected animals (**A, B**) as well as in contralateral non-injured quadriceps (**B**) For **A**,  $n = 62$  (Ctrl) animals over nine independent experiments at 0 dpi,  $n = 28$  (Gly) and 7 (CTX) animals over four independent experiments at 1 dpi,  $n = 3$  (Gly and CTX) animals over three independent experiments at 3, 7 and 9 dpi. For **B**,  $n = 62$  (Ctrl), 19 (Gly), 6 (CTX) animals over 9, 3, and 3 independent experiments, respectively. **C** Detection of *in vivo* Edu incorporation detected by flow cytometry in FAPs of control and injured animals (Gly, 1 dpi).  $n = 8$  animals at all time points over three independent experiments. **D** Representative confocal images and immunohistological analysis of injured (Gly and CTX) quadriceps at 1 dpi and

quantification of Sca-1<sup>int</sup>/Podoplanin<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup> cells *in situ*.  $n = 4$  (Ctrl and Gly) and 5 (CTX) animals over three independent experiments. Bar scale 50  $\mu$ m. **E, F** Clonogenic (E) and adipogenic (F) assays were performed on total SVF isolated from control or injured (Gly and CTX) muscle at 1 dpi. For **E**,  $n = 12$  (Ctrl) and 5 (Gly and CTX) animals over three independent experiments. For **F**,  $n = 8$  (Ctrl) and 14 (Gly), and 6 (CTX) animals over four independent experiments. **G** Representative phase contrast images of Ctrl, Gly, or CTX muscle-derived SVF cells under adipogenic culture conditions. Cells were fixed at day 4 and stained with Oil red O. Bar scale 50  $\mu$ m. **H** mRNA expression of adipogenic markers measured on total SVF isolated from control or injured (Gly and CTX) muscle at 1 dpi.  $n = 7$  (Gly and CTX) animals over four independent experiments. Results are expressed as a percentage of non-injured control animals with mean  $\pm$  SEM; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  vs Ctrl.

Consequently, we investigated *in vitro* whether serum from injured animals could trigger ASCs chemotaxis. We collected serum from control or injured (1 dpi) animals and ASCs chemotaxis was studied and compared. We found that whatever the injury model, serum from injured animals strongly induced the chemotaxis of ASCs (Fig. 4A) supporting the hypothesis that muscle injury may trigger the egress of ASCs from ScAT via the production of blood circulating factors. We also investigated whether such a mechanism may occur in humans. To do so, we took advantage of blood samples originating from a clinical study investigating the impact of an acute bout of continuous exercise<sup>38</sup> in young, active men (Table 1) as a putative source of muscle damage and/or fatigue. As we measured *in mice*, the chemotactic response of human-native ASCs towards the serum of each individual before and after exercise was studied. As shown in Fig. 4B, the chemotactic response of ASCs toward serum at post-exercise was increased by two- to fivefold compared with the pre-exercise condition, though heterogeneity was observed from one individual to another. We then wondered whether such a disparity could be explained by inter-individual variability to exercise-mediated stress response. Growth differentiation factor 15 (GDF-15) is induced under stress conditions, to maintain cell and tissue homeostasis<sup>39</sup>. Recent studies also suggested that GDF-15 is an exerciser<sup>36</sup>, exhibiting a possible protective role in exercise-induced muscle injury or inflammation<sup>40–43</sup>. Therefore, circulating blood levels of GDF-15 were measured before and after exercise to assess the exercise-induced stress response intensity of each individual (Table 2). In agreement with our hypothesis and the results obtained in mice, the chemotactic activity of ASCs is strongly correlated with GDF-15 levels akin to an index of muscle fatigue (Fig. 4C). These findings indicate that blood factors released after muscle injury/stress may trigger the mobilization of ASCs from the ScAT, in both mice and humans.

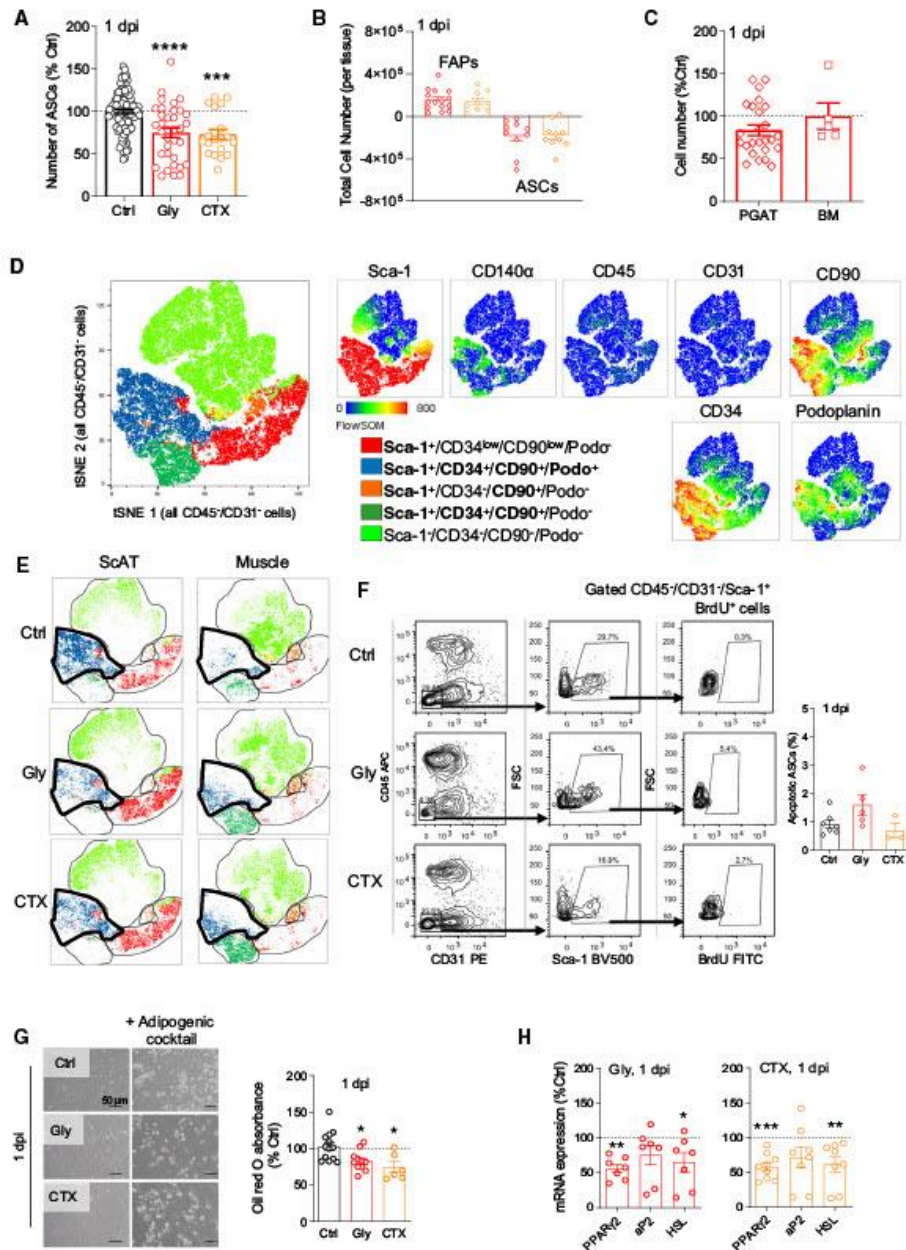
#### ASCs exit the ScAT and infiltrate the muscle after injury

To determine whether ASCs can leave the ScAT in response to muscle injury to further infiltrate it, we performed *in vivo* experiments in mice. However, due to the absence of unique specific ASC marker, no mouse model is so far available to visualize, *in vivo*, the trafficking of native ASCs from AT to any other tissue compartments. To overcome this obstacle, we first used Tg(Cd34-EGFP)MF6Gsat/Mmucd (referred to as CD34-GFP, an ASC surface marker) from which a piece of ScAT was grafted into the ScAT of a non-GFP recipient mouse (Fig. 4D). Fat graft revascularization, an index of viability, was verified by using retro-orbital injection of Rhodamin-lectin into grafted animals (Fig. 4D, S3A). At day 7 post-graft, muscle was damaged and the presence of GFP<sup>+</sup> cells into the injured muscles was assessed at 1 dpi. CD31<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup> cells were identified in injured muscles by flow cytometry (~8% of CD31<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup> cells, Fig. 4E) while by contrast no GFP cells were detected either in the muscle of a CD34-GFP ScAT grafted non-injured control animal (Fig. 4E), nor in a non-grafted mouse (Figure S3B). Recently, Giuliani et al.<sup>44–46</sup> reported that Sca-1 expression defines two

FAPs subsets, the Sca-1<sup>int</sup> and Sca-1<sup>low</sup> FAP subpopulations, and that Sca-1 level expression mirrors FAPs biological fate. Consequently, we analyzed Sca-1 level expression in muscle-infiltrated ASCs and found that GFP<sup>+</sup>-ASCs were mainly in the Sca-1<sup>low</sup> subpopulation (Fig. 4E). To verify GFP expression specificity, FAPs from grafted injured (1 dpi) or non-injured animals were sorted and genomic GFP expression was analyzed. Genomic GFP expression was found in FAPs of injured muscles (Figure S3C), in contrast to control muscles from grafted animals (Figure S3C) or other distant organs (Figure S3D). To rule out possible mouse model effect, ScAT graft from other fluorescent transgenic mouse models the Rosa26<sup>mT/mG</sup> or the *CAG::KikGR*<sup>33</sup> animals<sup>47,48</sup> were used (Figure S3E). Here again, we observed in mice grafted with the Rosa26<sup>mT/mG</sup> that ~10% of Tomato<sup>+</sup>-cells among the CD45<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup> cells were found in the injured muscle, corresponding to infiltrated ASCs originating from the red fluorescent mT/mG graft pad (Figure S3F). Interestingly, the Tomato<sup>+</sup>-cells laid preferentially among the CD45<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup>/Sca-1<sup>low</sup> cell subpopulation (Figure S3F, lower panel) such as observed previously in Fig. 4E. Collectively, our result demonstrates that following muscle injury, ScAT releases FAP-like cells, which specifically infiltrate the damaged muscle. Such specific post-damage cell infiltration originating from AT may largely contribute to the heterogeneity in Sca-1 expression recently described in the FAPs and which may impact the fate decision of FAPs<sup>46</sup>. Further analysis of their immunophenotype *in vivo* was performed using either CD34-GFP or KikGR AT grafted animals at 1 dpi. The infiltrated fluorescent cells were found to be Sca-1<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/Podoplanin<sup>+</sup>/CD140 $\alpha$ <sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>, corresponding to the ASCs immunophenotype (Fig. 4F–H, S3G). Altogether, these findings show that the first wave of FAP increase following muscle injury at 1 dpi largely results from ASC mobilization and infiltration into the damaged muscle.

#### ASC muscle infiltration involves platelets

Our current understanding of *in vivo* trafficking of native ASCs/ MSCs is still very incomplete<sup>49</sup> and mostly derives from *in vitro* experiments. However, some studies indicate that platelets control MSC trafficking and/or recruitment to sites of injury<sup>50–53</sup>. We found that the mobilizable ASC cell subset was podoplanin<sup>+</sup> and observed an upregulation of podoplanin expression at the cell surface of ASCs from injured animals measured by flow cytometry (Fig. 5A). Podoplanin is an endogenous ligand for C-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2) which is an essential platelet-activating receptor. Consequently, we next assessed whether ASC and platelet interaction are necessary for the recruitment of ASCs to the injured muscle. We used an *in vitro* assay whereby platelets, isolated from control or injured animals (1 dpi) were fluorescently labeled and co-incubated with ASCs (isolated from ScAT). The adhesion of platelets to ASCs was evaluated and compared. The results show that platelets originating from injured animals adhered more to ASCs *in vitro* (Fig. 5B, C), a physical interaction that was completely abolished when an antibody directed against podoplanin was added



(Fig. 5B, C). Given our results showing that both ASC mobilization and infiltration account for the first wave of FAP rise in injured muscle and that platelets originating from injured animals interact more with ASCs, we next investigated the consequences of platelet depletion in vivo on FAP augmentation following muscle injury. Muscle damage was induced as described earlier and either platelet

depletion or podoplanin inhibition was performed 1h later (Fig. 5D, E). FAP content was then quantified by flow cytometry at 1 dpi. Both platelet depletion and podoplanin inhibition diminished the increase of FAPs in the muscle by more than twofold at 1 dpi (Fig. 5F, G) suggesting that the infiltration of ASCs into the injured muscle involves platelets.



**Fig. 3 | ASC content diminishes in ScAT within 24 hours after muscle injury.** A Flow cytometry analyses of CD31, CD45, Sca-1, CD34, and podoplanin expression in ScAT-derived SVF of control and injured (Gly and CTX) animals at 1 dpi.  $n = 106$  (Ctrl), 34 (Gly), and 19 (CTX) animals over 15, 15, and 9 independent experiments respectively. B Relative cell numbers in injured muscle and ScAT at 1 dpi.  $n = 15$  (Gly) and 9 (CTX) animals for muscle and 10 (Gly) and 10 (CTX) animals for ScAT over three independent experiments. C ASCs and MSCs content in perigonadic adipose tissue (PGAT) and bone marrow (BM), respectively, using flow cytometry at 1 dpi in Gly-injured animals.  $n = 25$  (PGAT) and 5 (BM) animals over three independent experiments. D ASCs and FAPs phenotypic analysis by flow cytometry. Merged tSNE plot for all control and Gly-injured CD45<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> cell among ScAT and muscle SVF-derived cells. The identity of each cluster according to the combinatory expression level of multiple markers is color-coded in the tSNE plot. Cytometry

marker expression level plots are presented on the right-hand side. E Comparison of ScAT and muscle tSNE plot in control and injured (Gly and CTX) conditions at 1 dpi; clusters identified in D are black circled. F TUNEL staining of ScAT-derived SVF from Gly- or CTX-injured, or non-injured animals (Ctrl) at 1 dpi.  $n = 7$  (Ctrl), 5 (Gly), and 3 (CTX) animals over three independent experiments. G Phase contrast images of adipogenic challenged ScAT-derived SVF from Ctrl, Gly, and CTX-injured animals. Cells were fixed at day 4 of differentiation and stained with oil red O. Bar scale 50  $\mu\text{m}$ .  $n = 13$  (Ctrl), 11 (Gly), and 9 (CTX) animals over four independent experiments. H mRNA expression of adipogenic genes in ScAT-derived SVF from Ctrl, Gly, and CTX-injured animals at 1 dpi.  $n = 7$  (Ctrl), 7 (Gly), and 7 (CTX) animals over three independent experiments. Results are expressed as percentage of non-injured control animals with mean  $\pm$  SEM; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs Ctrl.

### ASC muscle infiltration is needed for effective regeneration

We next studied the impact of FAPs rise disruption on the muscle regeneration process. To do so, we further exploited the muscle injury model with platelet depletion until 14 dpi (Fig. 6A). Platelets depletion was maximal at 1 dpi, during the time of ASCs infiltration, before going back to basal in the later days, avoiding side effects due to long-term imbalance (Fig. 6B). The expression of genes involved in the molecular program of muscle regeneration was studied following muscle injury until 14 dpi. Even though the expression patterns of early genetic markers of the muscle regeneration program (*pax7*, *myf5*, *mrf4*) were not modified (Fig. 6C, S4), the expression of late myogenic markers (*myod*, *myog*, *myhC-emb*) were clearly modified in platelet-depleted animals compared with controls (Fig. 6C). To reinforce these results, we quantified both the number of newly synthesized centrally nucleated fibers and the fiber diameters, as markers of the regenerative process and found that the proportion of centrally nucleated fibers at 7 dpi as well as the cross-sectional area distribution of regenerating fibers at 14 dpi were dramatically diminished in platelet-depleted animals (Fig. 6D–F). In accordance with our hypothesis, the intramuscular injection of ASCs rescued the tested parameters (Fig. 6D–F). Beyond the formation of new myofibers, muscle regeneration also requires connective tissue restoration, via the secretion and organization of newly synthesized extracellular matrix<sup>55</sup>. We thus investigated the gene expression time course involved in this process up to 14 dpi (Gly) with initial platelet depletion. All the four markers studied (*tgfb1*, *col6a1*, *col1a1*, and *sma*) followed a dynamic expression profile upon glycerol injury that was disturbed upon platelet depletion. With ASCs injection such dynamic was partially restored though in a variable way from gene to gene (Fig. 6G). On the other hand, excessive and persistent intramuscular connective tissue deposition (IMCT) is a hallmark of fibrosis<sup>55,56</sup>. Knowing that the CTX injury model is described to be more pro-fibrotic compared to the Gly one, we investigated the consequence of platelet depletion in this context<sup>57</sup>. At 14 dpi, CTX injury causes a significant IMCT deposition that is worsened upon platelet depletion (Fig. 6H). Conversely, ASCs intramuscular injection improved IMCT levels, possibly indicating a pro-regenerative role following muscle injury (Fig. 6H).

### ASCs' tissue origin determines muscle regeneration outcome

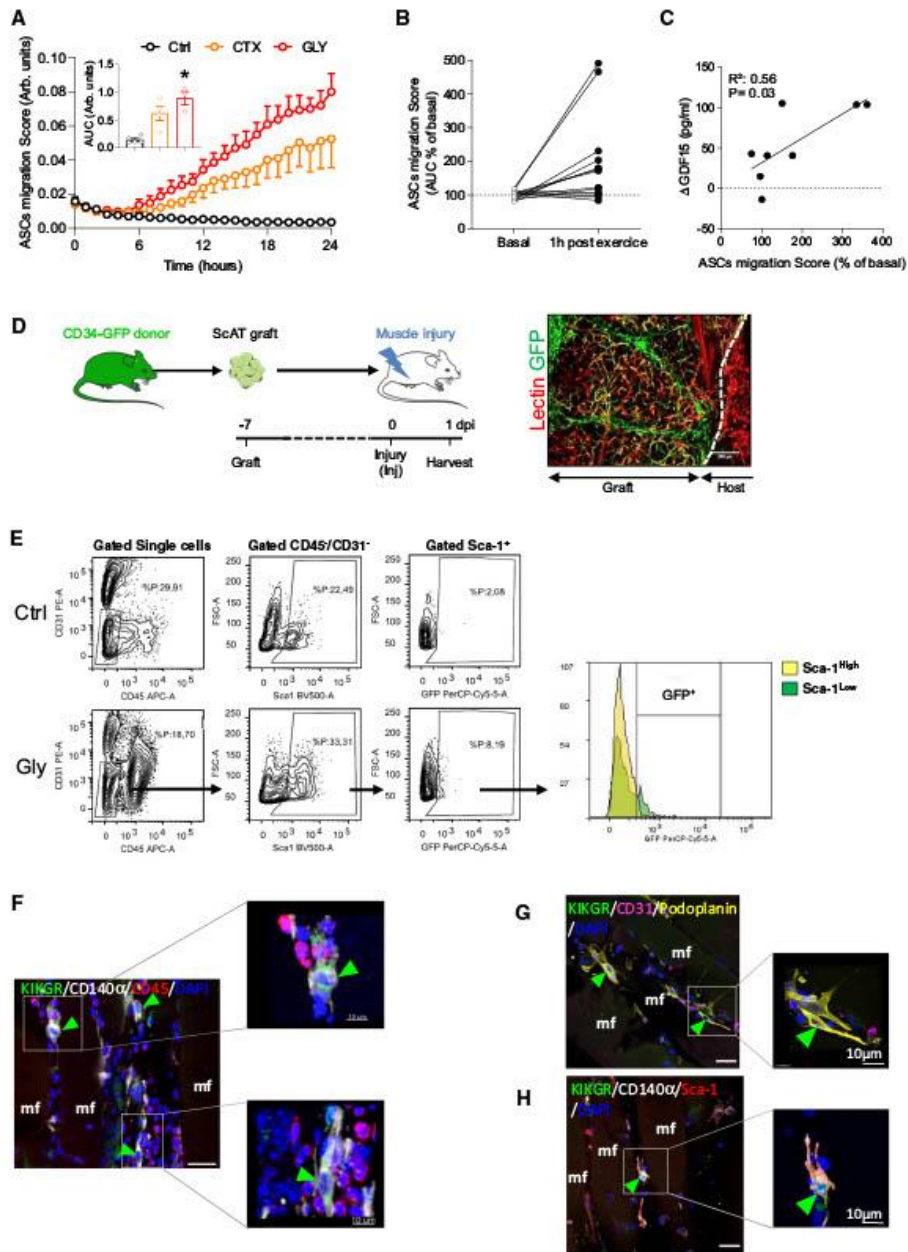
To further evaluate the impact of ASC infiltration on the muscle regeneration process, ScAT from both sides of the animal were removed to eliminate the injury-responsive reservoir of ASCs (Fig. 7A). We first verified the impact of bilateral lipectomy on both morphometric and metabolic parameters. Body weight and total fat mass were not significantly modified (Figure SSA, B). PGAT, the other main adipose depot, did not overgrow to compensate the removal of ScAT (Figure SSC). Food intake was only affected the first days after the surgery but normalized on later time points (Figure SSD). Finally, blood glucose was checked and did not show significant changes after the bilateral lipectomy (Figure SSE). Muscle injury was then performed as described earlier. It did not affect the weight of the remaining PGAT

and the injured muscle (Figure SSF, G). The expression of genes involved in the molecular program of muscle regeneration was then examined. As for platelet-depleted animals, the expression pattern of *pax7* was not modified (Fig. 7B) while the one of both late myogenic markers *myog*, and *myhC-emb*, was clearly affected (Fig. 7B). Accordingly, the number of newly synthesized centrally nucleated fibers, was diminished in ScAT-depleted animals (Fig. 7C, D). To our surprise, in ScAT-depleted animals, the early rise in FAPs content still occurred, in contrast to our prediction (Fig. 7E). Unlike the control animals, we found that the ASCs content of PGAT was diminished at 1 dpi when ScAT was removed (Fig. 7F). Consequently, these data suggest that in the absence of ScAT, PGAT depot takes over in terms of infiltration of FAP-like cells, yet without an efficient muscle regeneration outcome. This suggests that according to their fat depot source, ASCs may not exhibit similar regenerative potential. We thus compared the impact of ScAT- or PGAT- ASCs on muscle regeneration outcome in the context of ScAT reservoir removal. In ScAT-depleted animals the injection of ScAT-derived ASCs entirely rescued the level of centronucleated fibers while the ones from PGAT did not (Fig. 7G, H). Finally, we wondered whether ScAT-derived ASCs harbor a specific pro-regenerative profile that promotes better muscle regeneration. Functional analysis by gene ontology (GO) revealed specific gene expression profiles in ScAT-ASCs when compared to PGAT-ASCs. Indeed, there was an enrichment in ScAT-ASCs in the biological functions related to coordination of inflammation, stem cell proliferation and fate, and myoblast fusion (Fig. 7I, Supplementary data 1), all together being essential pathways to allow muscle regeneration in response to acute injury.

### Discussion

The regenerative capacity of skeletal muscle mostly relies on satellite cells (SCs), which proliferate in response to exercise or following myotrauma, to repair the injured muscle<sup>5,58</sup>. However, in the past decade many other cell types have been shown to contribute to this process in order to maintain skeletal muscle integrity and functions<sup>59,60</sup>.

Among those diverse and heterogeneous cell types, resident mesenchymal progenitors named FAPs have emerged as key players in skeletal muscle regeneration and disease by providing functional support to SCs to perform efficient muscle regeneration<sup>7,61,62</sup>. Upon muscle injury, FAPs become activated and expand rapidly<sup>4,5</sup>. Indeed, the number of FAPs peaks 96 h post-muscle damage<sup>9</sup> together with their proliferative activity<sup>4</sup>. Surprisingly, before FAPs proliferation is fully activated<sup>4,5,63</sup>, FAPs number dramatically increases within the 24 h following muscle injury and the origin of such rise has never been addressed in the literature so far<sup>6,9,15,64</sup>. Furthermore, various recent studies addressed the question of muscle resident cell heterogeneity in homeostasis and regenerative conditions using single-cell analysis<sup>5,17,60,65</sup>. In that context, Malecova et al<sup>15</sup> identified the appearance of a subpopulation of Tie2<sup>low</sup>FAPs within the 24 h following muscle injury in a mouse model, which they considered a reflection of the cell state of FAPs during muscle regeneration<sup>15</sup>.



The results presented here provide a mechanism that may explain both the rapid FAPs number increase observed 24 h after muscle injury without proliferation and FAPs heterogeneity. We show that in response to acute muscle injury ASCs egress ScAT and infiltrate the damaged muscle, a mechanism necessary for efficient muscle regeneration. Moreover, we propose that a subpopulation of mesenchymal

progenitors originating from ScAT participates to the pool of FAPs and could correspond to the subpopulation of “activated” FAPs reported by Oprescu et al<sup>17</sup>. Based on our results it seems likely that this FAP subpopulation originates from ScAT rather than being a transitory cell state of resident FAPs. Our data also suggest that such a mechanism may occur in humans in response to exercise-induced muscle fatigue.



**Fig. 4 | ASCs leave the ScAT and infiltrate injured muscle.** **A** Time course evaluation of murine *in vitro* ASC chemotaxis in response to plasma isolated from Ctrl, CTX- and Gly-injured animals at 1 dpi.  $n = 5$  (Ctrl), 3 (Gly) and 4 (CTX) animals over three independent experiments. **B** *In vitro* human ASCs (of three individuals) chemotaxis in response to serum of six individuals collected 1 hour after an acute bout of continuous exercise (60%  $\text{VO}_2$  max). **C** Correlation of human ASC chemotaxis with 1h-post exercise GDF-15 blood levels.  $n = 6$  serums tested on 1 or 2 sets of ASC over three independent experiments. **D** Model of ScAT grafting from CD34-GFP mouse into WT C57Bl/6 mice (left panel), the figure was partly generated using

Servier Medical Art, provided by Servier, licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 unported license. Immunofluorescence image of the ScAT depot 7 days post-graft surgery (right panel, bar scale 200  $\mu\text{m}$ ). **E** Flow cytometry analysis of the SVF from Gly-injured muscle of the grafted mice (1 dpi), GFP<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup> are scated on an histogram for Sca-1 intensity. **F–H** Immunohistological analysis of Gly-injured (1 dpi) quadriceps in grafted mice with KikGR ScAT *in situ* (green arrowheads point KikGR<sup>+</sup>/CD140 $\alpha$ <sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> (F), KikGR<sup>+</sup>/Podoplanin<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup> cells (G) or KikGR<sup>+</sup>/CD140 $\alpha$ <sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup> (H)). Bar scale 10  $\mu\text{m}$ . Results are expressed as mean  $\pm$  SEM; \* $p < 0.05$ .

**Table 1 | Anthropometry and body composition of the individuals enrolled in the clinical study**

| Subject ID | Age | Weight (kg) | Height (cm) | BMI (kg/m <sup>2</sup> ) | % Fat Mass | Fat mass (kg) | Free fat mass (kg) |
|------------|-----|-------------|-------------|--------------------------|------------|---------------|--------------------|
| A          | 22  | 79          | 184         | 23.33                    | 12.16      | 8.5           | 62.1               |
| B          | 19  | 87          | 193         | 23.36                    | 17         | 13.6          | 63.9               |
| D          | 19  | 70          | 171         | 23.94                    | 17.8       | 11.1          | 49.4               |
| I          | 27  | 87.2        | 185         | 24.54                    | 15.9       | 12.8          | 64.8               |
| J          | 24  | 79.3        | 191         | 21.7                     | 15.6       | 10.6          | 60.7               |
| M          | 29  | 71.3        | 176         | 23.01                    | 14.3       | 10.4          | 59.2               |

Indeed, GDF-15 has been implicated in exercise and exercise recovery and that high levels of GDF-15 may signal exercise aversion to prevent injurious behavior<sup>64</sup>. We show here that human ASCs migration score positively correlates with exercise-mediated GDF-15 level increase<sup>41</sup>, which may indicate that ASCs are mobilized when muscle signals a pre-injury state.

The mechanisms controlling the trafficking of endogenous MSCs and/or ASCs are poorly understood and our current understanding mostly derives from *in vitro* studies<sup>49</sup>. We show here that in response to muscle injury, ASCs within ScAT overexpress podoplanin, which is a ligand for the platelet receptor CLEC-2 (for C-type lectin-like receptor 2)<sup>67</sup>. In agreement with this result, several studies report that the majority of infused MSCs can be found within the circulation in close contact with platelets<sup>50,51</sup> to facilitate their homing to inflamed tissues<sup>30,68</sup>. Our data show that platelets originating from muscle-injured animals adhere more *in vitro* to ASCs and that neutralizing the CLEC-2/podoplanin interaction completely abolished this effect, suggesting a role for platelets in ASCs trafficking *in vivo*. This was confirmed in platelet-depleted animals where FAPs increase was strongly inhibited in response to muscle injury. The blunting in FAPs increase, observed in platelet-depleted animals was associated with impaired muscle regeneration that was rescued by intramuscular ASC injection. The precise mechanisms by which platelets control ASC egress and/or muscle infiltration are still unclear and need to be addressed in further studies. However, platelets have been shown to maintain endothelial permeability while the trafficking of infused MSCs to inflamed sites is facilitated by increased endothelial permeability<sup>65</sup>. Moreover, recent studies demonstrate that podoplanin expression imparts a promigratory phenotype in MSCs, facilitating their migration across the vessel wall and interaction with circulating platelets<sup>30</sup>.

To rule out platelet-dependent effects mediated by their secretion on muscle regeneration we set up another experimental model by the removal of ASCs source, i.e., a bilateral ScAT lipectomy. Though muscle regeneration was also strongly affected in that context, FAPs first wave at 1 dpi was unexpectedly maintained. We showed that in absence of ScAT, another AT depot, the PGAT, was solicited. Thus suggesting that when the bone fide source of ASCs is missing, another reservoir takes over but fails to support muscle regeneration. Actually, when directly injected into the injured muscle, PGAT-derived ASCs were not able to rescue muscle regeneration unlike their ScAT counterpart. Further transcriptomic analysis showed that ScAT- vs PGAT-derived ASCs are intrinsically functionally different. Extensive literature reports that FAPs secrete numerous factors being responsible

**Table 2 | GDF-15 blood levels in individuals before (pre) and after (post) an exercise on a bicycle ergometer at 60%  $\text{VO}_2$  peak for 1-hr**

| Subject ID | GDF-15 (pg/ml) |       |                       |
|------------|----------------|-------|-----------------------|
|            | Pre            | Post  | $\Delta$ (Post - Pre) |
| A          | 153,4          | 168,1 | 14,7                  |
| B          | 417,0          | 457,5 | 40,5                  |
| D          | 209,4          | 313,2 | 103,8                 |
| I          | 341,2          | 446,5 | 105,3                 |
| J          | 451,6          | 437,7 | -14,0                 |
| M          | 263,8          | 329,5 | 65,6                  |

$\Delta$  corresponds to the difference in GDF-15 blood level, before, and after the exercise.

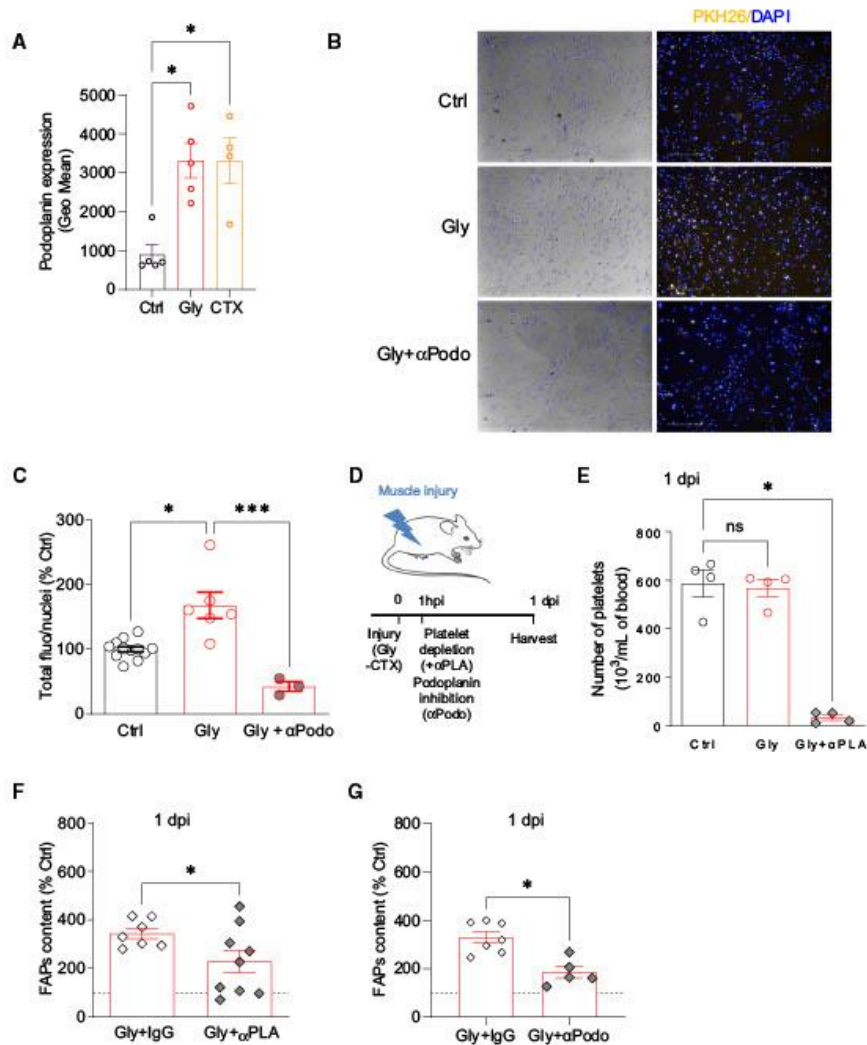
for immunomodulation and IMCT remodeling after damage that support muscle SC expansion, differentiation, self-renewal, and quiescence<sup>46,62,69–71</sup>. Our transcriptomic analysis of both ASC subpopulations indeed confirmed that they exhibit profound differences regarding those essential parameters for optimal muscle regeneration. It is well accepted that visceral AT and ScAT are functionally and metabolically distinct, the latter being more “protective”<sup>72</sup>. The present data provide a new set of evidence that ScAT exhibits another protective function during skeletal muscle regeneration. Our data reinforce the particular relationship between muscle and AT, mainly described until now by secretory crosstalk, by showing that cell exchanges between these two organs take place and impact their homeostasis<sup>73</sup>.

In conclusion, our work identifies an unsuspected role of ScAT in skeletal muscle regeneration. These findings introduce the concept of AT as an endogenous supplier of regenerative cells allowing skeletal muscle to regenerate efficiently. Whether such dialog is decisive in pathological contexts or during ageing where the repartition of adipose sources is dramatically affected remains to be investigated.

## Methods

### Animal experimental protocols

This work was submitted to and approved by the Regional Ethic Committee and registered to the French Ministère de la Recherche. Animals were kept under controlled light (12-hr light/dark cycles; 07h00–19h00), temperature (20 °C–22 °C), hygrometry (40%  $\pm$  20%) and fed *ad libitum* a chow diet (8.4% fat, Safe®A04, Safe lab).



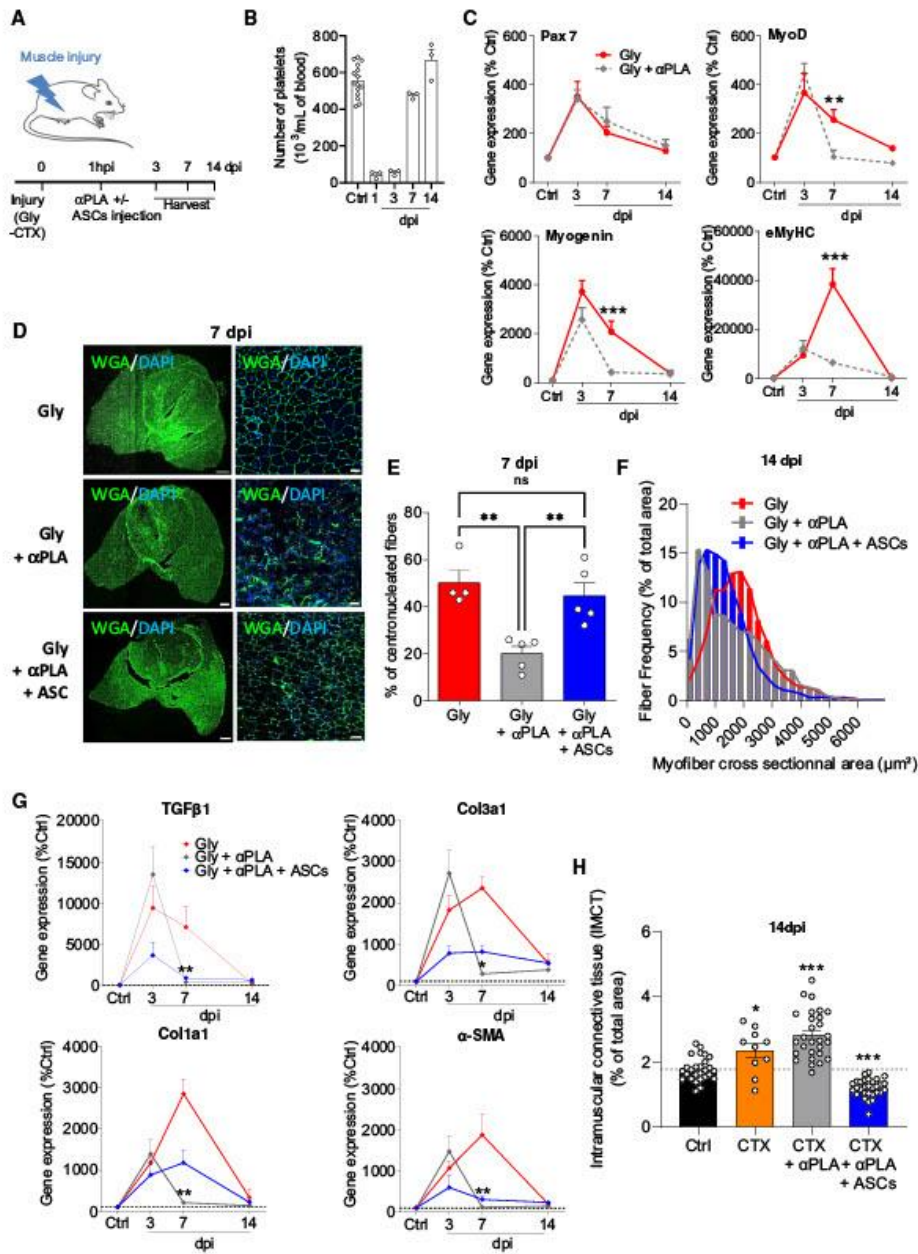
**Fig. 5 | The interaction of blood platelets with ASCs determines their infiltration into the damaged muscle.** **A** Cell surface podoplanin expression of ScAT-derived ASCs of injured (Gly and CTX) or control animals by flow cytometry at 1 dpi.  $n = 5$  (Ctrl), 5 (Gly), and 4 (CTX) animals over three independent experiments. **B** Representative phase contrast and fluorescent images of PKH26-stained platelets (yellow) co-incubated with ScAT-ASCs in the presence or not of blocking podoplanin antibody, bar scale 200  $\mu\text{m}$ . **C** Quantification of PKH26-stained platelets with ASCs.  $n = 12$  (Ctrl), 6 (Gly), and 3 (Gly +  $\alpha\text{Podo}$ ) animals over three independent experiments. **D** Model of platelet depletion, the figure was partly generated using Servier Medical Art, provided by Servier, licensed under a Creative

Commons Attribution 3.0 unported license. **E** Platelet numeration 1 day post platelet depletion.  $n = 4$  (Ctrl), 4 (Gly), and 4 (CTX) animals over two independent experiments. **F** FAPs content by flow cytometry in injured muscle from control (+IgG) or platelet-depleted animals (+ $\alpha\text{PLA}$ ).  $n = 7$  (Gly+IgG) and 9 (Gly+ $\alpha\text{PLA}$ ) animals over two independent experiments. **G** FAPs content by flow cytometry in injured muscle from control (+IgG) or antipodoplanin treated animals (+ $\alpha\text{Podo}$ ).  $n = 7$  (Gly+IgG) and 5 (Gly+ $\alpha\text{Podo}$ ) animals over three independent experiments. Results are expressed as percentage of non-injured control animals with mean  $\pm$  SEM; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

**Muscle injuries.** 8–12 weeks old male C57Bl/6 J mice (Janvier) were anesthetized with isoflurane and 80  $\mu\text{L}$  of 10  $\mu\text{M}$  cardiotoxin (Sigma, C9759) or 50% glycerol in saline solution (NaCl 0.9%) were injected into the right quadriceps.

**ScAT grafting.** Three transgenic fluorescent mice models were used as ScAT donors: the Tg(Cd34-EGFP)MF6Gsat/Mmcd (MMRRC), the Rosa26<sup>mT/mG</sup> and the CAG::KikGR animals respectively referred as CD34-GFP, mT/mG, and KikGR mice. Non fluorescent C57Bl/6J-recipient





mice received graft pads (10 mg) from the above models into their ScAT while sham control mice were only skin incised. After 7 days (grafted or sham) mice were injured.

**Platelet depletion.** Mice were injected intraperitoneally with platelet depleting antibody (anti-GPIb, EMFRET, #R300) in saline

solution at a concentration of 2 mg/kg. Control animals were injected with mixture of non-immune rat IgG which display no cytotoxic effects on platelets in mice (EMFRET, #C301, 2 mg/kg). Platelet depletion efficiency was verified on 20 μl of total blood of the animals (from day 0 to 14) using Micros 60 (HORIBA Medical).



**Fig. 6 | The interaction of blood platelets with ASCs is crucial for effective muscle regeneration.** **A** Model of platelet depletion and ASCs injection. The figure was partly generated using Servier Medical Art, provided by Servier, licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 unported license. **B** Platelet numeration time course in control and Gly-injured animals from 1 to 14 dpi.  $n = 15$  (Ctrl) and three animals for each other time point over two independent experiments. **C** Time course of mRNA expression of myogenic genes in quadriceps muscle from control and Gly-injured animals with and without platelet depletion.  $n = 12$ –16 (Ctrl) and 5–8 at 3 dpi, 6–8 at 7 dpi, and 6–9 at 14 dpi animals over four independent experiments. **D** Immunohistological confocal images of quadriceps muscles at 7 dpi (Gly +/- platelet depletion). Bar scales 500 (left) and 50 (right)  $\mu\text{m}$ . **E** Immunohistological-based quantification of regenerative (WGA centronucleated fibers) muscle fibers at 7 dpi.  $n = 5$  (Gly), 5 (Gly +  $\alpha\text{PLA}$ ) and 4 (Gly +  $\alpha\text{PLA}$  + ASCs)

animals over four independent experiments. **F** Size distribution of regenerating muscle fibers in Gly-injured (red), platelet-depleted (gray), and ASCs supplemented (green) animals at 14 dpi.  $n = 4$  (Gly), 6 (Gly +  $\alpha\text{PLA}$ ), and 5 (Gly +  $\alpha\text{PLA}$  + ASCs) animals over four independent experiments. **G** Time course of mRNA expression of intramuscular connective tissue (IMCT) genes in quadriceps muscle from control and Gly-injured animals with and without platelet depletion.  $n = 5$  (Ctrl) and, 5–7 at 3 dpi, 3–4 at 7 dpi, 4 at 14 dpi animals over three independent experiments. **H** Immunohistological-based quantification of IMCT deposition in quadriceps muscle from control and CTX-injured animals with and without platelet depletion at 14 dpi.  $n = 27$  (Ctrl), 10 (CTX), 28 (CTX +  $\alpha\text{PLA}$ ), and 30 (CTX +  $\alpha\text{PLA}$  + ASCs) pictures of 4, 3, 4, and 4 animals in each group, respectively, over three independent experiments. Results are expressed as a percentage of control animals with mean  $\pm$  SEM; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

**Antipodoplanin treatment.** Mice were injected intraperitoneally with InVivoMab anti-mouse Podoplanin (BioCell, #BE0236, 100  $\mu\text{g}$  per mouse) in saline solution. Control animals were injected with inVivoMab polyclonal Syrian hamster IgG (BioCell, #BE0087, 100  $\mu\text{g}$  per mouse).

**Bilateral lipectomy.** Mice were anesthetized with isoflurane and a skin incision was performed above ScAT lymph node. ScAT was removed using forceps to disrupt conjunctive tissue adhesions, and blood vessels located at the extremities were cauterized. Wound was sutured, and animals were monitored daily for 5–7 days. Muscle injured results were compared to non-injured animals, and lipectomy results were compared to sham (skin incision only) animals.

**ASC muscle injection.** For rescue experiments in both platelet-depleted and lipectomized animals, 250,000 to 300,000 freshly isolated ASCs (Sc or PG) were injected (G25 needle, 1 mL syringe in NaCl 0.9%, maximal volume of 80  $\mu\text{l}$ ) in anesthetized animals 1 hour after muscle injury.

**Tissue collection.** Blood was collected in anesthetized animals in the inferior cava vein with G25 needle and 1 mL syringe coated with PBS/Heparin (20 U/mL), and then dislocation was performed. Quadriceps muscle, subcutaneous (Sc) and perigonadic (PG) AT were either directly harvested for cell isolation or fresh frozen for RNAs extraction or genomic DNA (liver, heart, kidney and front limb).

#### Murine AT- or muscle-SVF isolation

Freshly harvested AT or muscle were minced and SVF were obtained by enzymatic digestion.

PGAT and ScAT were digested with collagenase (NB4, Coger; 0.4 U/mL) and DNase (1%, Roche) in  $\alpha\text{MEM}$  (GIBCO) at 37 °C for 45 and 60 min, respectively, under constant agitation. After centrifugation (300  $\times g$ , 10 min, RT) and elimination of the floating mature adipocytes, the pellet containing the SVF was resuspended in erythrocyte lysis buffer (155 mmol/L NH<sub>4</sub>Cl; 5.7 mmol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0.1 mmol/L EDTA, pH 7.3) to remove red blood cells. After filtration (34  $\mu\text{m}$  sieve) and centrifugation (300  $\times g$ , 10 min, RT), SVF were resuspended in PBS/0.5% bovine serum albumin (BSA)/2 mM EDTA.

Quadriceps muscles were digested with collagenase B (0.5 U/mL, Roche) and dispase II (2.4 U/mL; Roche) in Hank's Balanced Saline Solution (HBSS) + 2.5 mM Ca<sup>2+</sup> for two rounds of 30 min at 37 °C under agitation separated by mechanical dissociation through G18 syringe. Reaction was stopped by adding a two volumes of  $\alpha\text{MEM}$  + 10%NCS, then samples were filtered through 34  $\mu\text{m}$  sieve and centrifuged (300  $\times g$ , 10 min, RT) to eliminate supernatant and to resuspend the SVF in PBS/0.5%BSA/2 mM EDTA.

Freshly harvested AT- or muscle-derived SVF were used for direct flow cytometry analysis or cell sorting if needed.

#### Cell sorting

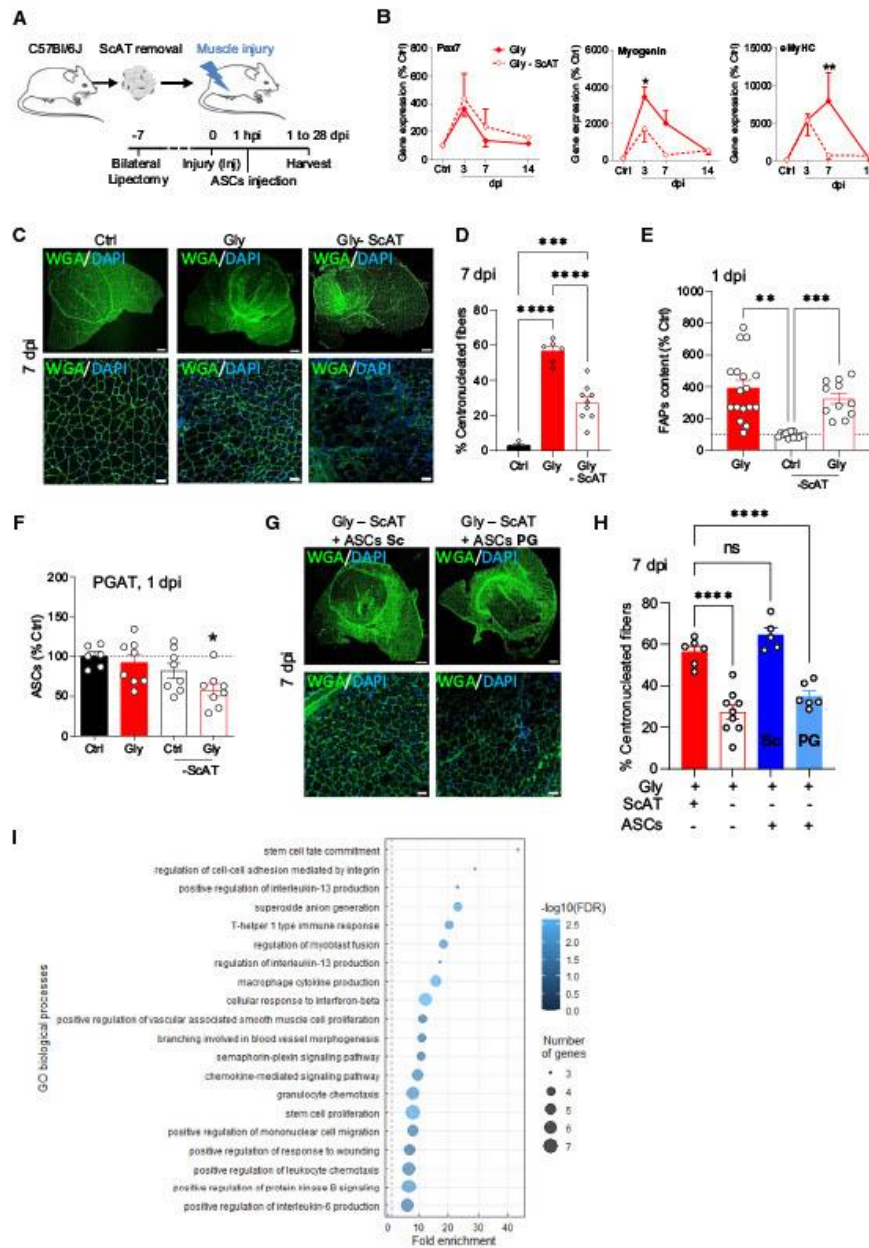
**ASC or FAP isolation.** ASC sorting: SCAT- or PGAT- derived SVF were depleted in CD45<sup>+</sup> and CD31<sup>+</sup> cells using anti-CD45-FITC (Miltenyi, 130-116-535) and anti-CD31-FITC antibodies (Miltenyi, 130-123-675) followed by anti-FITC magnetic microbeads (Miltenyi, 130-048-701) using an autoMACS<sup>®</sup> Pro Separator (MACS Cell Separation, Miltenyi Biotec SAS) according to the manufacturer's instructions. CD45<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> cells were then positively sorted for Sca-1 with anti-Sca-1 magnetic microbeads (Miltenyi, 130-106-641). Isolated ASCs were used for RNAseq experiments, for muscle injection in platelet-depleted or lipectomized animals (see methods), or for in vitro platelet/ASCs interaction challenges (see methods). FAP sorting: muscle-derived SVF were treated as above and used for RNAseq experiments, affymetrix analysis (ctrl or injured), and DNA extraction.

**Platelet isolation.** For platelet isolation, total blood was collected (heparin tubes), centrifuged (5 min, 500  $\times g$ , RT) and the plasma-rich platelets was resuspended in Tyrode's Buffer. Samples were centrifuged for two rounds (1900  $\times g$ , 8 min) and platelets were stained with PKH26 for 5 min at room temperature. After another centrifugation step (1900, 8 min, twice), platelets were resuspended in  $\alpha\text{MEM}$  + 10% NCS (10<sup>6</sup> platelets/mL). Platelets were used for in vitro platelet/ASC interaction challenges.

#### Flow cytometry acquisition and data analysis

To analyze the cellular composition of freshly harvested SVF from ATs or muscles, they were incubated (25 minutes, 4 °C, dark) with Phycoerythrin (PE) CD31 (BD Biosciences #553373), CD45 (BD Biosciences #553081), Allophycocyanin (APC)-Podoplanin (Biolegend #127410) or CD140 $\alpha$  (Biolegend #135908), Fluorescein isothiocyanate (FITC)-CD31 (BD Biosciences #553372), CD45 (BD Biosciences #553080), CD34 (BD Biosciences #553733) or Sca-1 (BD Biosciences #553335), V500- Sca-1 (BD Biosciences #561228) antibodies or the appropriate isotype controls (Rat Isotype PE IgG2a, BD Biosciences #553930; Mouse Isotype APC, Biolegend, #402012; Rat Isotype APC IgG2a, BD Biosciences, #553932; Rat Isotype FITC IgG2a, BD Biosciences, #554688; Rat Isotype BV500 IgG2a, BD Biosciences, #560786) all at dilution 1:100. After washing, the labeled cells were quantified on LSR Fortessa flow cytometer and analyzed using FACSDiva software v9.0.1 (BD Biosciences) and Flowlogic<sup>™</sup> software v7.2.1.

For the phenotypic characterization of ASCs and FAPs associated with T-Distributed Stochastic Neighbor Embedding (*tSNE*) representation, the SVFs were incubated with REA human anti-mouse antibodies (PerCP-Vio700-CD45, PE-CD31, FITC-CD34, PE-Vio770-Sca-1, APC-Vio770-CD140 $\alpha$ , Miltenyi, respectively #130-110-801, #130-111-540, #130-117-775, #130-106-258, #130-125-991), classic rat anti-mouse VioBlue-CD90.2 (Miltenyi, #130-102-345), Viability<sup>™</sup> 405/520 Fixable Dye (Miltenyi, #130-130-404) and rat anti-mouse APC-Podoplanin (Biolegend #127410) and the appropriate isotype controls (Isotype PerCP-Vio700, Miltenyi, #130-113-



453; Isotype PE, Miltenyi, # 130-113-450; Isotype FITC, Miltenyi, #130-113-449; Isotype PE-Vio770, Miltenyi, #130-113-452; Isotype APC-Vio770, Miltenyi, #130-113-447; Rat Isotype VioBlue IgG2b, Miltenyi, #130-102-661) all at dilution 1:100. The cells were quantified on LSR Fortessa flow cytometer and analyzed using Flowjo™ software v10.6, using the tSNE tool.

**Proliferation and cell death tests**

Proliferation in vivo was assessed with the Click Plus Edu 488 Flow Kit (Life Technologies) following the manufacturer's instructions. Briefly, animals were injected IP with Edu (40 mg/g) just after the muscle injury, (i.e., 24 hr before sacrifice, such as described by Lemos et al<sup>9</sup>). Isolated muscle SVF-derived cells were fixed and permeabilized and



**Fig. 7 | The origin of the ASCs reservoir determines muscle regeneration outcome.** **A** Model of bilateral lipectomy and ASC injection. The figure was partly generated using Servier Medical Art, provided by Servier, licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported license. **B** Time course of mRNA expression of myogenic genes in quadriceps muscle from control and Gly-injured animals with and without lipectomy.  $n = 4$  (Ctrl) and 3–4 at 3 dpi, 3–4 at 7 dpi, 3–4 at 14 dpi animals over three independent experiments. **C** Immunohistological confocal images of quadriceps muscles at 7 dpi (Gly +/- platelet depletion). Bar scales 500 (top) and 50 (bottom)  $\mu\text{m}$ . **D** Immunohistological-based quantification of regenerative (WGA centronucleated fibers) muscle fibers at 7 dpi.  $n = 4$  (Ctrl), 6 (Gly), and 9 (Gly-ScAT) animals over three independent experiments. **E** FAP number quantification in Gly-injured or control muscle with or without ScAT lipectomy.  $n = 17$

(Gly), 13 (Ctrl-ScAT), and 11 (Gly-ScAT) animals over five independent experiments. **F** ASC number quantification in Gly-injured or control PGAT with or without ScAT lipectomy.  $n = 6$  (Ctrl), 8 (Gly), 8 (Ctrl-ScAT), and 8 (Gly-ScAT) animals over four independent experiments. **G** Immunohistological confocal images of quadriceps Gly-injured and control muscles at 7 dpi with or without lipectomy. Bar scales 500 (top) and 50 (bottom)  $\mu\text{m}$ . **H** Immunohistological-based quantification of regenerative (WGA centronucleated fibers) muscle fibers at 7 dpi.  $n = 6$  (Gly), 9 (Gly-ScAT), 6 (Gly-ScAT+ASC(ScAT)), and 5 (Gly-ScAT+ASC(PGAT)) animals over five independent experiments. **I** Go term analysis between ScAT and PGAT-derived ASCs. Results are expressed as percentage of control animals with mean  $\pm$  SEM; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  vs Ctrl.

further incubated for 30 min with a Click It reaction cocktail to reveal Edu staining with Alexa Fluor 488 in proliferative cells.

For apoptose/necrose evaluation, In Situ Cell Death Detection Kit (ROCHE) was used following manufacturers' instructions. Shortly, isolated SVF-derived cells were fixed and permeabilized before the TUNEL staining (labeling solution + enzyme) for 1 hour at 37 °C. Stained cells were quantified by flow cytometry on LSR Fortessa (BD Biosciences) and analyzed using FACSDiva v9.0.1 (BD Biosciences) and Flowlogic™ softwares v7.2.1.

#### Clonogenic assay

SVF cells from AT or muscle were plated at 400 cells/cm<sup>2</sup> in 5 mL flasks with  $\alpha$ MEM + 10%NCS + 1% ASP at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>. Medium was totally removed after 24 hours, and then partially changed every 2 days for 11 days. Staining of the CFU-F was performed with RAL stainer MCDh Kit (RAL Diagnostics) following manufacturer's instructions.

#### Adipogenesis assay

SVF cells from AT or muscle were plated at a density of 60 000 cells/cm<sup>2</sup> in  $\alpha$ MEM + 10% NCS at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>. After 24 hours, medium was removed to eliminate the non-adherent cells, and replaced by adipogenic medium ( $\alpha$ MEM, 2% NCS, Dexamethazone 33 nM, Insulin 5 ng/mL, Rosiglitazone 1  $\mu\text{M}$ , T3 10  $\mu\text{M}$ , Transferrin 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). After 4 days of incubation, medium was removed and cells were either fixed for further red oil staining or frozen at -20 °C for RNAs extraction.

#### Cell migration assay

ASCs migration assay was performed using the IncuCyte® S3 Live-Cell Analysis System (v20192.3.7219.27517-1, 2019B Rev2 GUI, Essenbioscience). ASCs were isolated from mice ScAT or human samples as described above and were plated at a density of 2000 cell per well in a 96-well plate including a reservoir and an optically clear membrane insert assembly with laser-etched 8  $\mu\text{m}$  pore. For mice migration assay, the reservoirs were loaded with 200  $\mu\text{l}$  of plasma (50%) obtained from animals injured or not. For human migration assay, the reservoirs were loaded with 200  $\mu\text{l}$  of human serum at 25% from healthy volunteers before or 1 hour after exercise. Cell migration across the pores was automatically quantified for over 30 h or 40 h for human and mouse ASCs respectively. Migration was analyzed via the Incucyte S3 software (Essenbioscience) and area under curves were calculated and compared using GraphPad Prism software v9 (GraphPad Software).

#### Platelet/ASCs interaction assay

Freshly isolated ASCs were plated (80,000 cells/cm<sup>2</sup>) in  $\alpha$ MEM + 10% NCS with 5% CO<sub>2</sub>. At ASCs confluence, 100,000 freshly harvested platelets stained with PKH26 (see above) and originating from ctrl or injured animals were added to ASCs for 1 hour (37 °C, 5%CO<sub>2</sub>). Then, medium was removed, cells were rinsed with phosphate-buffered saline (PBS) and fixed with 3,7% PFA. Nuclei were stained with DAPI. Acquisition and analysis of data were performed with Operetta® system type HH12 (Perkin Elmer). In order to evaluate the role of podoplanin on this cell interaction, anti-Podoplanin blocking antibody

(Abcam, ab11936, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was added to the culture medium on ASCs before platelet addition.

#### Immunohistochemistry

**FAP/ASC immunohistology.** Paraformaldehyde (PFA) (4%) fixed muscles and ScAT were embedded in agarose 2 to 3% for 1 hour and sliced with Vibroslicer® 5100 mz (Campden instruments) (300  $\mu\text{m}$  thick). Samples were permeabilized with Triton X100 (0,2% in PBS) before non-specific antigen saturation with BSA 3% and Goat serum in PBS. Tissue sections were incubated with Goat anti-mouse CD140a (R&D AF1063, 1:100), rabbit anti-mouse CD45 (orb 10328 or sc-53665, 1:100), rat anti-mouse CD31 (BD 550274, 1:100), rat anti-mouse Sca-1 (BD 557403, 1:250), hamster anti-mouse podoplanin (Abcam 11936, 1:250), anti-GFP primary antibodies (Abcam ab1218 1:200) for 24 hours at 4 °C under constant agitation. Several washing with PBS were performed, and then sections were incubated with secondary antibodies (Donkey anti-goat 488/647, donkey anti-rabbit 594, goat anti-rabbit 647, donkey anti-rat 594, chicken anti-rat 647, goat anti-hamster 488/568, all from Invitrogen by ThermoFisher Scientific, respective references A11058, A21447, A21207, A21245, A21209, A21472, A21110, A21112 and used at a dilution of at 1:250) for 8 hours at RT. After several washes, nucleus were stained with DAPI, and images were obtained using ZEISS LSM780 Confocal microscope (Zen Blue v2.3-2) and analyzed with Zen Blue v2.3-2, Fiji v2.1.0-1 and IMARIS® v 8 and 9.9.1 (Bitplane) software.

**Regeneration evaluation.** Mouse muscle samples were cryopreserved in OCT frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane. Samples were then sectioned at 10  $\mu\text{m}$  on a cryostat and post fixed with 4% PFA for 10 min at RT. After antigen retrieval step, slides were incubated with PBS containing Triton 0.5% (10 min, RT) and further permeabilized (TBS, glycine 100 mM, 0.1% Triton X100, 10 min, RT). They were blocked with 2% BSA (1 h, RT), TBS rinsed, and stained overnight with WGA (ThermoFisher, W11261, 1:500) (4 °C, moist chamber). After washing with TBS, sections were soaked for 10 min in DAPI solution and washed once with TBST and TBS before mounting with antifading mounting medium. Images were obtained with ZEISS LSM780 Confocal microscope and analyzed with, Fiji v2.1.0-1 and IMARIS® v8 and v9.9.1 (Bit-plane) software. The size and distribution of myofibers with central nuclei was calculated from WGA-DAPI staining on all fibers of the section and area determination were performed across the entire sections using an automated image processing algorithm (Fiji v2.1.0-1).

**IMCT quantification.** Mouse muscles samples were carefully dissected at 14 dpi and fixed 24 h in PFA (4%). Muscles were then embedded in agarose 3% for 1 hour and sliced longitudinally with Vibroslicer® 5100 mz (Campden instruments) (300  $\mu\text{m}$  thick). Second Harmonic generation (SHG) of collagen fibers imaging was performed on muscle sections with a laser scanning microscope (LSM880; Carl Zeiss GmbH, Jena, Germany) combined with a pulsing titanium sapphire laser (Coherent, vissionII). xyz stacks images were acquired with a  $\times 2.5$  objective (NA0.12, Carl Zeiss, GmbH) with mosaic tile mode to acquire



the entire muscle section. The SHG signal of collagen fibers, and autofluorescence signals were detected at 830 nm excitation wavelength and respectively detected in a range of 408–420 and 446–695 nm. Muscle IMCT deposition was scored by determining the relative area of pixels exhibiting a significant SHG signal of the entire muscle section with a semi-segmentation process using the Fiji distribution (<http://pacific.mpi-cbg.de/wiki/index.php/Fiji>) of ImageJ (ImageJ-win64, Fiji v 2.1.0-1). 5–9 muscle sections were analyzed per animal in order to recapitulate the IMCT deposition of the entire quadriceps muscle.

#### RNA and genomic DNA extraction, and RT-qPCR

Extraction was performed on frozen cells or whole tissues using RNA Extractions Mini kit (QiaGen) following manufacturer's instructions. Briefly, samples were unfrozen in RLT and lysed with tissue lysis<sup>®</sup> (QIAGEN). Samples were passed through columns with washing steps to purify RNAs. Elution was performed with RNase free water, and RNAs concentration was evaluated with Nanodrop<sup>®</sup> 2000c (Thermo Scientific).

Genomic DNA was obtained with QiaAmp DNA Mini Kit (QiaGen) following manufacturer's instructions. Cells were lysed and passed through column to bind DNA, and after two washing steps genomic material was eluted in Elution Buffer. Genomic DNA concentration was measured using n Nanodrop<sup>®</sup> 2000c; and then stored at –20 °C.

For qPCR, RNAs were reverse transcribed using High capacity reverse transcriptase (Invitrogen) and diluted at 50 ng/μL in RNase-free water. Then, qPCR was performed using Fast SYBR<sup>®</sup> Green Mix (Applied Biosystems) on 96/384 wells plate, results were acquired with StepOne v2.3.3 and Vii7 devices (Life Technologies) and data were analyzed with Real-Time qPCR Studio (Life Technologies) using the 2–ΔΔCt method compared to Ctrl condition. All primer sequences are provided in a separate excel file called Supplementary Data 2.

#### RNAseq

Total RNA was extracted using Zymo microprep kit (Ozyme) according to the manufacturer's instructions. RNAseq (paired-end, 125 bp) was carried out by BGI Genomic Services using triplicates for each condition. Raw data were processed as follows. Sequencing reads were first filtered, using fastq Illumina filter v 0.1, and quality control of filtered reads was performed using FastQC v 0.11.9. Filtered reads were then aligned onto the mm10 mouse genome using HISAT2 v 2.2.1 and counts per gene were quantified using featureCounts from Subread package v 2.0.1 on the mm10 transcripts annotation obtained from UCSC genome browser. Differential expression and statistical analyses were performed using DESeq2 v 1.34.0. To compare gene expressions, we used the following cutoffs: LOG2FC > 0.58 and *p* value < 0.05. To generate heatmap, we selected the 3000 most variable genes using idep version 0.96. RNAseq data have been deposited under the accession number GSE214883.

#### Single-cell RNAseq analysis

Data from Oprescu et al.<sup>17</sup> and Malecova et al.<sup>15</sup> were obtained and analyzed using Seurat package v 4.1.1.

#### Human clinical study

Young active men (age 23.3 ± 1.7 years; BMI 23.3 ± 0.4 kg m<sup>-2</sup>; VO<sub>2</sub> max 47.5 ± 1.6 ml kg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>) were recruited to take part in this study. The protocol was approved by the Dublin City University Ethics Committee and conducted in accordance with the criteria set by the Declaration of Helsinki; all subjects gave written informed consent. Participants were instructed to refrain from exercise and to replicate food intake the day before each trial. In the morning, following an overnight fast, participants lay on a bed for 1-hr after arriving at the lab. A blood sample was taken and they then exercised on a bicycle ergometer at 60% VO<sub>2</sub> peak for 1-hr. VO<sub>2</sub> peak was determined on a cycle ergometer starting at 70 watts and increasing in

30-watt increments every 3 minutes until exhaustion. A blood sample was taken at the end of the exercise. The intensity was determined using the results of an incremental exercise test to exhaustion. GDF-15 protein levels in blood samples were determined by ELISA (R&D Systems).

#### Human AT samples

AT was obtained from patients who provided prior written informed consent according to the ethics committees of Toulouse Hospitals. AT was harvested during plastic surgery (abdominoplasty) from three adult patients (female, age 47.6 ± 3.7 years, BMI 26.7 ± 0.9 kg m<sup>-2</sup>) at Rangueil Hospital (part of CHU of Toulouse).

#### Human AT-SVF isolation

Human AT was digested for 45 minutes in α-MEM (GIBCO) containing collagenase (NB4, Coger, 0.4 IU/mL), Dispase II (Roche, 1.6 IU/mL, Basel), in a water-shaking bath at 37 °C. After digestion, an equal volume of α-MEM was added to stop enzymatic digestion. The cells were passed through a 100-μm filter (Steriflip, Millipore, Billerica, MA) and then centrifuged. The pellet was resuspended in α-MEM containing 2% PLP and the total number of cells in the SVF was counted.

#### Statistical analysis

Data are expressed as the mean ± s.e.m. Statistical analyses were performed using Student's *t* test (two-sided paired or unpaired) or one-way ANOVA followed by the post hoc Dunnett's and Tukey's test with GraphPad Prism software v9 (GraphPad Software). *P* values less than \**p* < 0.05; \*\**p* < 0.01 and \*\*\**p* < 0.001 were statistically significant.

#### Reporting summary

Further information on research design is available in the Nature Portfolio Reporting Summary linked to this article.

#### Data availability

Data underlying Fig. 2A–E, H; 3A–C, F–H; 4A–C; 5A, C, E–G; 6B, C, E–H; 7B, C E–H, I are provided as Source Data files. The remaining data and Supplementary Figures are available within the article or from the authors upon reasonable request. Data from the human cohort of exercised patients in this study are not publicly available but can be requested as above. The RNAseq data of primary ASCs and FAPs generated in this study have been deposited in the NCBI's GEO under accession code GSE214883. The single-cell RNAseq data from Oprescu et al.<sup>17</sup> and Malecova et al.<sup>15</sup> reanalyzed to generate Fig. 1E are accessible under accession codes GSE138826 and GSE100474, respectively. Confocal and Two-photon imaging datasets, which are several gigabytes, will be promptly made available upon request but are not immediately available for download due to file size. Source data are provided with this paper.

#### References

1. Chargé, S. B. P. & Rudnicki, M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol. Rev.* **84**, 209–238 (2004).
2. Hawke, T. J. & Garry, D. J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J. Appl. Physiol.* **91**, 534–551 (2001).
3. Mauro, A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9**, 493–495 (1961).
4. Joe, A. W. B. et al. Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat. Cell Biol.* **12**, 153–163 (2010).
5. Uezumi, A., Fukada, S., Yamamoto, N., Takeda, S. & Tsuchida, K. Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat. Cell Biol.* **12**, 143–152 (2010).
6. Wosczyzna, M. N., Biswas, A. A., Cogswell, C. A. & Goldhamer, D. J. Multipotent progenitors resident in the skeletal muscle interstitium

- exhibit robust BMP-dependent osteogenic activity and mediate heterotopic ossification. *J. Bone Min. Res.* **27**, 1004–1017 (2012).
7. Theret, M., Rossi, F. M. V. & Contreras, O. Evolving roles of muscle-resident fibro-adipogenic progenitors in health, regeneration, neuromuscular disorders, and aging. *Front. Physiol.* **12**, 673404 (2021).
  8. Fiore, D. et al. Pharmacological blockage of fibro/adipogenic progenitor expansion and suppression of regenerative fibrogenesis is associated with impaired skeletal muscle regeneration. *Stem Cell Res.* **17**, 161–169 (2016).
  9. 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).
  10. Murphy, M. M., Lawson, J. A., Mathew, S. J., Hutcheson, D. A. & Kardon, G. C. Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration. *Development* **138**, 3625–3637 (2011).
  11. Scott, R. W., Arostegui, M., Schweitzer, R., Rossi, F. M. V. & Underhill, T. M. Hic1 defines quiescent mesenchymal progenitor subpopulations with distinct functions and fates in skeletal muscle regeneration. *Cell Stem Cell* **25**, 797–813.e9 (2019).
  12. Contreras, O. et al. Cross-talk between TGF- $\beta$  and PDGFR $\alpha$  signaling pathways regulates the fate of stromal fibro-adipogenic progenitors. *J. Cell Sci.* **132**, jcs232157 (2019).
  13. Dulauroy, S., Di Carlo, S. E., Langa, F., Eberl, G. & Peduto, L. Lineage tracing and genetic ablation of ADAM12(+) perivascular cells identify a major source of profibrotic cells during acute tissue injury. *Nat. Med.* **18**, 1262–1270 (2012).
  14. Mathew, S. J. et al. Connective tissue fibroblasts and Tcf4 regulate myogenesis. *Development* **138**, 371–384 (2011).
  15. Malecova, B. et al. Dynamics of cellular states of fibro-adipogenic progenitors during myogenesis and muscular dystrophy. *Nat. Commun.* **9**, 3670 (2018).
  16. Stumm, J. et al. Odd skipped-related 1 (Osr1) identifies muscle-interstitial fibro-adipogenic progenitors (FAPs) activated by acute injury. *Stem Cell Res.* **32**, 8–16 (2018).
  17. Opreacu, S. N., Yue, F., Qiu, J., Brito, L. F. & Kuang, S. Temporal dynamics and heterogeneity of cell populations during skeletal muscle regeneration. *iScience* **23**, 100993 (2020).
  18. Gil-Ortega, M. et al. Native adipose stromal cells egress from adipose tissue in vivo: evidence during lymph node activation. *Stem Cells* **31**, 1309–1320 (2013).
  19. Rodeheffer, M. S., Birsoy, K. & Friedman, J. M. Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo. *Cell* **135**, 240–249 (2008).
  20. Tang, W. et al. White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science* **322**, 583–586 (2008).
  21. Gimble, J. M., Bunnell, B. A., Chiu, E. S. & Guilak, F. Concise review: adipose-derived stromal vascular fraction cells and stem cells: let's not get lost in translation. *Stem Cells* **29**, 749–754 (2011).
  22. Galipeau, J. & Sensébé, L. Mesenchymal stromal cells: clinical challenges and therapeutic opportunities. *Cell Stem Cell* **22**, 824–833 (2018).
  23. Arrighi, N. et al. Characterization of adipocytes derived from fibro/adipogenic progenitors resident in human skeletal muscle. *Cell Death Dis.* **6**, e1733 (2015).
  24. Judson, R. N., Zhang, R.-H. H. & Rossi, F. M. Tissue-resident mesenchymal stem/progenitor cells in skeletal muscle: collaborators or saboteurs? *FEBS J.* **280**, 4100–4108 (2013).
  25. Laurens, C. et al. Adipogenic progenitors from obese human skeletal muscle give rise to functional white adipocytes that contribute to insulin resistance. *Int. J. Obes.* **40**, 497–506 (2016).
  26. Gil-Ortega, M., Fernández-Alfonso, M. S., Somoza, B., Castellà, L. & Sengenès, C. Ex vivo microperfusion system of the adipose organ: a new approach to studying the mobilization of adipose cell populations. *Int. J. Obes.* **38**, 1255–1262 (2014).
  27. Grousse, A. et al. The release of adipose stromal cells from subcutaneous adipose tissue regulates ectopic intramuscular adipocyte deposition. *Cell Rep.* **27**, 323–333.e5 (2019).
  28. Crossno, J. T. Jr, Majka, S. M., Grazia, T., Gill, R. G. & Klemm, D. J. Rosiglitazone promotes development of a novel adipocyte population from bone marrow-derived circulating progenitor cells. *J. Clin. Invest.* **116**, 3220–3228 (2006).
  29. Rydén, M. On the origin of human adipocytes and the contribution of bone marrow-derived cells. *Adipocyte* **5**, 312–317 (2016).
  30. Ward, L. S. C. et al. Podoplanin regulates the migration of mesenchymal stromal cells and their interaction with platelets. *J. Cell. Sci.* **132**, jcs222067 (2019).
  31. Hardy, D. et al. Comparative study of injury models for studying muscle regeneration in mice. *PLoS One* **11**, e0147198 (2016).
  32. Sicherer, S. T., Venkatarama, R. S. & Grasman, J. M. Recent trends in injury models to study skeletal muscle regeneration and repair. *Bioengineering* **7**, 76 (2020).
  33. Pannérec, A., Formicola, L., Besson, V., Marazzi, G. & Sassoun, D. A. Defining skeletal muscle resident progenitors and their cell fate potentials. *Development* **140**, 2879–2891 (2013).
  34. Schulz, T. J. et al. Identification of inducible brown adipocyte progenitors residing in skeletal muscle and white fat. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **108**, 143–148 (2011).
  35. van der Maaten, L. & Hinton, G. Visualizing data using t-SNE. *J. Mach. Learn. Res.* **9**, 2579–2605 (2008).
  36. Toghi Eshghi, S. et al. Quantitative comparison of conventional and t-SNE-guided gating analyses. *Front. Immunol.* **10**, 1194 (2019).
  37. Sengenès, C., Lolmède, K., Zakaroff-Girard, A., Busse, R. & Bouloumié, A. Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from the adult mesenchymal and hematopoietic stem cells. *J. Cell. Physiol.* **205**, 114–122 (2005).
  38. Laurens, C. et al. Growth and differentiation factor 15 is secreted by skeletal muscle during exercise and promotes lipolysis in humans. *JCI insight* **5**, e131870 (2020).
  39. Wischhusen, J., Melero, I. & Fridman, W. H. Growth/differentiation factor-15 (GDF-15): from biomarker to novel targetable immune checkpoint. *Front. Immunol.* **11**, 951 (2020).
  40. Gil, C. I. et al. Role of GDF15 in active lifestyle induced metabolic adaptations and acute exercise response in mice. *Sci. Rep.* **9**, 20120 (2019).
  41. Klein, A. B. et al. Pharmacological but not physiological GDF15 suppresses feeding and the motivation to exercise. *Nat. Commun.* **12**, 1041 (2021).
  42. Conte, M. et al. GDF15 plasma level is inversely associated with level of physical activity and correlates with markers of inflammation and muscle weakness. *Front. Immunol.* **11**, 915 (2020).
  43. Johann, K., Kleinert, M. & Klaus, S. The role of GDF15 as a myomimetic. *Cells* **10**, 2990 (2021).
  44. Giuliani, G., Rosina, M. & Reggio, A. Signaling pathways regulating the fate of fibro/adipogenic progenitors (FAPs) in skeletal muscle regeneration and disease. *FEBS J.* **289**, 6484–6517.
  45. Reggio, A. et al. Adipogenesis of skeletal muscle fibro/adipogenic progenitors is affected by the WNT5a/GSK3 $\beta$ -catenin axis. *Cell Death Differ.* **27**, 2921–2941 (2020).
  46. Giuliani, G. et al. SCA-1 micro-heterogeneity in the fate decision of dystrophic fibro/adipogenic progenitors. *Cell Death Dis.* **12**, 122 (2021).
  47. Deepa, S. S. et al. A new mouse model of frailty: the Cu/Zn superoxide dismutase knockout mouse. *GeroScience* **39**, 187–198 (2017).
  48. Nowotschin, S. & Hadjantonakis, A.-K. Use of KikGR a photoconvertible green-to-red fluorescent protein for cell labeling and lineage analysis in ES cells and mouse embryos. *BMC Dev. Biol.* **9**, 49 (2009).



49. Gironce, A. et al. Endogenous mobilization of mesenchymal stromal cells: a pathway for interorgan communication? *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, 598520 (2021).
50. Sheriff, L. et al. Origin-specific adhesive interactions of mesenchymal stem cells with platelets influence their behavior after infusion. *Stem Cells* **36**, 1062–1074 (2018).
51. Teo, G. S. L., Yang, Z., Carman, C. V., Karp, J. M. & Lin, C. P. Intravital imaging of mesenchymal stem cell trafficking and association with platelets and neutrophils. *Stem Cells* **33**, 265–277 (2015).
52. Suzuki-Inoue, K. et al. Involvement of the snake toxin receptor CLEC-2, in podoplanin-mediated platelet activation, by cancer cells. *J. Biol. Chem.* **282**, 25993–26001 (2007).
53. Piñol-Jurado, P. et al. Platelet-derived growth factor BB influences muscle regeneration in duchenne muscle dystrophy. *Am. J. Pathol.* **187**, 1814–1827 (2017).
54. Ceafalan, L. C. et al. Gene expression profile of adhesion and extracellular matrix molecules during early stages of skeletal muscle regeneration. *J. Cell. Mol. Med.* **24**, 10140–10150 (2020).
55. Purslow, P. P. The structure and role of intramuscular connective tissue in muscle function. *Front. Physiol.* **11**, 495 (2020).
56. Contreras, O., Rebolledo, D. L., Oyarzún, J. E., Olguín, H. C. & Brandan, E. Connective tissue cells expressing fibro/adipogenic progenitor markers increase under chronic damage: relevance in fibroblast-myofibroblast differentiation and skeletal muscle fibrosis. *Cell Tissue Res.* **364**, 647–660 (2016).
57. Mahdy, M. A. A. Comparative study of muscle regeneration following cardiotoxin and glycerol injury. *Ann. Anat.* **202**, 18–27 (2015).
58. Sambasivan, R. et al. Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration. *Development* **138**, 3647–3656 (2011).
59. Wosczyzna, M. N. & Rando, T. A. A muscle stem cell support group: coordinated cellular responses in muscle regeneration. *Dev. Cell* **46**, 135–143 (2018).
60. Chazaud, B. Inflammation and skeletal muscle regeneration: leave it to the macrophages! *Trends Immunol.* **41**, 481–492 (2020).
61. Contreras, O., Rossi, F. M. V. & Theret, M. Origins, potency, and heterogeneity of skeletal muscle fibro-adipogenic progenitors—time for new definitions. *Skelet. Muscle* **11**, 16 (2021).
62. Biferalli, B., Proietti, D., Mozzetta, C. & Madaro, L. Fibro-adipogenic progenitors cross-talk in skeletal muscle: the social network. *Front. Physiol.* **10**, 1074 (2019).
63. Dong, Y., Silva, K. A., Dong, Y. & Zhang, L. Glucocorticoids increase adipocytes in muscle by affecting IL-4 regulated FAP activity. *FASEB J.* **28**, 4123–4132 (2014).
64. Contreras, O., Córdova-Casanova, A. & Brandan, E. PDGF-PDGFR network differentially regulates the fate, migration, proliferation, and cell cycle progression of myogenic cells. *Cell. Signal.* **84**, 110036 (2021).
65. Karp, J. M. & Leng Teo, G. S. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell* **4**, 206–216 (2009).
66. Kleinert, M. et al. Exercise increases circulating GDF15 in humans. *Mol. Metab.* **9**, 187–191 (2018).
67. Astarita, J. L., Acton, S. E. & Turley, S. J. C. Podoplanin: emerging functions in development, the immune system, and cancer. *Front. Immunol.* **3**, 283 (2012).
68. Jiang, L. et al. Platelet-mediated mesenchymal stem cells homing to the lung reduces monocrotaline-induced rat pulmonary hypertension. *Cell Transplant.* **21**, 1463–1475 (2012).
69. Uezumi, A. et al. Mesenchymal Bmp3b expression maintains skeletal muscle integrity and decreases in age-related sarcopenia. <https://doi.org/10.1172/JCI1139617> (2021).
70. Heredia, J. E. et al. Type 2 innate signals stimulate fibro/adipogenic progenitors to facilitate muscle regeneration. *Cell* **153**, 376–388 (2013).
71. Lutolf, M. P. & Blau, H. M. Artificial stem cell niches. *Adv. Mater.* **21**, 3255–3268 (2009).
72. Vishvanath, L. & Gupta, R. K. Contribution of adipogenesis to healthy adipose tissue expansion in obesity. <https://doi.org/10.1172/JCI129191> (2019).
73. Stanford, K. I. & Goodyear, L. J. Muscle-adipose tissue cross talk. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **8**, a029801 (2018).

### Acknowledgements

We are grateful to the RESTORE CERT platforms, Marie-Laure Renoud and Jessica Fontaine, for cytometry experiments; Mathieu Vignau for imaging analysis, and Emmanuelle Arnaud for affymetrix gene expression study. We also thank the Cellular Imaging Facility-ICM/TRI platform and Alexia Zakaroff-Girard and Elodie Riant for their helpful assistance. We acknowledge the animal facility US006/ CREFRE/INSERM/UPS. We acknowledge the assistance of Life Science Editors in preparing the final version of this manuscript. This work was financially supported by INSERM, CNRS, Etablissement Français du Sang (EFS), ANR 20-CE19-0010 (CS), AFM-Téléthon PhD grant 23384 (MM), and grant 23263 (AG).

### Author contributions

Q.S.A., M.Mat, A.G., S.M., X.C., M.G.O., C.S. performed experiments, collected and analyzed the data. C.B., C.G., M.A., V.B., C.L., C.M., N.J., M.Mar: provided technical assistance and expertise. B.C., A.V. provided human AT samples. C.M., D.O.G., E.M. designed and performed the clinical study and provided blood samples. L.C.: provided funding and scientific advisory. C.S., A.G.: conceptualization, supervision, funding acquisition, wrote and edited manuscript. C.S.: project management.

### Competing interests

The authors declare no competing interests.

### Additional information

**Supplementary information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41467-022-35524-7>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to Coralie Sengenès.

**Peer review information** *Nature Communications* thanks the anonymous reviewers for their contribution to the peer review of this work.

**Reprints and permissions information** is available at <http://www.nature.com/reprints>

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

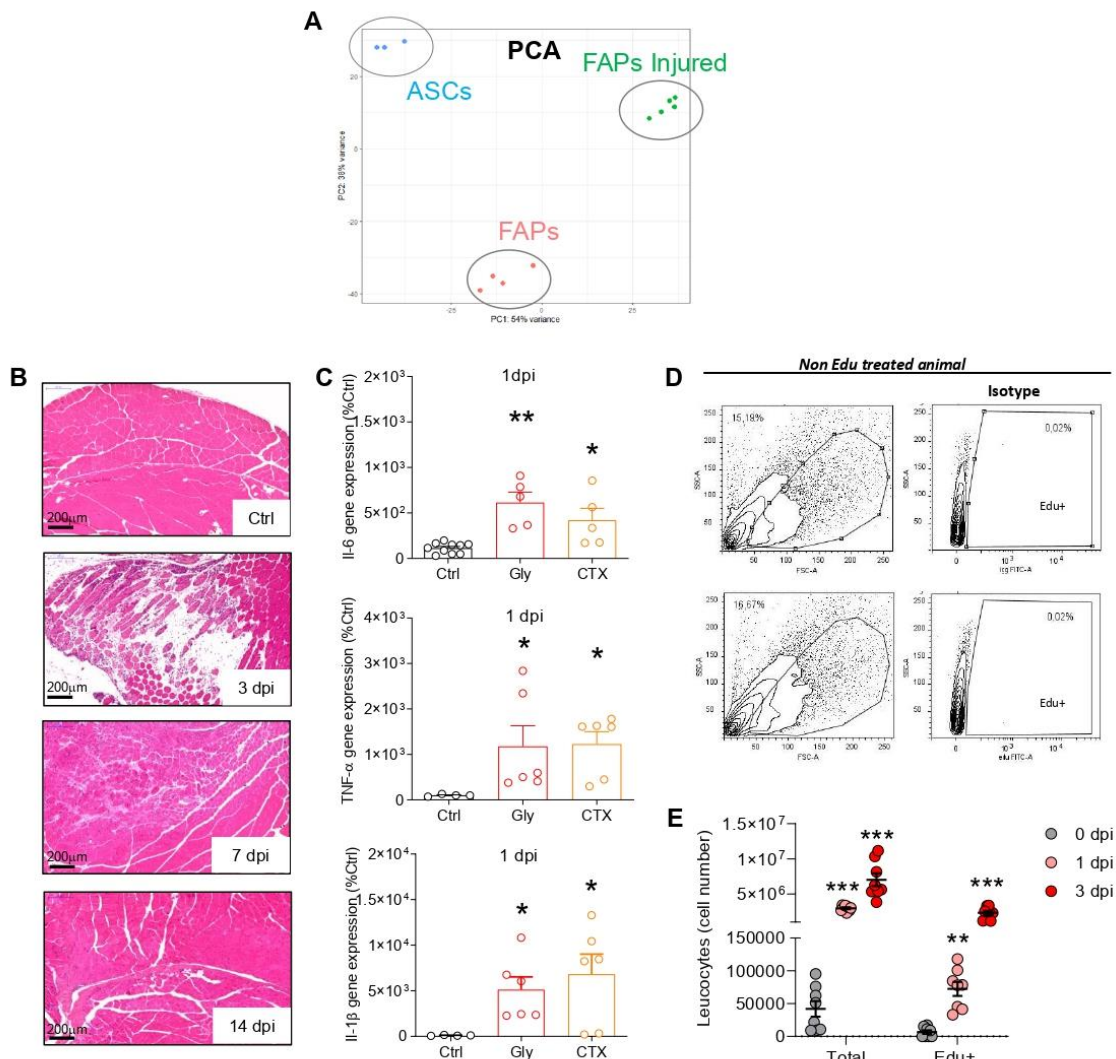
**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the 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) 2023



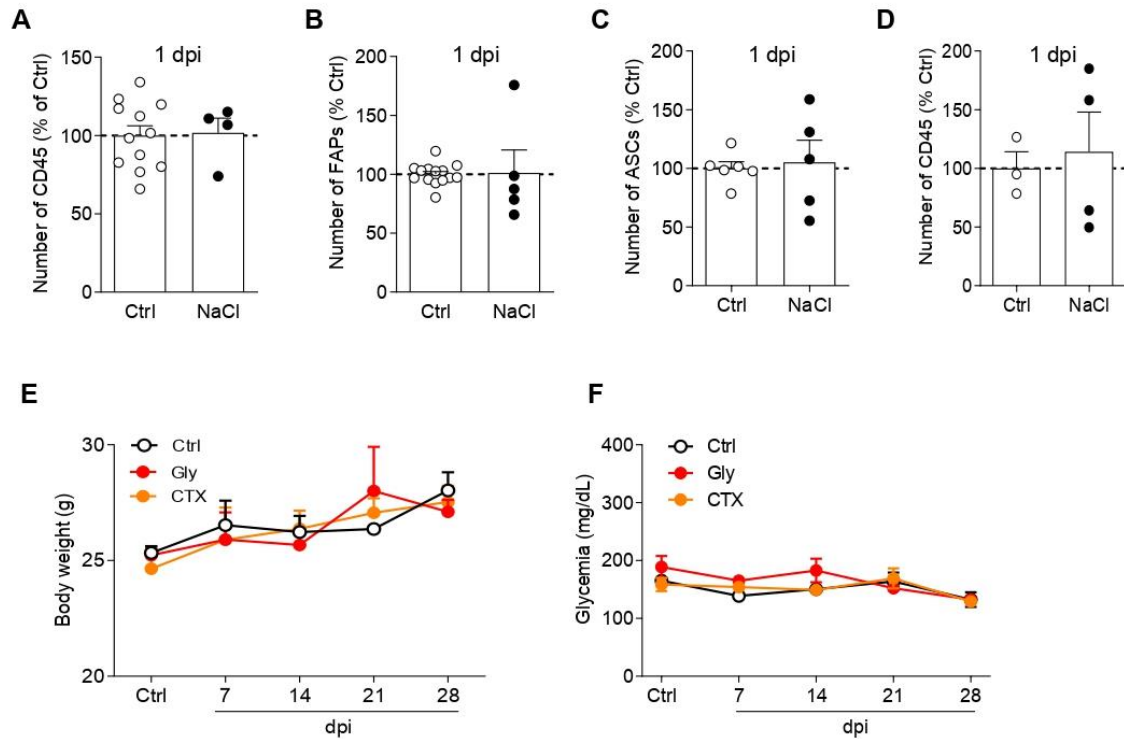
## Supplementary informations.

### Adipose tissue is a source of regenerative cells that augment the repair of skeletal muscle after injury



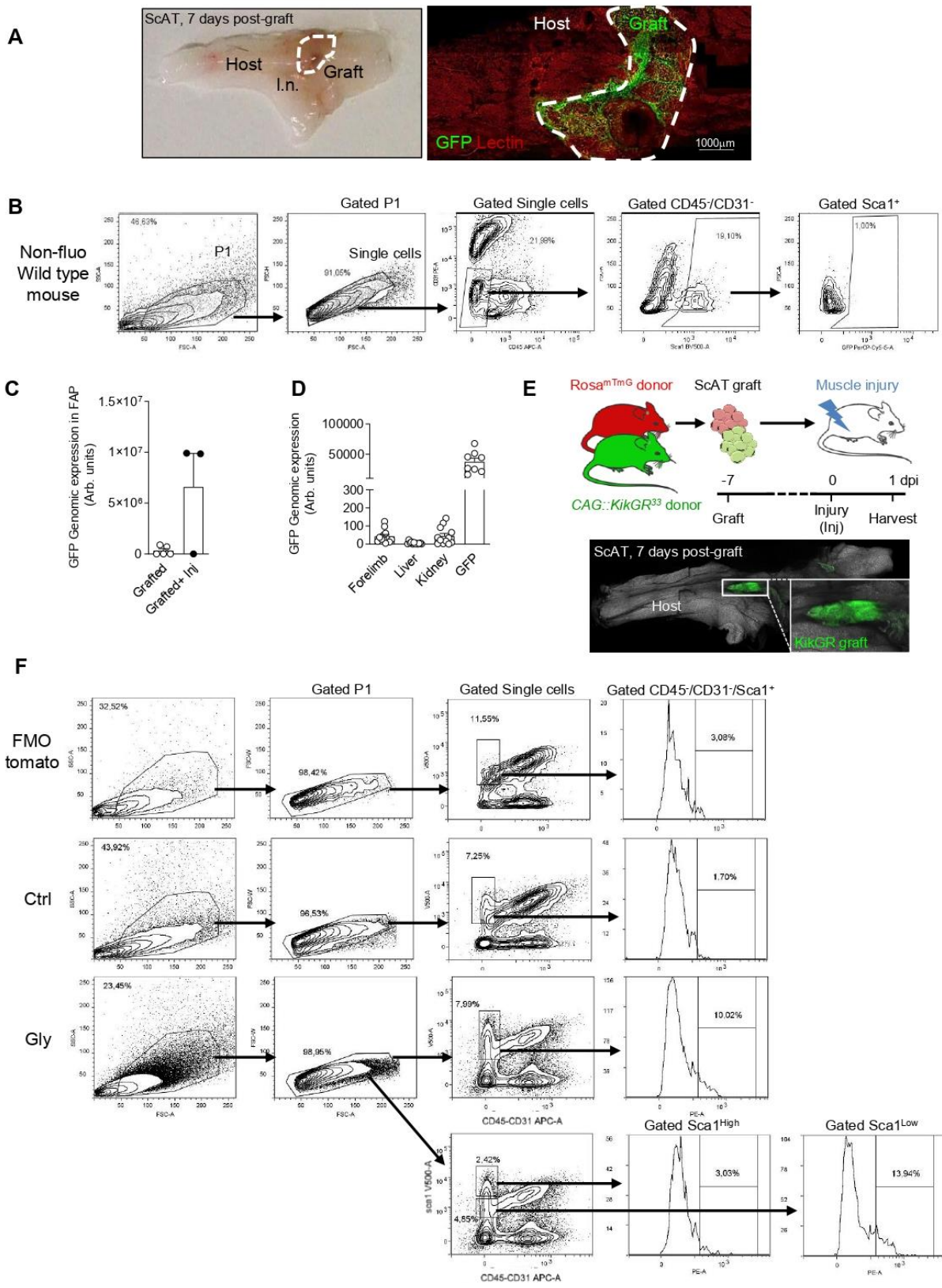
#### Figure S1 : Validation of mouse models of muscle injury

(A) Principal component analysis (PCA) of RNAseq expression values of FAPs and ASCs isolated from injured (1 dpi) and control animals. (B) Representative images of Hemalun-Eosine stained muscles from control uninjured mice (0 dpi) and during muscle regeneration (Gly, 3 to 14 dpi). Regenerating fibers are detected with the presence of centronuclei. Bar scale 200 μm. (C) Expression of proinflammatory cytokines at 1 dpi in injured muscles (Gly, CTX) compared to uninjured muscle (Ctrl). n= 4-10 (Ctrl), 5-6 (Gly or CTX) animals over 4 independent experiments. (D) Representative image of positive and negative gates which were set by analysing isotype or unstained control sample in each analysis. (E) Comparison of *in vivo* EdU incorporation in FAPs by flow cytometry after Gly damage at 1 dpi. n=8 animals at all time points over 3 independent experiments. Results are expressed as mean ± SEM; \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs Ctrl.

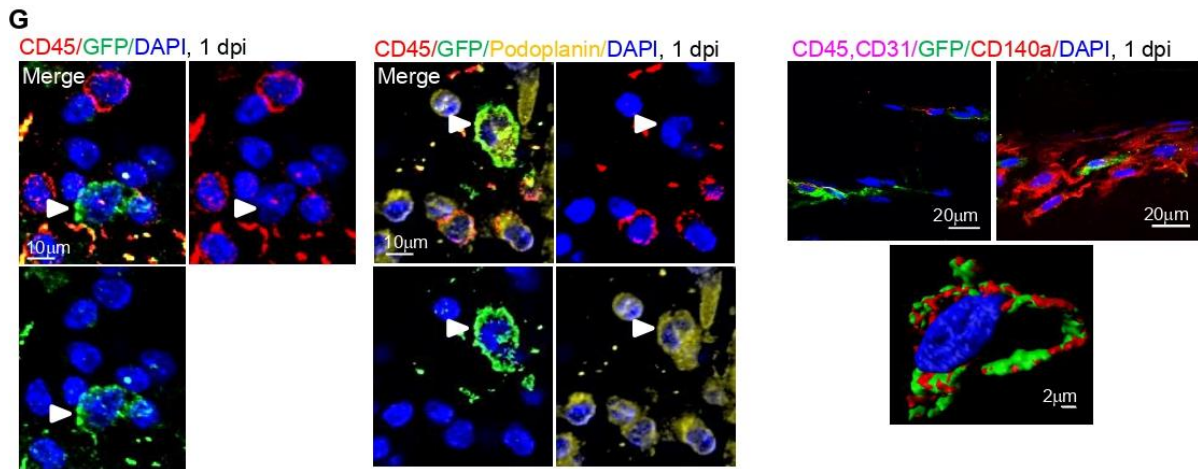


**Figure S2 : Both FAP increase and ASCs decrease are injury-dependent effects and do not modify body weight and glycemia of the animals.**

At 1 dpi with NaCl 0,9% injected in the quadriceps muscle, CD45<sup>+</sup> cells (A) and FAPs (B) were quantified in the muscle by flow cytometry analyses. For A, n= 12(Ctrl), 4 (NaCl) animals of 2 independent experiments. For B, n= 14 (Ctrl), 5 (NaCl) animals of 2 independent experiments. ASCs (C) or CD45<sup>+</sup> (D) cells from the ScAT were quantified by flow cytometry analyses at 1dpi with NaCl 0.9% injection in the quadriceps muscle. For C, n= 6 (Ctrl), 5 (NaCl) animals of 2 independent experiments. For D, n= 3 (Ctrl), 4 (NaCl) animals of 2 independent experiments. Time course of body weight (E) and glycemia (F) in uninjured (Ctrl) or muscle injured (Gly or CTX). For E and F, n=3 animals for all groups at each time point. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical significance is set at  $p \leq 0.05$ .

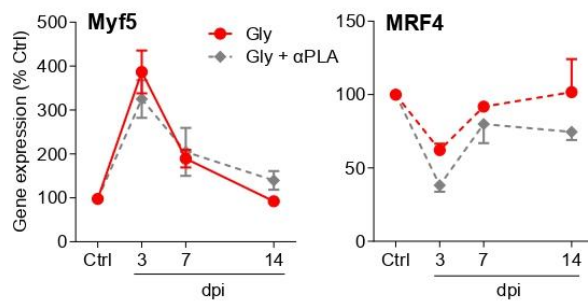




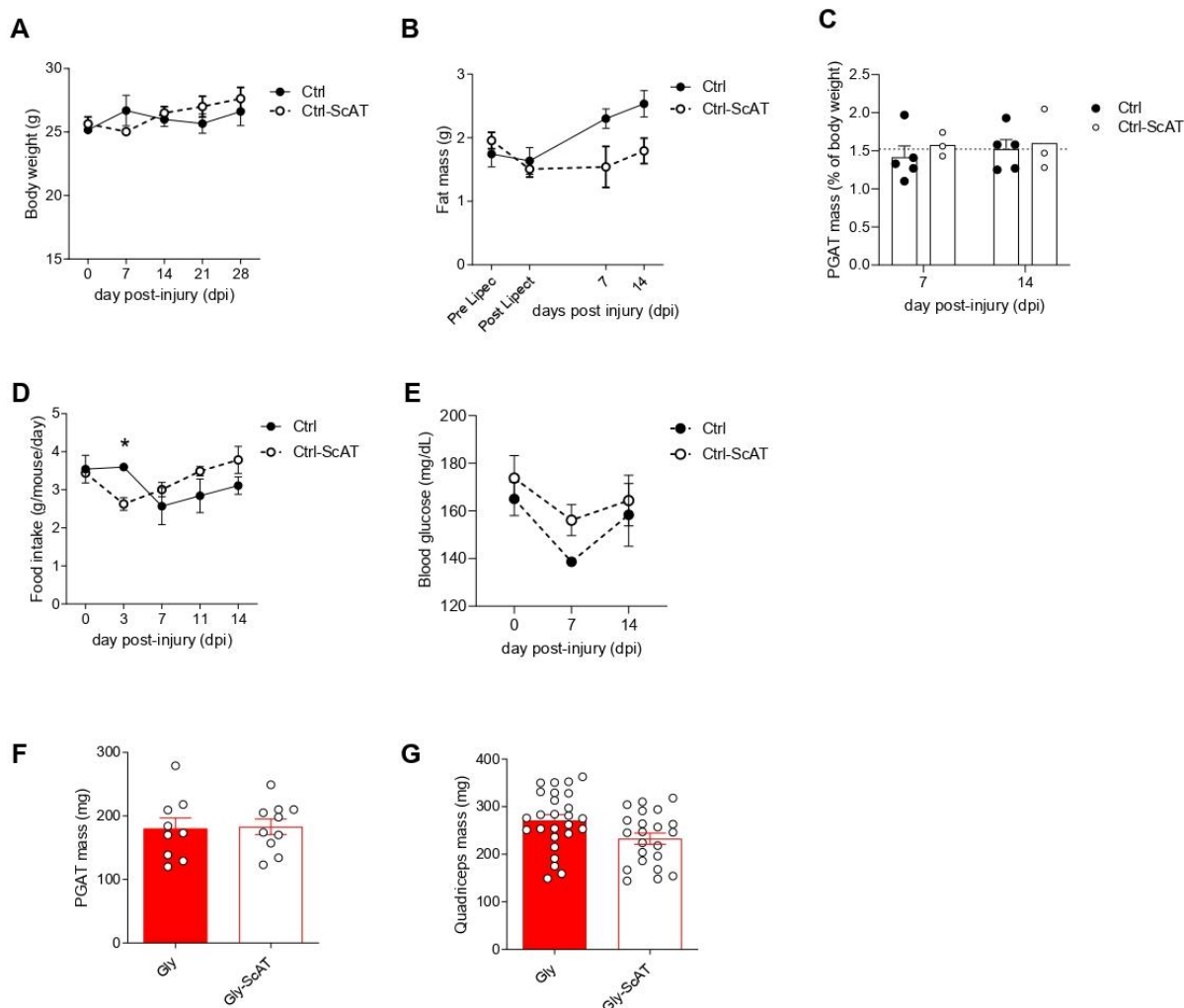


**Figure S3 : Validation of the fat grafting model.**

(A) Representative image of grafted ScAT (delimited by the white dashed line) inserted in the host adipose tissue (left panel). Fluorescent image was performed to visualize functional revascularization with lectin staining (red) injected *in vivo* 7 days after the grafting (right panel). Bar scale : 1 mm. (B) Gating strategy of muscle-derived SVFs from CD34-GFP grafted animals which were glycerol injured (Inj-Gly) or not (Ctrl), here is presented a non-fluorescent animal as an internal cytometry control. (C- D) GFP genomic expression analysis of CD34<sup>+</sup>-GFP cells infiltrated in organs of grafted mice at 1 dpi. For C, n= 5 (grafted) and 3 (grafted+Gly) animals over 2 independent experiments. For D, n=12 (Forelimb, liver and kidney) and 8 (GFP) animals over 4 independent experiments. (E) Model of ScAT grafting from Rpsa26<sup>mT/mG</sup> (red) or CAG:KikGR (green) mouse into WT C57Bl/6 mice, the figure was partly generated using Servier Medical Art, provided by Servier, licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 unported license. (F) Flow cytometry analysis of the SVF from injured muscle of the mT/mG grafted mice (1 dpi). (G) Immunohistological confocal images of injured quadriceps in CD34-GFP grafted mice at 1 dpi *in situ* (arrowheads point CD34-GFP<sup>+</sup>/Podoplanin<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> or CD34-GFP<sup>+</sup>/CD140a<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup> cells). Bar scales, 10 µm (left and middle panels), 20 and 2 µm (right panel). Results are expressed as mean ± SEM. Statistical significance is set at p≤0.05.



**Figure S4 : Effect of platelet depletion on gene expression of early markers of muscle regeneration**  
 (A) Time course expression of myogenic genes in quadriceps muscle from injured animals in the presence (Gly) or absence (Gly + αPL) of platelets. n= 8-14 (Ctrl), 3-9 (Gly), 4-6 (Gly+αPLA) animals over 4 independent experiments. Results are expressed as mean ± SEM. Statistical significance is set at  $p \leq 0.05$ .



**Figure S5: Time courses of body weight (A), fat mass (B), Perigonadal adipose tissue (PGAT) mass (C) food intake (D) and blood glucose (E) in sham control and lipectomied animals up to 28 days post-surgery.**

For A-E, n= 3-5 (Ctrl), 3-9 (Ctrl-ScAT) animals over 3 independent experiments. PGAT (F) and Quadriceps muscle (G) mass in sham and lipectomied animals 1 day post muscle injury with glycerol. For F-G n=9-16 (Ctrl), 10-22 (Ctrl-ScAT) animals over 5 independent experiments.



## Annexe n°2

### Endogenous Mobilization of Mesenchymal Stromal Cells : A Pathway for Interorgan Communication ?

Girousse A, Mathieu M, Sastourné-Arrey Q, Monferran S, Casteilla L, Sengenès C.

Front. Cell Dev. Biol. 08 Jan 2021 doi: 10.3389/fcell.2020.598520



# Endogenous Mobilization of Mesenchymal Stromal Cells: A Pathway for Interorgan Communication?

Amandine Girousse<sup>1†</sup>, Maxime Mathieu<sup>1†</sup>, Quentin Sastourné-Arrey<sup>2</sup>, Sylvie Monferran<sup>1</sup>, Louis Casteilla<sup>1</sup> and Coralie Sengenès<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Stromalab, Université de Toulouse, CNRS ERL5311, EFS, INP-ENVT, INSERM U1031, Université Paul Sabatier, Toulouse, France, <sup>2</sup> Sprott Center for Stem Cell Research, Ottawa Hospital Research Institute, Department of Cellular and Molecular Medicine, University of Ottawa, Ottawa, ON, Canada

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Simone Pacini,  
University of Pisa, Italy

### Reviewed by:

Christopher V. Carman,  
Harvard University, United States  
Julie Fradette,  
Laval University, Canada

### \*Correspondence:

Coralie Sengenès  
coralie.sengenès@inserm.fr

<sup>†</sup> These authors have contributed  
equally to this work

### Specialty section:

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

Received: 24 August 2020

Accepted: 18 November 2020

Published: 08 January 2021

### Citation:

Girousse A, Mathieu M,  
Sastourné-Arrey Q, Monferran S,  
Casteilla L and Sengenès C (2021)  
Endogenous Mobilization  
of Mesenchymal Stromal Cells:  
A Pathway for Interorgan  
Communication?  
Front. Cell Dev. Biol. 8:598520.  
doi: 10.3389/fcell.2020.598520

To coordinate specialized organs, inter-tissue communication appeared during evolution. Consequently, individual organs communicate their states *via* a vast interorgan communication network (ICN) made up of peptides, proteins, and metabolites that act between organs to coordinate cellular processes under homeostasis and stress. However, the nature of the interorgan signaling could be even more complex and involve mobilization mechanisms of unconventional cells that are still poorly described. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) virtually reside in all tissues, though the biggest reservoir discovered so far is adipose tissue where they are named adipose stromal cells (ASCs). MSCs are thought to participate in tissue maintenance and repair since the administration of exogenous MSCs is well known to exert beneficial effects under several pathological conditions. However, the role of endogenous MSCs is barely understood. Though largely debated, the presence of circulating endogenous MSCs has been reported in multiple pathophysiological conditions, but the significance of such cell circulation is not known and therapeutically untapped. In this review, we discuss current knowledge on the circulation of native MSCs, and we highlight recent findings describing MSCs as putative key components of the ICN.

**Keywords:** adipose tissue, native mesenchymal stromal cell, stroma homeostasis, endogenous reservoir, rare cells in circulation

## INTRODUCTION

Each organ is a combination of a functional compartment, the parenchyma, and a stromal compartment, the stroma, supporting the parenchymal cells of the organ (Feedback, 1987). The main function of the stromal compartment is to structure and remodel functional tissue in order to ensure organ homeostasis (Scadden, 2012). In normal tissue, stroma maintains the tissue microenvironment and sustains cell growth in various ways with spatial and temporal self-limitations (Huet et al., 2019). Conversely, stroma imbalance nurtures organ imbalance, which can eventually lead to tumor progression (Valkenburg et al., 2018). Among the cell types residing in the stroma, mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) are key components allowing stroma's supportive function. MSCs attract lots of attention because they hold great promise for a multitude

of emerging therapies in regenerative medicine since they promote tissue repair in various degenerative contexts such as osteoarthritis, bone defects, myocardial infarction, inflammatory bowel disease, or neurodegenerative disorders. As such, they have been the subject of clinical trials for more than 20 years (Galipeau and Sensébé, 2018; Pittenger et al., 2019). MSC identification and characterization rely on *in vitro* work, and long steps of culture are needed to collect a usable amount of cells (Dominici et al., 2006). Culture-expanded MSCs consist of a heterogeneous population of cells exhibiting various phenotypes and functional properties, and the extent of these properties depends on the tissue, donor, and species of origin, isolation technique, and culturing protocols (Ankrum et al., 2014). Such variations are known to limit the potential of MSCs for clinical translation, and strategies to enhance engraftment are needed (Hou et al., 2005; Hénon, 2020).

In the past few years, investigating the endogenous repair mechanisms of injured tissues has paved the way for future “*in situ*” strategies to potentiate the body’s own repair capacity (Andreas et al., 2014). In this regard, pharmacological activation of endogenous stem cell mobilization from either the blood or a tissue-specific niche is a promising approach (Krankel et al., 2011). Consequently, both triggering and controlling the endogenous mobilization of MSCs represent an additional strategy to achieve effective tissue repair and regeneration. In this review, we present the current state of knowledge and unresolved gaps about the circulation of endogenous MSCs and propose MSC interorgan trafficking as a complementary pathway of communication.

## WHAT DO WE KNOW ABOUT THE CIRCULATION OF ENDOGENOUS MESENCHYMAL STEM/STROMAL CELLS?

### Circulating Mesenchymal Stem/Stromal Cells: Myth or Reality?

Studies reporting the mobilization, circulation, and recruitment of endogenous MSCs are sparse and heterogeneous (Roufosse et al., 2004) and generated lots of conflicting results (Ojeda-Urbe et al., 1993; Lazarus et al., 1997; Zvaifler et al., 2000; Wexler et al., 2003). Consequently, the presence of blood circulating MSCs is still debated (Mansilla et al., 2006; Wang et al., 2006; Hoogduijn et al., 2014).

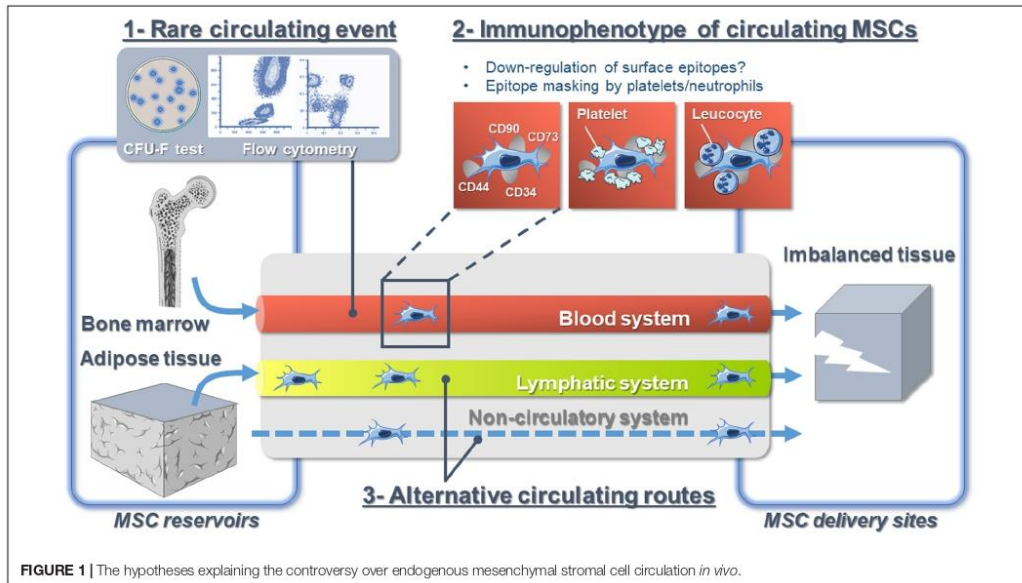
Yet, several studies show that endogenous MSCs are found in the bloodstream of various species, but their frequency is rare [0–0.025 colonies/10<sup>6</sup> of peripheral blood mononuclear cells (He et al., 2007)]. Conversely, the circulation of endogenous MSCs greatly increases in response to various types of injuries. Indeed, skeletal traumas, regardless of their severity (Alm et al., 2010), cardiomyopathies (Marketou et al., 2014, 2015), coronary syndrome (Wojakowski et al., 2008), skin burns (Mansilla et al., 2006), liver damages (Chen et al., 2010; Liu et al., 2015), and some types of cancers (Fernandez et al., 1997; Bian et al., 2009) are some examples of clinical situations triggering this

increase. Whether endogenous MSCs circulate *in vivo* is not a matter of debate anymore but rather a matter of methods of investigation, time frame (Churchman et al., 2020), and clinical context. Such limitations relate to a lack of precise knowledge of functional, phenotypic, and molecular criteria that define endogenous circulating MSCs.

### Immunophenotypic Characteristics of Circulating Endogenous Mesenchymal Stem/Stromal Cells

Despite extensive efforts to characterize MSCs, the definition of *in vivo* identity(ies) of MSCs is still very obscure (Parekkadan and Milwid, 2010). In humans, the canonical MSC surface marker combination CD13<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup>/CD73<sup>+</sup>/CD90<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup>/CD31<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup> directly derives from their *in vitro* culture expansion (Dominici et al., 2006). However, many factors, from the harvesting methodology to the conditions of cell culture, dramatically influence MSC phenotype and functions (Bara et al., 2014; Jones and Schäfer, 2015; Pittenger et al., 2019; Walter et al., 2020). In that regard, we and others have demonstrated that cell surface marker profiles of *in vitro* expanded human MSCs differ compared to freshly isolated cells and those residing in their native microenvironment (Sengenès et al., 2005; Maumus et al., 2011; Bara et al., 2014). In particular, the absence of CD34 is considered among the prerequisites to identify MSCs; however, we have shown that CD34 is strongly expressed in native adipose-derived MSCs and that cell culture abolishes its expression (Sengenès et al., 2005; Maumus et al., 2011). Moreover, though some of the MSC markers appear constitutively expressed regardless of environment (Jones et al., 2006), “immunophenotypic drifts” are expected while MSCs circulate. Indeed, the expression of membrane markers such as CD29, CD44, CD73, and CD90, which all regulate MSC adhesion/migration processes, is known to change dramatically to allow MSC detachment and further migration (Rege and Hagoood, 2006; Ode et al., 2011; Qian et al., 2012; Xu and Li, 2014). Consequently, using flow cytometry analysis with a combination of surface markers (validated *in vitro*) to detect circulating native MSCs may lead to underestimation and generates conflicting results when compared with studies using functional assays to detect MSCs [such as colony-forming unit-fibroblast (CFU-F) activity] (Fellous et al., 2020; **Figure 1**). Indeed, the level of blood circulating CD45<sup>-</sup>/CD271<sup>+</sup> MSCs shows higher correlation to CFU-F numbers than the one of CD45<sup>-</sup>/CD73<sup>+</sup>/CD90<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup> MSCs (Rebolj et al., 2018). This illustrates that understanding MSC heterogeneity holds promise for refining the definition of MSCs. In that regard, the analysis of MSC heterogeneity from various tissue [bone marrow (BM), adipose tissue (AT), skeletal muscle] is under active investigation using single-cell RNA sequencing technologies (Burl et al., 2018; Hepler et al., 2018; Baryawno et al., 2019; Wolock et al., 2019). However, though powerful, those studies will inform about the signature(s) of native tissue-resident MSC subpopulations but will fail for circulating MSCs. Interestingly, high-throughput technology capable of efficiently capturing





without marker-based approach and molecularly interrogating rare cells in the circulation at single-cell resolution is under development to study circulating tumor cells (CTCs) (Cheng et al., 2008). Those technologies will be of great utility both to capture and to enable single-cell transcriptome analysis of rare and limited cell populations of circulating endogenous MSCs.

### How Do Endogenous Mesenchymal Stem/Stromal Cells Navigate in the Bloodstream?

Little is known about the behavior of MSCs in flowing blood, and our current understanding mostly derives from intravascular infused cultured-expanded MSCs from which we could infer the behavior of native MSCs. While circulating MSCs are always considered to be isolated cells floating in the bloodstream, recent studies demonstrated the close interaction of MSCs with the blood microenvironment. Indeed, using *in vivo* confocal microscopy, it has been reported that the majority of intravascular MSCs are in contact with platelets and/or neutrophils (Teo et al., 2015). Additionally, BM-derived MSCs bind platelets that shield them from surface adhesion, so that they barely adhere at all in the blood flow *via* a mechanism involving podoplanin, the endogenous ligand for C-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2) (Sheriff et al., 2018; Ward et al., 2019). CLEC-2 is being expressed broadly, including in platelets, inflammatory leukocytes, and lymphatic endothelial cells. Moreover, platelet depletion decreases MSC trafficking to sites of injury (Langer et al., 2009; Teo et al., 2015). Platelet functions extend beyond the immediate environment of the

thrombus (Golebiewska and Poole, 2015). For instance, they play important roles for tissue regeneration (Eisinger et al., 2018), and they also contribute to tumor metastasis (Teshfamiariam, 2016). Indeed, it is admitted that CTCs are partly covered with platelets to provide them with “stealth” properties and help their survival in the circulation, where they are challenged by physical forces in the circulation (Nieswandt et al., 1999; Heeke et al., 2019). Whether circulating endogenous MSCs are not single cells traveling the blood alone but are accompanied by other cell types and partners possibly modifying their immunophenotype needs more investigations (Figure 1). However, targeting the interaction of MSCs with other cells is a promising tool and future research to improve endogenous MSC detection, collection, and trafficking.

### What if Not Just the Blood?

The peripheral blood is considered as the *bona fide* route for native MSC trafficking (He et al., 2007). Indeed, the detection of blood-borne CFU-Fs was earlier (Maximow, 1928) than the detection of BM CFU-Fs (Friedenstein et al., 1968, 1970). However, it is well established that some types of stem cells such as hematopoietic stem cells recirculate daily between the BM and the blood and egress to extramedullary tissues *via* the lymphatic system (Massberg et al., 2007). Until a few years ago, the composition of the lymphatic fluid was virtually unknown. This lack of knowledge was mostly due to the technical difficulty in cannulating lymphatic vessels and the small amount of collected fluid. Over time, some of these technical issues have been resolved, and as such, lymph “omic” composition in physiological and pathological conditions received a lot of

attention (Santambrogio, 2018). However, the precise cellular composition of lymph is still obscure, and immune cell transit was mostly investigated (Platt and Randolph, 2013). Yet, we have demonstrated that MSCs originating from AT, the ASCs (Zuk et al., 2001; Gimble and Guilak, 2003), are found in the lymph fluid in response to lymph node inflammation (Gil-Ortega et al., 2013). Other studies indicate that systemically infused MSCs can be found in secondary lymphoid organs [e.g., mesenteric lymph nodes after intracardiac infusion (Li et al., 2012), lymph nodes, Peyer patches, spleen (Schwarz et al., 2014)]. Interestingly, Han et al. (2020) very recently reported the presence of lots of circulating cells able to form spheroids in the thoracic duct of a mouse model of melanoma, though distant metastases were not developed. Altogether, those data suggest that as cancer cells do, MSCs may exploit several bodily fluid systems as natural transportation routes (Follain et al., 2020; **Figure 1**).

Whether the clinical context, fluid biomechanics, and tissue microenvironment have a role in the initial choice of the fluid route is unknown. As well, accessibility of blood and lymphatic vasculature may strongly influence the pathway taken for MSCs to transit. Finally, flow velocities and shear stress are lower in lymphatic vessels (Dixon et al., 2006), and lymphatic dissemination has been suggested as less deleterious than dissemination through the blood for some type of cancer cells (Wong and Hynes, 2006). Lymph fluid could thus represent a more favorable route for MSCs since their survival may benefit from the passive, low-shear system of fluid transport characteristic of lymphatics. Consequently, an improved understanding of this process might provide a new avenue for targeting MSC transit and might explain conflicting results. At last, the fibroblastic nature of MSCs allows considering extra-circulatory alternative routes, such as connective tissues, for MSC mobilization (**Figure 1**). The potential for such trafficking events, putative mechanisms, and potential functional roles represents important questions for future investigation.

### WHICH PHYSIOLOGICAL RESERVOIRS MAY BE MOBILIZED?

MSCs reside in virtually all postnatal organs and tissues; however, not all organs contain the same amount of MSCs (da Silva Meirelles et al., 2006; Crisan et al., 2009). BM is generally considered as the major reservoir of mobilizable MSCs (Koh et al., 2007; Koning et al., 2013). Nevertheless, together with the absence of unique specific markers, the lack of MSC tissue-specific markers impairs the parallel analysis of various physiological reservoirs. Consequently, it is very likely that the role played by extramedullary organs in participating in the pool of circulating endogenous MSCs is underestimated. Indeed, AT is a large source of MSCs, named ASCs (Zuk et al., 2001; Gimble and Guilak, 2003). The uncultured stroma-vascular fraction (SVF) from AT usually contains up to 30% of ASCs. This is 2,500-fold more than the frequency found in BM (Fraser et al., 2008; Baer and Geiger, 2012). Consequently, AT represents so far the largest physiological reservoir of MSCs.

In the attempt of investigating to what extent AT contributes to the pool of circulating endogenous MSCs, we and others have shown that endogenous ASCs are mobilizable and that such mobilization is triggered in response to various types of stresses from inflammation to fat overload (Zhang et al., 2009; Kolonin, 2012; Gil-Ortega et al., 2013, 2014; Girousse et al., 2019). Consequently, AT also largely accounts for the pool of circulating endogenous MSCs, but animal models are still needed to clearly evaluate the respective part played by BM vs. AT.

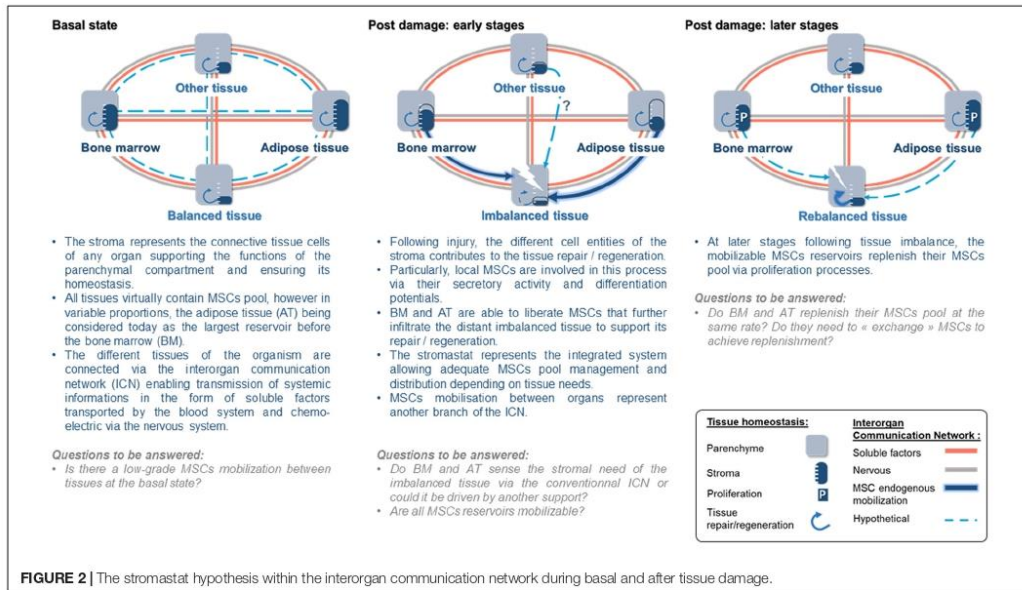
### WHY DO ENDOGENOUS MESENCHYMAL STEM/STROMAL CELLS CIRCULATE?

Whatever the reservoir, circulating endogenous MSCs belong to the group of blood-circulating rare cell populations, classified by Schreier and Triampo (2020) into “constructive” and “destructive” cell types. MSCs are mostly considered as constructive cell types because of their repair and/or homeostasis maintenance properties. The current knowledge on the functional roles of MSCs mainly relies on studies using *in vitro*-expanded MSCs (Keating, 2012; Galipeau and Sensebé, 2018; Pittenger et al., 2019). The struggles in clearly defining native MSCs negatively influence advancement in understanding their role(s) *in vivo* and what is more the role of their circulation. Last, since MSCs virtually reside in all postnatal organs and tissues (da Silva Meirelles et al., 2006; Crisan et al., 2009), one may wonder why MSCs circulate toward distant “injured/inflamed” sites, while resident ones could perform the same activities.

### The Interorgan Communication Network

The long-term maintenance of an organism's homeostasis and health relies on the accurate regulation of organ-organ communication (Silverthorn et al., 2009). To do so, the central nervous system regulates many organ behaviors using hormones or neurons and organs developed systems to directly communicate their states to one another. This interorgan communication network (ICN) is made up of soluble factors such as peptides, proteins, and metabolites that act between organs to coordinate essential and specialized cellular processes under homeostasis and stress (Droujinine and Perrimon, 2016; **Figure 2**). Recent studies show that more than 15% of the protein-coding genome encodes for roughly 3,000 secreted proteins, but only a handful of them has been properly annotated (Uhlen et al., 2010; Lindskog, 2015). Consequently, the nature of the ICN remains largely a mystery (Droujinine and Perrimon, 2013). The interorgan communication is seen to occur through secreted molecules; however, accumulating data show that organs communicate their state *via* other ways. For instance, extracellular vesicles (EVs) have emerged as a novel messaging system of the organism, mediating cell-cell and interorgan communication (Gould et al., 2003). EVs are secreted membranous structures, entrapping nucleic acids, diverse cellular proteins, and metabolites, and are predicted to transfer their packaged molecules from one cell to another (Gould et al., 2003). EVs traffic to local or distant targets to execute defined biological





functions (Théry et al., 2009; Thomou et al., 2017; Margolis and Sadovsky, 2019). Consequently, the ICN encompasses other modes of communication than secreted molecules, and as such, whether the circulation of MSCs is a way of communication between organs needs to be considered.

### Circulating Mesenchymal Stem/Stromal Cells, a Way to Communicate Between Bodily Stromas

As stated above, the stromal compartment of each organ structures, nurtures, and remodels the functional compartment to ensure organ homeostasis. MSCs, being a central cellular component of bodily stromas, can be viewed as stroma “sentinel,” sensing stromal state and ultimately the organ state. The following scenario regarding the role of circulating endogenous MSCs may be proposed.

Just as suggested for the regulation of body temperature or AT mass in the form of thermostat and adipostat, respectively, bodily stromas could be regulated by a set point to ensure the organism’s homeostasis that we will name here the “stromastat.” Organ failure leading to stromastat modification could be detected by resident MSCs and trigger the early and rapid transfer from MSC reservoirs to the failing organ. This early transfer of MSCs would support the resident pool of MSCs to allow the rebalance of the failing organ. In parallel, to ensure stromastat, data report that the mobilized reservoir may be replenished (Koning et al., 2013; Figure 2). Thus, a possible answer to the meaning of MSC circulation could be that MSCs may represent the cellular part of the ICN. Indeed, evidence that MSCs may belong to the ICN is accumulating. For instance, following organ

imbalance (e.g., inflammation, metabolic stress), we observed that ASCs transfer very early from AT toward inflamed lymph nodes (Gil-Ortega et al., 2013) or injured/remodeling skeletal muscle (Girousse et al., 2019). Similar results were also reported for BM-derived MSCs in response to other inflammatory/injury contexts such as myocardial infarction (Fukuda and Fujita, 2005), cranio cerebral trauma (Deng et al., 2011), and encephalomyelitis (Koning et al., 2013). Interestingly, independently of the clinical context or the reservoir investigated, the common point of those studies is the kinetic with which MSCs transfer from their reservoir to the unbalanced site. Such interorgan MSC transfer involves few amounts of cells when compared to the pool of local MSCs. However, we and others have demonstrated that, though discrete, such infiltration dramatically impacts the fate of the organ repair/regeneration/remodeling (Kumar and Ponnazhagan, 2012; Hu et al., 2013; Koning et al., 2013; Girousse et al., 2019). In addition to this, the impact of this rare MSC population could be amplified by the production of EVs, like an inverted funnel effect.

### CONCLUSION AND PERSPECTIVES

Both the mobilization and circulation of endogenous MSCs in physiology and pathology are undoubtful as seen in the present review. However, there are still several questions to be resolved before understanding the meaning of such circulation. One can argue that this is merely explainable because of current available technologies and lack of MSC-specific markers. Indeed, being a population of rare cells in the blood, we have only scratched the surface of the potential of circulating MSCs in



diagnostics and regenerative medicine. It appears that in case of “emergency,” MSCs traffic from adipose or BM reservoir toward distant “injured/inflamed/imbalance” organs where infiltrated MSCs trigger local mechanisms to allow repair/regeneration. In return, the MSC provider replenishes its own reservoir so that both compartments balance their respective MSC pools, suggesting the presence of a set point that we suggested to name the “stromastat” (Figure 2). How the stromastat regulates organ responses to various stresses and pathological contexts is completely unexplored. This interorgan way of communication may be an unsuspected source of therapeutic targets to help in maintaining whole-organism homeostasis. At last, a better understanding of the control of endogenous MSC circulation, including the description of mobilization and attraction mechanisms, will represent an essential step that will condition their therapeutic potential.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors contributed to the design and writing of the manuscript. AG, MM, QS-A, SM, and LC proofread and given comments as well as suggestions. AG designed all the figures. CS supervised and finalized the manuscript.

## FUNDING

Funding supported from the INSERM: French National Research Health Institute, CNRS: French National Research Institute, the University of Toulouse, the FRM (ING20140129326): Fondation pour la recherche médicale, the AFM-TELETHON (23384): Association Française pour la Myopathie, Téléthon.

## REFERENCES

- Alm, J. J., Koivu, H., Heino, T. J., Hentunen, T. A., Laitinen, S., and Aro, H. T. (2010). Circulating plastic adherent mesenchymal stem cells in aged hip fracture patients. *J. Orthop. Res.* 28, 1634–1642. doi: 10.1002/jor.21167
- Andreas, K., Sittiger, M., and Ringe, J. (2014). Toward in situ tissue engineering: chemokine-guided stem cell recruitment. *Trends Biotechnol.* 32, 483–492. doi: 10.1016/j.tibtech.2014.06.008
- Ankrum, J. A., Ong, J. F., and Karp, J. M. (2014). Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. *Nat. Biotechnol.* 32, 252–260. doi: 10.1038/nbt.2816
- Baer, P. C., and Geiger, H. (2012). Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. *Stem Cells Int.* 2012, 812693. doi: 10.1155/2012/812693
- Bara, J. J., Richards, R. G., Alini, M., and Stoddart, M. J. (2014). Concise review: bone marrow-derived mesenchymal stem cells change phenotype following in vitro culture: implications for basic research and the clinic. *Stem Cells* 32, 1713–1723. doi: 10.1002/stem.1649
- Baryawno, N., Przybylski, D., Kowalczyk, M. S., Kfoury, Y., Severe, N., Gustafsson, K., et al. (2019). A cellular taxonomy of the bone marrow stroma in homeostasis and Leukemia. *Cell* 177, 1915–1932.e16. doi: 10.1016/j.cell.2019.04.040
- Bian, Z.-Y., Li, G., Gan, Y.-K., Hao, Y.-Q., Xu, W.-T., and Tang, T.-T. (2009). Increased number of mesenchymal stem cell-like cells in peripheral blood of patients with bone sarcomas. *Arch. Med. Res.* 40, 163–168. doi: 10.1016/j.arcmed.2009.01.002
- Burl, R. B., Ramseyer, V. D., Rondini, E. A., Pique-Regi, R., Lee, Y.-H., and Granneman, J. G. (2018). Deconstructing adipogenesis induced by  $\beta$ -adrenergic receptor activation with single-cell expression profiling. *Cell Metab.* 28, 300–309.e4. doi: 10.1016/j.cmet.2018.05.025
- Chen, Y., Xiang, L.-X. X., Shao, J.-Z. Z., Pan, R.-L. L., Wang, Y.-X. X., Dong, X.-J. J., et al. (2010). Recruitment of endogenous bone marrow mesenchymal stem cells towards injured liver. *J. Cell. Mol. Med.* 14, 1494–1508. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00912.x
- Cheng, Y., Samia, A. C., Meyers, J. D., Panagopoulos, I., Fei, B., and Burda, C. (2008). Highly efficient drug delivery with gold nanoparticle vectors for in vivo photodynamic therapy of cancer. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 10643–10647. doi: 10.1021/ja801631c
- Churchman, S. M., Jones, E. A., Roshdy, T., Cox, G., Boxall, S. A., McGonagle, D., et al. (2020). Transient existence of circulating mesenchymal stem cells in the deep veins in humans following long bone intramedullary reaming. *J. Clin. Med.* 9, 968. doi: 10.3390/jcm9040968
- Crisan, M., Chen, C. W., Corselli, M., Andriolo, G., Lazzari, L., and Peault, B. (2009). Perivascular multipotent progenitor cells in human organs. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1176, 118–123. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04967.x
- da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P. C., and Nardi, N. B. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J. Cell Sci.* 119, 2204–2213. doi: 10.1242/jcs.02932
- Deng, J., Zou, Z., Zhou, T., Su, Y., Ai, G., Wang, J., et al. (2011). Bone marrow mesenchymal stem cells can be mobilized into peripheral blood by G-CSF in vivo and integrate into traumatically injured cerebral tissue. *Neurol. Sci.* 32, 641–651. doi: 10.1007/s10072-011-0608-2
- Dixon, J. B., Greiner, S. T., Gashev, A. A., Cote, G. L., Moore, J. E., and Zawieja, D. C. (2006). Lymph flow, shear stress, and lymphocyte velocity in rat mesenteric prenodal lymphatics. *Microcirculation* 13, 597–610. doi: 10.1080/10739680600893909
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., et al. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315–317. doi: 10.1080/14653240600855905
- Droujinine, I., and Perrimon, N. (2013). Defining the interorgan communication network: systemic coordination of organismal cellular processes under homeostasis and localized stress. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3:82. doi: 10.3389/fcimb.2013.00082
- Droujinine, I. A., and Perrimon, N. (2016). Interorgan communication pathways in physiology: focus on *Drosophila*. *Annu. Rev. Genet.* 50, 539–570. doi: 10.1146/annurev-genet-121415-122024
- Eisinger, F., Patzelt, J., and Langer, H. F. (2018). The platelet response to tissue injury. *Front. Med.* 5:317. doi: 10.3389/fmed.2018.00317
- Feedback, D. L. (1987). “Organs and systems,” in *Histology Oklahoma Notes*, ed. D. L. Feedback (New York, NY: Springer), 89–190. doi: 10.1007/978-1-4612-4630-5\_3
- Fellous, T. G., Redpath, A. N., Fleischer, M. M., Gandhi, S., Hartner, S. E., Newton, M. D., et al. (2020). Pharmacological tools to mobilise mesenchymal stromal cells into the blood promote bone formation after surgery. *NPJ Regen. Med.* 5:3. doi: 10.1038/s41536-020-0088-1
- Fernandez, M., Simon, V., Herrera, G., Cao, C., Del Favero, H., and Minguell, J. J. (1997). Detection of stromal cells in peripheral blood progenitor cell collections from breast cancer patients. *Bone Marrow Transplant.* 20, 265–271. doi: 10.1038/sj.bmt.1700890
- Follain, G., Hermann, D., Harlepp, S., Hyenne, V., Osmani, N., Warren, S. C., et al. (2020). Fluids and their mechanics in tumour transit: shaping metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 20, 107–124. doi: 10.1038/s41568-019-0221-x
- Fraser, J. K., Zhu, M., Wulur, I., and Alfonso, Z. (2008). Adipose-derived stem cells. *Methods Mol. Biol.* 449, 59–67. doi: 10.1007/978-1-60327-169-1\_4
- Friedenstein, A. J., Chaiakhjan, R. K., and Lalykina, K. S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 3, 393–403. doi: 10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x
- Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V., Kurolesova, A. I., and Frolova, G. P. (1968). Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 6, 230–247.
- Fukuda, K., and Fujita, J. U. N. (2005). Mesenchymal, but not hematopoietic, stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial

- infarction in mice. *Kidney Int.* 68, 1940–1943. doi: 10.1111/j.1523-1755.2005.00624.x
- Galipeau, J., and Sensébé, L. (2018). Mesenchymal stromal cells: clinical challenges and therapeutic opportunities. *Cell Stem Cell* 22, 824–833. doi: 10.1016/j.stem.2018.05.004
- Gil-Ortega, M., Fernández-Alfonso, M. S., Somoza, B., Castilla, L., and Sengenès, C. (2014). Ex vivo microperfusion system of the adipose organ: a new approach to studying the mobilization of adipose cell populations. *Int. J. Obes. (Lond.)* 38, 1255–1262. doi: 10.1038/ijo.2013.243
- Gil-Ortega, M., Garidou, L., Barreau, C., Maumus, M., Breasson, L., Tavernier, G., et al. (2013). Native adipose stromal cells egress from adipose tissue in vivo: evidence during lymph node activation. *Stem Cells* 31, 1309–1320. doi: 10.1002/stem.1375
- Gimble, J. M., and Guilak, F. (2003). Differentiation potential of adipose derived adult stem (ADAS) cells. *Curr. Top. Dev. Biol.* 58, 137–160. doi: 10.1016/s0070-2153(03)58005-x
- Girousse, A., Gil-Ortega, M., Bourlier, V., Bergeaud, C., Sastourné-Arrey, Q., Moro, C., et al. (2019). The release of adipose stromal cells from subcutaneous adipose tissue regulates ectopic intramuscular adipocyte deposition. *Cell Rep.* 27, 323–333.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2019.03.038
- Golebiewska, E. M., and Poole, A. W. (2015). Platelet secretion: from haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev.* 29, 153–162. doi: 10.1016/j.blre.2014.10.003
- Gould, S. J., Booth, A. M., and Hildreth, J. E. K. (2003). The Trojan exosome hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 10592–10597. doi: 10.1073/pnas.1831413100
- Han, M., Watts, J. A., Jamshidi–Parsian, A., Nadeem, U., Siegel, E. R., Zharov, V. P., et al. (2020). Lymph liquid biopsy for detection of cancer stem cells. *Cytometry Part A* doi: 10.1002/cyto.a.24221. [Epub ahead of print].
- He, Q., Wan, C., and Li, G. (2007). Concise review: multipotent mesenchymal stromal cells in blood. *Stem Cells* 25, 69–77. doi: 10.1634/stemcells.2006-0335
- Hecke, S., Mograbi, B., Alix-Panabières, C., and Hofman, P. (2019). Never travel alone: the crosstalk of circulating tumor cells and the blood microenvironment. *Cells* 8:714. doi: 10.3390/cells8070714
- Hénon, P. (2020). Key success factors for regenerative medicine in acquired heart diseases. *Stem Cell Rev. Rep.* 16, 441–458. doi: 10.1007/s12015-020-09961-0
- Hepler, C., Shan, B., Zhang, Q., Henry, G. H., Shao, M., Vishvanath, L., et al. (2018). Identification of functionally distinct fibro-inflammatory and adipogenic stromal subpopulations in visceral adipose tissue of adult mice. *Elife* 7:e39636. doi: 10.7554/eLife.39636
- Hoogduijn, M. J., Versteegen, M. M. A., Engela, A. U., Korevaar, S. S., Roemeling-van Rhijn, M., Merino, A., et al. (2014). No evidence for circulating mesenchymal stem cells in patients with organ injury. *Stem Cells Dev.* 23, 2328–2335. doi: 10.1089/scd.2014.0269
- Hou, D., Youssef, E. A.-S., Brinton, T. J., Zhang, P., Rogers, P., Price, E. T., et al. (2005). Radiolabeled cell distribution after intramyocardial, intracoronary, and interstitial retrograde coronary venous delivery: implications for current clinical trials. *Circulation* 112, 1150–1156. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.526749
- Hu, C., Yong, X., Li, C., Lü, M., Liu, D., Chen, L., et al. (2013). CXCL12/CXCR4 axis promotes mesenchymal stem cell mobilization to burn wounds and contributes to wound repair. *J. Surg. Res.* 183, 427–434. doi: 10.1016/j.jss.2013.01.019
- Huet, E., Jaroz, C., Nguyen, H. Q., Belkacemi, Y., de la Taille, A., Stavrinides, V., et al. (2019). Stroma in normal and cancer wound healing. *FEBS J.* 286, 2909–2920. doi: 10.1111/febs.14842
- Jones, E., and Schäfer, R. (2015). Biological differences between native and cultured mesenchymal stem cells: implications for therapies. *Methods Mol. Biol.* 1235, 105–120. doi: 10.1007/978-1-4939-1785-3\_10
- Jones, E. A., English, A., Kinsey, S. E., Straszynski, L., Emery, P., Ponchel, F., et al. (2006). Optimization of a flow cytometry-based protocol for detection and phenotypic characterization of multipotent mesenchymal stromal cells from human bone marrow. *Cytometry B Clin. Cytom.* 70, 391–399. doi: 10.1002/cyto.b.20118
- Keating, A. (2012). Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem Cell* 10, 709–716. doi: 10.1016/j.stem.2012.05.015
- Koh, Y. J., Kang, S., Lee, H. J., Choi, T. S., Lee, H. S., Cho, C. H., et al. (2007). Bone marrow-derived circulating progenitor cells fail to transdifferentiate into adipocytes in adult adipose tissues in mice. *J. Clin. Invest.* 117, 3684–3695. doi: 10.1172/jci32504
- Kolonin, M. G. (2012). Progenitor cell mobilization from extramedullary organs. *Methods Mol. Biol.* 904, 243–252. doi: 10.1007/978-1-61779-943-3\_20
- Koning, J. J., Kooij, G., de Vries, H. E., Nolte, M. A., and Mebius, R. E. (2013). Mesenchymal stem cells are mobilized from the bone marrow during inflammation. *Front. Immunol.* 4:49. doi: 10.3389/fimmu.2013.00049
- Krankel, N., Spinetti, G., Amadesi, S., and Madeddu, P. (2011). Targeting stem cell niches and trafficking for cardiovascular therapy. *Pharmacol. Ther.* 129, 62–81. doi: 10.1016/j.pharmthera.2010.10.002
- Kumar, S., and Ponnazhagan, S. (2012). Mobilization of bone marrow mesenchymal stem cells in vivo augments bone healing in a mouse model of segmental bone defect. *Bone* 50, 1012–1018. doi: 10.1016/j.bone.2012.01.027
- Langer, H. F., Stellos, K., Steingen, C., Frohofer, A., Schönberger, T., Krämer, B., et al. (2009). Platelet derived bFGF mediates vascular integrative mechanisms of mesenchymal stem cells in vitro. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 47, 315–325. doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.03.011
- Lazarus, H. M., Haynesworth, S. E., Gerson, S. L., and Caplan, A. I. (1997). Human bone marrow-derived mesenchymal (stromal) progenitor cells (MPCs) cannot be recovered from peripheral blood progenitor cell collections. *J. Hematother.* 6, 447–455. doi: 10.1089/scd.1.1997.6.447
- Li, X., Ling, W., Khan, S., and Yacoby, S. (2012). Therapeutic effects of intrabone and systemic mesenchymal stem cell cytotrophy on myeloma bone disease and tumor growth. *J. Bone Miner. Res.* 27, 1635–1648. doi: 10.1002/jbmr.1620
- Lindskog, C. (2015). The potential clinical impact of the tissue-based map of the human proteome. *Expert Rev. Proteomics* 12, 213–215. doi: 10.1586/14789450.2015.1040771
- Liu, Y., Yang, X., Jing, Y., Zhang, S., Zong, C., Jiang, J., et al. (2015). Contribution and mobilization of mesenchymal stem cells in a mouse model of carbon tetrachloride-induced liver fibrosis. *Sci. Rep.* 5:17762. doi: 10.1038/srep17762
- Mansilla, E., Marin, G. H., Drago, H., Sturla, F., Salas, E., Gardiner, C., et al. (2006). Bloodstream cells phenotypically identical to human mesenchymal bone marrow stem cells circulate in large amounts under the influence of acute large skin damage: new evidence for their use in regenerative medicine. *Transplant. Proc.* 38, 967–969. doi: 10.1016/j.transproceed.2006.02.053
- Margolis, L., and Sadovsky, Y. (2019). The biology of extracellular vesicles: the known unknowns. *PLoS Biol.* 17:e3000363. doi: 10.1371/journal.pbio.3000363
- Marketou, M. E., Parthenakis, F. I., Kalyva, A., Pontikoglou, C., Maragkoudakis, S., Kontarakis, J. E., et al. (2014). Increased mobilization of mesenchymal stem cells in patients with essential hypertension: the effect of left ventricular hypertrophy. *J. Clin. Hypertens. (Greenwich)* 16, 883–888. doi: 10.1111/jch.12426
- Marketou, M. E., Parthenakis, F. I., Kalyva, A., Pontikoglou, C., Maragkoudakis, S., Kontarakis, J. E., et al. (2015). Circulating mesenchymal stem cells in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Cardiovasc. Pathol.* 24, 149–153. doi: 10.1016/j.carpath.2015.02.005
- Massberg, S., Schaerli, P., Knezevic-Maramica, I., Köllnberger, M., Tubo, N., Ashley Moseman, E., et al. (2007). Physiological recirculation of hematopoietic stem and progenitor cells through blood, lymph and extramedullary tissues. *Cell* 131, 994–1008. doi: 10.1016/j.cell.2007.09.047
- Maumus, M., Peyrafitte, J.-A., D'Angelo, R., Fournier-Wirth, C., Bouloumié, A., Castilla, L., et al. (2011). Native human adipose stromal cells: localization, morphology and phenotype. *Int. J. Obes. (Lond.)* 35, 1141–1153. doi: 10.1038/ijo.2010.269
- Maximow, A. A. (1928). Cultures of blood leucocytes; from lymphocyte and monocyte to connective tissue. *Arch. Exp. Zellforsch.* 5, 169–268.
- Nieswandt, B., Hafner, M., Echtenacher, B., and Männel, D. N. (1999). Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. *Cancer Res.* 59, 1295–1300.
- Ode, A., Kopf, J., Kurtz, A., Schmidt-Bleek, K., Schrade, P., Kolar, P., et al. (2011). CD73 and CD29 concurrently mediate the mechanically induced decrease of migratory capacity of mesenchymal stromal cells. *Eur. Cells Mater.* 22, 26–42.
- Ojeda-Urbe, M., Brunot, A., Lenat, A., and Legros, M. (1993). Failure to detect spindle-shaped fibroblastoid cell progenitors in PBPC collections. *Acta Haematol.* 90, 139–143. doi: 10.1159/000204395
- Parekkadan, B., and Milwid, J. M. C. (2010). Mesenchymal stem cells as therapeutics. *Ann. Rev. Biomed. Eng.* 12, 87–117. doi: 10.1146/annurev-bioeng-070909-105309



- Pittenger, M. F., Discher, D. E., Péault, B. M., Phinney, D. G., Hare, J. M., and Caplan, A. I. (2019). Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *NPJ Regen. Med.* 4:22. doi: 10.1038/s41536-019-0083-6
- Platt, A. M., and Randolph, G. J. (2013). "Cellular composition of lymph," in *Immunology of the Lymphatic System*, ed. L. Santambrogio (New York, NY: Springer), 53–64. doi: 10.1007/978-1-4614-3235-7\_4
- Qian, H., Le Blanc, K., and Sigvardsson, M. (2012). Primary mesenchymal stem and progenitor cells from bone marrow lack expression of CD44 protein. *J. Biol. Chem.* 287, 25795–25807. doi: 10.1074/jbc.M112.339622
- Rebolj, K., Veber, M., Drobní, M., and Maličev, E. (2018). Hematopoietic stem cell and mesenchymal stem cell population size in bone marrow samples depends on patient's age and harvesting technique. *Cytotechnology* 70, 1575–1583. doi: 10.1007/s10616-018-0250-4
- Rege, T. A., and Hagood, J. S. (2006). Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. *FASEB J.* 20, 1045–1054. doi: 10.1096/fj.05-5460rev
- Roufosse, C. A., Direkze, N. C., Otto, W. R., and Wright, N. A. (2004). Circulating mesenchymal stem cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 585–597. doi: 10.1016/j.biocel.2003.10.007
- Santambrogio, L. (2018). "Chapter four – the lymphatic fluid," in *International Review of Cell and Molecular Biology*, ed. L. Galluzzi (Cambridge, MA: Academic Press), 111–133. doi: 10.1016/bs.ircmb.2017.12.002
- Scadden, D. T. (2012). Rethinking stroma: lessons from the blood. *Cell Stem Cell* 10, 648–649. doi: 10.1016/j.stem.2012.05.011
- Schreier, S., and Triampo, W. (2020). The blood circulating rare cell population. What is it and what is it good for? *Cells* 9:790. doi: 10.3390/cells9040790
- Schwarz, S., Huss, R., Schulz-Siegmund, M., Vogel, B., Brandau, S., Lang, S., et al. (2014). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells migrate to healthy and damaged salivary glands following stem cell infusion. *Int. J. Oral Sci.* 6, 154–161. doi: 10.1038/ijos.2014.23
- Sengenès, C., Lomède, K., Zakaroff-Girard, A., Busse, R., and Bouloumié, A. (2005). Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from the adult mesenchymal and hematopoietic stem cells. *J. Cell. Physiol.* 205, 114–122. doi: 10.1002/jcp.20381
- Sheriff, L., Alanazi, A., Ward, L. S. C., Ward, C., Munir, H., Rayes, J., et al. (2018). Origin-specific adhesive interactions of mesenchymal stem cells with platelets influence their behavior after infusion. *Stem Cells* 36, 1062–1074. doi: 10.1002/stem.2811
- Silverthorn, D., Ober, W., Garrison, C., Silverthorn, A., and Johnson, B. (2009). *Human Physiology: An Integrated Approach*, 7th Edn. San Francisco, CA: Pearson/Benjamin Cummings.
- Teo, G. S. L., Yang, Z., Carman, C. V., Karp, J. M., and Lin, C. P. (2015). Intravital imaging of mesenchymal stem cell trafficking and association with platelets and neutrophils. *Stem Cells* 33, 265–277. doi: 10.1002/stem.1848
- Tesfamariam, B. (2016). Involvement of platelets in tumor cell metastasis. *Pharmacol. Ther.* 157, 112–119. doi: 10.1016/j.pharmthera.2015.11.005
- Théry, C., Ostrowski, M., and Segura, E. (2009). Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 581–593. doi: 10.1038/nri2567
- Thomou, T., Mori, M. A., Dreyfuss, J. M., Konishi, M., Sakaguchi, M., Wolfrum, C., et al. (2017). Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues. *Nature* 542, 450–455. doi: 10.1038/nature21365
- Uhlen, M., Oksvold, P., Fagerberg, L., Lundberg, E., Jonasson, K., Forsberg, M., et al. (2010). Towards a knowledge-based human protein Atlas. *Nat. Biotechnol.* 28, 1248–1250. doi: 10.1038/nbt1210-1248
- Valkenburg, K. C., de Groot, A. E., and Pienta, K. J. (2018). Targeting the tumour stroma to improve cancer therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 15, 366–381. doi: 10.1038/s41571-018-0007-1
- Walter, S. G., Randau, T. M., Hilgers, C., Haddouti, E.-M., Masson, W., Gravius, S., et al. (2020). Molecular and functional phenotypes of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells depend on harvesting techniques. *Int. J. Mol. Sci.* 21:4382. doi: 10.3390/ijms21124382
- Wang, Y., Johnsen, H. E., Mortensen, S., Bindlev, L., Ripa, R. S., Haack-Sorensen, M., et al. (2006). Changes in circulating mesenchymal stem cells, stem cell homing factor, and vascular growth factors in patients with acute ST elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention. *Heart* 92, 768–774. doi: 10.1136/hrt.2005.069799
- Ward, L. S. C., Sheriff, L., Marshall, J. L., Manning, J. E., Brill, A., Nash, G. B., et al. (2019). Podoplanin regulates the migration of mesenchymal stromal cells and their interaction with platelets. *J. Cell. Sci.* 132:jcs222067. doi: 10.1242/jcs.222067
- Wexler, S. A., Donaldson, C., Denning-Kendall, P., Rice, C., Bradley, B., and Hows, J. M. (2003). Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal "stem" cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br. J. Haematol.* 121, 368–374. doi: 10.1046/j.1365-2141.2003.04284.x
- Wojakowski, W., Kucia, M., Kałomierski, M., Ratajczak, M. Z., and Tendera, M. (2008). Circulating progenitor cells in stable coronary heart disease and acute coronary syndromes: relevant reparatory mechanism? *Heart* 94, 27–33. doi: 10.1136/hrt.2006.103358
- Wolock, S. L., Krishnan, I., Tenen, D. E., Matkins, V., Camacho, V., Patel, S., et al. (2019). Mapping distinct bone marrow niche populations and their differentiation paths. *Cell Rep.* 28, 302–311.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2019.06.031
- Wong, S. Y., and Hynes, R. O. (2006). Lymphatic or hematogenous dissemination: how does a metastatic tumor cell decide? *Cell Cycle* 5, 812–817.
- Xu, L., and Li, G. (2014). Circulating mesenchymal stem cells and their clinical implications. *J. Orthop. Translat.* 2, 1–7. doi: 10.1016/j.jot.2013.11.002
- Zhang, Y., Daquinag, A., Traktuev, D. O., Amaya-Manzanares, F., Simmons, P. J., March, K. L., et al. (2009). White adipose tissue cells are recruited by experimental tumors and promote cancer progression in mouse models. *Cancer Res.* 69, 5259–5266.
- Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., et al. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 7, 211–228.
- Zvaifler, N. J., Marinova-Mutafchieva, L., Adams, G., Edwards, C. J., Moss, J., Burger, J. A., et al. (2000). Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res.* 2, 477–488. doi: 10.1186/ar130

**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 Girousse, Mathieu, Sastourné-Arrey, Monferran, Casteilla and Sengenès. 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.

## Annexe n°3

Et si l'origine des progéniteurs fibro-adipeux contribuait à leur hétérogénéité dans le muscle? Quand le tissu adipeux bouscule le dogme.

Mathieu M, Grousse A, Sengenès C.

Les cahiers de myologie

L'article a été accepté et sera publié à la fin de l'année 2023

## **Et si l'origine des progéniteurs fibro-adipeux contribuait à leur hétérogénéité dans le muscle ? Quand le tissu adipeux bouscule le dogme.**

Maxime Mathieu<sup>1</sup>, Amandine Gironse<sup>1\*</sup>, Coralie Sengenès<sup>1</sup>

Institut RESTORE, UMR INSERM 1301 / CNRS 5070, Toulouse, France

\*Contact [amandine.gironse@inserm.fr](mailto:amandine.gironse@inserm.fr)

### **Résumé**

Les progéniteurs fibro-adipegéniques (FAPs), cellules stromales mésenchymateuses (CSMs) résidentes du muscle squelettique, jouent un rôle crucial dans l'homéostasie et la régénération musculaire via leurs activité paracrine. Les avancées technologiques récentes dans le domaine du séquençage de l'ARN en cellule unique ont permis la description de l'hétérogénéité de cette population cellulaire. Dans cet article nous présenterons les différentes sous-populations de FAPs en condition basale, lésionnelle ou de dégénérescence ainsi que leurs fonctions associées chez la souris et l'Homme. Nous discuterons ensuite de l'origine extra-musculaire possible d'une population de FAPs post lésion. Ainsi, des travaux récents démontrent que des CSMs provenant du tissu adipeux et infiltrées dans le muscle pourraient participer à l'hétérogénéité des FAPs.

### **Introduction**

En 2010, deux groupes décrivent dans les muscles squelettiques de souris la présence de progéniteurs fibro-adipegéniques (FAPs)[1, 2]. Les FAPs appartiennent à la famille des cellules stromales mésenchymateuses (CSMs) définies en 1974 par Friedenstein dans la moelle osseuse[3] et qui se caractérisent par leur capacité à se différencier en adipocytes, chondrocytes et ostéocytes. En outre les FAPs possèdent également une valence fibroblastique[1, 2]. Bien que les FAPs aient d'abord été identifiés dans un contexte physiopathologique visant à expliquer les mécanismes cellulaires responsables de l'accumulation ectopique de graisse dans les muscles squelettiques, un ensemble d'études a mis en lumière depuis 2010 leurs rôles bénéfiques dans l'homéostasie et la régénération musculaire[4].

Comme la plupart des populations cellulaires, les FAPs présentent une hétérogénéité, soit intrinsèque, soit influencée par le microenvironnement. L'étude de cette hétérogénéité initialement réalisée par des mesures d'expression génique sur FAPs triés et par cytométrie en flux s'est enrichie des technologies plus puissantes de séquençage de l'ARN sur groupe de cellules puis en cellule unique. Ainsi, cette revue a pour objectif de présenter succinctement dans une première partie les différentes sous-populations de FAPs et leurs fonctions identifiées chez la souris et l'Homme. Dans une seconde partie, nous discuterons de travaux récents mettant en jeu tissu adipeux et muscle squelettique, qui permettent aujourd'hui de proposer une origine extra-musculaire d'une population de FAPs participant à l'hétérogénéité de cette famille cellulaire.

## I/ La Mosaïque fascinante des FAPs

D'un point de vue fonctionnel, les FAPs sont décrits pour fournir un environnement de soutien aux cellules myogéniques ; ils représentent la principale source de composants de la matrice extracellulaire (MEC), tels que les collagènes (par exemple Col6a1, Col5a1), la laminine (laminA, laminB1) et la fibronectine (Fbn1)[5]. Cette structure joue un rôle essentiel dans la transmission de la force musculaire, fonction principale du muscle. Les FAPs permettent ainsi le maintien de l'organisation de la MEC et donc d'assurer la longévité de la fonction musculaire.

### a) FAPs quiescents : les gardiens de la structure

Une vingtaine d'études fondées sur des analyses OMICS en cellules uniques ont documenté l'hétérogénéité de la population de FAPs. Chez la souris, Malecova et al. ont d'abord rapporté l'existence de 2 populations caractérisées par les marqueurs Tie2 et Vcam1; la forte expression de Vcam1 étant préférentiellement associée à un profil pro-fibrotique[6]. Par la suite, d'autres études ont également décrit la présence de deux populations différentes de FAPs[7–10] : i) une population de progéniteurs multipotents ayant pour marqueurs dpp4<sup>+</sup>, fbn1<sup>+</sup> et cd55<sup>+</sup> et ii) une population cxcl14<sup>+</sup>, lum<sup>+</sup>, exprimant des gènes impliqués dans le remodelage de la MEC (Tableau 1). Le sécrétome « virtuel » proposé par Negróni et al. soutient le rôle fonctionnel de ces 2 sous-populations de FAPs dans l'organisation structurelle de la MEC[11].

Chez l'Homme, la première description de l'hétérogénéité des FAPs a été réalisée par Rubenstein et al. dans une étude qui inclut de jeunes individus sains[9]. Dans ce travail, ils rapportent la présence de deux populations de FAPs similaires à celles identifiées chez la souris, i.e. une population FAPs lum<sup>+</sup> et une autre fbn1<sup>+</sup> (Tableau 1). Par ailleurs, un ATLAS représentatif de toutes les populations cellulaires retrouvées au sein du muscle squelettique chez l'Homme a été publié[12] et a permis de confirmer ces sous-populations de FAPs (Tableau 1). Récemment, Fitzgerald et ses collaborateurs identifient une population supplémentaire de FAPs, exprimant le marqueur Mme<sup>+</sup>, présentant un profil pro-adipogénique (Tableau 1).

### b) FAPs activés : les émissaires de la régénération musculaire.

Afin d'étudier la diversité et l'évolution des populations de FAPs en condition de régénération musculaire, le modèle murin de lésion musculaire induite par des agents myotoxiques tels que la cardiotoxine ou la notexine (qui entraînent une rupture des jonctions neuromusculaires aboutissant à une nécrose des fibres musculaires) est le plus répandu dans la littérature. Quantitativement, la population de FAPs, mesurée par cytométrie en flux, augmente dès le premier jour post lésion (jpl) pour atteindre un maximum autour de 3-4 jpl. Cette augmentation de FAPs est soutenue par une prolifération qui, elle, débute à 2 jpl[1, 13], laissant la phase précoce d'amplification des FAPs sans explication (Figure 1). Qualitativement, dans la phase précoce (0.5-2 jpl), différents auteurs décrivent un changement d'expression génique des FAPs caractérisé par l'expression de marqueurs communs, dont de nombreuses cyto/chimiokines (Tableau 1) et qui a été traduite par une « activation » des FAPs. Il est intéressant de noter que cette population apparaît dès 12h[7] post-lésion et perdure à 48h[8, 10].

D'un point de vue fonctionnel, l'importance de la production de cytokines par les FAPs nécessaire à une régénération musculaire efficace a été largement démontrée[14–17]. C'est le cas, par exemple de l'IL-33, majoritairement produite par les FAPs au cours des 12 premières heures après la lésion, et qui permet de stimuler la prolifération des cellules immunitaires Treg[16]. Les FAPs ont aussi été rapportés comme sécrétant de l'IL-10 en réponse à une lésion[18], jouant un rôle important dans le changement



phénotypique des macrophage vers un profil anti-inflammatoire et favorisant ainsi la régénération musculaire[19]. De plus, les travaux de Negronei et al. visant à analyser le « sécretome virtuel » des FAPs, identifient la follistatine, l'Il-6, le CXCL1 et le CXCL5[11] à ce stade de la régénération musculaire. L'Il-6 et la follistatine ont été rapportées comme étant produites au cours de la régénération[1, 17] et favorisent la prolifération[20] et la fusion[17] des cellules souches musculaires respectivement.

En résumé, à ce stade précoce du processus de régénération, les « FAPs quiescents », subissent un changement d'état vers un statut « activé ». Ce profil d'expression génique distinct, orienté vers la sécrétion de cytokines et de chimiokines permettrait d'établir une communication spécifique avec les cellules environnantes, notamment les cellules souches satellites et les cellules immunitaires, essentielles à l'initiation du processus de régénération musculaire. Pour illustrer l'adaptation très rapide des FAPs au changement du microenvironnement induit par la lésion et leur mission support dès l'initiation de la régénération musculaire nous proposons un statut de FAPs « réactifs » plutôt qu' « activés » comme mentionné dans la littérature.

#### **c) FAPs de remodelage : les ouvriers de la régénération.**

Une régénération musculaire est considérée comme aboutie lorsque la récupération morphologique et fonctionnelle du tissu a lieu entre 21 et 28 jpl [21]. Dans le processus de régénération, la quantité des FAPs atteint un pic autour de 3 jpl pour retrouver les quantités initiales autour de 9 jpl[13]. Dans ce contexte, les analyses OMICS en cellule unique ont révélé là aussi un changement de l'expression des gènes des FAPs « réactifs ». Entre 3 et 10 jpl il est rapporté par Oprescu et al., De Michelli et al. et Scott et al., une diminution de l'expression des cytokines et chimiokines au profit d'une expression de gènes liés à la modulation de la MEC tels que les gènes de la grande famille des collagènes, des laminines et des fibrillines[7, 8, 10] (Tableau 1). L'étude d'Oprescu et al. définit cette population de FAPs par l'expression dominante du marqueur  $wisp1^+$ [7]. A 10 jpl, les FAPs adoptent ensuite un profil d'expression qui se caractérise par l'expression majeure de  $dlk1$  (Figure 1), un marqueur connu des progéniteurs adipogéniques[22] pouvant suggérer un engagement de cette population vers un profil adipeux dans des temps plus tardifs de la régénération. L'étude menée par Negronei et al. soutient également ces observations, mettant en évidence la prédiction de la sécrétion de protéines essentielles à la composition et l'organisation de la MEC[11], un processus nécessaire à la régénération musculaire[23]. Par leurs sécrétions les FAPs agissent alors comme des « ouvriers » capables de restaurer le réseau matriciel qui a été désorganisé suite à la lésion musculaire[21, 24].

#### **d) FAPs de résolution : pour un retour de l'équilibre.**

Au cours des stades terminaux de la régénération musculaire, entre 21 et 28 jpl, Oprescu et al. ont identifié une population de FAPs caractérisée par l'expression de  $Osr1$ . Au sein de cette population, l'étude de trajectoire permettant d'établir le devenir de cette population à partir de l'expression génique, a permis de révéler une divergence de la population  $Osr1^+$  vers deux sous-populations distinctes marquées par l'expression respective de  $dpp4$  et  $cxcl14$  décrits initialement à l'état basal (Tableau 1). Entre 7 jpl[10] et 14 jpl[8], De Micheli et al. et Scott et al. décrivent une réapparition des populations de « FAPs quiescents ».

#### **e) Les FAPs en condition pathologique : émergence ou dérégulation ?**

La perte de masse musculaire et son remplacement par des tissus fibreux et adipeux sont des caractéristiques fréquentes de diverses maladies musculaires telle que la myopathie de Duchenne (DMD). Pour tenter d'expliquer l'origine de ces dépôts anormaux, l'attention s'est portée sur les FAPs

du fait de leur capacité à se différencier en adipocytes ou en cellules fibroblastiques[1, 2]. Dans ce contexte l'hétérogénéité des FAPs a également été décrite.

Contrairement à une lésion aiguë, qui induit une expansion transitoire de la population de FAPs (Figure 1), une augmentation persistante du nombre et de l'hétérogénéité des FAPs est observée dans les muscles dystrophiques murins. Deux sous-populations de FAPs, caractérisées par leurs niveaux d'expression des marqueurs sca-1 et cd34[25] sont présents dans les muscles des animaux dystrophiques. Un niveau de sca-1 élevé est associé à un état prolifératif tandis qu'un niveau faible semble plutôt pro-adipogénique[25]. Plus récemment, une étude a été réalisée chez l'Homme par Fitzgerald et al. à partir de biopsies de patients ayant subi une arthroplastie de la hanche (THA), une condition également associée à une dégénérescence adipeuse des muscles à proximité. Les auteurs ont identifié et caractérisé fonctionnellement une population particulière de FAPs pro-adipogéniques exprimant le marqueur mme (ainsi que d'autres gènes comme ptgds, cxcl14 et smoc2 impliqués dans l'immunorégulation et l'organisation de la MEC [26]. En revanche, cette étude n'apporte pas de point de comparaison chez des sujets sains, qui aurait permis de mieux caractériser cette population et surtout de comprendre son évolution au cours de la mise en place de la pathologie. À ce jour, la littérature ne permet pas de déterminer si la fibrose et/ou l'accumulation adipeuse observée dans des conditions physiopathologiques résulte de l'émergence d'une nouvelle population de FAPs dans le muscle ou de modifications quantitatives et/ou qualitatives d'une population déjà présente à l'état basal (Figure 1).

L'étude des facteurs micro-environnementaux régissant l'engagement fibro-adipeux des FAPs demeure nécessaire à la compréhension globale des myopathies. Différentes études ont illustré le rôle du TGF- $\beta$ , pro-fibrotique et anti-adipogénique[24] en condition de régénération défectueuse. D'autre part, la sécrétion de TGF- $\beta$  par les macrophages inhibe l'apoptose des FAPs et favorise leur sécrétion de MEC, mettant ainsi en évidence leur rôle pro-fibrotique dans le muscle dystrophique[13].

Pour résumer, les techniques récentes de séquençage de l'ARN en cellule unique ont permis d'affiner notre connaissance des FAPs et de décrire la diversité de cette population cellulaire. Les différents travaux en situation basale et suite à la lésion musculaire ont révélé des sous-populations tour à tour « quiescentes », « réactives » et « remodelantes », avec réapparition du profil initial à l'issue de la régénération. Sur le plan quantitatif, les études montrent une augmentation du nombre de FAPs dès les phases précoces de la régénération (1 jpl), mais paradoxalement sans soutien prolifératif à ce stade. Cette observation soulève l'hypothèse d'une origine extra musculaire de certaines sous-populations de FAPs qui apparaissent post-lésion. Dans le prochain chapitre, nous explorerons l'hypothèse du tissu adipeux comme source de CSMs contribuant à l'hétérogénéité de la population de FAPs du muscle squelettique.

## **II/ Deux mondes en synchronisation : le tissu adipeux et le muscle en tandem.**

### **a) Le tissu adipeux : réservoir d'une population de progéniteurs hétérogènes.**

Au sein du tissu adipeux, il existe un type cellulaire étroitement similaire aux FAPs appelé ASCs, pour *Adipose Stromal Cells*, qui appartiennent également à la famille des CSMs. Si les ASCs ont été caractérisées bien avant les FAPs[27], l'étude de leur hétérogénéité par des méthodes de séquençage de l'ARN en cellule unique n'est que plus récente. Les différents travaux ayant analysé les tissus adipeux murins (sous-cutané -ScAT, et viscéral) avec cette technologie s'accordent tous sur la description de 3 sous-populations d'ASCs en condition basale chez la souris : i) une population de progéniteurs multipotents avec les marqueurs principaux dpp4, cd55 ou cd34 (Tableau 1) douée d'une forte activité proliférative, ii) une population de précurseurs engagés dans la voie adipogénique (avec

marqueurs principaux *icam1*, *dlk1*, *pparg*) et iii) une population d'ASCs régulatrices (avec marqueurs principaux *cd142*) capables de réprimer l'adipogénèse des autres ASCs via leur activité paracrine [28–32] (Figure 1). Chez l'Homme ces populations sont également conservées [26, 28] en condition basale et pathologique [33].

#### **b) FAPs et ASCs : ressemblances et dissonances ?**

Jusqu'à présent, aucun travail n'avait réellement comparé les populations de FAPs du muscle squelettique aux populations d'ASCs du tissu adipeux que ce soit chez l'Homme ou chez la souris. Ce n'est qu'en 2023 que les travaux de Fitzgerald et al., dans le cadre de l'étude de la dégénérescence graisseuse des muscles fessiers chez des patients subissant des THA, proposent une comparaison de leurs données humaines dans le muscle avec les résultats de Merrick et al. dans le tissu adipeux. Leur population de FAPs *cd55*<sup>+</sup> est très étroitement apparentée à la population d'ASCs multipotentes exprimant *dpp4* du tissu adipeux. En revanche, la population de FAPs pro-adipogénique (caractérisée par le marqueur *mme*) semble transcriptionnellement distincte de la populations d'ASCs *icam*<sup>+</sup>/*dlk1*<sup>+</sup> douée pourtant, au sein du tissu adipeux, du même potentiel de différenciation.

Il est toutefois intéressant de noter que cette population de précurseurs engagés dans l'adipogénèse du tissu adipeux s'apparente fortement aux populations de FAPs respectivement *dlk1*<sup>+</sup> et *icam1*<sup>+</sup> décrites par Oprescu et al. et Merrick et al. post lésion musculaire et soupçonnés de contribuer à la formation d'adipocytes ectopiques en situation pathologique [26, 34] soulevant ainsi la question de l'existence de sous-populations de MSCs communes à ces deux tissus (Figure 2). Nos travaux de séquençage d'ARN, sur pools d'ASCs murines de tissu adipeux sous-cutané d'une part et de FAPs de muscle quadriceps d'autre part, avant et 24h post lésion musculaire, ont renforcé cette hypothèse. Nous avons en effet observé que le profil transcriptomique des FAPs post-lésion s'apparente plus fortement à celui des ASCs qu'à celui des FAPs avant la lésion [35].

#### **c) Le tissu adipeux : contributeur à l'hétérogénéité des FAPs ?**

Les travaux antérieurs de notre équipe démontrant que le tissu adipeux sous-cutané de souris était capable de libérer des ASCs en réponse à des stress d'origine inflammatoire [36] et métabolique [37], le profil transcriptionnel préférentiel de ces cellules en faveur des mécanismes de migration ainsi que les similitudes entre ASCs et FAPs évoquées précédemment nous ont permis de proposer l'hypothèse, dans l'article de Sastourné-Arrey et al. en 2023, selon laquelle le tissu adipeux était capable de libérer des ACSs qui infiltrent le muscle suite à la lésion.

Par des approches *in vivo* de traçage des ASCs couplées à des méthodes de cytométrie en flux et d'immunohistochimie, nous avons été capable de démontrer et quantifier l'infiltration musculaire des ASCs du tissu adipeux sous-cutané dans le muscle à 1 jpl. Sur un plan fonctionnel, l'interruption de cette infiltration affecte négativement la régénération musculaire. Ce travail permet donc de démontrer chez la souris que suite à une lésion musculaire, une partie des FAPs du muscle sont en réalité des ACSs provenant du tissu adipeux sous-cutané.

#### **Conclusion**

Jusqu'à présent, l'hétérogénéité de la population de FAPs observée dans le muscle était attribuée aux changements d'expression génique induites par le micro-environnement lésionnel permettant aux cellules d'acquérir temporairement un profil transcriptionnel nécessaire pour assurer leurs différentes fonctions au cours de la régénération musculaire. Nos récents travaux démontrent, en plus, que cette hétérogénéité peut être alimentée par une origine extra-musculaire d'une partie des FAPs post lésion.

Le rôle de cette communication inter-organes ainsi que le celui de cette population cellulaire infiltrée restent à définir.

### **Liens d'intérêt**

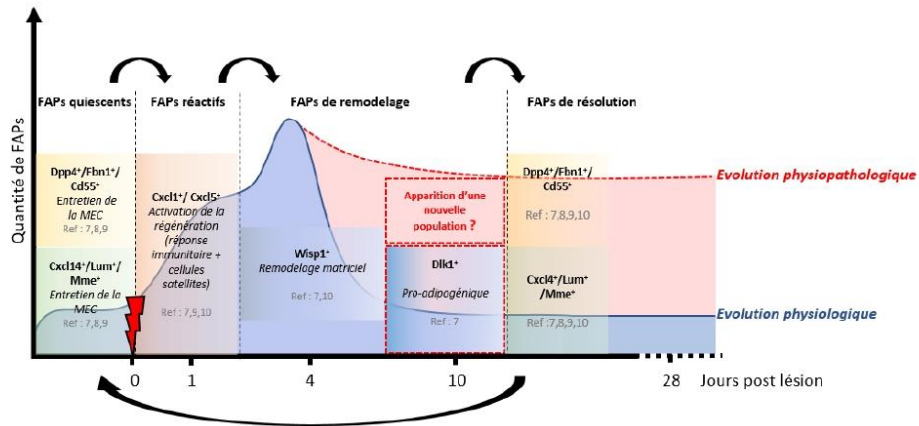
Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.



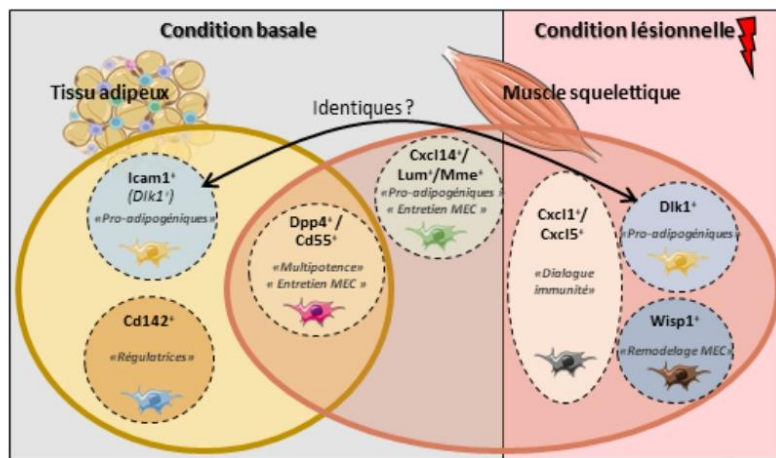
## Liste des figures

| Tissu         | Groupe de FAPs / ASCs                           | Marqueurs   | Espèce  | Références              |                         |
|---------------|---|---|---|-------------------------|-------------------------|
| Muscle        | FAPs Quiescents (Etat basal)                    | F1: <b>Dpp4+</b> , <i>Pi16</i> , <i>Igf1bp5</i> , <i>Fbn1</i> , <i>Cd55</i> , <i>Mfap5</i> , <i>Pcolce2</i><br>F2: <b>Cxcl14+</b> , <i>Smoc2</i> , <i>Gsn</i> , <i>Lum</i> , <i>Col15a1</i> , <i>Col4a1</i>   | souris  | Oprescu et al. 2020     |                         |
|               |   | F1: <i>Sfrp4</i> , <i>Igf1bp5</i> , <i>Sema3c</i> , <i>Dpp6</i> , <i>Tgfrb2</i> , <i>Wnt2</i><br>F2: <i>Cxcl14</i> , <i>Col4a1</i> , <i>Col4a2</i> , <i>Col6a1</i> , <i>6a2</i> , <i>6a3</i> , <i>Col15a1</i> , <i>Lum</i> , <i>Sparcl1</i> , <i>Podn</i> , <i>Smoc2</i> , <i>Mgp</i> , <i>Bgn</i>              | souris  | Scott et al. 2019       |                         |
|               |   | F1: <b>FBN1+</b> , <i>Cd55</i> , <i>Mfap5</i> , <i>Fstl1</i><br>F2: <b>LUM+</b> , <i>Col4a2</i> , <i>Col15a1</i> , <i>Cxcl14</i> , <i>Smoc2</i> , <i>Dcn</i>  | Souris/<br>Humain   | Rubenstein et al. 2020  |                         |
|               |   | F1: <i>Fbn1</i> , <i>Mfap5</i> , <i>Cd55</i><br>F2: <i>Smoc2</i> , <i>Adh1b</i> , <i>Abc18</i> , <i>Cxcl14</i><br>F3: <i>Col1a1</i> , <i>Sfrp4</i> , <i>Serpine1</i> , <i>Ccl2</i><br>Adipocytes : <i>Apod</i> , <i>Gpx3</i> , <i>Glul</i> , <i>Cxcl14</i>  | Humain  | De Michelli et al. 2020 |                         |
|               |   | F1: <b>Cd55+</b> , <i>Tnxb</i> , <i>Mfap5</i> , <i>Pcolce2</i> , <i>Fbn1</i> , <i>Prg4</i><br>F2: <b>Mme+</b> , <i>Ptgds</i> , <i>Cxcl14</i> , <i>Smoc2</i><br>F3: <b>gpc3+</b> , <i>Sfrp2</i>  | Humain  | Fitzgerald et al. 2023  |                         |
| Muscle        | FAPs « Activés » / « Réactifs » (0,5 - 1,5 jpl) | <b>Cxcl5</b> , <i>Cxcl3</i> , <i>Ccl7</i> , <i>Ccl2</i>   | souris  | Oprescu et al. 2020     |                         |
|               |   | <b>Cxcl3</b> , <i>Cxcl5</i> , <i>Cxcl2</i> , <i>Cxcl14</i> , <i>Csf1</i> et <i>Ccl7</i>   | souris  | Scott et al. 2019       |                         |
|               |   | <b>Ccl7</b> , <b>Cxcl5</b> , <b>Cxcl1</b>   | souris  | De Michelli et al. 2020 |                         |
| Muscle        | FAPs Remodelage (3 - 10 jpl)                    | <b>Wisp+</b> , <i>Col8a1</i> , <i>Col12a1</i> , <i>Col16a1</i> , <i>Col11a1</i> , <i>Tnc</i> , <i>Fbn2</i> et <b>Adam12</b>   | <b>Dlk1+</b> , <i>B830012L14Rik</i> , <i>Meg3</i> , <i>Airn</i> , <i>Peg3</i> , <i>Zim1</i> , <i>H19</i> , et <i>Igf2</i> | Souris                  | Oprescu et al. 2020     |
|               |   | <i>Col8a2</i> , <i>Col14a1</i> , <i>Col15a1</i> , <i>Fbn1</i> , <i>Fbn3</i> , <i>Hspg2</i> , <i>Lama2</i> , <i>Lama4</i> , <i>Lamc1</i> , <i>Lamb2</i> , <i>Nid2</i> , <b>Adam12</b> , <b>Postn</b> , <i>Lox</i> , <i>Acta2</i> , <b>Col1a1</b> , <b>Col1a2</b>   |   | Souris                  | Scott et al. 2019       |
|               |   | <b>Col1a1</b> , <b>Col1a2</b> , <b>Postn</b> , <i>Bgn</i> , <i>Sparc</i>  |   | Souris                  | De Michelli et al. 2020 |
| Muscle        | FAPs Résolution (7 - 21 jpl)                    | <b>Dpp4+</b> , <i>Pi16</i> , <i>Wnt2</i>  | <b>Cxcl14+</b> , <i>Enpp2</i> , <i>Crispld2</i> , <i>Hsd11b1</i>  | Souris                  | Oprescu et al. 2020     |
|               |   | « return to baseline level »  |   | Souris                  | Scott et al. 2019       |
|               |   | « return to baseline level »  |   | Souris                  | De Michelli et al. 2020 |
| Tissu adipeux | ASCs Quiescents (Etat basal)                    | A1: <b>Dpp4+</b> , <i>Wnt2</i> , <i>Bmp7</i> , <i>Pi16</i><br>A2: <b>ICAM1+</b> , <i>Dlk1</i> , <i>Ppara</i> , <i>Fabp4</i> , <i>Cd36</i><br>A3: <b>Cd142+</b> , <i>Clec11a</i>   |   | Souris / Humain         | Merrick et al. 2019     |
|               |   | A1 : <i>Cd55</i> , <i>Il13ra1</i><br>A2 : <i>Ppara</i> , <i>Fabp4</i> , <i>Prdm16</i> , <i>Adam12</i><br>A3 : <b>Cd142</b> , <i>Abcg1</i>   |   | Souris                  | Schwalie et al. 2018    |
|               |   | A1 : <i>Ppara</i> , <i>Fabp4</i><br>A2 : <b>Cd36</b> , <b>Plin1</b><br>Précurseurs fibro-inflammatoires : <i>Ly6C1</i> , <i>Sfrp4</i> , <b>Pi16</b> , <i>Limch1</i>   |   | Souris                  | Emont et al. 2022       |
|               |   | A1 : <i>Foxp2</i> , <i>Hes1</i> , <i>Lox</i> , <i>Igf1</i> , <i>Lpb</i><br>A2 : <b>Cd36</b> , <i>Lpl</i> , <i>Gata2</i> , <i>Ppara</i> , <i>Fgf10</i><br>A3 : <i>Ebf2</i> , <i>Rock2</i> , <i>Zfp521</i> , <i>Bmp6</i> , <i>Ebf1</i><br>A4 : <i>Fbn1</i> , <i>Klf4</i> , <i>Klf2</i> , <i>Fn1</i> , <i>Lox1</i> |   | Souris                  | Sárvári et al. 2021     |
|               |   | A1 : <b>Dpp4</b> , <i>Pi16</i><br>A2 : <b>ICAM1</b> , <i>Col4a2</i> , <i>Cav1</i><br>Diff. ASC : <i>Lipe</i> , <i>Adipoq</i> , <b>Plin1</b> , <i>Cor3</i>   |   | Souris                  | Burl et al. 2018        |

Tableau 1 : Liste des gènes exprimés par chaque sous-populations de FAPs et ASCs murines et humaines. En gras, les marqueurs majeurs choisis par les auteurs pour définir la sous-population. Les gènes soulignés sont communs aux différentes études.



**Figure 1** : Evolution de l'hétérogénéité des FAPs au cours de la régénération musculaire chez la souris. La courbe bleue correspond à l'évolution de la quantité de FAPs post-lésion issue de l'étude de Lemos et al.. Les encadrés correspondent à chaque population de FAPs définie par leur(s) marqueur(s). Les flèches en gras correspondent au changement d'état de chacune des populations conformément à l'hypothèse des différents auteurs.



**Figure 2** : Représentation des différentes populations d'ASCs et FAPs présentes dans le tissu adipeux et le muscle en condition basale et lésionnelle.



## Références

1. Joe, A. W. B., Yi, L., Natarajan, A., Le Grand, F. et al. (2010). Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nature Cell Biology*, 12(2), 153–163.
2. Uezumi, A., Fukada, S., Yamamoto, et al. (2010). Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nature Cell Biology*, 12(2), 143–152.
3. Friedenstein, A. J., Deriglasova, U. F., Kulagina, et al. (1974). Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Experimental Hematology*, 2(2), 83–92.
4. Theret, M., Rossi, F. M. V., & Contreras, O. (2021). Evolving Roles of Muscle-Resident Fibro-Adipogenic Progenitors in Health, Regeneration, Neuromuscular Disorders, and Aging. *Frontiers in Physiology*, 12, 673404.
5. Chapman, M. A., Mukund, K., Subramaniam, S. et al. (2017). Three distinct cell populations express extracellular matrix proteins and increase in number during skeletal muscle fibrosis. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 312(2), C131–C143.
6. Malecova, B., Gatto, S., Etxaniz, U. et al. (2018). Dynamics of cellular states of fibro-adipogenic progenitors during myogenesis and muscular dystrophy. *Nature Communications*, 9(1), 1–12.
7. Opreacu, S. N., Yue, F., Qiu, J. et al. (2020). Temporal Dynamics and Heterogeneity of Cell Populations during Skeletal Muscle Regeneration. *iScience*, 23(4), 100993.
8. Scott, R. W., Arostegui, M., Schweitzer, et al. (2019). Hic1 Defines Quiescent Mesenchymal Progenitor Subpopulations with Distinct Functions and Fates in Skeletal Muscle Regeneration. *Cell Stem Cell*, 25(6), 797-813.e9.
9. Rubenstein, A. B., Smith, G. R., Raue, U. et al. (2020). Single-cell transcriptional profiles in human skeletal muscle. *Scientific Reports*, 10(1), 229.

10. De Micheli, A. J., Laurilliard, E. J., Heinke, C. L. et al. (2020). Single-Cell Analysis of the Muscle Stem Cell Hierarchy Identifies Heterotypic Communication Signals Involved in Skeletal Muscle Regeneration. *Cell Reports*, 30(10), 3583-3595.e5.
11. Negroni, E., Kondili, M., Muraine, L. et al. (2022). Muscle fibro-adipogenic progenitors from a single-cell perspective: Focus on their “virtual” secretome. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 952041.
12. De Micheli, A. J., Spector, J. A., Elemento, O. et al. (2020). A reference single-cell transcriptomic atlas of human skeletal muscle tissue reveals bifurcated muscle stem cell populations. *Skeletal Muscle*, 10, 19.
13. Lemos, D. R., Babaeijandaghi, F., Low, M., et al. (2015). Nilotinib reduces muscle fibrosis in chronic muscle injury by promoting TNF-mediated apoptosis of fibro/adipogenic progenitors. *Nature Medicine*, 21(7), 786–794.
14. Biferali, B., Proietti, D., Mozzetta, C. et al. (2019). Fibro-Adipogenic Progenitors Cross-Talk in Skeletal Muscle: The Social Network. *Frontiers in Physiology*, 10, 1074.
15. Chargé, S. B. P., & Rudnicki, M. A. (2004). Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiological Reviews*, 84(1), 209–238.
16. Kuswanto, W., Burzyn, D., Panduro, M. et al. (2016). Poor Repair of Skeletal Muscle in Aging Mice Reflects a Defect in Local, Interleukin-33-Dependent Accumulation of Regulatory T Cells. *Immunity*, 44(2), 355–367.
17. Mozzetta, C., Consalvi, S., Saccone, V. et al. (2013). Fibroadipogenic progenitors mediate the ability of HDAC inhibitors to promote regeneration in dystrophic muscles of young, but not old Mdx mice. *EMBO Molecular Medicine*, 5(4), 626–639.
18. Lemos, D. R., Paylor, B., Chang, C. et al. (2012). Functionally Convergent White Adipogenic Progenitors of Different Lineages Participate in a Diffused System Supporting Tissue Regeneration. *Stem Cells*, 30(6), 1152–1162.

19. Dort, J., Fabre, P., Molina, T. et al. (2019). Macrophages Are Key Regulators of Stem Cells during Skeletal Muscle Regeneration and Diseases. *Stem Cells International*, 2019,
20. Serrano, A. L., Baeza-Raja, B., Perdiguero, E. et al. (2008). Interleukin-6 Is an Essential Regulator of Satellite Cell-Mediated Skeletal Muscle Hypertrophy. *Cell Metabolism*, 7(1), 33–44.
21. Laumonier, T., & Menetrey, J. (2016). Muscle injuries and strategies for improving their repair. *Journal of Experimental Orthopaedics*, 3, 15.
22. Sul, H. S. (2009). Minireview: Pref-1: Role in Adipogenesis and Mesenchymal Cell Fate. *Molecular Endocrinology*, 23(11), 1717–1725.
23. Gillies, A. R., & Lieber, R. L. (2011). Structure and Function of the Skeletal Muscle Extracellular Matrix. *Muscle & nerve*, 44(3), 318–331.
24. Contreras, O., Rossi, F. M. V., & Theret, M. (2021). Origins, potency, and heterogeneity of skeletal muscle fibro-adipogenic progenitors—time for new definitions. *Skeletal Muscle*, 11(1), 16.
25. Giuliani, G., Vumbaca, S., Fuoco, C. et al. (2021). SCA-1 micro-heterogeneity in the fate decision of dystrophic fibro/adipogenic progenitors. *Cell Death & Disease*, 12(1), 1–24.
26. Fitzgerald, G., Turiel, G., Gorski, T. et al. (2023). MME+ fibro-adipogenic progenitors are the dominant adipogenic population during fatty infiltration in human skeletal muscle. *Communications Biology*, 6, 111.
27. Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H. et al. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, 7(2), 211–228.
28. Merrick, D., Sakers, A., Irgebay, Z. et al. (2019). Identification of a mesenchymal progenitor cell hierarchy in adipose tissue. *Science (New York, N.Y.)*, 364(6438), eaav2501.
29. Schwalie, P. C., Dong, H., Zachara, M. et al. (2018). A stromal cell population that inhibits adipogenesis in mammalian fat depots. *Nature*, 559(7712), 103–108.
30. Emont, M. P., Jacobs, C., Essene, A. L. et al. (2022). A single-cell atlas of human and mouse white adipose tissue. *Nature*, 603(7903), 926–933.

31. Sárvári, A. K., Van Hauwaert, E. L., Markussen, L. K. et al. (2021). Plasticity of Epididymal Adipose Tissue in Response to Diet-Induced Obesity at Single-Nucleus Resolution. *Cell Metabolism*, 33(2), 437-453.e5.
32. Burl, R. B., Ramseyer, V. D., Rondini, E. A. et al. (2018). Deconstructing Adipogenesis Induced by  $\beta$ 3-Adrenergic Receptor Activation with Single-Cell Expression Profiling. *Cell Metabolism*, 28(2), 300-309.e4.
33. Liu, X., Yuan, M., Xiang, Q. et al. (2022). Single-cell RNA sequencing of subcutaneous adipose tissues identifies therapeutic targets for cancer-associated lymphedema. *Cell Discovery*, 8(1), 1–20.
34. Biltz, N. K., Collins, K. H., Shen, K. C. et al. (2020). Infiltration of intramuscular adipose tissue impairs skeletal muscle contraction. *The Journal of Physiology*, 598(13), 2669–2683.
35. Sastourné-Arrey, Q., Mathieu, M., Contreras, X. et al. (2023). Adipose tissue is a source of regenerative cells that augment the repair of skeletal muscle after injury. *Nature Communications*, 14(1), 80.
36. Gil-Ortega, M., Garidou, L., Barreau, C. et al. (2013). Native Adipose Stromal Cells Egress from Adipose Tissue In Vivo: Evidence During Lymph Node Activation. *STEM CELLS*, 31(7), 1309–1320.
37. Grousse, A., Gil-Ortega, M., Bourlier, V. et al. (2019). The Release of Adipose Stromal Cells from Subcutaneous Adipose Tissue Regulates Ectopic Intramuscular Adipocyte Deposition. *Cell Reports*, 27(2), 323-333.e5.

## Annexe n°4

### Preparation of mouse quadriceps muscle slices for immunohistochemistry investigations.

Barreau C, Mathieu M, Girousse A, Sengenès C.

Campden Instruments Application Note. 08 Jan 2022

## Preparation of mouse quadriceps muscle slices for immunohistochemistry investigations.

Corinne BARREAU, Maxime MATHIEU, Amandine GIROUSSE, Coralie SENGENES

RESTORE, Team STROMAGICS, 4bis Avenue Hubert Curien, Bâtiment INCERE, 31100 Toulouse, France

### Introduction

Skeletal muscles represent 40% of the body mass. It is formed by contractile multinucleated muscle fibres, resulting from the fusion of myoblasts. The main function of skeletal muscles is to generate the forces required to maintain posture and produce movement. After a trauma, skeletal muscles exhibit this amazing capacity to regenerate and repair. However, this regenerative capacity is dramatically impaired as we age leading to muscle mass decline, associated with physical frailty and increased risk of morbidity.

It has been shown that adipose tissue mass is correlated with skeletal muscle function and mobility, such that adipose tissue deposition in muscle and loss of muscle mass occur simultaneously with aging and in other muscle-related diseases [1-5]. Furthermore, muscle regeneration after injury is also associated with a transient remodeling of the stromal and immune cell component of muscular cells [6]. Thus, a better characterization of both adipocyte accumulation and cellular composition in skeletal muscle after injury is mandatory to increase our knowledge of the events occurring during muscle regeneration post-damage.

Tissue clearing techniques, especially those using organic solvents have enabled three-dimensional imaging of whole tissues by transforming thick tissues

into optically transparent thick tissues. But these techniques present some drawbacks since direct lipid staining is impossible because of their complete extraction, making it impossible to visualize adipocytes by using probes staining lipids (bodipy). Furthermore, some tissues such as large skeletal muscles are difficult to clear entirely. An intermediate solution for quantification of both adipocyte content and cellular composition post-injury resides in pseudo 3D imaging on thick muscle slices.

### Procedures

*Sample preparation:* For this purpose, we routinely perform quadriceps femoris muscle sampling in mice. Our objective is to obtain a global vision of the events present in the muscle at a given time. Longitudinal sections are the most pertinent to answer this question.

The muscle is fixed in neutral buffered 4% (w/v) paraformaldehyde (24h at room temperature). Note, if samples are fluorescent, it is important to keep them away from light during fixation. Then, the muscle is rinsed in PBS and embedded in 3% agarose gel to perform longitudinal sectioning. In order to make parallel sections with the muscle fibres, the muscle must be embedded as shown in Figure 1.

### Product Focus: 5100mz Vibrotome



This entry-level Microtome is perfect for techniques such as histology, organotypic slice culture and low-resolution imaging

| Application Parameters |               |
|------------------------|---------------|
| Amplitude              | 1.5mm         |
| Frequency              | 50Hz          |
| Advance Speed          | 0.10-0.25mm/s |

For more information click visit <https://campdeninstruments.com/products/vibrating-microtome-5100mz>

Model: 5100mz • Date: January 2022  
Campden Instruments tel: +44 (0)1509 814790 • email: info@campdeninstruments.com • web: www.campdeninstruments.com • Loughborough, Leics., England





Figure 1: Schematic representation of the quadriceps femoris muscle mounting

**Sample sectioning:** The agarose block containing the muscle is then turned over and attached with glue to the metal tissue mount of the 5100mz vibratome. Then, the whole muscle is immersed in a pre-cooled PBS solution making sure to keep the temperature between 3 and 4°C to improve the sectioning efficiency. The cutting speed is a key parameter to preserve the integrity of the tissue. The amplitude, frequency and the section thickness remain fixed. We use a speed of 0.25mm/s for young mice muscles and 0.10mm/s for the injured/old ones. Using a paintbrush, the floating muscle thick section is then transferred to a culture dish previously filled with PBS containing antibiotics and antifungals, for longer preservation.

### Specific examples

Fat accumulation in the form of adipocytes located between muscle fibres in response to diet challenge [4] or after muscle injury was investigated. BODIPY, a marker of neutral lipids, was used to stain the lipid droplets of mature adipocytes. Then, using confocal microscopy on whole muscle section we quantified the surface occupied by adipocytes within the muscle.

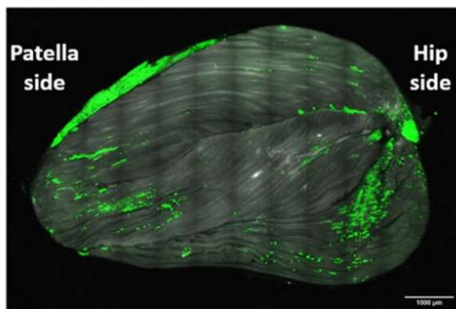


Figure 2: Mouse quadriceps muscle section stained with bodipy (green). (Scale 1000 µm)

This type of muscle sectioning combined with the immunofluorescence technique has also allowed us to observe both muscle-derived stromal and immune components. Using a CD45 antibody, a leukocyte

marker, and PDGFR $\alpha$  antibody, a marker of muscle mesenchymal stromal cells, we were able to monitor the evolution of these cell types in the muscle over time after injury.

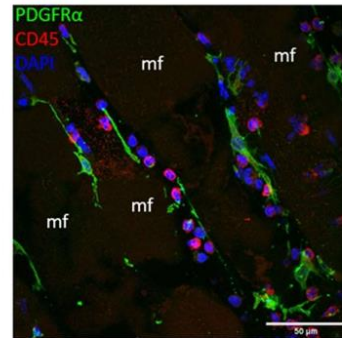


Figure 3: Mouse quadriceps muscle section stained with PDGFR $\alpha$  (green), CD45 (red) antibody and DAPI (blue) 1 day after muscle injury. (mf: muscle fibers; Scale 50 µm)

### References

1. Batsis, J.A. Obesity in the Older Adult: Special Issue. J. Nutr. Gerontol. Geriatr. 2019, 38, 1–5.  
<https://doi.org/10.1080/21551197.2018.1564197>
2. Newman, A.B.; Haggerty, C.L.; Goodpaster, B.; Harris, T.; Kritchevsky, S.; Nevitt, M.; Miles, T.P.; Visser, M.; Health, A. Body Composition Research Group. Strength and muscle quality in a well-functioning cohort of older adults: The Health, Aging and Body Composition Study. J. Am. Geriatr. Soc. 2003, 51, 323–330.  
<https://doi.org/10.1046/j.1532-5415.2003.51105.x>
3. Newman, A.B.; Kupelian, V.; Visser, M.; Simonsick, E.; Goodpaster, B.; Nevitt, M.; Kritchevsky, S.B.; Tylavsky, F.A.; Rubin, S.M.; Harris, T.B.; et al. Sarcopenia: Alternative definitions and associations with lower extremity function. J. Am. Geriatr. Soc. 2003, 51, 1602–1609.  
<https://doi.org/10.1046/j.1532-5415.2003.51534.x>
4. Girousse A, Gil-Ortega M, Bourlier V, Bergeaud C, Sastourné-Arrey Q, Moro C, Barreau C, Guissard C, Vion J, Arnaud E, Pradère JP, Juin N, Casteilla L, Sengenès C. The Release of Adipose Stromal Cells from Subcutaneous Adipose Tissue Regulates Ectopic Intramuscular Adipocyte Deposition. Cell Rep. 2019 Apr 9;27(2):323-333. e5.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.03.038>
5. Amandine Girousse, Maxime Mathieu, Quentin Sastourné-Arrey, Sylvie Monferran, Louis Casteilla, Coralie Sengenès Endogenous Mobilization of Mesenchymal Stromal Cells: A Pathway for Interorgan Communication? Front Cell Dev Biol. 2021 Jan 8 ;8.  
<https://doi.org/10.3389/fcell.2020.598520>
6. Julier Z., Park A. J., Briquez P. S., Martino M. M. Promoting tissue regeneration by modulating the immune system. Acta Biomaterialia 2017, 53, 13-28  
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.01.056>

## REFERENCES

1. Regeneration in the metazoans: why does it happen? - Alvarado - 2000 - BioEssays - Wiley Online Library. [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(200006\)22:6%3C578::AID-BIES11%3E3.0.CO;2-%23](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/(SICI)1521-1878(200006)22:6%3C578::AID-BIES11%3E3.0.CO;2-%23).
2. Zhao, A., Qin, H. & Fu, X. What Determines the Regenerative Capacity in Animals? *BioScience* **66**, 735–746 (2016).
3. Yun, M. H. Changes in Regenerative Capacity through Lifespan. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 25392–25432 (2015).
4. Reddy, P. C., Gungi, A. & Unni, M. Cellular and Molecular Mechanisms of Hydra Regeneration. *Results Probl. Cell Differ.* **68**, 259–290 (2019).
5. Iismaa, S. E. *et al.* Comparative regenerative mechanisms across different mammalian tissues. *Npj Regen. Med.* **3**, 1–20 (2018).
6. Ciciliot, S. & Schiaffino, S. Regeneration of mammalian skeletal muscle. Basic mechanisms and clinical implications. *Curr. Pharm. Des.* **16**, 906–914 (2010).
7. Faber, P. & Siervo, M. *Nutrition in Critical Care*. (Cambridge University Press, 2014).
8. Bruusgaard, J. C., Liestøl, K., Ekmark, M., Kollstad, K. & Gundersen, K. Number and spatial distribution of nuclei in the muscle fibres of normal mice studied in vivo. *J. Physiol.* **551**, 467–478 (2003).
9. Delbono, O., Rodrigues, A. C. Z., Bonilla, H. J. & Messi, M. L. The emerging role of the sympathetic nervous system in skeletal muscle motor innervation and sarcopenia. *Ageing Res. Rev.* **67**, 101305 (2021).
10. Dave, H. D., Shook, M. & Varacallo, M. Anatomy, Skeletal Muscle. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2023).
11. Frontera, W. R. & Ochala, J. Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. *Calcif. Tissue Int.* **96**, 183–195 (2015).
12. Ottenheijm, C. A. C. & Granzier, H. Lifting the Nebula: Novel Insights into Skeletal Muscle Contractility. *Physiology* **25**, 304–310 (2010).
13. Cassens, R. G. & Cooper, C. C. Red and White Muscle. in *Advances in Food Research* (eds. Chichester, C. O., Mrak, E. M. & Stewart, G. F.) vol. 19 1–74 (Academic Press, 1971).
14. Larson, L., Lioy, J., Johnson, J. & Medler, S. Transitional Hybrid Skeletal Muscle Fibers in Rat Soleus Development. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* **67**, 891–900 (2019).
15. Ouédraogo, N., Kaboré, F. A. & Mion, G. Physiologie de la jonction neuromusculaire et mécanisme d'action des curares. *Prat. En Anesth. Réanimation* **15**, 329–338 (2011).
16. Kalamida, D. *et al.* Muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Structure, function and pathogenicity. *FEBS J.* **274**, 3799–3845 (2007).
17. Johnstone, A. F. M., Viele, K. & Cooper, R. L. Structure/function assessment of synapses at motor nerve terminals. *Synap. N. Y. N* **65**, 287–299 (2011).
18. Lovrić, A. *et al.* Single-cell sequencing deconvolutes cellular responses to exercise in human skeletal muscle. *Commun. Biol.* **5**, 1–14 (2022).
19. Murrant, C. L., Lamb, I. R. & Novielli, N. M. Capillary endothelial cells as coordinators of skeletal muscle blood flow during active hyperemia. *Microcirculation* **24**, e12348 (2017).
20. Véliz, L. P., González, F. G., Duling, B. R., Sáez, J. C. & Boric, M. P. Functional role of gap junctions in cytokine-induced leukocyte adhesion to endothelium in vivo. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **295**, H1056–H1066 (2008).
21. Latroche, C., Weiss-Gayet, M., Gitiaux, C. & Chazaud, B. Cell sorting of various cell types from mouse and human skeletal muscle. *Methods* **134–135**, 50–55 (2018).
22. Havas, E. *et al.* Lymph flow dynamics in exercising human skeletal muscle as detected by scintigraphy. *J. Physiol.* **504**, 233–239 (1997).
23. Ji, R.-C. Recent advances and new insights into muscular lymphangiogenesis in health and disease. *Life Sci.* **211**, 261–269 (2018).

24. Kong, L.-L. *et al.* The optimum marker for the detection of lymphatic vessels. *Mol. Clin. Oncol.* **7**, 515–520 (2017).
25. Randolph, G. J., Ivanov, S., Zinselmeyer, B. H. & Scallan, J. P. The Lymphatic System: Integral Roles in Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **35**, 31–52 (2017).
26. Shefer, G., Wleklinski-Lee, M. & Yablonka-Reuveni, Z. Skeletal muscle satellite cells can spontaneously enter an alternative mesenchymal pathway. *J. Cell Sci.* **117**, 5393–5404 (2004).
27. Asakura, A., Komaki, M. & Rudnicki, M. Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. *Differ. Res. Biol. Divers.* **68**, 245–253 (2001).
28. Wada, M. R., Inagawa-Ogashiwa, M., Shimizu, S., Yasumoto, S. & Hashimoto, N. Generation of different fates from multipotent muscle stem cells. *Dev. Camb. Engl.* **129**, 2987–2995 (2002).
29. Pisani, D. F. *et al.* Isolation of a Highly Myogenic CD34-Negative Subset of Human Skeletal Muscle Cells Free of Adipogenic Potential. *Stem Cells* **28**, 753–764 (2010).
30. Vauchez, K. *et al.* Aldehyde Dehydrogenase Activity Identifies a Population of Human Skeletal Muscle Cells With High Myogenic Capacities. *Mol. Ther.* **17**, 1948–1958 (2009).
31. Uezumi, A., Fukada, S., Yamamoto, N., Takeda, S. & Tsuchida, K. Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat. Cell Biol.* **12**, 143–152 (2010).
32. Joe, A. W. B. *et al.* Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat. Cell Biol.* **12**, 153–163 (2010).
33. Manohar, M. *et al.* Novel circulating and tissue monocytes as well as macrophages in pancreatitis and recovery. *Gastroenterology* **161**, 2014–2029.e14 (2021).
34. Contreras, O., Rossi, F. M. & Brandan, E. Adherent muscle connective tissue fibroblasts are phenotypically and biochemically equivalent to stromal fibro/adipogenic progenitors. *Matrix Biol. Plus* **2**, 100006 (2019).
35. Giuliani, G. *et al.* SCA-1 micro-heterogeneity in the fate decision of dystrophic fibro/adipogenic progenitors. *Cell Death Dis.* **12**, 1–24 (2021).
36. Farup, J. *et al.* Human skeletal muscle CD90+ fibro-adipogenic progenitors are associated with muscle degeneration in type 2 diabetic patients. *Cell Metab.* **33**, 2201–2214.e10 (2021).
37. Uezumi, A. *et al.* Cell-Surface Protein Profiling Identifies Distinctive Markers of Progenitor Cells in Human Skeletal Muscle. *Stem Cell Rep.* **7**, 263–278 (2016).
38. Goloviznina, N. A., Xie, N., Dandapat, A., Iuzzo, P. A. & Kyba, M. Prospective isolation of human fibroadipogenic progenitors with CD73. *Heliyon* **6**, e04503 (2020).
39. Jensen, J. B. *et al.* Isolation and characterization of muscle stem cells, fibro-adipogenic progenitors, and macrophages from human skeletal muscle biopsies. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **321**, C257–C268 (2021).
40. Friedenstein, A. J. *et al.* Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp. Hematol.* **2**, 83–92 (1974).
41. Dominici, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315–317 (2006).
42. Charbord, P. & Casteilla, L. La biologie des cellules souches mésenchymateuses d'origine humaine. *médecine/sciences* **27**, 261–267 (2011).
43. Uezumi, A. *et al.* Identification and characterization of PDGFR $\alpha$ + mesenchymal progenitors in human skeletal muscle. *Cell Death Dis.* **5**, e1186 (2014).
44. Wosczyzna, M. N. *et al.* Mesenchymal Stromal Cells Are Required for Regeneration and Homeostatic Maintenance of Skeletal Muscle. *Cell Rep.* **27**, 2029–2035.e5 (2019).
45. Tseng, H.-W. *et al.* Spinal cord injury reprograms muscle fibroadipogenic progenitors to form heterotopic bones within muscles. *Bone Res.* **10**, 22 (2022).
46. Yao, L. *et al.* Gli1 Defines a Subset of Fibro-adipogenic Progenitors that Promote Skeletal Muscle Regeneration With Less Fat Accumulation. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **36**, 1159–1173 (2021).

47. Roberts, E. W. *et al.* Depletion of stromal cells expressing fibroblast activation protein- $\alpha$  from skeletal muscle and bone marrow results in cachexia and anemia. *J. Exp. Med.* **210**, 1137–1151 (2013).
48. Tonson, A., Ratel, S., Le Fur, Y., Cozzone, P. & Bendahan, D. Effect of maturation on the relationship between muscle size and force production. *Med. Sci. Sports Exerc.* **40**, 918–925 (2008).
49. Malecova, B. *et al.* Dynamics of cellular states of fibro-adipogenic progenitors during myogenesis and muscular dystrophy. *Nat. Commun.* **9**, 1–12 (2018).
50. Oprescu, S. N., Yue, F., Qiu, J., Brito, L. F. & Kuang, S. Temporal Dynamics and Heterogeneity of Cell Populations during Skeletal Muscle Regeneration. *iScience* **23**, 100993 (2020).
51. Scott, R. W., Arostegui, M., Schweitzer, R., Rossi, F. M. V. & Underhill, T. M. Hic1 Defines Quiescent Mesenchymal Progenitor Subpopulations with Distinct Functions and Fates in Skeletal Muscle Regeneration. *Cell Stem Cell* **25**, 797–813.e9 (2019).
52. Rubenstein, A. B. *et al.* Single-cell transcriptional profiles in human skeletal muscle. *Sci. Rep.* **10**, 229 (2020).
53. De Micheli, A. J. *et al.* Single-Cell Analysis of the Muscle Stem Cell Hierarchy Identifies Heterotypic Communication Signals Involved in Skeletal Muscle Regeneration. *Cell Rep.* **30**, 3583–3595.e5 (2020).
54. Negroni, E. *et al.* Muscle fibro-adipogenic progenitors from a single-cell perspective: Focus on their “virtual” secretome. *Front. Cell Dev. Biol.* **10**, 952041 (2022).
55. De Micheli, A. J., Spector, J. A., Elemento, O. & Cosgrove, B. D. A reference single-cell transcriptomic atlas of human skeletal muscle tissue reveals bifurcated muscle stem cell populations. *Skelet. Muscle* **10**, 19 (2020).
56. Mauro, A. SATELLITE CELL OF SKELETAL MUSCLE FIBERS. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9**, 493–495 (1961).
57. Muir, A. R., Kanji, A. H. & Allbrook, D. The structure of the satellite cells in skeletal muscle. *J. Anat.* **99**, 435–444 (1965).
58. Snow, M. H. A quantitative ultrastructural analysis of satellite cells in denervated fast and slow muscles of the mouse. *Anat. Rec.* **207**, 593–604 (1983).
59. Zhang, L. *et al.* The CalcR-PKA-Yap1 Axis Is Critical for Maintaining Quiescence in Muscle Stem Cells. *Cell Rep.* **29**, 2154–2163.e5 (2019).
60. Feige, P., Brun, C. E., Ritso, M. & Rudnicki, M. A. Orienting Muscle Stem Cells for Regeneration in Homeostasis, Aging, and Disease. *Cell Stem Cell* **23**, 653–664 (2018).
61. García-Prat, L. *et al.* FoxO maintains a genuine muscle stem-cell quiescent state until geriatric age. *Nat. Cell Biol.* **22**, 1307–1318 (2020).
62. Kotsaris, G. *et al.* Odd skipped-related 1 controls the pro-regenerative response of fibro-adipogenic progenitors. *Npj Regen. Med.* **8**, 1–16 (2023).
63. Gromova, A., Tierney, M. T. & Sacco, A. FACS-based Satellite Cell Isolation From Mouse Hind Limb Muscles. *Bio-Protoc.* **5**, e1558 (2015).
64. Capkovic, K. L., Stevenson, S., Johnson, M. C., Thelen, J. J. & Cornelison, D. D. W. Neural cell adhesion molecule (NCAM) marks adult myogenic cells committed to differentiation. *Exp. Cell Res.* **314**, 1553–1565 (2008).
65. Seale, P. *et al.* Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* **102**, 777–786 (2000).
66. Relaix, F., Rocancourt, D., Mansouri, A. & Buckingham, M. A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature* **435**, 948–953 (2005).
67. Roth, S. M. *et al.* Skeletal muscle satellite cell populations in healthy young and older men and women. *Anat. Rec.* **260**, 351–358 (2000).
68. Oustanina, S., Hause, G. & Braun, T. Pax7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells but not their specification. *EMBO J.* **23**, 3430–3439 (2004).
69. Yablonka-Reuveni, Z., Day, K., Vine, A. & Shefer, G. Defining the transcriptional signature of skeletal muscle stem cells. *J. Anim. Sci.* **86**, E207–E216 (2008).



70. Buckingham, M. & Relaix, F. PAX3 and PAX7 as upstream regulators of myogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* **44**, 115–125 (2015).
71. Relaix, F., Rocancourt, D., Mansouri, A. & Buckingham, M. Divergent functions of murine Pax3 and Pax7 in limb muscle development. *Genes Dev.* **18**, 1088–1105 (2004).
72. Dumont, N. A., Bentzinger, C. F., Sincennes, M.-C. & Rudnicki, M. A. Satellite Cells and Skeletal Muscle Regeneration. *Compr. Physiol.* **5**, 1027–1059 (2015).
73. Huo, F., Liu, Q. & Liu, H. Contribution of muscle satellite cells to sarcopenia. *Front. Physiol.* **13**, (2022).
74. Bjornson, C. R. R. *et al.* Notch Signaling Is Necessary to Maintain Quiescence in Adult Muscle Stem Cells. *Stem Cells* **30**, 232–242 (2012).
75. 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).
76. Wang, X. *et al.* KLF7 Regulates Satellite Cell Quiescence in Response to Extracellular Signaling. *Stem Cells* **34**, 1310–1320 (2016).
77. Rozo, M., Li, L. & Fan, C.-M. Targeting  $\beta$ 1-integrin signaling enhances regeneration in aged and dystrophic muscle in mice. *Nat. Med.* **22**, 889–896 (2016).
78. Abou-Khalil, R. *et al.* Autocrine and Paracrine Angiopoietin 1/Tie-2 Signaling Promotes Muscle Satellite Cell Self-Renewal. *Cell Stem Cell* **5**, 298–309 (2009).
79. Sampath, S. C. *et al.* Induction of muscle stem cell quiescence by the secreted niche factor Oncostatin M. *Nat. Commun.* **9**, 1531 (2018).
80. Nakano, A., Harada, T., Morikawa, S. & Kato, Y. Expression of leukocyte common antigen (CD45) on various human leukemia/lymphoma cell lines. *Acta Pathol. Jpn.* **40**, 107–115 (1990).
81. Wang, X. *et al.* Heterogeneous origins and functions of mouse skeletal muscle-resident macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **117**, 20729–20740 (2020).
82. Pillon, N. J., Bilan, P. J., Fink, L. N. & Klip, A. Cross-talk between skeletal muscle and immune cells: muscle-derived mediators and metabolic implications. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **304**, E453–E465 (2013).
83. Ginhoux, F. & Jung, S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 392–404 (2014).
84. Coulis, G. *et al.* Single-cell and spatial transcriptomics identify a macrophage population associated with skeletal muscle fibrosis. *Sci. Adv.* **9**, eadd9984 (2023).
85. Soliman, H. *et al.* Pathogenic Potential of Hic1-Expressing Cardiac Stromal Progenitors. *Cell Stem Cell* **26**, 205–220.e8 (2020).
86. Cappellari, O. & Cossu, G. Pericytes in development and pathology of skeletal muscle. *Circ. Res.* **113**, 341–347 (2013).
87. Darland, D. C. *et al.* Pericyte production of cell-associated VEGF is differentiation-dependent and is associated with endothelial survival. *Dev. Biol.* **264**, 275–288 (2003).
88. Chintalgattu, V. *et al.* Coronary microvascular pericytes are the cellular target of sunitinib malate-induced cardiotoxicity. *Sci. Transl. Med.* **5**, 187ra69 (2013).
89. Kostallari, E. *et al.* Pericytes in the myovascular niche promote post-natal myofiber growth and satellite cell quiescence. *Dev. Camb. Engl.* **142**, 1242–1253 (2015).
90. Armulik, A., Genové, G. & Betsholtz, C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev. Cell* **21**, 193–215 (2011).
91. Murray, I. R. *et al.* Natural history of mesenchymal stem cells, from vessel walls to culture vessels. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **71**, 1353–1374 (2014).
92. Avolio, E. *et al.* Combined intramyocardial delivery of human pericytes and cardiac stem cells additively improves the healing of mouse infarcted hearts through stimulation of vascular and muscular repair. *Circ. Res.* **116**, e81–94 (2015).
93. Maumus, M. *et al.* Native human adipose stromal cells: localization, morphology and phenotype. *Int. J. Obes. 2005* **35**, 1141–1153 (2011).
94. Crisan, M. *et al.* A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* **3**, 301–313 (2008).

95. Hinz, B. & Lagares, D. Evasion of apoptosis by myofibroblasts: a hallmark of fibrotic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* **16**, 11–31 (2020).
96. Hinz, B., McCulloch, C. A. & Coelho, N. M. Mechanical regulation of myofibroblast phenoconversion and collagen contraction. *Exp. Cell Res.* **379**, 119–128 (2019).
97. Darby, I., Skalli, O. & Gabbiani, G. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab. Invest. J. Tech. Methods Pathol.* **63**, 21–29 (1990).
98. Hinz, B., Celetta, G., Tomasek, J. J., Gabbiani, G. & Chaponnier, C. Alpha-Smooth Muscle Actin Expression Upregulates Fibroblast Contractile Activity. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2730–2741 (2001).
99. Arnoldi, R., Chaponnier, C., Gabbiani, G. & Hinz, B. Chapter 88 - Heterogeneity of Smooth Muscle. in *Muscle* (eds. Hill, J. A. & Olson, E. N.) 1183–1195 (Academic Press, Boston/Waltham, 2012). doi:10.1016/B978-0-12-381510-1.00088-0.
100. Kannan, R., Palmquist, D. L. & Baker, N. Contribution of intermuscular fat to lipogenesis from dietary glucose carbon in mice. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Lipids Lipid Metab.* **431**, 225–232 (1976).
101. Kannan, R. & Baker, N. Net changes in intermuscular fat before and during rapid lipogenic activation in mice. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Lipids Lipid Metab.* **431**, 233–240 (1976).
102. Hilton, T. N., Tuttle, L. J., Bohnert, K. L., Mueller, M. J. & Sinacore, D. R. Excessive Adipose Tissue Infiltration in Skeletal Muscle in Individuals With Obesity, Diabetes Mellitus, and Peripheral Neuropathy: Association With Performance and Function. *Phys. Ther.* **88**, 1336–1344 (2008).
103. De Feyter, H. M. *et al.* Increased intramyocellular lipid content but normal skeletal muscle mitochondrial oxidative capacity throughout the pathogenesis of type 2 diabetes. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **22**, 3947–3955 (2008).
104. Al Saedi, A., Debruin, D. A., Hayes, A. & Hamrick, M. Lipid metabolism in sarcopenia. *Bone* **164**, 116539 (2022).
105. Vettor, R. *et al.* The origin of intermuscular adipose tissue and its pathophysiological implications. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **297**, E987–E998 (2009).
106. Gaeta, M. *et al.* Muscle fat-fraction and mapping in Duchenne muscular dystrophy: evaluation of disease distribution and correlation with clinical assessments. *Skeletal Radiol.* **41**, 955–961 (2012).
107. Torriani, M. *et al.* Lower leg muscle involvement in Duchenne muscular dystrophy: an MR imaging and spectroscopy study. *Skeletal Radiol.* **41**, 437–445 (2012).
108. Goodpaster, B. H., Bergman, B. C., Brennan, A. M. & Sparks, L. M. Intermuscular adipose tissue in metabolic disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* **19**, 285–298 (2023).
109. Oldknow, K. J., Macrae, V. E., Farquharson, C. & Bünger, L. Evaluating invasive and non-invasive methods to determine fat content in the laboratory mouse. *Open Life Sci.* **10**, (2015).
110. Pisani, D. F., Bottema, C. D. K., Butori, C., Dani, C. & Dechesne, C. A. Mouse model of skeletal muscle adiposity: A glycerol treatment approach. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **396**, 767–773 (2010).
111. Massopust, R. T. *et al.* Lifetime analysis of mdx skeletal muscle reveals a progressive pathology that leads to myofiber loss. *Sci. Rep.* **10**, 17248 (2020).
112. Bonilla, E. & Prella, A. Application of Nile blue and Nile red, two fluorescent probes, for detection of lipid droplets in human skeletal muscle. *J. Histochem. Cytochem.* **35**, 619–621 (1987).
113. Spangenburg, E. E., Pratt, S. J. P., Wohlers, L. M. & Lovering, R. M. Use of BODIPY (493/503) to visualize intramuscular lipid droplets in skeletal muscle. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, 598358 (2011).
114. Sztalryd, C. & Brasaemle, D. L. The perilipin family of lipid droplet proteins: Gatekeepers of intracellular lipolysis. *Biochim. Biophys. Acta* **1862**, 1221–1232 (2017).
115. Seibert, J. T., Najt, C. P., Heden, T. D., Mashek, D. G. & Chow, L. S. Muscle Lipid Droplets: Cellular Signaling to Exercise Physiology and Beyond. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* **31**, 928–938 (2020).



116. Lukjanenko, L., Brachat, S., Pierrel, E., Lach-Trifilieff, E. & Feige, J. N. Genomic Profiling Reveals That Transient Adipogenic Activation Is a Hallmark of Mouse Models of Skeletal Muscle Regeneration. *PLoS ONE* **8**, (2013).
117. Verboven, K. *et al.* Abdominal subcutaneous and visceral adipocyte size, lipolysis and inflammation relate to insulin resistance in male obese humans. *Sci. Rep.* **8**, 4677 (2018).
118. Wattjes, M. P., Kley, R. A. & Fischer, D. Neuromuscular imaging in inherited muscle diseases. *Eur. Radiol.* **20**, 2447–2460 (2010).
119. Goodpaster, B. H. *et al.* Association between regional adipose tissue distribution and both type 2 diabetes and impaired glucose tolerance in elderly men and women. *Diabetes Care* **26**, 372–379 (2003).
120. Goodpaster, B. H., Thaete, F. L. & Kelley, D. E. Thigh adipose tissue distribution is associated with insulin resistance in obesity and in type 2 diabetes mellitus. *Am. J. Clin. Nutr.* **71**, 885–892 (2000).
121. Bhullar, A. S. *et al.* Lipid is heterogeneously distributed in muscle and associates with low radiodensity in cancer patients. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle* **11**, 735–747 (2020).
122. Sachs, S. *et al.* Intermuscular adipose tissue directly modulates skeletal muscle insulin sensitivity in humans. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **316**, E866–E879 (2019).
123. Rahemi, H., Nigam, N. & Wakeling, J. M. The effect of intramuscular fat on skeletal muscle mechanics: implications for the elderly and obese. *J. R. Soc. Interface* **12**, 20150365 (2015).
124. Bh, G., Fl, T. & De, K. Composition of skeletal muscle evaluated with computed tomography. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **904**, (2000).
125. Essén, B., Hagenfeldt, L. & Kaijser, L. Utilization of blood-borne and intramuscular substrates during continuous and intermittent exercise in man. *J. Physiol.* **265**, 489–506 (1977).
126. Coen, P. M. & Goodpaster, B. H. Role of intramyocellular lipids in human health. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* **23**, 391–398 (2012).
127. Bergman, B. C. *et al.* Evaluation of exercise and training on muscle lipid metabolism. *Am. J. Physiol.* **276**, E106–117 (1999).
128. Watt, M. J., Heigenhauser, G. J. F. & Spriet, L. L. Intramuscular triacylglycerol utilization in human skeletal muscle during exercise: is there a controversy? *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* **93**, 1185–1195 (2002).
129. Guo, Z., Burguera, B. & Jensen, M. D. Kinetics of intramuscular triglyceride fatty acids in exercising humans. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* **89**, 2057–2064 (2000).
130. White, L. J., Ferguson, M. A., McCoy, S. C. & Kim, H. Intramyocellular lipid changes in men and women during aerobic exercise: a (1)H-magnetic resonance spectroscopy study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**, 5638–5643 (2003).
131. Langfort, J., Ploug, T., Ihlemann, J., Holm, C. & Galbo, H. Stimulation of hormone-sensitive lipase activity by contractions in rat skeletal muscle. *Biochem. J.* **351**, 207–214 (2000).
132. Alsted, T. J. *et al.* Adipose triglyceride lipase in human skeletal muscle is upregulated by exercise training. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **296**, E445–453 (2009).
133. Mattacks, C. A., Sadler, D. & Pond, C. M. The effects of exercise and dietary restriction on the activities of hexokinase and phosphofructokinase in superficial, intra-abdominal and intermuscular adipose tissue of guinea-pigs. *Comp. Biochem. Physiol. B* **87**, 533–542 (1987).
134. Pond, C. M. & Mattacks, C. A. The effects of noradrenaline and insulin on lipolysis in adipocytes isolated from nine different adipose depots of guinea-pigs. *Int. J. Obes.* **15**, 609–618 (1991).
135. Lafontan, M. & Berlan, M. Les récepteurs adrénérgiques de l'adipocyte : quelles implications dans l'obésité ? *Médecine Nutr.* **41**, 9–20 (2005).
136. Chapman, M. A., Mukund, K., Subramaniam, S., Brenner, D. & Lieber, R. L. Three distinct cell populations express extracellular matrix proteins and increase in number during skeletal muscle fibrosis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **312**, C131–C143 (2017).
137. Csapo, R., Gumpenberger, M. & Wessner, B. Skeletal Muscle Extracellular Matrix – What Do We Know About Its Composition, Regulation, and Physiological Roles? A Narrative Review. *Front. Physiol.* **11**, (2020).

138. McKee, T. J., Perlman, G., Morris, M. & Komarova, S. V. Extracellular matrix composition of connective tissues: a systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* **9**, 10542 (2019).
139. Guiraud, S. *et al.* HANAC Col4a1 Mutation in Mice Leads to Skeletal Muscle Alterations due to a Primary Vascular Defect. *Am. J. Pathol.* **187**, 505–516 (2017).
140. Culav, E. M., Clark, C. H. & Merrilees, M. J. Connective tissues: matrix composition and its relevance to physical therapy. *Phys. Ther.* **79**, 308–319 (1999).
141. Allikian, M. J., Hack, A. A., Mewborn, S., Mayer, U. & McNally, E. M. Genetic compensation for sarcoglycan loss by integrin  $\alpha 7\beta 1$  in muscle. *J. Cell Sci.* **117**, 3821–3830 (2004).
142. Zhang, W., Liu, Y. & Zhang, H. Extracellular matrix: an important regulator of cell functions and skeletal muscle development. *Cell Biosci.* **11**, 65 (2021).
143. Cornelison, D. D. W., Filla, M. S., Stanley, H. M., Rapraeger, A. C. & Olwin, B. B. Syndecan-3 and Syndecan-4 Specifically Mark Skeletal Muscle Satellite Cells and Are Implicated in Satellite Cell Maintenance and Muscle Regeneration. *Dev. Biol.* **239**, 79–94 (2001).
144. Kannus, P. *et al.* Location and Distribution of Non-collagenous Matrix Proteins in Musculoskeletal Tissues of Rat. *Histochem. J.* **30**, 799–810 (1998).
145. Arnò, B. *et al.* TNAP limits TGF- $\beta$ -dependent cardiac and skeletal muscle fibrosis by inactivating the SMAD2/3 transcription factors. *J. Cell Sci.* **132**, jcs234948 (2019).
146. Lukjanenko, L. *et al.* Loss of fibronectin from the aged stem cell niche affects the regenerative capacity of skeletal muscle in mice. *Nat. Med.* **22**, 897–905 (2016).
147. Thorsteinsdóttir, S., Deries, M., Cachaço, A. S. & Bajanca, F. The extracellular matrix dimension of skeletal muscle development. *Dev. Biol.* **354**, 191–207 (2011).
148. Laminin-111 Improves Skeletal Muscle Stem Cell Quantity and Function Following Eccentric Exercise | Stem Cells Translational Medicine | Oxford Academic.  
<https://academic.oup.com/stcltm/article/3/9/1013/6388185>.
149. Frantz, C., Stewart, K. M. & Weaver, V. M. The extracellular matrix at a glance. *J. Cell Sci.* **123**, 4195–4200 (2010).
150. Bloch, R. J. & Gonzalez-Serratos, H. Lateral force transmission across costameres in skeletal muscle. *Exerc. Sport Sci. Rev.* **31**, 73–78 (2003).
151. Volume change and pressure development in muscle during contraction | American Journal of Physiology-Legacy Content.  
<https://journals.physiology.org/doi/abs/10.1152/ajplegacy.1967.213.4.1025>.
152. Mukund, K. & Subramaniam, S. Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **12**, e1462 (2020).
153. Leto, D. & Saltiel, A. R. Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 383–396 (2012).
154. Katz, A. A century of exercise physiology: key concepts in regulation of glycogen metabolism in skeletal muscle. *Eur. J. Appl. Physiol.* **122**, 1751–1772 (2022).
155. Rivera-Brown, A. M. & Frontera, W. R. Principles of Exercise Physiology: Responses to Acute Exercise and Long-term Adaptations to Training. *PM&R* **4**, 797–804 (2012).
156. Eaton, S., Bartlett, K. & Pourfarzam, M. Mammalian mitochondrial beta-oxidation. *Biochem. J.* **320 ( Pt 2)**, 345–357 (1996).
157. Badin, P.-M. *et al.* Altered skeletal muscle lipase expression and activity contribute to insulin resistance in humans. *Diabetes* **60**, 1734–1742 (2011).
158. Recazens, E., Mouisel, E. & Langin, D. Hormone-sensitive lipase: sixty years later. *Prog. Lipid Res.* **82**, 101084 (2021).
159. Badin, P.-M., Langin, D. & Moro, C. Dynamics of skeletal muscle lipid pools. *Trends Endocrinol. Metab.* **24**, 607–615 (2013).
160. Haman, F. & Blondin, D. P. Shivering thermogenesis in humans: Origin, contribution and metabolic requirement. *Temp. Multidiscip. Biomed. J.* **4**, 217–226 (2017).
161. Nowack, J., Giroud, S., Arnold, W. & Ruf, T. Muscle Non-shivering Thermogenesis and Its Role in the Evolution of Endothermy. *Front. Physiol.* **8**, 889 (2017).

162. Lagarde, D., Montané, R., Ader, I., Casteilla, L. & Carrière, A. Stimuler les tissus adipeux bruns et beiges : un levier thérapeutique ? *Médecine Mal. Métaboliques* **15**, 753–762 (2021).
163. Costford, S. R. *et al.* The energetic implications of uncoupling protein-3 in skeletal muscle. *Appl. Physiol. Nutr. Metab. Physiol. Appl. Nutr. Metab.* **32**, 884–894 (2007).
164. Fuller-Jackson, J.-P. & Henry, B. A. Adipose and skeletal muscle thermogenesis: studies from large animals. *J. Endocrinol.* **237**, R99–R115 (2018).
165. Periasamy, M., Herrera, J. L. & Reis, F. C. G. Skeletal Muscle Thermogenesis and Its Role in Whole Body Energy Metabolism. *Diabetes Metab. J.* **41**, 327–336 (2017).
166. Pedersen, B. K. & Febbraio, M. A. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat. Rev. Endocrinol.* **8**, 457–465 (2012).
167. Matthews, V. B. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor is produced by skeletal muscle cells in response to contraction and enhances fat oxidation via activation of AMP-activated protein kinase. *Diabetologia* **52**, 1409–1418 (2009).
168. Rentería, I. *et al.* The Molecular Effects of BDNF Synthesis on Skeletal Muscle: A Mini-Review. *Front. Physiol.* **13**, 934714 (2022).
169. Clow, C. & Jasmin, B. J. Brain-derived neurotrophic factor regulates satellite cell differentiation and skeletal muscle regeneration. *Mol. Biol. Cell* **21**, 2182–2190 (2010).
170. Balakrishnan, R. & Thurmond, D. C. Mechanisms by Which Skeletal Muscle Myokines Ameliorate Insulin Resistance. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 4636 (2022).
171. Biferali, B., Proietti, D., Mozzetta, C. & Madaro, L. Fibro-Adipogenic Progenitors Cross-Talk in Skeletal Muscle: The Social Network. *Front. Physiol.* **10**, 1074 (2019).
172. Braga, M. *et al.* Follistatin promotes adipocyte differentiation, browning, and energy metabolism. *J. Lipid Res.* **55**, 375–384 (2014).
173. McPherron, A. C., Lawler, A. M. & Lee, S. J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* **387**, 83–90 (1997).
174. Kim, H. S. *et al.* Inhibition of preadipocyte differentiation by myostatin treatment in 3T3-L1 cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **281**, 902–906 (2001).
175. Iizuka, K., Machida, T. & Hirafuji, M. Skeletal muscle is an endocrine organ. *J. Pharmacol. Sci.* **125**, 125–131 (2014).
176. Hardy, D. *et al.* Comparative Study of Injury Models for Studying Muscle Regeneration in Mice. *PLOS ONE* **11**, e0147198 (2016).
177. Pessina, P. *et al.* Novel and optimized strategies for inducing fibrosis in vivo: focus on Duchenne Muscular Dystrophy. *Skelet. Muscle* **4**, 7 (2014).
178. Mahdy, M. A. A., Lei, H. Y., Wakamatsu, J.-I., Hosaka, Y. Z. & Nishimura, T. Comparative study of muscle regeneration following cardiotoxin and glycerol injury. *Ann. Anat. - Anat. Anz.* **202**, 18–27 (2015).
179. Giuliani, G., Rosina, M. & Reggio, A. Signaling pathways regulating the fate of fibro/adipogenic progenitors (FAPs) in skeletal muscle regeneration and disease. *FEBS J.* **289**, 6484–6517 (2022).
180. Kim, C.-S. *et al.* Electrophysiological study for comparing the effect of biological activity between type A botulinum toxins in rat gastrocnemius muscle. *Hum. Exp. Toxicol.* **32**, 914–920 (2013).
181. Harris, J. B., Grubb, B. D., Maltin, C. A. & Dixon, R. The Neurotoxicity of the Venom Phospholipases A2, Notexin and Taipoxin. *Exp. Neurol.* **161**, 517–526 (2000).
182. Mahdy, M. A. A. Glycerol-induced injury as a new model of muscle regeneration. *Cell Tissue Res.* **374**, 233–241 (2018).
183. Morton, A. B. *et al.* Barium chloride injures myofibers through calcium-induced proteolysis with fragmentation of motor nerves and microvessels. *Skelet. Muscle* **9**, 27 (2019).
184. Harris, J. B. Myotoxic phospholipases A2 and the regeneration of skeletal muscles. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology* **42**, 933–945 (2003).
185. Lees-Shepard, J. B. *et al.* Activin-dependent signaling in fibro/adipogenic progenitors causes fibrodysplasia ossificans progressiva. *Nat. Commun.* **9**, 471 (2018).

186. Menetrey, J., Kasemkijwattana, C., Fu, F. H., Moreland, M. S. & Huard, J. Suturing versus immobilization of a muscle laceration. A morphological and functional study in a mouse model. *Am. J. Sports Med.* **27**, 222–229 (1999).
187. Roman, W. *et al.* Muscle repair after physiological damage relies on nuclear migration for cellular reconstruction. *Science* **374**, 355–359 (2021).
188. Gillani, S., Cao, J., Suzuki, T. & Hak, D. J. The effect of ischemia reperfusion injury on skeletal muscle. *Injury* **43**, 670–675 (2012).
189. Vignaud, A. *et al.* Impaired Skeletal Muscle Repair after Ischemia-Reperfusion Injury in Mice. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**, 724914 (2010).
190. Bernard, C., Jomard, C., Chazaud, B. & Gondin, J. Kinetics of skeletal muscle regeneration after mild and severe muscle damage induced by electrically-evoked lengthening contractions. *FASEB J.* **37**, e23107 (2023).
191. Goel, A. J., Rieder, M.-K., Arnold, H.-H., Radice, G. L. & Krauss, R. S. Niche Cadherins Control the Quiescence-to-Activation Transition in Muscle Stem Cells. *Cell Rep.* **21**, 2236–2250 (2017).
192. Rodgers, J. T., Schroeder, M. D., Ma, C. & Rando, T. A. HGFA Is an Injury-Regulated Systemic Factor that Induces the Transition of Stem Cells into GAlert. *Cell Rep.* **19**, 479–486 (2017).
193. Cornelison, D. D. W. & Wold, B. J. Single-Cell Analysis of Regulatory Gene Expression in Quiescent and Activated Mouse Skeletal Muscle Satellite Cells. *Dev. Biol.* **191**, 270–283 (1997).
194. Pallafacchina, G. *et al.* An adult tissue-specific stem cell in its niche: a gene profiling analysis of in vivo quiescent and activated muscle satellite cells. *Stem Cell Res.* **4**, 77–91 (2010).
195. Sheehan, S. M. & Allen, R. E. Skeletal muscle satellite cell proliferation in response to members of the fibroblast growth factor family and hepatocyte growth factor. *J. Cell. Physiol.* **181**, 499–506 (1999).
196. Zhang, W. *et al.* Synergistic effects of TGF $\beta$ 2, WNT9a, and FGFR4 signals attenuate satellite cell differentiation during skeletal muscle development. *Aging Cell* **17**, e12788 (2018).
197. Wang, Y. X. & Rudnicki, M. A. Satellite cells, the engines of muscle repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 127–133 (2011).
198. Relaix, F. & Zammit, P. S. Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage. *Development* **139**, 2845–2856 (2012).
199. Bentzinger, C. F., Wang, Y. X. & Rudnicki, M. A. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, a008342 (2012).
200. Almada, A. E. & Wagers, A. J. Molecular circuitry of stem cell fate in skeletal muscle regeneration, ageing and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 267–279 (2016).
201. Cao, Y. *et al.* Global and gene-specific analyses show distinct roles for Myod and Myog at a common set of promoters. *EMBO J.* **25**, 502–511 (2006).
202. Cao, Y. *et al.* Genome-wide MyoD binding in skeletal muscle cells: a potential for broad cellular reprogramming. *Dev. Cell* **18**, 662–674 (2010).
203. Gayraud-Morel, B. *et al.* A role for the myogenic determination gene Myf5 in adult regenerative myogenesis. *Dev. Biol.* **312**, 13–28 (2007).
204. Megeney, L. A., Kablar, B., Garrett, K., Anderson, J. E. & Rudnicki, M. A. MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. *Genes Dev.* **10**, 1173–1183 (1996).
205. Yue, F. *et al.* Lipid droplet dynamics regulate adult muscle stem cell fate. *Cell Rep.* **38**, 110267 (2022).
206. Sousa-Victor, P., García-Prat, L. & Muñoz-Cánoves, P. Control of satellite cell function in muscle regeneration and its disruption in ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **23**, 204–226 (2022).
207. Yeh, C.-J., Sattler, K. M. & Lepper, C. Molecular regulation of satellite cells via intercellular signaling. *Gene* **858**, 147172 (2023).
208. Fuchs, E. & Blau, H. M. Tissue Stem Cells: Architects of Their Niches. *Cell Stem Cell* **27**, 532–556 (2020).
209. Charrasse, S., Causeret, M., Comunale, F., Bonet-Kerrache, A. & Gauthier-Rouvière, C. Rho GTPases and cadherin-based cell adhesion in skeletal muscle development. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **24**, 309–313 (2003).

210. Charrasse, S. *et al.* RhoA GTPase regulates M-cadherin activity and myoblast fusion. *Mol. Biol. Cell* **17**, 749–759 (2006).
211. Chen, B., You, W., Wang, Y. & Shan, T. The regulatory role of Myomaker and Myomixer-Myomerger-Minion in muscle development and regeneration. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **77**, 1551–1569 (2020).
212. Shi, J. *et al.* Requirement of the fusogenic micropeptide myomixer for muscle formation in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 11950–11955 (2017).
213. Wang, Y., Lu, J. & Liu, Y. Skeletal Muscle Regeneration in Cardiotoxin-Induced Muscle Injury Models. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 13380 (2022).
214. Eliazer, S. *et al.* Wnt4 from the Niche Controls the Mechano-Properties and Quiescent State of Muscle Stem Cells. *Cell Stem Cell* **25**, 654-665.e4 (2019).
215. Judson, R. N. *et al.* The Hippo pathway member Yap plays a key role in influencing fate decisions in muscle satellite cells. *J. Cell Sci.* **125**, 6009–6019 (2012).
216. Brack, A. S., Conboy, I. M., Conboy, M. J., Shen, J. & Rando, T. A. A Temporal Switch from Notch to Wnt Signaling in Muscle Stem Cells Is Necessary for Normal Adult Myogenesis. *Cell Stem Cell* **2**, 50–59 (2008).
217. Rayagiri, S. S. *et al.* Basal lamina remodeling at the skeletal muscle stem cell niche mediates stem cell self-renewal. *Nat. Commun.* **9**, 1075 (2018).
218. Tierney, M. T. *et al.* Autonomous Extracellular Matrix Remodeling Controls a Progressive Adaptation in Muscle Stem Cell Regenerative Capacity during Development. *Cell Rep.* **14**, 1940–1952 (2016).
219. Gilbert, P. M. *et al.* Substrate elasticity regulates skeletal muscle stem cell self-renewal in culture. *Science* **329**, 1078–1081 (2010).
220. Bentzinger, C. F., Wang, Y. X., Dumont, N. A. & Rudnicki, M. A. Cellular dynamics in the muscle satellite cell niche. *EMBO Rep.* **14**, 1062–1072 (2013).
221. Brigitte, M. *et al.* Muscle resident macrophages control the immune cell reaction in a mouse model of notexin-induced myoinjury. *Arthritis Rheum.* **62**, 268–279 (2010).
222. Soehnlein, O. & Lindbom, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 427–439 (2010).
223. Galli, S. J., Nakae, S. & Tsai, M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* **6**, 135–142 (2005).
224. Duchesne, E., Tremblay, M.-H. & Côté, C. H. Mast cell tryptase stimulates myoblast proliferation; a mechanism relying on protease-activated receptor-2 and cyclooxygenase-2. *BMC Musculoskelet. Disord.* **12**, 235 (2011).
225. Dumont, N., Lepage, K., Côté, C. H. & Frenette, J. Mast cells can modulate leukocyte accumulation and skeletal muscle function following hindlimb unloading. *J. Appl. Physiol.* **103**, 97–104 (2007).
226. Scapini, P. *et al.* The neutrophil as a cellular source of chemokines: Neurotrophil-derived chemokines. *Immunol. Rev.* **177**, 195–203 (2000).
227. Geissmann, F., Jung, S. & Littman, D. R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* **19**, 71–82 (2003).
228. Arnold, L. *et al.* Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J. Exp. Med.* **204**, 1057–1069 (2007).
229. Auffray, C. *et al.* Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* **317**, 666–670 (2007).
230. Martinez, C. O. *et al.* Regulation of skeletal muscle regeneration by CCR2-activating chemokines is directly related to macrophage recruitment. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **299**, R832-842 (2010).
231. Sun, D. *et al.* Bone marrow-derived cell regulation of skeletal muscle regeneration. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **23**, 382–395 (2009).



232. Lu, H., Huang, D., Ransohoff, R. M. & Zhou, L. Acute skeletal muscle injury: CCL2 expression by both monocytes and injured muscle is required for repair. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **25**, 3344–3355 (2011).
233. Saidj, T. *et al.* Optimized Flow Cytometry Strategy for Phenotyping Intramuscular Leukocytes: Application to the Evaluation of Myopathological Processes. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **81**, 193–207 (2022).
234. Côté, C. H., Bouchard, P., van Rooijen, N., Marsolais, D. & Duchesne, E. Monocyte depletion increases local proliferation of macrophage subsets after skeletal muscle injury. *BMC Musculoskelet. Disord.* **14**, 359 (2013).
235. Segawa, M. *et al.* Suppression of macrophage functions impairs skeletal muscle regeneration with severe fibrosis. *Exp. Cell Res.* **314**, 3232–3244 (2008).
236. Tidball, J. G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **288**, R345–R353 (2005).
237. St Pierre, B. A. & Tidball, J. G. Differential response of macrophage subpopulations to soleus muscle reloading after rat hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* **1985** **77**, 290–297 (1994).
238. Chazaud, B. Inflammation and Skeletal Muscle Regeneration: Leave It to the Macrophages! *Trends Immunol.* **41**, 481–492 (2020).
239. Dumont, N. & Frenette, J. Macrophages protect against muscle atrophy and promote muscle recovery in vivo and in vitro: a mechanism partly dependent on the insulin-like growth factor-1 signaling molecule. *Am. J. Pathol.* **176**, 2228–2235 (2010).
240. Ruffell, D. *et al.* A CREB-C/EBP $\beta$  cascade induces M2 macrophage-specific gene expression and promotes muscle injury repair. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 17475–17480 (2009).
241. Deng, B., Wehling-Henricks, M., Villalta, S. A., Wang, Y. & Tidball, J. G. IL-10 triggers changes in macrophage phenotype that promote muscle growth and regeneration. *J. Immunol. Baltim. Md* **1950** **189**, 3669–3680 (2012).
242. Villalta, S. A., Nguyen, H. X., Deng, B., Gotoh, T. & Tidball, J. G. Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 482–496 (2009).
243. Saclier, M. *et al.* Differentially activated macrophages orchestrate myogenic precursor cell fate during human skeletal muscle regeneration. *Stem Cells Dayt. Ohio* **31**, 384–396 (2013).
244. Dufresne, S. S., Frenette, J. & Dumont, N. A. Inflammation et régénération musculaire - Une arme à double tranchant. *médecine/sciences* **32**, 591–597 (2016).
245. Liu, W., Wei-LaPierre, L., Klose, A., Dirksen, R. T. & Chakkalakal, J. V. Inducible depletion of adult skeletal muscle stem cells impairs the regeneration of neuromuscular junctions. *eLife* **4**, e09221.
246. 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).
247. Lemos, D. R. *et al.* Functionally Convergent White Adipogenic Progenitors of Different Lineages Participate in a Diffused System Supporting Tissue Regeneration. *Stem Cells* **30**, 1152–1162 (2012).
248. 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).
249. Uezumi, A. *et al.* Mesenchymal Bmp3b expression maintains skeletal muscle integrity and decreases in age-related sarcopenia. *J. Clin. Invest.* **131**, e139617.
250. Fiore, D. *et al.* Pharmacological blockage of fibro/adipogenic progenitor expansion and suppression of regenerative fibrogenesis is associated with impaired skeletal muscle regeneration. *Stem Cell Res.* **17**, 161–169 (2016).
251. Mathew, S. J. *et al.* Connective tissue fibroblasts and Tcf4 regulate myogenesis. *Dev. Camb. Engl.* **138**, 371–384 (2011).



252. Theret, M., Rossi, F. M. V. & Contreras, O. Evolving Roles of Muscle-Resident Fibro-Adipogenic Progenitors in Health, Regeneration, Neuromuscular Disorders, and Aging. *Front. Physiol.* **12**, 673404 (2021).
253. Serrano, A. L., Baeza-Raja, B., Perdiguero, E., Jardí, M. & Muñoz-Cánoves, P. Interleukin-6 Is an Essential Regulator of Satellite Cell-Mediated Skeletal Muscle Hypertrophy. *Cell Metab.* **7**, 33–44 (2008).
254. Schiaffino, S. & Mammucari, C. Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. *Skelet. Muscle* **1**, 4 (2011).
255. Mozzetta, C. *et al.* Fibroadipogenic progenitors mediate the ability of HDAC inhibitors to promote regeneration in dystrophic muscles of young, but not old Mdx mice. *EMBO Mol. Med.* **5**, 626–639 (2013).
256. Reggio, A. *et al.* Adipogenesis of skeletal muscle fibro/adipogenic progenitors is affected by the WNT5a/GSK3/β-catenin axis. *Cell Death Differ.* **27**, 2921–2941 (2020).
257. Santini, M. P. *et al.* Tissue-Resident PDGFRα+ Progenitor Cells Contribute to Fibrosis versus Healing in a Context- and Spatiotemporally Dependent Manner. *Cell Rep.* **30**, 555-570.e7 (2020).
258. Melincovici, C. S. *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. *Romanian J. Morphol. Embryol. Rev. Roum. Morphol. Embryol.* **59**, 455–467 (2018).
259. Verma, M. *et al.* Muscle Satellite Cell Cross-Talk with a Vascular Niche Maintains Quiescence via VEGF and Notch Signaling. *Cell Stem Cell* **23**, 530-543.e9 (2018).
260. Mashinchian, O., Pisconti, A., Le Moal, E. & Bentzinger, C. F. Chapter Two - The Muscle Stem Cell Niche in Health and Disease. in *Current Topics in Developmental Biology* (ed. Sassoon, D.) vol. 126 23–65 (Academic Press, 2018).
261. Chargé, S. B. P. & Rudnicki, M. A. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiol. Rev.* **84**, 209–238 (2004).
262. Kuswanto, W. *et al.* Poor Repair of Skeletal Muscle in Aging Mice Reflects a Defect in Local, Interleukin-33-Dependent Accumulation of Regulatory T Cells. *Immunity* **44**, 355–367 (2016).
263. Dort, J., Fabre, P., Molina, T. & Dumont, N. A. Macrophages Are Key Regulators of Stem Cells during Skeletal Muscle Regeneration and Diseases. *Stem Cells Int.* **2019**, 4761427 (2019).
264. Kang, X. *et al.* Interleukin-15 facilitates muscle regeneration through modulation of fibro/adipogenic progenitors. *Cell Commun. Signal. CCS* **16**, 42 (2018).
265. Laumonier, T. & Menetrey, J. Muscle injuries and strategies for improving their repair. *J. Exp. Orthop.* **3**, 15 (2016).
266. Sul, H. S. Minireview: Pref-1: Role in Adipogenesis and Mesenchymal Cell Fate. *Mol. Endocrinol.* **23**, 1717–1725 (2009).
267. Lukjanenko, L. *et al.* Aging Disrupts Muscle Stem Cell Function by Impairing Matricellular WISP1 Secretion from Fibro-Adipogenic Progenitors. *Cell Stem Cell* **24**, 433-446.e7 (2019).
268. Gillies, A. R. & Lieber, R. L. Structure and Function of the Skeletal Muscle Extracellular Matrix. *Muscle Nerve* **44**, 318–331 (2011).
269. Contreras, O., Rossi, F. M. V. & Theret, M. Origins, potency, and heterogeneity of skeletal muscle fibro-adipogenic progenitors—time for new definitions. *Skelet. Muscle* **11**, 16 (2021).
270. Chen, W., You, W., Valencak, T. G. & Shan, T. Bidirectional roles of skeletal muscle fibro-adipogenic progenitors in homeostasis and disease. *Ageing Res. Rev.* **80**, 101682 (2022).
271. Turner, N. J. & Badylak, S. F. Regeneration of skeletal muscle. *Cell Tissue Res.* **347**, 759–774 (2012).
272. Bogdanis, G. C. Effects of Physical Activity and Inactivity on Muscle Fatigue. *Front. Physiol.* **3**, 142 (2012).
273. Distefano, G. & Goodpaster, B. H. Effects of Exercise and Aging on Skeletal Muscle. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **8**, a029785 (2018).
274. Barohn, R. J., Dimachkie, M. M. & Jackson, C. E. A PATTERN RECOGNITION APPROACH TO THE PATIENT WITH A SUSPECTED MYOPATHY. *Neurol. Clin.* **32**, 569–vii (2014).

275. Nagy, H. & Veerapaneni, K. D. Myopathy. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2023).
276. Gilbreath, H. R., Castro, D. & Iannaccone, S. T. Congenital myopathies and muscular dystrophies. *Neurol. Clin.* **32**, 689–703, viii (2014).
277. Koo, B. K. Assessment of Muscle Quantity, Quality and Function. *J. Obes. Metab. Syndr.* **31**, 9–16 (2022).
278. Otto, L. A. M. *et al.* Quantitative MRI of skeletal muscle in a cross-sectional cohort of patients with spinal muscular atrophy types 2 and 3. *NMR Biomed.* **33**, e4357 (2020).
279. Joyce, N. C., Oskarsson, B. & Jin, L.-W. Muscle Biopsy Evaluation in Neuromuscular Disorders. *Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am.* **23**, 609–631 (2012).
280. Bonetto, A., Andersson, D. C. & Waning, D. L. Assessment of muscle mass and strength in mice. *BoneKEy Rep.* **4**, 732 (2015).
281. Ex Vivo Assessment of Contractility, Fatigability and Alternans in Isolated Skeletal Muscles | Protocol (Translated to French). <https://www.jove.com/fr/v/4198/ex-vivo-assessment-contractility-fatigability-alternans-isolated?language=French>.
282. Wood, W. M., Etemad, S., Yamamoto, M. & Goldhamer, D. J. MyoD-expressing progenitors are essential for skeletal myogenesis and satellite cell development. *Dev. Biol.* **384**, 114–127 (2013).
283. Myopathie de Duchenne · Inserm, La science pour la santé. *Inserm* <https://www.inserm.fr/dossier/myopathie-duchenne/>.
284. Koenig, M., Monaco, A. P. & Kunkel, L. M. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* **53**, 219–228 (1988).
285. McArdle, A., Edwards, R. H. & Jackson, M. J. How does dystrophin deficiency lead to muscle degeneration?—evidence from the mdx mouse. *Neuromuscul. Disord. NMD* **5**, 445–456 (1995).
286. Watkins, S. C. & Cullen, M. J. A quantitative study of myonuclear and satellite cell nuclear size in Duchenne’s muscular dystrophy, polymyositis and normal human skeletal muscle. *Anat. Rec.* **222**, 6–11 (1988).
287. Matsumura, K. *et al.* The role of the dystrophin-glycoprotein complex in the molecular pathogenesis of muscular dystrophies. *Neuromuscul. Disord. NMD* **3**, 533–535 (1993).
288. Bulfield, G., Siller, W. G., Wight, P. A. & Moore, K. J. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 1189–1192 (1984).
289. Sacco, A. *et al.* Short telomeres and stem cell exhaustion model Duchenne muscular dystrophy in mdx/mTR mice. *Cell* **143**, 1059–1071 (2010).
290. Shaw, S., Denison, E. & Cooper, C. Epidemiology of Sarcopenia: Determinants Throughout the Lifecourse. *Nat. Rev. Rheumatol.* **13**, 340–347 (2017).
291. Wang, S., Lai, X., Deng, Y. & Song, Y. Correlation between mouse age and human age in anti-tumor research: Significance and method establishment. *Life Sci.* **242**, 117242 (2020).
292. Larsson, L. *et al.* Sarcopenia: Aging-Related Loss of Muscle Mass and Function. *Physiol. Rev.* **99**, 427–511 (2019).
293. Yamakawa, H., Kusumoto, D., Hashimoto, H. & Yuasa, S. Stem Cell Aging in Skeletal Muscle Regeneration and Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1830 (2020).
294. Muñoz-Cánoves, P., Neves, J. & Sousa-Victor, P. Understanding muscle regenerative decline with aging: new approaches to bring back youthfulness to aged stem cells. *FEBS J.* **287**, 406–416 (2020).
295. Geiger, A. E. *et al.* Dual effects of obesity on satellite cells and muscle regeneration. *Physiol. Rep.* **8**, e14511 (2020).
296. Fontbonne, D. A., Nocca, P. D. & Ursulet, J.-P. Quoi de neuf au sujet de l’épidémiologie de l’obésité en France ? **18**, (2023).
297. Obésité et surpoids. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
298. Diabète et obésité : nos recherches. *Institut Pasteur de Lille* <https://pasteur-lille.fr/centre-de-recherche/thematiques-de-recherche/diabete-et-obesite/>.

299. Jung, U. J. & Choi, M.-S. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 6184–6223 (2014).
300. Nguyen, M.-H., Cheng, M. & Koh, T. J. Impaired muscle regeneration in ob/ob and db/db mice. *ScientificWorldJournal* **11**, 1525–1535 (2011).
301. Boldrin, L., Zammit, P. S. & Morgan, J. E. Satellite cells from dystrophic muscle retain regenerative capacity. *Stem Cell Res.* **14**, 20–29 (2015).
302. Akhmedov, D. & Berdeaux, R. The effects of obesity on skeletal muscle regeneration. *Front. Physiol.* **4**, (2013).
303. Kottlors, M. & Kirschner, J. Elevated satellite cell number in Duchenne muscular dystrophy. *Cell Tissue Res.* **340**, 541–548 (2010).
304. Dumont, N. A. *et al.* Dystrophin expression in muscle stem cells regulates their polarity and asymmetric division. *Nat. Med.* **21**, 1455–1463 (2015).
305. Jiang, C. *et al.* Notch signaling deficiency underlies age-dependent depletion of satellite cells in muscular dystrophy. *Dis. Model. Mech.* **7**, 997–1004 (2014).
306. Shefer, G., Van de Mark, D. P., Richardson, J. B. & Yablonka-Reuveni, Z. Satellite-cell pool size does matter: defining the myogenic potency of aging skeletal muscle. *Dev. Biol.* **294**, 50–66 (2006).
307. Brack, A. S., Bildsoe, H. & Hughes, S. M. Evidence that satellite cell decrement contributes to preferential decline in nuclear number from large fibres during murine age-related muscle atrophy. *J. Cell Sci.* **118**, 4813–4821 (2005).
308. Cerletti, M., Jang, Y. C., Finley, L. W. S., Haigis, M. C. & Wagers, A. J. Short-term calorie restriction enhances skeletal muscle stem cell function. *Cell Stem Cell* **10**, 515–519 (2012).
309. Chakkalakal, J. V., Jones, K. M., Basson, M. A. & Brack, A. S. The aged niche disrupts muscle stem cell quiescence. *Nature* **490**, 355–360 (2012).
310. Turpin, S. M., Lancaster, G. I., Darby, I., Febbraio, M. A. & Watt, M. J. Apoptosis in skeletal muscle myotubes is induced by ceramides and is positively related to insulin resistance. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **291**, E1341–E1350 (2006).
311. Brack, A. S. & Rando, T. A. Intrinsic changes and extrinsic influences of myogenic stem cell function during aging. *Stem Cell Rev.* **3**, 226–237 (2007).
312. Fukada, S. *et al.* Molecular signature of quiescent satellite cells in adult skeletal muscle. *Stem Cells Dayt. Ohio* **25**, 2448–2459 (2007).
313. Cohn, R. D. *et al.* Disruption of DAG1 in differentiated skeletal muscle reveals a role for dystroglycan in muscle regeneration. *Cell* **110**, 639–648 (2002).
314. Chargé, S. B. P., Brack, A. S. & Hughes, S. M. Aging-related satellite cell differentiation defect occurs prematurely after Ski-induced muscle hypertrophy. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **283**, C1228–C1241 (2002).
315. Holloszy, J. O. & Peterson, C. A. Cell Culture Systems as Tools for Studying Age-Related Changes in Skeletal Muscle. *J. Gerontol. Ser. A* **50A**, 142–146 (1995).
316. Campisi, J., Kim, S. H., Lim, C. S. & Rubio, M. Cellular senescence, cancer and aging: the telomere connection. *Exp. Gerontol.* **36**, 1619–1637 (2001).
317. Decary, S. *et al.* Shorter telomeres in dystrophic muscle consistent with extensive regeneration in young children. *Neuromuscul. Disord. NMD* **10**, 113–120 (2000).
318. Decary, S. *et al.* Replicative potential and telomere length in human skeletal muscle: implications for satellite cell-mediated gene therapy. *Hum. Gene Ther.* **8**, 1429–1438 (1997).
319. Sousa-Victor, P., Perdiguero, E. & Muñoz-Cánoves, P. Geroconversion of aged muscle stem cells under regenerative pressure. *Cell Cycle Georget. Tex* **13**, 3183–3190 (2014).
320. Baker, D. J. *et al.* Clearance of p16 Ink4a -positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* **479**, 232–236 (2011).
321. Sousa-Victor, P., García-Prat, L., Serrano, A. L., Perdiguero, E. & Muñoz-Cánoves, P. Muscle stem cell aging: regulation and rejuvenation. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* **26**, 287–296 (2015).

322. Carlson, M. E. & Conboy, I. M. Loss of stem cell regenerative capacity within aged niches. *Aging Cell* **6**, 371–382 (2007).
323. Carlson, B. M. & Faulkner, J. A. Muscle transplantation between young and old rats: age of host determines recovery. *Am. J. Physiol.* **256**, C1262–1266 (1989).
324. Lazure, F. *et al.* Transcriptional reprogramming of skeletal muscle stem cells by the niche environment. *Nat. Commun.* **14**, 535 (2023).
325. Conboy, I. M. *et al.* Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature* **433**, 760–764 (2005).
326. Hu, Z. *et al.* PTEN inhibition improves muscle regeneration in mice fed a high-fat diet. *Diabetes* **59**, 1312–1320 (2010).
327. Woo, M. *et al.* Early life nutrition modulates muscle stem cell number: implications for muscle mass and repair. *Stem Cells Dev.* **20**, 1763–1769 (2011).
328. D’Souza, D. M. *et al.* Diet-induced obesity impairs muscle satellite cell activation and muscle repair through alterations in hepatocyte growth factor signaling. *Physiol. Rep.* **3**, e12506 (2015).
329. Brown, L. A. *et al.* Diet-induced obesity alters anabolic signalling in mice at the onset of skeletal muscle regeneration. *Acta Physiol.* **215**, 46–57 (2015).
330. Domingues-Faria, C., Goncalves-Mendes, N. & Farges, M.-C. Muscle Immune Cells, Obesity, and High-Fat Feeding. in *Nutrition and Skeletal Muscle* 125–135 (Elsevier, 2019). doi:10.1016/B978-0-12-810422-4.00010-5.
331. Heng, S., Betin, M. & Limon, I. Obésité et résistance centrale à la leptine - Impact sur la maladie d’Alzheimer. *médecine/sciences* **38**, 746–478 (2022).
332. Lair, B., Laurens, C., Van Den Bosch, B. & Moro, C. Novel Insights and Mechanisms of Lipotoxicity-Driven Insulin Resistance. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 6358 (2020).
333. Turpin, S. M. *et al.* Examination of ‘lipotoxicity’ in skeletal muscle of high-fat fed and ob/ob mice. *J. Physiol.* **587**, 1593–1605 (2009).
334. Tatsumi, R., Hattori, A., Ikeuchi, Y., Anderson, J. E. & Allen, R. E. Release of hepatocyte growth factor from mechanically stretched skeletal muscle satellite cells and role of pH and nitric oxide. *Mol. Biol. Cell* **13**, 2909–2918 (2002).
335. Fu, X. *et al.* Obesity Impairs Skeletal Muscle Regeneration Through Inhibition of AMPK. *Diabetes* **65**, 188–200 (2016).
336. Kodippili, K. & Rudnicki, M. A. Satellite cell contribution to disease pathology in Duchenne muscular dystrophy. *Front. Physiol.* **14**, (2023).
337. Webster, C., Silberstein, L., Hays, A. P. & Blau, H. M. Fast muscle fibers are preferentially affected in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* **52**, 503–513 (1988).
338. Maltin, C. A. Muscle development and obesity. *Organogenesis* **4**, 158–169 (2008).
339. Miljkovic, N., Lim, J.-Y., Miljkovic, I. & Frontera, W. R. Aging of Skeletal Muscle Fibers. *Ann. Rehabil. Med.* **39**, 155–162 (2015).
340. Siparsky, P. N., Kirkendall, D. T. & Garrett, W. E. Muscle Changes in Aging. *Sports Health* **6**, 36–40 (2014).
341. Kadi, F., Charifi, N. & Henriksson, J. The number of satellite cells in slow and fast fibres from human vastus lateralis muscle. *Histochem. Cell Biol.* **126**, 83–87 (2006).
342. Conboy, I. M., Conboy, M. J., Smythe, G. M. & Rando, T. A. Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle. *Science* **302**, 1575–1577 (2003).
343. Tripodi, L., Villa, C., Molinaro, D., Torrente, Y. & Farini, A. The Immune System in Duchenne Muscular Dystrophy Pathogenesis. *Biomedicines* **9**, 1447 (2021).
344. Howard, Z. M. *et al.* Early Inflammation in Muscular Dystrophy Differs between Limb and Respiratory Muscles and Increases with Dystrophic Severity. *Am. J. Pathol.* **191**, 730–747 (2021).
345. Dadgar, S. *et al.* Asynchronous remodeling is a driver of failed regeneration in Duchenne muscular dystrophy. *J. Cell Biol.* **207**, 139–158 (2014).
346. Hodgetts, S., Radley, H., Davies, M. & Grounds, M. D. Reduced necrosis of dystrophic muscle by depletion of host neutrophils, or blocking TNFalpha function with Etanercept in mdx mice. *Neuromuscul. Disord. NMD* **16**, 591–602 (2006).

347. Radley, H. G. & Grounds, M. D. Cromolyn administration (to block mast cell degranulation) reduces necrosis of dystrophic muscle in mdx mice. *Neurobiol. Dis.* **23**, 387–397 (2006).
348. Tulangekar, A. & Sztal, T. E. Inflammation in Duchenne Muscular Dystrophy—Exploring the Role of Neutrophils in Muscle Damage and Regeneration. *Biomedicines* **9**, 1366 (2021).
349. Burzyn, D. *et al.* A special population of regulatory T cells potentiates muscle repair. *Cell* **155**, 1282–1295 (2013).
350. Farini, A. *et al.* T and B lymphocyte depletion has a marked effect on the fibrosis of dystrophic skeletal muscles in the scid/mdx mouse. *J. Pathol.* **213**, 229–238 (2007).
351. Villalta, S. A. *et al.* Regulatory T cells suppress muscle inflammation and injury in muscular dystrophy. *Sci. Transl. Med.* **6**, 258ra142 (2014).
352. Tidball, J. G., Flores, I., Welc, S. S., Wehling-Henricks, M. & Ochi, E. Aging of the immune system and impaired muscle regeneration: a failure of immunomodulation of adult myogenesis. *Exp. Gerontol.* **145**, 111200 (2021).
353. Reidy, P. T., Dupont-Versteegden, E. E. & Drummond, M. J. Macrophage Regulation of Muscle Regrowth From Disuse in Aging. *Exerc. Sport Sci. Rev.* **47**, 246–250 (2019).
354. Wang, Y., Wehling-Henricks, M., Samengo, G. & Tidball, J. G. Increases of M2a macrophages and fibrosis in aging muscle are influenced by bone marrow aging and negatively regulated by muscle-derived nitric oxide. *Aging Cell* **14**, 678–688 (2015).
355. Sorensen, J. R. *et al.* An altered response in macrophage phenotype following damage in aged human skeletal muscle: implications for skeletal muscle repair. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **33**, 10353–10368 (2019).
356. Sloboda, D. D., Brown, L. A. & Brooks, S. V. Myeloid Cell Responses to Contraction-induced Injury Differ in Muscles of Young and Old Mice. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **73**, 1581–1590 (2018).
357. Przybyla, B. *et al.* Aging alters macrophage properties in human skeletal muscle both at rest and in response to acute resistance exercise. *Exp. Gerontol.* **41**, 320–327 (2006).
358. Tobin, S. W. *et al.* Delineating the relationship between immune system aging and myogenesis in muscle repair. *Aging Cell* **20**, e13312 (2021).
359. Paliwal, P., Pishesha, N., Wijaya, D. & Conboy, I. M. Age dependent increase in the levels of osteopontin inhibits skeletal muscle regeneration. *Aging* **4**, 553–566 (2012).
360. Peake, J., Della Gatta, P. & Cameron-Smith, D. Aging and its effects on inflammation in skeletal muscle at rest and following exercise-induced muscle injury. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **298**, R1485-1495 (2010).
361. Wu, H. & Ballantyne, C. M. Skeletal muscle inflammation and insulin resistance in obesity. *J. Clin. Invest.* **127**, 43–54 (2017).
362. Petrilli, L. L. *et al.* High-Dimensional Single-Cell Quantitative Profiling of Skeletal Muscle Cell Population Dynamics during Regeneration. *Cells* **9**, 1723 (2020).
363. Uezumi, A. *et al.* Fibrosis and adipogenesis originate from a common mesenchymal progenitor in skeletal muscle. *J. Cell Sci.* **124**, 3654–3664 (2011).
364. Contreras, O., Rebolledo, D. L., Oyarzún, J. E., Olguín, H. C. & Brandan, E. Connective tissue cells expressing fibro/adipogenic progenitor markers increase under chronic damage: relevance in fibroblast-myofibroblast differentiation and skeletal muscle fibrosis. *Cell Tissue Res.* **364**, 647–660 (2016).
365. Pessina, P. *et al.* Fibrogenic Cell Plasticity Blunts Tissue Regeneration and Aggravates Muscular Dystrophy. *Stem Cell Rep.* **4**, 1046–1060 (2015).
366. Ardite, E. *et al.* PAI-1-regulated miR-21 defines a novel age-associated fibrogenic pathway in muscular dystrophy. *J. Cell Biol.* **196**, 163–175 (2012).
367. Chen, Y.-W. *et al.* Early onset of inflammation and later involvement of TGFbeta in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* **65**, 826–834 (2005).
368. Lukjanenko, L. *et al.* Aging Disrupts Muscle Stem Cell Function by Impairing Matricellular WISP1 Secretion from Fibro-Adipogenic Progenitors. *Cell Stem Cell* **24**, 433-446.e7 (2019).



369. Zhao, L. *et al.* Retinoic acid signalling in fibro/adipogenic progenitors robustly enhances muscle regeneration. *EBioMedicine* **60**, 103020 (2020).
370. Grounds, M. D. Complexity of Extracellular Matrix and Skeletal Muscle Regeneration. in *Skeletal Muscle Repair and Regeneration* (eds. Schiaffino, S. & Partridge, T.) 269–302 (Springer Netherlands, Dordrecht, 2008). doi:10.1007/978-1-4020-6768-6\_13.
371. Mann, C. J. *et al.* Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. *Skelet. Muscle* **1**, 21 (2011).
372. Henderson, N. C., Rieder, F. & Wynn, T. A. Fibrosis: from mechanisms to medicines. *Nature* **587**, 555–566 (2020).
373. Serrano, A. L. *et al.* Cellular and molecular mechanisms regulating fibrosis in skeletal muscle repair and disease. *Curr. Top. Dev. Biol.* **96**, 167–201 (2011).
374. Fadic, R. *et al.* Increase in decorin and biglycan in Duchenne Muscular Dystrophy: role of fibroblasts as cell source of these proteoglycans in the disease. *J. Cell. Mol. Med.* **10**, 758–769 (2006).
375. Pakshir, P. & Hinz, B. The big five in fibrosis: Macrophages, myofibroblasts, matrix, mechanics, and miscommunication. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **68–69**, 81–93 (2018).
376. Bersini, S. *et al.* Tackling muscle fibrosis: From molecular mechanisms to next generation engineered models to predict drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **129**, 64–77 (2018).
377. Cordova, G., Negroni, E., Cabello-Verrugio, C., Mouly, V. & Trollet, C. Combined Therapies for Duchenne Muscular Dystrophy to Optimize Treatment Efficacy. *Front. Genet.* **9**, (2018).
378. Hu, L.-Y. *et al.* Skeletal muscle progenitors are sensitive to collagen architectural features of fibril size and cross linking. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **321**, C330–C342 (2021).
379. Jacobson, C., Côté, P. D., Rossi, S. G., Rotundo, R. L. & Carbonetto, S. The dystroglycan complex is necessary for stabilization of acetylcholine receptor clusters at neuromuscular junctions and formation of the synaptic basement membrane. *J. Cell Biol.* **152**, 435–450 (2001).
380. Hindle, A. G., Horning, M., Mellish, J.-A. E. & Lawler, J. M. Diving into old age: muscular senescence in a large-bodied, long-lived mammal, the Weddell seal (*Leptonychotes weddellii*). *J. Exp. Biol.* **212**, 790–796 (2009).
381. Wood, L. K. *et al.* Intrinsic stiffness of extracellular matrix increases with age in skeletal muscles of mice. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* **117**, 363–369 (2014).
382. Berria, R. *et al.* Increased collagen content in insulin-resistant skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **290**, E560–565 (2006).
383. Järvinen, T. A. H., Józsa, L., Kannus, P., Järvinen, T. L. N. & Järvinen, M. Organization and distribution of intramuscular connective tissue in normal and immobilized skeletal muscles. An immunohistochemical, polarization and scanning electron microscopic study. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **23**, 245–254 (2002).
384. Kovanen, V., Suominen, H., Risteli, J. & Risteli, L. Type IV collagen and laminin in slow and fast skeletal muscle in rats--effects of age and life-time endurance training. *Coll. Relat. Res.* **8**, 145–153 (1988).
385. Yin, H., Price, F. & Rudnicki, M. A. Satellite Cells and the Muscle Stem Cell Niche. *Physiol. Rev.* **93**, 23–67 (2013).
386. Alameddine, H. S. Matrix metalloproteinases in skeletal muscles: friends or foes? *Neurobiol. Dis.* **48**, 508–518 (2012).
387. Chen, X. & Li, Y. Role of matrix metalloproteinases in skeletal muscle: migration, differentiation, regeneration and fibrosis. *Cell Adhes. Migr.* **3**, 337–341 (2009).
388. Gosselin, L. E., Williams, J. E., Personius, K. & Farkas, G. A. A comparison of factors associated with collagen metabolism in different skeletal muscles from dystrophic (mdx) mice: impact of pirfenidone. *Muscle Nerve* **35**, 208–216 (2007).
389. Fischmann, A. *et al.* Quantitative MRI and loss of free ambulation in Duchenne muscular dystrophy. *J. Neurol.* **260**, 969–974 (2013).

390. Lee, S., Kim, Y., White, D. A., Kuk, J. L. & Arslanian, S. Relationships between insulin sensitivity, skeletal muscle mass and muscle quality in obese adolescent boys. *Eur. J. Clin. Nutr.* **66**, 1366–1368 (2012).
391. Hogarth, M. W., Uapinyoying, P., Mázala, D. A. G. & Jaiswal, J. K. Pathogenic role and therapeutic potential of fibro-adipogenic progenitors in muscle disease. *Trends Mol. Med.* **28**, 8–11 (2022).
392. de Vries, A. P. J. *et al.* Fatty kidney: emerging role of ectopic lipid in obesity-related renal disease. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **2**, 417–426 (2014).
393. Szendroedi, J. & Roden, M. Ectopic lipids and organ function. *Curr. Opin. Lipidol.* **20**, 50–56 (2009).
394. Laurens, C. & Moro, C. Intramyocellular fat storage in metabolic diseases. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* **26**, 43–52 (2016).
395. Sinha, R. *et al.* Assessment of skeletal muscle triglyceride content by (1)H nuclear magnetic resonance spectroscopy in lean and obese adolescents: relationships to insulin sensitivity, total body fat, and central adiposity. *Diabetes* **51**, 1022–1027 (2002).
396. Boesch, C., Machann, J., Vermathen, P. & Schick, F. Role of proton MR for the study of muscle lipid metabolism. *NMR Biomed.* **19**, 968–988 (2006).
397. Malenfant, P. *et al.* Fat content in individual muscle fibers of lean and obese subjects. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* **25**, 1316–1321 (2001).
398. Nielsen, J., Christensen, A. E., Nellemann, B. & Christensen, B. Lipid droplet size and location in human skeletal muscle fibers are associated with insulin sensitivity. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* (2017) doi:10.1152/ajpendo.00062.2017.
399. Gueugneau, M. *et al.* Skeletal muscle lipid content and oxidative activity in relation to muscle fiber type in aging and metabolic syndrome. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **70**, 566–576 (2015).
400. Choi, S. J. *et al.* Intramyocellular Lipid and Impaired Myofiber Contraction in Normal Weight and Obese Older Adults. *J. Gerontol. Ser. A* **71**, 557–564 (2016).
401. Hamrick, M. W., McGee-Lawrence, M. E. & Frechette, D. M. Fatty Infiltration of Skeletal Muscle: Mechanisms and Comparisons with Bone Marrow Adiposity. *Front. Endocrinol.* **7**, 69 (2016).
402. Schwenzer, N. F. *et al.* Aging effects on human calf muscle properties assessed by MRI at 3 Tesla. *J. Magn. Reson. Imaging JMRI* **29**, 1346–1354 (2009).
403. Laurens, C. *et al.* Adipogenic progenitors from obese human skeletal muscle give rise to functional white adipocytes that contribute to insulin resistance. *Int. J. Obes.* **40**, 497–506 (2016).
404. La, M. *et al.* Three-dimensional niche stiffness synergizes with Wnt7a to modulate the extent of satellite cell symmetric self-renewal divisions. *Mol. Biol. Cell* **31**, (2020).
405. Molina, T., Fabre, P. & Dumont, N. A. Fibro-adipogenic progenitors in skeletal muscle homeostasis, regeneration and diseases. *Open Biol.* **11**, 210110.
406. Kopinke, D., Roberson, E. C. & Reiter, J. F. Ciliary Hedgehog Signaling Restricts Injury-Induced Adipogenesis. *Cell* **170**, 340–351.e12 (2017).
407. Moratal, C. *et al.* IL-1 $\beta$ - and IL-4-polarized macrophages have opposite effects on adipogenesis of intramuscular fibro-adipogenic progenitors in humans. *Sci. Rep.* **8**, 17005 (2018).
408. Lindahl, P., Johansson, B. R., Levéen, P. & Betsholtz, C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* **277**, 242–245 (1997).
409. Claesson-Welsh, L., Eriksson, A., Westermark, B. & Heldin, C. H. cDNA cloning and expression of the human A-type platelet-derived growth factor (PDGF) receptor establishes structural similarity to the B-type PDGF receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 4917–4921 (1989).
410. Gronwald, R. G. *et al.* Cloning and expression of a cDNA coding for the human platelet-derived growth factor receptor: evidence for more than one receptor class. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 3435–3439 (1988).
411. Roskoski, R. The role of small molecule platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) inhibitors in the treatment of neoplastic disorders. *Pharmacol. Res.* **129**, 65–83 (2018).

412. Heldin, C. H. & Westermark, B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol. Rev.* **79**, 1283–1316 (1999).
413. Contreras, O. *et al.* Cross-talk between TGF- $\beta$  and PDGFR $\alpha$  signaling pathways regulates the fate of stromal fibro-adipogenic progenitors. *J. Cell Sci.* **132**, jcs232157 (2019).
414. Mueller, A. A., van Velthoven, C. T., Fukumoto, K. D., Cheung, T. H. & Rando, T. A. Intronic polyadenylation of PDGFR $\alpha$  in resident stem cells attenuates muscle fibrosis. *Nature* **540**, 276–279 (2016).
415. Uezumi, A., Ikemoto-Uezumi, M. & Tsuchida, K. Roles of nonmyogenic mesenchymal progenitors in pathogenesis and regeneration of skeletal muscle. *Front. Physiol.* **5**, (2014).
416. Ieronimakis, N. *et al.* PDGFR $\alpha$  signalling promotes fibrogenic responses in collagen-producing cells in Duchenne muscular dystrophy. *J. Pathol.* **240**, 410–424 (2016).
417. Wang, X. *et al.* Diverse effector and regulatory functions of fibro/adipogenic progenitors during skeletal muscle fibrosis in muscular dystrophy. *iScience* **26**, 105775 (2023).
418. Fitzgerald, G. *et al.* MME+ fibro-adipogenic progenitors are the dominant adipogenic population during fatty infiltration in human skeletal muscle. *Commun. Biol.* **6**, 111 (2023).
419. Fuster, J. J., Ouchi, N., Gokce, N. & Walsh, K. Obesity-induced Changes in Adipose Tissue Microenvironment and Their Impact on Cardiovascular Disease. *Circ. Res.* **118**, 1786–1807 (2016).
420. Hansen, J. B. & Kristiansen, K. Regulatory circuits controlling white versus brown adipocyte differentiation. *Biochem. J.* **398**, 153–168 (2006).
421. Mouisel, E. & Langin, D. La lipolyse adipocytaire. in *Physiologie et physiopathologie du tissu adipeux* (eds. Bastard, J.-P. & Fève, B.) 143–160 (Springer, Paris, 2013). doi:10.1007/978-2-8178-0332-6\_10.
422. Harvey, I., Boudreau, A. & Stephens, J. M. Adipose tissue in health and disease. *Open Biol.* **10**, 200291 (2020).
423. Kwok, K. H.M. & Xu, A. Chapter 21 - Heterogeneity of White Adipose Tissue. in *The Molecular Nutrition of Fats* (ed. Patel, V. B.) 271–288 (Academic Press, 2019). doi:10.1016/B978-0-12-811297-7.00021-4.
424. Zuk, P. A. *et al.* Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Mol. Biol. Cell* **13**, 4279–4295 (2002).
425. Emont, M. P. *et al.* A single-cell atlas of human and mouse white adipose tissue. *Nature* **603**, 926–933 (2022).
426. Nseir, I. *et al.* Apport du tissu adipeux et de la fraction vasculaire stromale en chirurgie de la main. *Rev. Chir. Orthopédique Traumatol.* **103**, 643–648 (2017).
427. Rodbell, M. METABOLISM OF ISOLATED FAT CELLS. I. EFFECTS OF HORMONES ON GLUCOSE METABOLISM AND LIPOLYSIS. *J. Biol. Chem.* **239**, 375–380 (1964).
428. Gimble, J. M. & Guilak, F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy* **5**, 362–369 (2003).
429. Sengenès, C., Lohmède, K., Zakaroff-Girard, A., Busse, R. & Bouloumié, A. Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from the adult mesenchymal and hematopoietic stem cells. *J. Cell. Physiol.* **205**, 114–122 (2005).
430. Gersh, I. & Still, M. A. BLOOD VESSELS IN FAT TISSUE. RELATION TO PROBLEMS OF GAS EXCHANGE. *J. Exp. Med.* **81**, 219–232 (1945).
431. Permana, P. A., Menge, C. & Reaven, P. D. Macrophage-secreted factors induce adipocyte inflammation and insulin resistance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **341**, 507–514 (2006).
432. Kim, C.-S., Kawada, T., Yoo, H., Kwon, B.-S. & Yu, R. Macrophage inflammatory protein-related protein-2, a novel CC chemokine, can regulate preadipocyte migration and adipocyte differentiation. *FEBS Lett.* **548**, 125–130 (2003).
433. Zuk, P. A. *et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* **7**, 211–228 (2001).

434. Krotkiewski, M., Björntorp, P., Sjöström, L. & Smith, U. Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution. *J. Clin. Invest.* **72**, 1150–1162 (1983).
435. Rodeheffer, M. S., Birsoy, K. & Friedman, J. M. Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo. *Cell* **135**, 240–249 (2008).
436. Bertheuil, N. *et al.* Adipose mesenchymal stromal cells: Definition, immunomodulatory properties, mechanical isolation and interest for plastic surgery. *Ann. Chir. Plast. Esthét.* **64**, 1–10 (2019).
437. Merrick, D. *et al.* Identification of a mesenchymal progenitor cell hierarchy in adipose tissue. *Science* **364**, eaav2501 (2019).
438. Schwalie, P. C. *et al.* A stromal cell population that inhibits adipogenesis in mammalian fat depots. *Nature* **559**, 103–108 (2018).
439. Sárvári, A. K. *et al.* Plasticity of Epididymal Adipose Tissue in Response to Diet-Induced Obesity at Single-Nucleus Resolution. *Cell Metab.* **33**, 437–453.e5 (2021).
440. Burl, R. B. *et al.* Deconstructing Adipogenesis Induced by  $\beta$ 3-Adrenergic Receptor Activation with Single-Cell Expression Profiling. *Cell Metab.* **28**, 300–309.e4 (2018).
441. Liu, X. *et al.* Single-cell RNA sequencing of subcutaneous adipose tissues identifies therapeutic targets for cancer-associated lymphedema. *Cell Discov.* **8**, 1–20 (2022).
442. Biltz, N. K. *et al.* Infiltration of intramuscular adipose tissue impairs skeletal muscle contraction. *J. Physiol.* **598**, 2669–2683 (2020).
443. Argentati, C. *et al.* Adipose Stem Cell Translational Applications: From Bench-to-Bedside. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 3475 (2018).
444. Ong, W. K. & Sugii, S. Adipose-derived stem cells: fatty potentials for therapy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **45**, 1083–1086 (2013).
445. Lim, M. H., Ong, W. K. & Sugii, S. The current landscape of adipose-derived stem cells in clinical applications. *Expert Rev. Mol. Med.* **16**, e8 (2014).
446. Rodriguez, A.-M. *et al.* Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J. Exp. Med.* **201**, 1397–1405 (2005).
447. Zuk, P. Adipose-Derived Stem Cells in Tissue Regeneration: A Review. *Int. Sch. Res. Not.* **2013**, e713959 (2013).
448. Shukla, L., Yuan, Y., Shayan, R., Greening, D. W. & Karnezis, T. Fat Therapeutics: The Clinical Capacity of Adipose-Derived Stem Cells and Exosomes for Human Disease and Tissue Regeneration. *Front. Pharmacol.* **11**, 158 (2020).
449. Gui, C., Parson, J. & Meyer, G. A. Harnessing adipose stem cell diversity in regenerative medicine. *APL Bioeng.* **5**, 021501 (2021).
450. Wang, S., Qu, X. & Zhao, R. C. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* **5**, 19 (2012).
451. Amorin, B. *et al.* Mesenchymal stem cell therapy and acute graft-versus-host disease: a review. *Hum. Cell* **27**, 137–150 (2014).
452. Frölich, K., Hagen, R. & Kleinsasser, N. [Adipose-derived stromal cells (ASC) - basics and therapeutic approaches in otorhinolaryngology]. *Laryngorhinootologie.* **93**, 369–380 (2014).
453. Varghese, J., Griffin, M., Mosahebi, A. & Butler, P. Systematic review of patient factors affecting adipose stem cell viability and function: implications for regenerative therapy. *Stem Cell Res. Ther.* **8**, 45 (2017).
454. Barba, M., Cicione, C., Bernardini, C., Michetti, F. & Lattanzi, W. Adipose-Derived Mesenchymal Cells for Bone Regereneration: State of the Art. *BioMed Res. Int.* **2013**, e416391 (2013).
455. Hsiao, S. T.-F. *et al.* Comparative Analysis of Paracrine Factor Expression in Human Adult Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow, Adipose, and Dermal Tissue. *Stem Cells Dev.* **21**, 2189–2203 (2012).
456. Zhou, Z. *et al.* Comparison of mesenchymal stromal cells from human bone marrow and adipose tissue for the treatment of spinal cord injury. *Cytotherapy* **15**, 434–448 (2013).

457. Verstockt, B., Ferrante, M., Vermeire, S. & Van Assche, G. New treatment options for inflammatory bowel diseases. *J. Gastroenterol.* **53**, 585–590 (2018).
458. Ode, A. *et al.* CD73 and CD29 concurrently mediate the mechanically induced decrease of migratory capacity of mesenchymal stromal cells. *Eur. Cell. Mater.* **22**, 26–42 (2011).
459. Rombouts, W. J. C. & Ploemacher, R. E. Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. *Leukemia* **17**, 160–170 (2003).
460. Eggenhofer, E., Luk, F., Dahlke, M. H. & Hoogduijn, M. J. The Life and Fate of Mesenchymal Stem Cells. *Front. Immunol.* **5**, (2014).
461. Hale, S. L., Dai, W., Dow, J. S. & Kloner, R. A. Mesenchymal stem cell administration at coronary artery reperfusion in the rat by two delivery routes: a quantitative assessment. *Life Sci.* **83**, 511–515 (2008).
462. Geißler, S. *et al.* Functional Comparison of Chronological and In Vitro Aging: Differential Role of the Cytoskeleton and Mitochondria in Mesenchymal Stromal Cells. *PLoS ONE* **7**, e52700 (2012).
463. Cofano, F. *et al.* Mesenchymal Stem Cells for Spinal Cord Injury: Current Options, Limitations, and Future of Cell Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 2698 (2019).
464. Wu, C.-C. *et al.* G-CSF-mobilized Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Replenish Neural Lineages in Alzheimer’s Disease Mice via CXCR4/SDF-1 Chemotaxis. *Mol. Neurobiol.* **54**, 6198–6212 (2017).
465. Terrovitis, J. V., Smith, R. R. & Marbán, E. Assessment and optimization of cell engraftment after transplantation into the heart. *Circ. Res.* **106**, 479–494 (2010).
466. Taghavi, S. & George, J. C. Homing of stem cells to ischemic myocardium. *Am. J. Transl. Res.* **5**, 404–411 (2013).
467. Schrepfer, S. *et al.* Stem Cell Transplantation: The Lung Barrier. *Transplant. Proc.* **39**, 573–576 (2007).
468. He, Q., Wan, C. & Li, G. Concise Review: Multipotent Mesenchymal Stromal Cells in Blood. *STEM CELLS* **25**, 69–77 (2007).
469. Alm, J. J. *et al.* Circulating plastic adherent mesenchymal stem cells in aged hip fracture patients. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* **28**, 1634–1642 (2010).
470. Marketou, M. E. *et al.* Increased mobilization of mesenchymal stem cells in patients with essential hypertension: the effect of left ventricular hypertrophy. *J. Clin. Hypertens. Greenwich Conn* **16**, 883–888 (2014).
471. Marketou, M. E. *et al.* Circulating mesenchymal stem cells in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Cardiovasc. Pathol.* **24**, 149–153 (2015).
472. Wojakowski, W., Kucia, M., Kaźmierski, M., Ratajczak, M. Z. & Tendera, M. Circulating progenitor cells in stable coronary heart disease and acute coronary syndromes: relevant reparatory mechanism? *Heart Br. Card. Soc.* **94**, 27–33 (2008).
473. Mansilla, E. *et al.* Bloodstream cells phenotypically identical to human mesenchymal bone marrow stem cells circulate in large amounts under the influence of acute large skin damage: new evidence for their use in regenerative medicine. *Transplant. Proc.* **38**, 967–969 (2006).
474. Chen, Y. *et al.* Recruitment of endogenous bone marrow mesenchymal stem cells towards injured liver. *J. Cell. Mol. Med.* **14**, 1494–1508 (2010).
475. Bian, Z.-Y. *et al.* Increased number of mesenchymal stem cell-like cells in peripheral blood of patients with bone sarcomas. *Arch. Med. Res.* **40**, 163–168 (2009).
476. Teo, G. S. L., Yang, Z., Carman, C. V., Karp, J. M. & Lin, C. P. Intravital Imaging of Mesenchymal Stem Cell Trafficking and Association With Platelets and Neutrophils. *STEM CELLS* **33**, 265–277 (2015).
477. Sheriff, L. *et al.* Origin-Specific Adhesive Interactions of Mesenchymal Stem Cells with Platelets Influence Their Behavior After Infusion. *Stem Cells Dayt. Ohio* **36**, 1062–1074 (2018).
478. Ward, L. S. C. *et al.* Podoplanin regulates the migration of mesenchymal stromal cells and their interaction with platelets. *J. Cell Sci.* **132**, jcs222067 (2019).



479. Homing of Hematopoietic Cells to the Bone Marrow | Protocol (Translated to French). <https://www.jove.com/fr/v/1104/homing-of-hematopoietic-cells-to-the-bone-marrow?language=French>.
480. Gironde, A. *et al.* Endogenous Mobilization of Mesenchymal Stromal Cells: A Pathway for Interorgan Communication? *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, (2021).
481. Zhang, Y. *et al.* White Adipose Tissue Cells Are Recruited by Experimental Tumors and Promote Cancer Progression in Mouse Models. *Cancer Res.* **69**, (2009).
482. Hu, C. *et al.* CXCL12/CXCR4 axis promotes mesenchymal stem cell mobilization to burn wounds and contributes to wound repair. *J. Surg. Res.* **183**, 427–434 (2013).
483. Lapidot, T., Dar, A. & Kollet, O. How do stem cells find their way home? *Blood* **106**, 1901–1910 (2005).
484. Kim, J., Kim, N. K., Park, S. R. & Choi, B. H. GM-CSF Enhances Mobilization of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells via a CXCR4-Mediated Mechanism. *Tissue Eng. Regen. Med.* **16**, 59–68 (2019).
485. Sengenès, C. *et al.* Chemotaxis and differentiation of human adipose tissue CD34+/CD31-progenitor cells: role of stromal derived factor-1 released by adipose tissue capillary endothelial cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* **25**, 2269–2276 (2007).
486. Gil-Ortega, M. *et al.* Native Adipose Stromal Cells Egress from Adipose Tissue In Vivo: Evidence During Lymph Node Activation. *STEM CELLS* **31**, 1309–1320 (2013).
487. Toupadakis, C. A. *et al.* Mobilization of endogenous stem cell populations enhances fracture healing in a murine femoral fracture model. *Cytotherapy* **15**, 1136–1147 (2013).
488. Zhao, Y. & Zhang, H. Update on the mechanisms of homing of adipose tissue-derived stem cells. *Cytotherapy* **18**, 816–827 (2016).
489. Zhai, R. *et al.* Pharmacological Mobilization of Endogenous Bone Marrow Stem Cells Promotes Liver Regeneration after Extensive Liver Resection in Rats. *Sci. Rep.* **8**, 3587 (2018).
490. Gil-Ortega, M., Fernández-Alfonso, M. S., Somoza, B., Casteilla, L. & Sengenès, C. Ex vivo microperfusion system of the adipose organ: a new approach to studying the mobilization of adipose cell populations. *Int. J. Obes.* **38**, 1255–1262 (2014).
491. Bellows, C. F., Zhang, Y., Simmons, P. J., Khalsa, A. S. & Kolonin, M. G. Influence of BMI on Level of Circulating Progenitor Cells. *Obesity* **19**, 1722–1726 (2011).
492. Gironde, A. *et al.* The Release of Adipose Stromal Cells from Subcutaneous Adipose Tissue Regulates Ectopic Intramuscular Adipocyte Deposition. *Cell Rep.* **27**, 323–333.e5 (2019).
493. Sastourné-Arrey, Q. *et al.* Adipose tissue is a source of regenerative cells that augment the repair of skeletal muscle after injury. *Nat. Commun.* **14**, 80 (2023).
494. Serhan, C. N. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature* **510**, 92–101 (2014).
495. Yan, J. & Horng, T. Lipid Metabolism in Regulation of Macrophage Functions. *Trends Cell Biol.* **30**, 979–989 (2020).
496. Shook, B. A. *et al.* Dermal Adipocyte Lipolysis and Myofibroblast Conversion Are Required for Efficient Skin Repair. *Cell Stem Cell* **26**, 880–895.e6 (2020).
497. Demonbreun, A. R. & McNally, E. M. Muscle cell communication in development and repair. *Curr. Opin. Pharmacol.* **34**, 7–14 (2017).
498. Suzuki-Inoue, K. *et al.* Involvement of the snake toxin receptor CLEC-2, in podoplanin-mediated platelet activation, by cancer cells. *J. Biol. Chem.* **282**, 25993–26001 (2007).
499. Piñol-Jurado, P. *et al.* Platelet-Derived Growth Factor BB Influences Muscle Regeneration in Duchenne Muscle Dystrophy. *Am. J. Pathol.* **187**, 1814–1827 (2017).
500. Ceafalan, L. C. *et al.* Gene expression profile of adhesion and extracellular matrix molecules during early stages of skeletal muscle regeneration. *J. Cell. Mol. Med.* **24**, 10140–10150 (2020).
501. Graca, F. A. *et al.* Platelet-derived chemokines promote skeletal muscle regeneration by guiding neutrophil recruitment to injured muscles. *Nat. Commun.* **14**, 2900 (2023).
502. Lemos, D. R. & Duffield, J. S. Tissue-resident mesenchymal stromal cells: Implications for tissue-specific antifibrotic therapies. *Sci. Transl. Med.* **10**, eaan5174 (2018).

503. Emont, M. P. *et al.* A single-cell atlas of human and mouse white adipose tissue. *Nature* **603**, 926–933 (2022).
504. Bui, T. M., Wiesolek, H. L. & Sumagin, R. ICAM-1: A master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis. *J. Leukoc. Biol.* **108**, 787–799 (2020).
505. Benzakour, O., Gely, A., Lara, R. & Coronas, V. Fonctions nouvelles de Gas-6 et de la protéine S - Facteurs vitamine K-dépendants et ligands des récepteurs tyrosine kinase de la famille TAM. *médecine/sciences* **23**, 826–833 (2007).
506. Heredia, J. E. *et al.* Type 2 innate signals stimulate fibro/adipogenic progenitors to facilitate muscle regeneration. *Cell* **153**, 376–388 (2013).
507. Huang, Y. & Mahley, R. W. Apolipoprotein E: Structure and Function in Lipid Metabolism, Neurobiology, and Alzheimer's Diseases. *Neurobiol. Dis.* **72PA**, 3–12 (2014).
508. Barreau, C., Mathieu, M., Gironde, A. & Sengenès, C. Preparation of mouse muscle quadriceps slices for immunohistochemistry investigations. *Campden Instrum.* (2022).
509. Schmidt, M., Schüler, S. C., Hüttner, S. S., von Eyss, B. & von Maltzahn, J. Adult stem cells at work: regenerating skeletal muscle. *Cell. Mol. Life Sci.* **76**, 2559–2570 (2019).
510. Muntifering, M. *et al.* Clearing for Deep Tissue Imaging. *Curr. Protoc. Cytom.* **86**, e38 (2018).
511. Marinkovic, M. *et al.* Skeletal Muscle Fibro-Adipogenic Progenitors of Dystrophic Mice Are Insensitive to NOTCH-Dependent Regulation of Adipogenesis. <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/223370> (2017) doi:10.1101/223370.
512. Noë, S. *et al.* The Myotube Analyzer: how to assess myogenic features in muscle stem cells. *Skelet. Muscle* **12**, 12 (2022).
513. Pisani, D. F., Bottema, C. D. K., Butori, C., Dani, C. & Dechesne, C. A. Mouse model of skeletal muscle adiposity: A glycerol treatment approach. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **396**, 767–773 (2010).
514. Moitra, J. *et al.* Life without white fat: a transgenic mouse. *Genes Dev.* **12**, 3168–3181 (1998).
515. Liu, W., Liu, Y., Lai, X. & Kuang, S. Intramuscular adipose is derived from a non-Pax3 lineage and required for efficient regeneration of skeletal muscles. *Dev. Biol.* **361**, 27–38 (2012).
516. Coats, B. R. *et al.* Metabolically Activated Adipose Tissue Macrophages Perform Detrimental and Beneficial Functions during Diet-Induced Obesity. *Cell Rep.* **20**, 3149–3161 (2017).
517. Pagano, A. F. *et al.* Muscle Regeneration with Intermuscular Adipose Tissue (IMAT) Accumulation Is Modulated by Mechanical Constraints. *PLoS ONE* **10**, e0144230 (2015).
518. Pagano, A. F., Arc-Chagnaud, C., Brioche, T., Chopard, A. & Py, G. Muscle Resting and TGF- $\beta$  Inhibitor Treatment Prevent Fatty Infiltration Following Skeletal Muscle Injury. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **53**, 62–75 (2019).
519. Hausman, G. J., Basu, U., Du, M., Fernyhough-Culver, M. & Dodson, M. V. Intermuscular and intramuscular adipose tissues: Bad vs. good adipose tissues. *Adipocyte* **3**, 242–255 (2014).
520. Tropis, C., Catenacci, M., Valet, P. & Dray, C. Modifications du tissu adipeux au cours du vieillissement. *Médecine Mal. Métaboliques* **15**, 142–148 (2021).
521. Lagarde, D. *et al.* Lactate Fluxes and Plasticity of Adipose Tissues: A Redox Perspective. *Front. Physiol.* **12**, 689747 (2021).
522. Kawamata, T., Katayama, Y., Hovda, D. A., Yoshino, A. & Becker, D. P. Lactate accumulation following concussive brain injury: the role of ionic fluxes induced by excitatory amino acids. *Brain Res.* **674**, 196–204 (1995).
523. Caslin, H. L., Abeyayehu, D., Pinette, J. A. & Ryan, J. J. Lactate Is a Metabolic Mediator That Shapes Immune Cell Fate and Function. *Front. Physiol.* **12**, 688485 (2021).
524. Lampe, K. J., Namba, R. M., Silverman, T. R., Bjugstad, K. B. & Mahoney, M. J. Impact of Lactic Acid on Cell Proliferation and Free Radical Induced Cell Death in Monolayer Cultures of Neural Precursor Cells. *Biotechnol. Bioeng.* **103**, 1214–1223 (2009).
525. Seale, P. *et al.* PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* **454**, 961–967 (2008).
526. Barreau, C. *et al.* Regionalization of browning revealed by whole subcutaneous adipose tissue imaging. *Obes. Silver Spring Md* **24**, 1081–1089 (2016).

527. Lagarde, D. *et al.* Lactate fluxes mediated by the monocarboxylate transporter-1 are key determinants of the metabolic activity of beige adipocytes. *J. Biol. Chem.* **296**, 100137 (2021).
528. Merlin, J. *et al.* Rosiglitazone and a  $\beta$ 3-Adrenoceptor Agonist Are Both Required for Functional Browning of White Adipocytes in Culture. *Front. Endocrinol.* **9**, (2018).
529. Tseng, Y.-H. *et al.* New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature* **454**, 1000–1004 (2008).
530. Rodrigues, A. C. Z. *et al.* The sympathetic nervous system regulates skeletal muscle motor innervation and acetylcholine receptor stability. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* **225**, e13195 (2019).
531. Ono, Y. *et al.* BMP signalling permits population expansion by preventing premature myogenic differentiation in muscle satellite cells. *Cell Death Differ.* **18**, 222–234 (2011).
532. Forcina, L., Cosentino, M. & Musarò, A. Mechanisms Regulating Muscle Regeneration: Insights into the Interrelated and Time-Dependent Phases of Tissue Healing. *Cells* **9**, 1297 (2020).
533. Kershaw, E. E. & Flier, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**, 2548–2556 (2004).
534. Gerst, F. *et al.* What role do fat cells play in pancreatic tissue? *Mol. Metab.* **25**, 1–10 (2019).
535. Yue, F. *et al.* Lipid droplet dynamics regulate adult muscle stem cell fate. *Cell Rep.* **38**, 110267 (2022).
536. Blandin, A. *et al.* Lipidomic analysis of adipose-derived extracellular vesicles reveals specific EV lipid sorting informative of the obesity metabolic state. *Cell Rep.* **42**, 112169 (2023).
537. Suganami, T. *et al.* Prevention and reversal of renal injury by leptin in a new mouse model of diabetic nephropathy. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **19**, 127–129 (2005).
538. Gavrilova, O. *et al.* Surgical implantation of adipose tissue reverses diabetes in lipotrophic mice. *J. Clin. Invest.* **105**, 271–278 (2000).
539. Ober: Human physiology: an integrated approach - Google Scholar.  
[https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?journal=Human+Physiology%3A+An+Integrated+Approach&author=Silverthon+D.&author=Ober+W.&author=Garrison+C.&author=Silverthon+A.&author=Johnson+B.&publication\\_year=2009](https://scholar.google.com/scholar_lookup?journal=Human+Physiology%3A+An+Integrated+Approach&author=Silverthon+D.&author=Ober+W.&author=Garrison+C.&author=Silverthon+A.&author=Johnson+B.&publication_year=2009).
540. Droujinine, I. & Perrimon, N. Defining the interorgan communication network: systemic coordination of organismal cellular processes under homeostasis and localized stress. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **3**, (2013).
541. Sanchez-Diaz, M. *et al.* Biodistribution of Mesenchymal Stromal Cells after Administration in Animal Models and Humans: A Systematic Review. *J. Clin. Med.* **10**, 2925 (2021).
542. Hadden, W. J. *et al.* Stem cell migration and mechanotransduction on linear stiffness gradient hydrogels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 5647–5652 (2017).
543. García-García, A. & Méndez-Ferrer, S. The Autonomic Nervous System Pulls the Strings to Coordinate Circadian HSC Functions. *Front. Immunol.* **11**, (2020).
544. Karaman, S. & Detmar, M. Mechanisms of lymphatic metastasis. *J. Clin. Invest.* **124**, 922–928 (2014).
545. Shao, L., Takeda, K., Kato, S., Mori, S. & Kodama, T. Communication between lymphatic and venous systems in mice. *J. Immunol. Methods* **424**, 100–105 (2015).
546. Adstrum, S., Hedley, G., Schleip, R., Stecco, C. & Yucesoy, C. A. Defining the fascial system. *J. Bodyw. Mov. Ther.* **21**, 173–177 (2017).
547. Avila Gonzalez, C. A. *et al.* Frontiers in fascia research. *J. Bodyw. Mov. Ther.* **22**, 873–880 (2018).
548. Langevin, H. M. *et al.* Connecting (T)issues: How Research in Fascia Biology Can Impact Integrative Oncology. *Cancer Res.* **76**, 6159–6162 (2016).
549. Gurkan, U. A., Cheng, X., Kishore, V., Uquillas, J. A. & Akkus, O. Comparison of Morphology, Orientation, and Migration of Tendon Derived Fibroblasts and Bone Marrow Stromal Cells on Electrochemically Aligned Collagen Constructs. *J. Biomed. Mater. Res. A* **94**, 1070–1079 (2010).
550. Correa-Gallegos, D. *et al.* Patch repair of deep wounds by mobilized fascia. *Nature* **576**, 287–292 (2019).
551. Jiang, D. *et al.* Injury triggers fascia fibroblast collective cell migration to drive scar formation through N-cadherin. *Nat. Commun.* **11**, 5653 (2020).

552. Zacharia, A. *et al.* Distinct infrastructure of lipid networks in visceral and subcutaneous adipose tissues in overweight humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **112**, 979–990 (2020).
553. Hou, B. *et al.* Targeted lipidomics and transcriptomics profiling reveal the heterogeneity of visceral and subcutaneous white adipose tissue. *Life Sci.* **245**, 117352 (2020).