Article original

Régénération musculaire après une irradiation localisée à forte dose

Potentiel thérapeutique d'une modulation de la voie de signalisation Hedgehog

D. RICCOBONO[(1)], E. ROTA GRAZIOSI[(2)], S. FRANÇOIS[(3)], M. GAUTHIER[(4)], M. DROUET[(5)], N. JULLIEN[(6)]

(1,3,5) Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Département des Effets Biologiques des Rayonnements, Brétigny-sur-Orge / Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR 1296 « Radiations : Défense, Santé, Environnement », Lyon
(2,4,6) Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Département des Effets Biologiques des Rayonnements, Unité de Radiobiologie, Brétigny-sur-Orge

D. RICCOBONO et E. ROTA GRAZIOSI ont contribué à parts égales dans la rédaction de ce manuscrit.

Auteur correspondant : diane.riccobono@def.gouv.fr

Open access DOI
10.17184/eac.8641

Reçu
le 9 janvier 2023

Accepté
le 20 décembre 2023

Publié
le 5 juin 2024

Conflit d'intérêt
Les auteurs ne déclarent pas de conflit d'intérêt.

Résumé :
Ces vingt dernières années, une augmentation des accidents d'irradiation localisée à forte dose a été constatée, nécessitant le développement de nouvelles contre-mesures médicales pour assurer le traitement difficile des conséquences des rayonnements. L'exposition de la peau, mais aussi de la musculature sous-jacente, entraîne le développement d'un syndrome cutané radio-induit. Actuellement, le traitement de référence consiste en une chirurgie complétée par thérapie cellulaire ; ce qui améliore la survie fonctionnelle et globale du patient, mais laisse subsister un défaut musculaire limitant la mobilité, la motricité et la qualité de vie. L'identification de nouvelles cibles thérapeutiques s'avère donc indispensable pour améliorer la régénération musculaire post-irradiation.
Ainsi, ce projet vise à évaluer la modulation de la voie de signalisation Hedgehog comme potentielle stratégie médicale. Une étude *in vitro* a permis d'analyser la prolifération, la différenciation, la survie et les variations d'expression génique et protéique des cellules musculaires C2C12 irradiées et traitées avec deux conditionnements post-irradiation (prolifération ou différenciation) en présence d'un agoniste (Sonic Hedgehog) ou d'un antagoniste de la voie Hedgehog (la cyclopamine).
Il a été mis en évidence que l'irradiation présente un impact négatif sur les mécanismes de prolifération et de différenciation des C2C12 qui peuvent être modulées par la voie Hedgehog.

En effet, son activation permet de stimuler la survie et la prolifération cellulaire alors que son inhibition favorise la différenciation cellulaire. Ces résultats suggèrent qu'un traitement séquentiel des lésions radio-induites pourrait être envisagé, consistant 1- en l'activation de la voie Hedgehog pour permettre à un nombre suffisant de précurseurs myogéniques de survivre et de proliférer ; suivi 2- d'une inhibition favorisant leur différenciation et donc la régénération musculaire. L'efficacité thérapeutique de ce traitement séquentiel *in vivo* reste à être évaluée ; ce qui constitue la dernière étape de ce projet.

Mots-clés : Cellules satellites. Modulation de la voie de signalisation Hedgehog. Régénération musculaire. Syndrome cutané radio-induit. Médecine d'armée.

Abstract:

MUSCULAR REGENERATION AFTER A HIGHLY-DOSED LOCALIZED IRRADIATION: THERAPEUTIC POTENTIAL OF MODULATING THE HEDGEHOG SIGNALING PATHWAY

In the last twenty years, an increase in high-dose localized radiation accidents has been observed, requiring the development of new medical countermeasures to ensure the difficult treatment of radiation consequences. Exposure of the skin, but also of the underlying musculature, leads to the development of a radiation-induced skin syndrome. Currently, the reference treatment consists of surgery supplemented by cell therapy. This improves the functional and overall survival of the patient, but leaves a muscle defect limiting mobility, motor skills and quality of life. The identification of new therapeutic targets is therefore essential to improve post-irradiation muscle regeneration.

Thus, this project aims at assessing the modulation of the Hedgehog signaling pathway as a potential medical strategy. In an *in vitro* study, we analyzed the proliferation, differentiation, survival and gene expression variations of C2C12 muscle cells irradiated and treated with two post-irradiation conditions (proliferation or differentiation), in the presence of an agonist (Sonic Hedgehog) or an antagonist of the Hedgehog pathway (cyclopamine). It has been shown that irradiation has a negative impact on the mechanisms of proliferation and differentiation of C2C12 which can be modulated by the Hedgehog pathway.

Indeed, its activation stimulates cell survival and proliferation while its inhibition promotes cell differentiation. These results suggest that a sequential treatment of radiation-induced lesions could be considered, consisting of 1- activation of the Hedgehog pathway to allow a sufficient number of myogenic precursors to survive and proliferate, followed by 2- inhibition to promote their differentiation and thus muscle regeneration.

Published in : SERVICE DE SANTÉ DES ARMÉES, - (dir.), *Médecine et Armées Vol.50 No.2. Menace nucleaire et radiologique*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813005427, doi : 10.17184/eac.9782813005427

The therapeutic efficacy of this sequential *in vivo* treatment remains to be evaluated, which is the last step of this project.

Keywords: Satellite cells. Modulation of Hedgehog pathway. Muscle regeneration. Cutaneous radiation syndrome. Military medicine.

Introduction

Les surexpositions liées aux accidents radiologiques, de radiothérapie ou à des actes terroristes utilisant des sources cachées peuvent être à l'origine d'une exposition locale à de fortes doses de rayonnements ionisants qui affectent les barrières physiologiques telles que la peau et les muscles squelettiques sous-cutanés (1). Selon la dose reçue, le type de rayonnement et le volume des tissus touchés, il peut résulter un Syndrome cutané radio-induit (SCR) qui provoque au fur et à mesure de son évolution des lésions dégénératives sévères et hautement inflammatoires (1,2).

Le traitement de référence actuel du SCR consiste en une reconstruction dosimétrique de la lésion afin de guider l'excision large des tissus, suivie d'une chirurgie reconstructrice utilisant des lambeaux musculo-cutanés couplée à des injections itératives de Cellules stromales mésenchymateuses issues de moelle osseuse autologue (CSM-MO). Néanmoins, malgré la mise en place de ce traitement, une dégénérescence musculaire persistante a pu être observée (3,4). Afin d'optimiser la prise en charge du SCR, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques est donc nécessaire pour favoriser la régénération musculaire post-irradiation.

Après une blessure, le muscle strié squelettique est capable de régénérer afin de recouvrer sa fonction. Ceci est rendu possible grâce à des cellules souches particulières identifiées en 1961 par l'équipe de Mauro et connues sous le nom de Cellules satellites (SC) (5). Ces progéniteurs quiescents s'activent en cas de lésion et suivent un programme de néo-myogenèse aboutissant à la formation de nouvelles fibres fonctionnelles après des étapes de prolifération, de différenciation puis de fusion. Ce processus est contrôlé par une cascade de facteurs de régulation myogéniques précoces (Pax3, Pax7), intermédiaires (Myf5, MyoD1) et tardifs (myogénine). La myogénine joue un rôle dans les phases tardives de fusion et dans la synthèse des isoformes de la myosine, essentielles à la fonctionnalité du muscle. D'autres protéines matures sont également synthétisées à la fin du processus, comme la bêta-énolase (ENO3) qui est impliquée dans le stockage du glycogène.

Parmi les cibles pharmacologiques à fort potentiel thérapeutique, la voie de signalisation Hedgehog (Hh) est largement décrite dans la littérature (6,7) et semble particulièrement prometteuse pour le traitement du SCR. Trois activateurs physiologiques sont connus à ce jour : Sonic (Shh), Desert (Dhh) et Indian Hedgehog (Ihh). Divers rôles biologiques dont la neurogenèse, l'angiogenèse et la myogenèse ont été attribués aux protéines Hh dans des conditions physiologiques normales, principalement au cours

Published in : SERVICE DE SANTÉ DES ARMÉES, - (dir.), *Médecine et Armées Vol.50 No.2. Menace nucleaire et radiologique*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813005427, doi : 10.17184/eac.9782813005427

du développement, de la drosophile aux mammifères. En effet, Shh est un morphogène qui régule notamment les étapes majeures de la formation du muscle squelettique au cours de l'embryogenèse (8). La voie Hedgehog peut aussi être activée après un traumatisme musculaire, tel qu'une ischémie, et a un rôle majeur dans la régénération tissulaire en favorisant la myogenèse, la néoangiogenèse et en limitant l'inflammation (9-11). L'activation de cette voie augmente également la réparation après une lésion musculaire, même dans le contexte d'une myodystrophie (12). Cependant, il semble que ce bénéfice de l'activation de la voie Hh diminue avec l'âge (10).

Dans cette étude *in vitro*, nous avons évalué les effets de la modulation de la voie de signalisation Hh sur la capacité des cellules C2C12 (13,14) à survivre, proliférer et se différencier après une exposition à de fortes doses de radiations. Après une dose unique de 5 Gy de rayons X, les modifications ont été évaluées dans les cellules où la voie Hh a été soit stimulée par du Shh recombinant murin, soit bloquée par l'inhibiteur sélectif cyclopamine, dans des conditions de prolifération ou de différenciation.
Le but de notre étude est d'acquérir des données sur le potentiel thérapeutique de l'activation ou de l'inhibition de la voie Hh pour améliorer la régénération musculaire après irradiation.

1 Matériels et Méthodes

1.1 Modèle cellulaire et plan expérimental

Les C2C12 sont une lignée adhérente de myoblastes murins C2C12 (ATCC) capables de proliférer dans un milieu basal (Mx Prolif) ou de se différencier pour former des myotubes dans un milieu de différenciation (Mx Diff). Elles sont très largement décrites et utilisées comme modèle *in vitro* pour étudier la myogenèse (figure 1) (14).

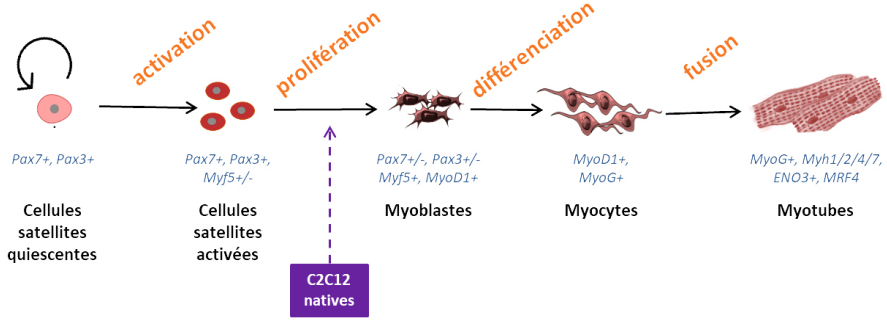


Fig. 1 : Schéma représentatif des différentes étapes de la myogenèse et de gènes majeurs impliqués dans ce processus © Emmanuelle Rota Graziosi et Nicolas Jullien / IRBA

Nous avons mis au point un modèle de dérégulation radio-induite de la myogenèse dans l'objectif d'évaluer le potentiel thérapeutique de l'activation ou de l'inhibition de la voie Hh. Les effets de la modulation de la voie de signalisation Hh sur la capacité des cellules C2C12 (13,14) à survivre, proliférer et se différencier après une irradiation à de fortes doses ont été étudiés. Le plan expérimental de cette étude est illustré par la figure 2. La voie Hh a été soit stimulée par du Shh recombinant murin,

Published in : SERVICE DE SANTÉ DES ARMÉES, - (dir.), *Médecine et Armées Vol.50 No.2. Menace nucleaire et radiologique*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813005427, doi : 10.17184/eac.9782813005427

soit bloquée par l'inhibiteur sélectif cyclopamine, dans des conditions de prolifération ou de différenciation.

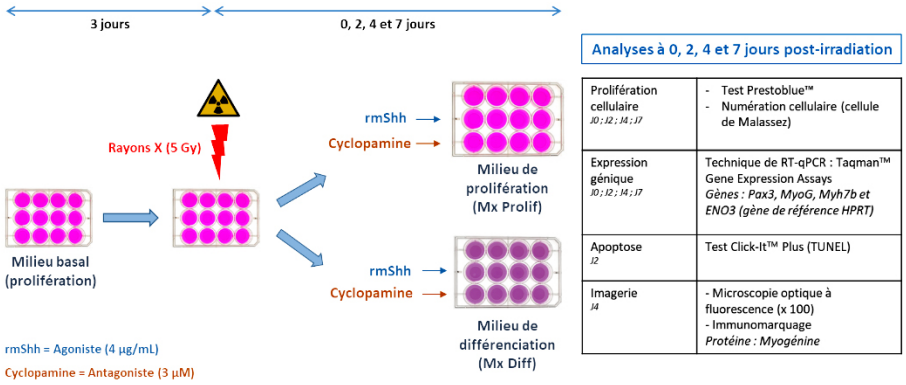


FIG. 2 : Plan expérimental de l'étude de la modulation de la voie de signalisation Hedgehog après irradiation © Emmanuelle Rota Graziosi et Nicolas Jullien / IRBA

1.2 Techniques d'évaluation des effets de la modulation de la voie Hh post-irradiation

1.2.1 Irradiation

Les cellules C2C12 ont été irradiées sur une plateforme de type SARRP (*Small Animal Radiation Research Platform, XStrahl*) équipée d'un générateur de rayons X calibré pour délivrer une dose homogène de 5 Gy (220 kV, 13 mA, avec une filtration en Cu de 0,5 mm, débit de dose d'environ 0,7 Gy/min).

1.2.2 Analyse de la prolifération cellulaire

L'activité métabolique des cellules vivantes a été analysée avec le réactif PrestoBlue™ aux jours 0, 2, 4 et 7, selon le protocole du fabricant.

1.2.3 Analyse par RT-PCR quantitative des variations d'expression génique

Après extraction des ARN totaux et transcription inverse, les PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ont été réalisées dans un thermocycleur 7900HT *Fast Real-Time PCR* en utilisant des amorces spécifiques (tableau 1). Les résultats sont exprimés en expression relative du gène ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) avec HPRT comme gène de référence et le jour 0 ou milieu basal/0 Gy/jour 4 comme condition de contrôle.

TAB. 1 : Gènes amplifiés par RT-qPCR et références des kits TaqMan Gene Expression Assays utilisés ©Nicolas Jullien / IRBA

Gene	Protéine correspondante	Référence Applied	Taille d'amplicon
Pax3	paired-box 3	Mm00435491_m1	57
MyoG	myogénine	Mm00446194_m1	69
Myh7b	myosine type 7b	Mm01249941_m1	73
ENO3	bêta-énolase	Mm00468267_m1	54
HPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase	Mm00446968_m1	65

Published in : SERVICE DE SANTÉ DES ARMÉES, - (dir.), *Médecine et Armées Vol.50 No.2. Menace nucleaire et radiologique*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813005427, doi : 10.17184/eac.9782813005427

1.2.4 Analyse de la mort cellulaire par apoptose et marquage immunohistochimique

Les cellules apoptotiques ont été marquées avec le kit de dosage Click-It^{TM} Plus TUNEL puis quantifiées avec le logiciel d'analyse d'image Fiji. Pour le marquage immuno-fluorescent, un anticorps primaire anti-myogénine et un anticorps secondaire couplé à un florophore Alexa fluor 488 ont été utilisés pour cette étude.

1.2.5 Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés en moyennes ± SEM et chaque étude a été répétée au moins trois fois indépendamment. Les analyses de comparaison ont été réalisées par un test Z-score et/ou un test non paramétrique Mann Whitney. $*\, p < 0{,}05$, $**\, p < 0{,}01$, $***$ p <0,001, *ns* non significatif.

2 Résultats

2.1 Mise au point d'un modèle *in vitro* de dérégulation radio-induite de la myogenèse

2.1.1 L'irradiation impacte les processus de prolifération et de survie des cellules C2C12

L'évaluation de la prolifération cellulaire a été réalisée par la mesure du taux d'activité métabolique (TAM). À J0, en conditionnement Mx Prolif, avec ou sans irradiation, les TAM sont identiques. L'irradiation a diminué de plus de 25 % le TAM des C2C12 par rapport aux cellules non irradiées. Aucune variation des TAM n'a été observée en condition de différenciation puisque ce milieu, en promouvant la différenciation, bloque la prolifération cellulaire. L'irradiation semble ainsi engendrer une altération de la prolifération des C2C12, en phase précoce de la myogenèse (figure 3A).

Deux jours après irradiation, les cellules conditionnées en Mx Prolif ne présentent aucune différence du taux d'apoptose, avec ou sans irradiation. En revanche, le conditionnement en milieu de différenciation augmente d'environ trois fois le taux d'apoptose des cellules non irradiées, par rapport au Mx Prolif. Les cellules irradiées conditionnées en milieu de différenciation ont un taux d'apoptose presque doublé par rapport aux cellules non irradiées dans le même milieu. L'irradiation semble donc engendrer une perturbation des phases plus tardives de la myogenèse et provoque une augmentation de la mort cellulaire programmée, principalement au cours de la différenciation (figure 3B).

Ainsi, dans notre modèle de myogenèse *in vitro*, l'irradiation agit sur la phase précoce de prolifération en réduisant l'activité mitochondriale et la prolifération, et sur les stades plus tardifs de différenciation en favorisant la mort cellulaire par apoptose.

Published in : SERVICE DE SANTÉ DES ARMÉES, - (dir.), *Médecine et Armées Vol.50 No.2. Menace nucleaire et radiologique*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813005427, doi : 10.17184/eac.9782813005427

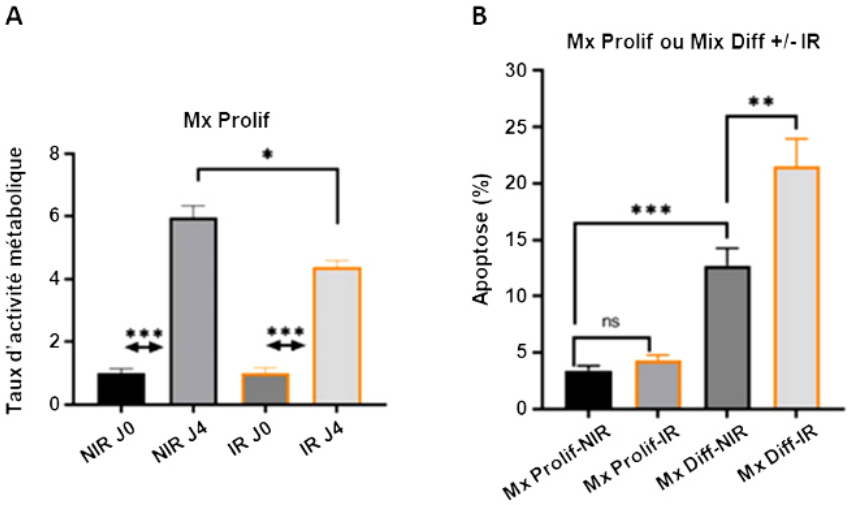


FIG. 3 : Évaluation des effets de l'irradiation sur la prolifération et la survie des cellules C2C12. (A) Test de prolifération/métabolisme réalisé à J4 au PrestoBlue^{TM}. (B) Pourcentage d'apoptose mesuré à J2 par la technique TUNEL dans les deux conditionnements (Mx Prolif et Mx Diff) avec ou sans irradiation, Les analyses de comparaison ont été réalisées par un test non paramétrique Mann Whitney. $*\,p < 0{,}05$, $**\,p < 0{,}01$, $***$p <0,001, *ns* non significatif. © Emmanuelle Rota Graziosi et Nicolas Jullien / IRBA avec *GraphPad Prism v9*

2.1.2 L'irradiation module l'expression des gènes impliqués dans le processus de myogenèse

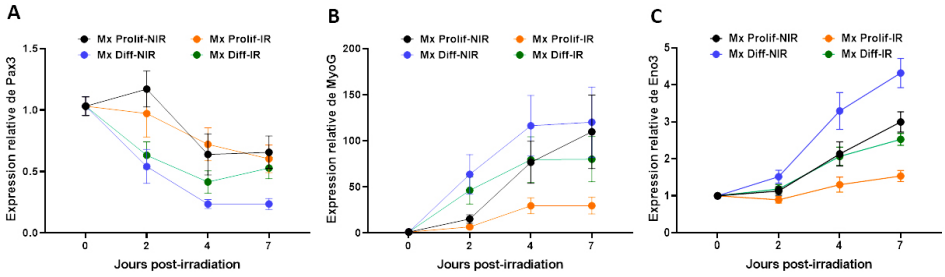


FIG. 4 : Étude de l'expression des gènes (A) Pax3 (B) MyoG et (C) ENO3 sur sept jours, dans des cellules C2C12 irradiées à 5 Gy (IR) ou non (NIR), en condition de prolifération (Mx Prolif) ou de différenciation (Mx Diff) © Emmanuelle Rota Graziosi et Nicolas Jullien / IRBA avec *GraphPad Prism v9*

Comme l'illustre la figure 1, les gènes tels que Pax3 sont impliqués précocement dans la myogenèse (stade de prolifération) alors que les gènes MyoG et ENO3 sont, eux, plus tardifs (stade de fusion/maturation). Une analyse de l'expression de ces gènes a été réalisée par PCR quantitative, dans les différentes conditions vues précédemment (figure 4).

L'expression relative du gène Pax3 diminue au cours du temps, quelle que soit la condition (figure 4A). Cela traduit un engagement des cellules dans la différenciation s'accompagnant d'une diminution des marqueurs précoces.

Ainsi, comme le montre le tableau 2 qui se focalise à J4 post-irradiation, les cellules non irradiées expriment significativement moins le gène Pax3 en Mx Diff qu'en Mx Prolif. Il est également remarquable que l'irradiation limite significativement la baisse d'expression de ce marqueur en Mx Diff, montrant une diminution radio-induite de la différenciation des C2C12 dans ce milieu. Aucune différence n'est, en revanche, observée avec ou sans irradiation en Mx Prolif. L'expression des gènes de maturité MyoG et ENO3 augmente, quant à elle, au cours du temps (figures 4B et C) et l'induction de la différenciation par le Mx Diff conduit à une augmentation accrue.
À J4, on observe ainsi une augmentation de l'expression de MyoG (*ns*) et de ENO3 ($p < 0{,}01$) dans les cellules non irradiées en Mx Diff par rapport au conditionnement en Mx Prolif. Après exposition aux rayonnements ionisants, l'expression génique de MyoG et ENO3 diminue, en Mx Prolif ou Mx Diff, traduisant une diminution de l'engagement des cellules en différenciation (tableau 2).

Tab. 2 : Variations de l'expression des gènes Pax3, MyoG et ENO3 à J4, dans des cellules C2C12 irradiées à 5 Gy (IR) ou non (NIR), en condition de prolifération (Mx Prolif) ou de différenciation (Mx Diff) ©Nicolas Jullien / IRBA

Gene	NIR Mx Diff vs Mx Prolif	Mx Prolif IR vs NIR	Mx Diff IR vs NIR
Pax3	↘ *	→	↗
MyoG	↗ ns	↘ ns	↘ ns
ENO3	↗ **	↘ ***	↘ **

L'ensemble de ces données montre que le modèle décrit ci-dessus est un modèle d'altération radio-induite de la myogenèse en phase de prolifération (diminution de l'activité métabolique et augmentation de l'expression des gènes précoces) et en phase de différenciation (augmentation de l'apoptose et diminution de l'expression des gènes tardifs). La dérégulation de la myogenèse peut être illustrée ici par l'immunomarquage de la myogénine (marqueur tardif de la myogenèse) et le nombre réduit de cellules engagées dans la différenciation, avec une altération dans la formation des myotubes (figure 5). Les critères d'évaluation *in vitro* de dérégulation radio-induite de la myogenèse peuvent ainsi être utilisés pour évaluer l'efficacité de cibles thérapeutiques potentielles.

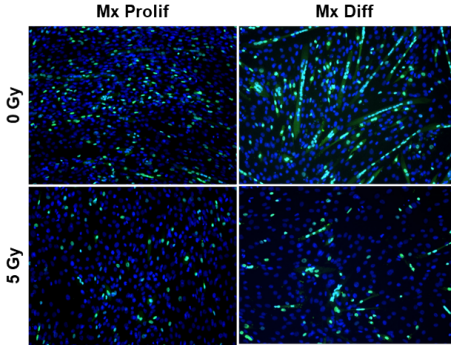


Fig. 5 : Immunomarquage de la myogénine (vert) avec identification des noyaux au DAPI (bleu) ©Nicolas Jullien / IRBA

Published in : SERVICE DE SANTÉ DES ARMÉES, - (dir.), *Médecine et Armées Vol.50 No.2. Menace nucleaire et radiologique*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813005427, doi : 10.17184/eac.9782813005427

2.2 Évaluation *in vitro* du potentiel thérapeutique de l'activation ou de l'inhibition de la voie Hh sur la dérégulation radio-induite de la myogenèse

L'impact de la modulation de la voie Hh a été étudié après irradiation sur les C2C12 en analysant la prolifération, la survie et la différenciation. Pour cela, dans les mêmes conditions d'irradiation, les cellules en Mx Prolif ou Mx Diff ont été traitées avec mrShh (agoniste) ou la cyclopamine (antagoniste).

2.2.1 Évaluation du potentiel thérapeutique de Shh et de la cyclopamine sur le métabolisme et la survie des cellules irradiées

Comme décrit précédemment, les cellules irradiées présentent un TAM réduit par rapport aux non irradiées. En condition de prolifération, l'ajout de cyclopamine a réduit significativement le TAM des C2C12 non irradiées (données non montrées). Cette même observation peut être faite avec les cellules irradiées, mais de manière non significative (figure 6A). En revanche, l'addition de Shh permet d'augmenter le TAM des C2C12 irradiées jusqu'à atteindre le même niveau que les C2C12 contrôles (non irradiées et non traitées). Ces données mettent en évidence que l'activation de la voie Hh stimule la prolifération des cellules après une irradiation, alors que son blocage diminue cette prolifération (figure 6A).

En milieu de prolifération, l'ajout de Shh ou de cyclopamine n'a aucun impact sur la mesure de l'apoptose, que les cellules soient irradiées ou non (données non montrées). En revanche, en milieu de différenciation, l'ajout de Shh diminue significativement le taux d'apoptose radio-induite de 37 % ($p < 0{,}05$)) par rapport aux cellules irradiées mais non traitées (figure 6B). À l'inverse, l'ajout de cyclopamine augmente de manière non significative le taux d'apoptose des cellules irradiées (figure 6C).
Ainsi, en condition de différenciation, Shh semble jouer un rôle protecteur contre l'apoptose radio-induite, alors que la cyclopamine ne la module pas significativement.

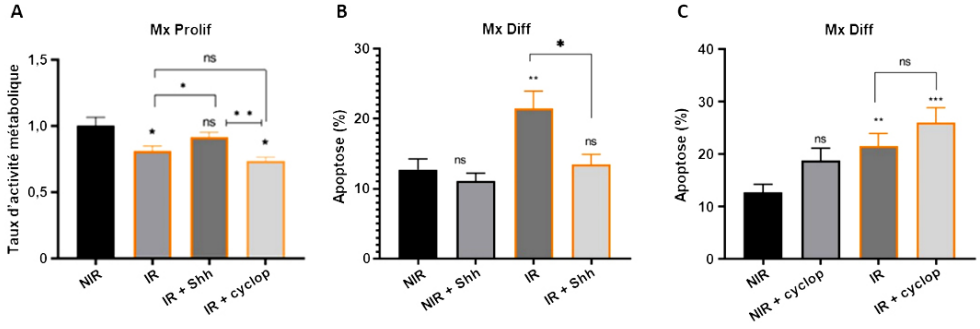


FIG. 6 : Effet de la modulation post-irradiation de la voie Hh sur la prolifération et la survie cellulaire. (A) Test de prolifération/métabolisme réalisé à J4 au PrestoBlue™ en condition de prolifération. (B et C) Pourcentage d'apoptose radio-induite mesuré à J2 par la technique TUNEL en condition de différenciation avec ou sans addition de (B) Shh ou (C) de cyclopamine (cyclop) avec (IR) ou sans irradiation (NIR). Les analyses comparatives ont été réalisées avec un test non paramétrique Mann Whitney. $*p < 0{,}05$, $**p < 0{,}01$, $***p < 0{,}001$, *ns* non significatif. © Emmanuelle Rota Graziosi et Nicolas Jullien / IRBA avec *GraphPad Prism v9*

Published in : SERVICE DE SANTÉ DES ARMÉES, - (dir.), *Médecine et Armées Vol.50 No.2. Menace nucleaire et radiologique*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813005427, doi : 10.17184/eac.9782813005427

2.2.2 Évaluation du potentiel thérapeutique de Shh et de la cyclopamine sur la modulation de l'expression des gènes myogéniques

L'expression génique des marqueurs myogéniques a été mesurée par RT-qPCR après irradiation et traitement avec Shh ou cyclopamine, en condition de prolifération ou de différenciation. Une synthèse des résultats est présentée dans le tableau 3.

En milieu de prolifération, les résultats tendent à montrer une régulation positive de l'expression de Pax3 par Shh et une régulation négative par la cyclopamine. L'activation de la voie Hh semble ainsi favoriser la précocité des progéniteurs musculaires, alors que son blocage favoriserait l'initiation de la différenciation. En Mx Diff, aucune variation de l'expression du gène Pax3 n'a été observée.

L'effet délétère de l'irradiation sur l'expression de MyoG et ENO3 a été montré précédemment (tableau 2), avec une diminution de l'expression des deux gènes quelle que soit la condition de culture. En milieu de prolifération, après addition de Shh, le taux d'expression de ces deux gènes de maturité n'est pas modifié dans les cellules irradiées, alors qu'il est encore significativement diminué en milieu de différenciation. Ainsi, l'irradiation et l'activation de la voie Hh ont un effet négatif sur la différenciation. En revanche, le niveau d'expression de MyoG et ENO3 est significativement augmenté par la cyclopamine après irradiation, quelle que soit la condition de culture. Dans chacun des milieux, l'expression des deux gènes est ramenée à un niveau proche de celui des cellules non irradiées, traduisant ainsi un effet stimulant du blocage de la voie Hh sur la différenciation myogénique des C2C12.

Tab. 3 : Variations de l'expression des gènes Pax3, MyoG et ENO3 à J4, dans des cellules C2C12 irradiées à 5 Gy, en condition de prolifération (Mx Prolif) ou de différenciation (Mx Diff), après addition de Shh ou de cyclopamine ©Nicolas Jullien / IRBA

	+ Shh		+ Cyclopamine	
Gene	**Mx Prolif**	**Mx Diff**	**Mx Prolif**	**Mx Diff**
Pax3	↗ ns	→	↘ ns	→
MyoG	→	↘ ***	↗ ***	↗ **
ENO3	→	↘ **	↗ ***	↗ ***

3 Discussion

Chez l'homme, les dommages musculaires radio-induits et leur réparation après irradiation localisée à forte dose sont largement négligés et constituent une perspective d'amélioration du traitement de référence actuel. Les Cellules satellites (CS) sont des cellules indifférenciées spécifiques du tissu musculaire (5). Dans des conditions physiologiques normales, elles représentent environ 2 % du nombre total de noyaux présents dans le muscle squelettique adulte et assurent la myogenèse pendant la croissance musculaire, après un effort physique intense et un traumatisme physiopathologique ou accidentel (15,16). Cependant, les CS sont très radiosensibles et une irradiation localisée à forte dose diminue fortement leur nombre (16). Or, lorsqu'un trop grand nombre de CS disparaît, la néo-myogenèse est alors mise en péril. Notre étude s'est axée sur l'impact de la modulation de la voie Hh sur la régulation de la myogenèse.

Published in : SERVICE DE SANTÉ DES ARMÉES, - (dir.), *Médecine et Armées Vol.50 No.2. Menace nucleaire et radiologique*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813005427, doi : 10.17184/eac.9782813005427

Outre son rôle dans la régulation des étapes de formation du muscle squelettique au cours de l'embryogenèse, la voie Hedgehog peut aussi être activée après un traumatisme musculaire, comme une ischémie, et joue un rôle majeur dans la régénération tissulaire en favorisant la myogenèse, la néo-angiogenèse et en limitant l'inflammation (9,10). L'activation de cette voie augmente également la réparation après une lésion musculaire, même dans le contexte d'une myodystrophie (13,14). Dans des modèles d'ischémie ou de lésions musculaires provoquées par l'injection de cardiotoxine (CTX) chez des souris dystrophiques Mdx, la thérapie génique avec Shh stimule fortement la régénération musculaire (12). À l'inverse, le blocage du signal Hh par la cyclopamine limite fortement la régénération musculaire après une blessure mécanique ou l'injection de CTX dans le muscle tibial antérieur de souris C57Bl/6J (17), probablement en bloquant la prolifération des progéniteurs.

Dans notre étude, les cellules C2C12 sont utilisées pour reproduire *in vitro* les mécanismes de prolifération et de différenciation des CS (14). Nous avons mis en évidence un impact direct de la modulation la voie Hh sur le comportement des C2C12 en culture : son activation par l'agoniste Shh augmente la survie après irradiation et favorise la prolifération des C2C12, alors que son inhibition par la cyclopamine stimule la différenciation (figure 6, tableau 3). Après irradiation, la baisse du nombre de ces cellules en condition de prolifération, l'augmentation du nombre de cellules apoptotiques et la diminution de la différenciation dans toutes les conditions (figures 3, 4 et 5 ; tableau 2) tendent à montrer que les cellules C2C12, comme les CS, présentent un haut niveau de sensibilité aux radiations ionisantes. Ces effets délétères ont également été démontrés dans des modèles cellulaires similaires, avec différentes sources de rayonnements (18,19).

Comme Koleva *et al.* qui utilisent des modèles *in vitro* de cellules C2C12 ou satellites en condition de prolifération (20), nous avons mis en évidence que l'activation de la voie Hh par Shh recombinant stimule la prolifération et limite l'apoptose.
Cette prévention de la mort cellulaire programmée pourrait être due à l'effet bloquant de Shh sur l'activation de la Caspase-3 (20). Après irradiation, l'activation de la voie de signalisation Hh semble donc apporter un bénéfice majeur pour la conservation de la réserve de progéniteurs myogéniques en favorisant à la fois la prolifération des CS en milieu de prolifération ainsi que leur survie en conditions de prolifération ou de différenciation. L'inhibition de la voie Hh par la cyclopamine a l'effet inverse, notamment sur la survie cellulaire, qu'elle diminue légèrement en même temps qu'elle favorise la différenciation (figure 6 ; tableau 3). Dans des conditions similaires aux nôtres, l'activation de la voie Hh s'est avérée très délétère pour la différenciation des CS en l'absence d'irradiation. La formation de myotubes est fortement réduite en présence de 4 μg/mL de Shh recombinant (20). De même, dans notre modèle cellulaire et dans les conditions d'irradiation et de culture décrites ci-dessus, nous avons montré que l'activation de la voie Hh *via* Shh et que l'inhibition par la cyclopamine tendent respectivement à diminuer et à augmenter l'expression de ces marqueurs tardifs de différenciation (tableau 3).

Published in : SERVICE DE SANTÉ DES ARMÉES, - (dir.), *Médecine et Armées Vol.50 No.2. Menace nucleaire et radiologique*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813005427, doi : 10.17184/eac.9782813005427

Conclusion

Cette étude fournit donc de nouvelles données qui soutiennent que la modulation de la voie de signalisation Hh pourrait constituer un moyen efficace d'améliorer la régénération musculaire post-irradiation dans le cadre du SCR. Ceci pourrait ouvrir la voie à une stratégie thérapeutique originale et innovante qui utiliserait séquentiellement : (1) une stimulation locale de la voie Hh pour limiter l'apoptose radio-induite et stimuler la prolifération des précurseurs myogéniques à proximité de la zone irradiée ; suivie (2) d'une inhibition de la voie pour favoriser la différenciation cellulaire et former des fibres musculaires matures pour, à terme, soutenir la régénération musculaire en complément du traitement actuel de référence du SCR (figure 7).

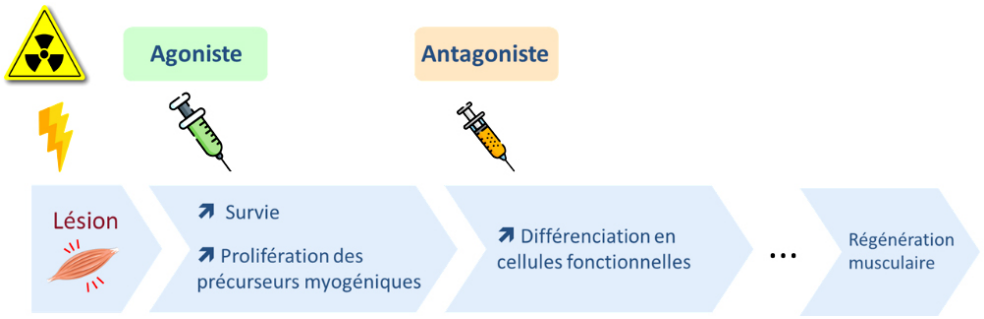


Fig. 7 : Illustration de la modulation de la voie Hh comme traitement potentiel contre la dérégulation radio-induite de la myogenèse ©Emmanuelle Rota Graziosi / IRBA

Il est possible d'envisager que la stimulation du Shh puisse être réalisée *via* un apport de microvésicules dérivées de cellules souches stromales mésenchymateuses surexprimant Shh, produites dans notre laboratoire. De plus, vismodegib ou sonidegib, deux inhibiteurs puissants et spécifiques de la voie Hh utilisés en clinique pour lutter contre les cancers basocellulaires, pourraient également être utilisés comme substituts à la cyclopamine.

Enfin, ce traitement pourra être évalué sur d'autres pathologies musculaires, après une lésion traumatique ou ischémique par exemple, afin de compléter la pharmacopée existante et accélérer la réparation du muscle.

Remerciements

Nous adressons nos profonds remerciements à la Direction générale de l'armement (DGA) pour le financement de notre travail ; à l'Unité de biologie moléculaire de l'IRBA dirigée par le Dr Laure Barbier pour son aide dans la mise en place des tests de RT-PCR ; à l'Unité imagerie de l'IRBA dirigée par le PHC Anne-Laure Favier, et plus particulièrement au Dr Myriam Oger et à M. Xavier Butigieg, pour leur aide en microscopie à fluorescence et l'analyse de l'étude de l'apoptose ; à Mme Véronique Chastres pour ses précieux conseils en statistiques.

Remerciements à la linguiste relectrice : France Lepez.

Financements

Les auteurs indiquent qu'ils ont reçu un financement de la Direction générale de l'armement (DGA) pour le travail présenté dans cet article (Biomedef NBC-4-NR-4306).

Contributions des auteurs

Conception et méthodologie : ERG, NJ. Réalisation des études : ERG, MG, NJ.
Validation et gestion des études : NJ. Écriture du manuscrit initial : ERG, NJ, SF.
Relecture et correction du manuscrit : ERG, DR, MD, NJ, SF.
Obtention du financement : DR, NJ.

Approbation éthique

Les études *in vitro* présentées ici ont été réalisées sur une lignée cellulaire commerciale et n'ont pas nécessité d'approbation éthique de la part du Comité d'éthique du SSA (C2EA-SSA).

Références bibliographiques

1. Lefaix JL, Delanian S. Menace terroriste, approche médicale : nucléaire, radiologique, biologique, chimique. Montrouge : J. Libbey Eurotext ; 2005.
2. Hopewell JW. The Skin : Its Structure and Response to Ionizing Radiation. Int J Radiat Biol. 1990 ;57(4) :751-73.
3. Lataillade J, Doucet C, Bey E, Carsin H, Huet C, Clairand I, *et al.* New approach to radiation burn treatment by dosimetry-guided surgery combined with autologous mesenchymal stem cell therapy. Regen Med. 2007 ;2(5) :785-94.
4. Bey E, Prat M, Duhamel P, Benderitter M, Brachet M, Trompier F, *et al.* Emerging therapy for improving wound repair of severe radiation burns using local bone marrow-derived stem cell administrations. Wound Repair Regen. 2010 ;18(1) :50-8.
5. Mauro A. SATELLITE CELL OF SKELETAL MUSCLE FIBERS. J Biophys Biochem Cytol. 1 févr 1961 ;9(2) :493-5.
6. Bürglin TR. The Hedgehog protein family. Genome Biol. 2008 ;9(11) :241.
7. Teperino R, Aberger F, Esterbauer H, Riobo N, Pospisilik JA. Canonical and non-canonical Hedgehog signalling and the control of metabolism. Semin Cell Dev Biol. 2014 ;33 :81-92.
8. Anderson C, Williams VC, Moyon B, Daubas P, Tajbakhsh S, Buckingham ME, *et al.* Sonic hedgehog acts cell-autonomously on muscle precursor cells to generate limb muscle diversity. Genes Dev. 2012 ;26(18) :2103-17.
9. Renault MA, Vandierdonck S, Chapouly C, Yu Y, Qin G, Metras A, *et al.* Gli3 Regulation of Myogenesis Is Necessary for Ischemia-Induced Angiogenesis. Circ Res. 2013 ;113(10) :1148-58.
10. Renault MA, Robbesyn F, Chapouly C, Yao Q, Vandierdonck S, Reynaud A, *et al.* Hedgehog-Dependent Regulation of Angiogenesis and Myogenesis Is Impaired in Aged Mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013 ;33(12) :2858-66.
11. Caradu C, Guy A, James C, Reynaud A, Gadeau AP, Renault MA. Endogenous Sonic Hedgehog limits inflammation and angiogenesis in the ischaemic skeletal muscle of mice. Cardiovasc Res. 2018 ;114(5) :759-70.
12. Piccioni A, Gaetani E, Palladino M, Gatto I, Smith RC, Neri V, *et al.* Sonic hedgehog gene therapy increases the ability of the dystrophic skeletal muscle to regenerate after injury. Gene Ther. 2014 ;21(4) :413-21.
13. Blau HM, Chiu CP, Webster C. Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons. Cell. 1983 ;32(4) :1171-80.
14. McMahon DK, Anderson PA, Nassar R, Bunting JB, Saba Z, Oakeley AE, *et al.* C2C12 cells : biophysical, biochemical, and immunocytochemical properties. Am J Physiol-Cell Physiol. 1994 ; 266(6) : C1795-802.

Published in : SERVICE DE SANTÉ DES ARMÉES, - (dir.), *Médecine et Armées Vol.50 No.2. Menace nuclaire et radiologique*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813005427, doi : 10.17184/eac.9782813005427

15. Appell HJ, Forsberg S, Hollmann W. Satellite Cell Activation in Human Skeletal Muscle After Training : Evidence for Muscle Fiber Neoformation. Int J Sports Med. 1988 ;09(04) :297-9.
16. Jurdana M. Radiation effects on skeletal muscle. Radiol Oncol [En ligne]. 1 janv 2008 [cité le 23 févr 2023] ;42(1). Disponible : https://content.sciendo.com/doi/10.2478/v10019-007-0034-51
17. Straface G, Aprahamian T, Flex A, Gaetani E, Biscetti F, Smith RC, *et al.* Sonic hedgehog regulates angiogenesis and myogenesis during post-natal skeletal muscle regeneration. J Cell Mol Med. 2009 ;13(8b) :2424-35.
18. Ikeda, R. Hachisu, A. Yamaguchi, Y. S. Radiation retards muscle differentiation but does not affect osteoblastic differentiation induced by bone morphogenetic protein-2 in C2C12 myoblasts. Int J Radiat Biol. 2000 ;76(3) :403-11.
19. Sakurai T, Ueda T, Kawai M, Tobita H, Miyakoshi J. Protective effects of insulin-like growth factor-I on the decrease in myogenic differentiation by ionizing radiation. Int J Radiat Biol. 2009 ;85(2) :153-8.
20. Koleva M, Kappler R, Vogler M, Herwig A, Fulda S, Hahn H. Pleiotropic effects of sonic hedgehog on muscle satellite cells. Cell Mol Life Sci. 2005 ;62(16) :1863-70.

Published in : SERVICE DE SANTÉ DES ARMÉES, - (dir.), *Médecine et Armées Vol.50 No.2. Menace nuclaire et radiologique*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813005427, doi : 10.17184/eac.9782813005427