



HAL
open science

Étude de l'interaction MyoD/NFATc2 au cours de la myogenèse chez la souris

Nissrine Daou

► **To cite this version:**

Nissrine Daou. Étude de l'interaction MyoD/NFATc2 au cours de la myogenèse chez la souris. Sciences agricoles. Université René Descartes - Paris V, 2013. Français. NNT : 2013PA05T013 . tel-01160990

HAL Id: tel-01160990

<https://theses.hal.science/tel-01160990>

Submitted on 8 Jun 2015

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.

Université Paris Descartes - UFR Biomédicale

Thèse

Pour obtenir le grade de docteur de l'Université Paris Descartes

Ecole Doctorale B3MI

« **Biochimie, Biothérapie, Biologie Moléculaire et Infectiologie** »

Présentée et soutenue publiquement le 28 juin 2013 par

Nissrine DAOU

**Étude de l'interaction MyoD/NFATc2 au cours de la
myogenèse chez la souris**

Jury

Présidente : Dr. Suzie LEFEBVRE
Rapporteur : Pr. Jamileh MOVASSAT
Rapporteur : Pr. Michèle BEAUDRY
Encadrante : Dr. Anne-Sophie ARMAND
Directeur de thèse : Pr. Christophe CHANOINE

À ma mine d'or,

À Kazboul,

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	12
I MYOGENESE DU MUSCLE SQUELETTIQUE	14
I.1 <u>LE SYSTEME MUSCULAIRE SQUELETTIQUE</u>	14
I.1.1 <i>Les différents tissus musculaires</i>	14
I.1.2 <i>Organisation du muscle squelettique</i>	16
I.1.2.1 <i>Structure du muscle squelettique</i>	16
I.1.2.2 <i>Caractéristiques fonctionnelles du muscle squelettique</i>	19
I.1.2.3 <i>Diversité des fibres musculaires</i>	20
I.1.2.3.1 <i>Histoire de la fibre musculaire</i>	20
I.1.2.3.2 <i>Les différents types de fibres</i>	21
I.1.3 <i>Myogenèse primaire et secondaire</i>	23
I.2 <u>CONSTRUCTION DU MUSCLE SQUELETTIQUE</u>	24
I.2.1 <i>La somitogenèse</i>	25
I.2.2 <i>Devenir des cellules somitiques et acquisition de l'identité myogénique</i>	27
I.2.3 <i>Les facteurs Pax3 et Pax7</i>	30
I.2.4 <i>Détachement et migration des progéniteurs musculaires impliqués dans la formation des muscles des membres</i>	31
I.2.5 <i>Progression myogénique</i>	32
I.2.5.1 <i>Expression des facteurs myogéniques au cours de l'ontogenèse musculaire</i>	32
I.2.5.2 <i>Effets de l'inactivation des gènes codant pour les facteurs myogéniques</i>	34
I.2.5.3 <i>Prolifération des myoblastes</i>	37
I.2.5.4 <i>Arrêt de la prolifération et levée de l'inhibition de la différenciation : la sortie du cycle cellulaire et l'activation de la différenciation</i>	38
I.2.5.5 <i>Activation du programme myogénique</i>	39
I.2.5.6 <i>Fusion des myoblastes en myotubes</i>	40
I.2.5.6.1 <i>Les interactions cellulaires</i>	40
I.2.5.6.2 <i>Le Remodelage du cytosquelette</i>	42
I.2.6 <i>Expression des facteurs Myf5 et MyoD et la régénération musculaire</i>	43
II LA VOIE DE SIGNALISATION CALCINEURINE/ NFAT	46
II.1 <u>LA CALCINEURINE</u>	46
II.1.1 <i>Les propriétés de la calcineurine</i>	46
II.1.2 <i>Structure de la calcineurine</i>	46
II.1.3 <i>Distribution tissulaire de la calcineurine</i>	48
II.2 <u>LA FAMILLE NFAT</u>	48
II.2.1 <i>Structure des protéines NFATs</i>	49
II.2.2 <i>Liaison de NFATc2 à l'ADN</i>	49
II.2.3 <i>Activation des protéines NFATs</i>	51
II.3 <u>INHIBITION DE LA VOIE CALCINEURINE/ NFAT</u>	52
II.4 <u>LA VOIE CALCINEURINE/NFAT ET LE DEVELOPPEMENT</u>	54

II.4.1	<i>Rôles des protéines NFAT dans le développement de différents systèmes</i>	54
II.4.2	<i>Rôle de la voie calcineurine dans le développement du muscle squelettique</i>	55
II.4.3	<i>Rôles du facteur NFATc3 dans le développement musculaire</i>	55
INTRODUCTION AU TRAVAIL		57
RÉSULTATS		63
I	ANALYSE DES PROFILS D'EXPRESSION GENIQUE DES FACTEURS MYOGENIQUES ET DES FACTEURS NFATS PAR HYBRIDATION IN SITU AU COURS DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE CHEZ LA SOURIS	65
I.1	PRINCIPE DE L'HYBRIDATION IN SITU (HIS) SUR EMBRYON ENTIER	65
I.1.1	<i>Conditions de manipulation</i>	66
I.1.2	<i>Le choix des sondes</i>	67
I.1.3	<i>Étapes de l'hybridation in situ</i>	70
I.2	ETUDE DES DOMAINES D'EXPRESSION DES FACTEURS MYOGENIQUES ET DES FACTEURS NFATS PAR HYBRIDATION IN SITU SUR EMBRYON MURIN IN TOTO	71
I.2.1	<i>Domaine d'expression des facteurs MyoD et NFATc2</i>	71
I.2.2	<i>Expression des autres facteurs myogéniques et des autres membres de la famille NFAT</i>	72
I.3	CONCLUSION	74
II	NFATC2 REGULE SPECIFIQUEMENT L'EXPRESSION DE LA CHAÎNE LOURDE NEONATALE DE MYOSINE EN COOPERATION AVEC MYOD AU COURS DE LA MYOGENESE CHEZ LA SOURIS (ARTICLE)	74
II.1	INTRODUCTION	74
II.2	ARTICLE	76
II.3	CONCLUSION	116
III	L'ABSENCE D'EXPRESSION DE MYOD ET DE NFATC2 SE CARACTERISE PAR UNE APLASIE MUSCULAIRE AU COURS DE LA MYOGENESE SECONDAIRE	117
III.1	ANALYSE HISTOLOGIQUE ET IMMUNOFLOUORESCENCE	117
III.2	ÉTUDE DU PHENOTYPE MUSCULAIRE DES EMBRYONS DOUBLE MUTANTS <i>MYOD (-/-)</i> ; <i>NFATC2 (-/-)</i>	118
III.3	CONCLUSION	119
CONCLUSION GÉNÉRALE		122
BIBLIOGRAPHIE		128

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURE 1: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES TROIS TYPES MUSCULAIRES ET FORMES CARACTERISTIQUES DES CELLULES MUSCULAIRES CORRESPONDANTES.	15
FIGURE 2: REPRESENTATION DES DIFFERENTS NIVEAUX D'ORGANISATION DU MUSCLE SQUELETTIQUE.	17
FIGURE 3: LE SARCOMERE, UNITE MOTRICE.	19
FIGURE 4: LES ETAPES IMPORTANTES DE L'HISTOIRE DE LA FIBRE MUSCULAIRE [4].	21
FIGURE 5: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA MYOGENESE SQUELETTIQUE DU MEMBRE CHEZ LES VERTEBRES.	25
FIGURE 6: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA SOMITOGENESE CHEZ LES VERTEBRES [32].	26
FIGURE 7: SOMITOGENESE : MODELE DE "CLOCK AND WAVEFRONT" [33].	27
FIGURE 8: SIGNAUX CONTROLANT LA DETERMINATION DES CELLULES SOMITIQUES EN PROGENITEURS MUSCULAIRES.	28
FIGURE 9: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES PRECURSEURS SOMITIQUES EN DEVELOPPEMENT [46].	29
FIGURE 10: ORIGINES DES MUSCLES SQUELETTIQUES, DES TENDONS ET DES OS CHEZ LES VERTEBRES.	30
FIGURE 11: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA STRUCTURE DES QUATRE FACTEURS MYOGENIQUES.	34
FIGURE 12: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA CINETIQUE D'EXPRESSION DES FACTEURS MYOGENIQUES DE LA FAMILLE MYOD, AU COURS DU DEVELOPPEMENT MUSCULAIRE CHEZ LA SOURIS [94].	34
FIGURE 13: RESULTATS DES INVALIDATIONS DES GENES MRFs CHEZ LA SOURIS.	37
FIGURE 14: UN MODELE DE FUSION DES MYOBLASTES CHEZ UN EMBRYON DE DROSOPHILE [128].	40
FIGURE 16: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA REGENERATION MUSCULAIRE [159].	44
FIGURE 18: STRUCTURE ET SEQUENCE DU DOMAINE DE LA CALCINEURINE A [170].	47
FIGURE 19: STRUCTURE DES DIFFERENTES ISOFORMES NFATs [185].	50
FIGURE 20: STRUCTURE GLOBALE DE LA PROTEINE NFATC2 [186].	51
FIGURE 21: L'INHIBITION DE LA VOIE DE LA CALCINEURINE-NFAT A DIFFERENTS NIVEAUX [189].	53
FIGURE 22: HYBRIDATION IN SITU SUR EMBRYON ENTIER.	66
FIGURE 23: CARTE DU PLASMIDE pSC-A.	68
FIGURE 24: LOCALISATION DES TRANSCRITS MYOD ET NFATC2 PAR HYBRIDATION IN SITU DANS DES EMBRYONS TEMOINS A 10.5 ET 11.5 DE LA VIE EMBRYONNAIRE, BARRE D'ECHELLE (50µM).	72
FIGURE 25: LOCALISATION DES TRANSCRITS NFATC1 ET NFATC4 PAR HYBRIDATION IN SITU DANS DES EMBRYONS TEMOINS A 9.5, 10.5 ET 11.5 JOURS DE LA VIE EMBRYONNAIRE, BARRE D'ECHELLE (50µM).	73
FIGURE 26: LOCALISATION DES TRANSCRITS MYF5 ET DE LA MYOGENINE PAR HYBRIDATION IN SITU DANS DES EMBRYONS TEMOINS A 9.5, 10.5 ET 11.5 JOURS DE LA VIE EMBRYONNAIRE., BARRE D'ECHELLE (50µM).	73
FIGURE 27: APLASIE DES FIBRES MUSCULAIRES DES MEMBRES POSTERIEURS DES EMBRYONS MYOD (-/-); NFATC2 (-/-).	119

INDEX DES TABLEAUX

TABLEAU 1: CARACTERISTIQUES DES FIBRES MUSCULAIRES CHEZ LA SOURIS [3].	21
TABLEAU 2: EXEMPLE DES FACTEURS IMPLIQUES DANS LA PROLIFERATION ET LA DIFFERENCIATION DES MYOBLASTES.	38
TABLEAU 3: LISTE DES MOLECULES IMPLIQUEES DANS LA FUSION DES MYOBLASTES CHEZ LES MAMMIFERES [147].	43
TABLEAU 5: LES DIFFERENTES SONDAS UTILISEES.	69

ABRÉVIATIONS

AA: Acides Aminés

Ac : Anticorps

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADNc: Acide Désoxyribonucléique complémentaire

ARN: Acide Ribonucléique

ARNc: Acide Ribonucléique complémentaire

ARNi: Acide Ribonucléique interférant

ARNm: Acide Ribonucléique messenger

AID: Auto Inhibitory Domain

ATP: Adénosine TriPhosphate

bHLH: basic Helix-loop-helix

BMP: Bone Morphogenic Factor

BCO: Brother Of CDON

Brdu: Bromodéoxyuridine

CAM: Cell Adhesion Molecules

CaM: Calmoduline

CaN: Calcineurine

CaN A: Calcineurine A

CaN B: Calcineurine B

Cbx1: Chromobox protein homolog 1

CCF: Cellule Compétente à la Fusion

CDKn1c: Cyclin-Dependent kinase inhibitor 1c

CDKn1a: Cyclin-Dependent kinase inhibitor 1a

Ck1 : Casein Kinase 1

CF: Cellule Fondatrice

Ck1: Casein kinase 1

C-met: mesenchymal-epithelial transition factor

CsA : Cyclosporin A

CTD : C-Terminal Domain

CTX : Cardiotoxin

C2C12: lignée myoblastique murine

DBD: DNA Binding Domain

DIG: Digoxigenin

E: Embryonnaire

eFGF : FGF embryonnaire

EGF: Epidermal Growth Factor

FGFR1: Fibroblast Growth Factor Receptor 1

ES: Embryonic Stem

FGF: Fibroblast Growth Factor

FGFR4: Fibroblast Growth Factor Receptor 4

ERK: Extracellular signal-Regulated Kinases

Gab1:GRB2-associated-binding protein 1

GEF: Guanine nucleotide Exchange Factors

GdF8: Growth Differentiation factor 8

HGF: Hepatocyte Growth Factor

HIS: Hybridation in Situ

IGF: Insulin-like Growth Factor

IL-6: Interleukin 6

Lbx1: Ladybird homeobox 1

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinases

MEC: Matrice ExtraCellulaire

MEF2: Myocyte Enhancer Factor-2

MNF: Myocyte Nuclear Factor
MRF: Myogenic Regulatory Factor
MRF4: Myogenic Regulatory Factor 4
Myf5: Myogenic factor 5
MyHC: Myosin Heavy Chain
MyoD: Myogenic differentiation
Myog: Myogénine
Msx1: Msh homeobox 1
NCAM: Neural Cell Adhesion Molecule
NFATc: Nuclear Factor of Activated T-cells
NHR: NFAT Homology Sequence
NICD: Notch IntraCellular Domain
NLS: Nuclear Localization Sequence
Pax: Paired-box
PFA: Paraformaldéhyde
PBS: Phosphate Buffer Saline
PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen
PSM: Presomitic Mesoderm
RA : Retinoic Acid
Ras : Rat Sarcoma
Rb : Retinoblastoma-associated protein
RE: Réticulum Endoplasmique
RER : Réticulum Endoplasmique Rugueux
RHR : Rel Homology Domain
RS : Réticulum Sarcoplasmique
RSD: Rel Similarity Domain

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SF: Scatter Factor

siRNA: Small interfering RiboNucleic Acid

SRF: Serum Response Factor

Shh: Sonic Hedgehog

shRNA: Short hairpin RiboNucleic Acid

TAD: Transactivation Amino-terminal Domain

TCR: T cells Receptor

TGF β : Transforming Growth Factor beta

VCAM: Vascular Cell Adhesion Molecule

Wnt: Wingless integration

INTRODUCTION

I Myogenèse du muscle squelettique

Le muscle symbolise depuis l'aube de l'humanité la force. Il est capable d'exercer une force par son aptitude à transformer une énergie chimique (sous forme d'ATP) en énergie mécanique dirigée.

I.1 Le système musculaire squelettique

Le tissu musculaire est un constituant fondamental de l'organisme. C'est l'un des tissus les plus abondants chez les vertébrés. À titre d'exemple, il représente de 30 % à 40 % de la masse corporelle totale de l'homme et 38 % de la masse corporelle totale de la souris [1]. On considère les muscles comme les « moteurs » de l'organisme. La mobilité du corps dans son ensemble résulte de l'activité des muscles squelettiques.

I.1.1 Les différents tissus musculaires

Les muscles sont composés de tissus conjonctifs, de vaisseaux sanguins, de nerfs et du matériel contractile. Il existe trois types de tissus musculaires : le tissu musculaire strié squelettique, le tissu musculaire lisse et le tissu strié cardiaque (myocarde). Quel que soit leur type, les tissus musculaires sont caractérisés par leur capacité à se contracter. Cette fonction cellulaire fondamentale est assurée par deux sortes de myofilaments, qui sont les équivalents musculaires des microfilaments d'actine et de myosine non musculaire. Ces deux protéines jouent un rôle dans la motilité et les changements de forme d'un grand nombre de cellules de l'organisme. Toutes les cellules musculaires, appelées myocytes, ont une forme allongée et c'est pour cette raison qu'on les nomme fibres musculaires. Bien qu'ayant ces ressemblances, les trois types de tissus musculaires se distinguent par certaines spécificités de la structure cellulaire, de leur position dans le corps, par les fonctions qu'ils effectuent et par le mode de déclenchement de leurs contractions (Figure 1).

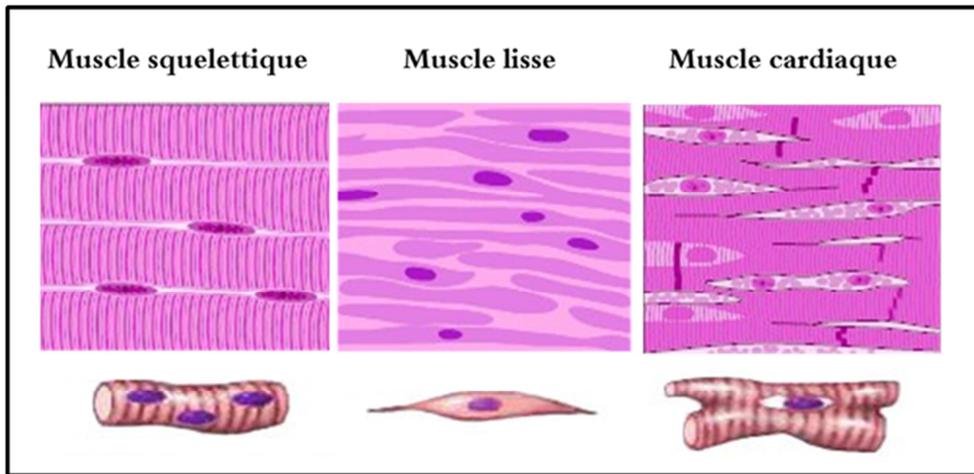


Figure 1: Représentation schématique des trois types musculaires et formes caractéristiques des cellules musculaires correspondantes.

Après une coloration à l'hématoxyline (noyau) et à l'éosine (cytoplasme), les types musculaires cardiaque et squelettique apparaissent striés, contrairement au type musculaire lisse. Les cellules musculaires squelettiques sont multinucléées, les noyaux étant périphériques. Elles interviennent dans les mouvements volontaires. Les cellules musculaires lisses sont mononucléées avec un noyau en position central. Elles interviennent dans le contrôle autonome de la contraction et sont donc impliquées dans la fonction végétative. Enfin, les cellules musculaires cardiaques contiennent des noyaux centraux, elles sont mono ou binucléées et ramifiées. Elles interviennent dans le contrôle autonome de la contraction cardiaque (D'après *Atlas de poche d'Histologie- W. Kuhnel- Traduction française par J. Roos Ed Flammarion Médecine Sciences 1991*).

Le premier type musculaire correspond aux muscles squelettiques. Ils recouvrent le squelette osseux et s'y attachent. Les fibres musculaires squelettiques sont les fibres musculaires les plus longues, elles portent des bandes bien visibles nommées stries, elles sont multinucléées, les noyaux étant situés en périphérie. Les muscles squelettiques sont aussi appelés muscles volontaires, car ils sont soumis à la volonté. Leur contrôle s'effectue principalement via le système nerveux central. Les muscles squelettiques se contractent rapidement et vigoureusement, mais ils se fatiguent facilement. Ils interviennent dans la fonction motrice et la posture. Les muscles lisses constituent le deuxième type musculaire. Ils tapissent les parois des organes viscéraux creux comme l'estomac, la vessie et les organes des voies respiratoires. Ils sont contrôlés par le système nerveux autonome, donc ils ne sont pas soumis à la volonté. Les contractions des fibres musculaires lisses sont lentes et continues. Les cellules musculaires lisses sont fusiformes et mononucléées avec un noyau central. Pour les décrire avec précision, on peut dire qu'ils sont viscéraux, non striés et que leurs mouvements sont involontaires. Enfin, le troisième type de tissu musculaire correspond au myocarde. Il n'existe que dans le cœur. Il a bien l'aspect d'un muscle strié, comme les muscles squelettiques, mais sa contraction dépend du système nerveux autonome. Le muscle cardiaque se contracte à un

rythme relativement constant d'une façon involontaire. Nous n'exerçons aucune maîtrise consciente sur notre rythme cardiaque. Les cellules cardiaques sont mononucléées ou binucléées, le (les) noyau (x) étant en position centrale.

Après avoir passé en revue brièvement les différents types de tissus musculaires, nous allons nous intéresser plus particulièrement au muscle squelettique. La section suivante du manuscrit portera sur l'organisation du muscle en question.

I.1.2 Organisation du muscle squelettique

Le muscle squelettique est constitué de faisceaux musculaires formés eux-mêmes d'un ensemble de fibres musculaires. Chaque muscle est rattaché aux os par l'intermédiaire de tendons (Figure 2). Les muscles sont de forme cylindrique et sont caractérisés par des fibres musculaires plurinucléées.

I.1.2.1 Structure du muscle squelettique

Un muscle squelettique est constitué d'un faisceau de fibres musculaires, regroupés dans un tissu conjonctif dense nommé l'épimysium. Ce dernier recouvre et protège l'ensemble du muscle. Les faisceaux de fibres musculaires sont délimités par une autre couche de tissu conjonctif plus épaisse appelé le périmysium. Chaque fibre est entourée et séparée elle-même des autres fibres par une mince couche de tissu conjonctif nommé l'endomysium (Figure 2).

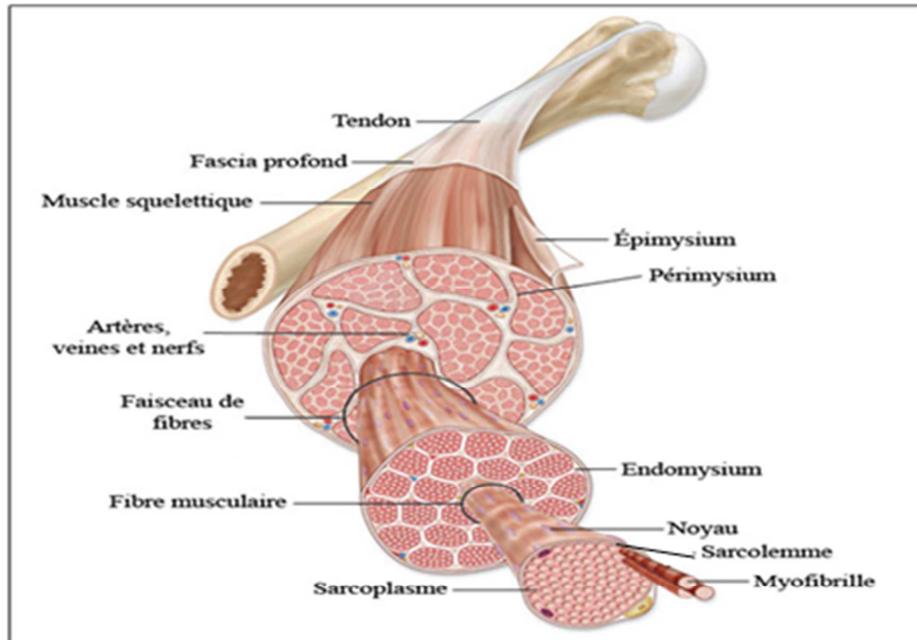


Figure 2: Représentation des différents niveaux d'organisation du muscle squelettique.

Les myofibrilles constituent l'élément contractile de la fibre musculaire, ou myofibre. Chaque fibre est entourée et séparée des autres par une mince couche de tissu conjonctif nommé l'endomysium. Les fibres musculaires sont regroupées en un faisceau délimité par une couche de tissu conjonctif appelé le périmysium. Enfin l'ensemble du muscle comprenant plusieurs faisceaux est protégé par l'épimysium et est attaché à l'os par un tendon (D' après *The McGraw-Hill Companies, I. 1999*).

Ces fibres correspondent à des cellules musculaires cylindriques nommées fibres musculaires. Chaque fibre musculaire squelettique est un cylindre ayant un diamètre de 10 à 100 μm et une longueur qui peut atteindre 30 cm. Ces longues et fines fibres multinucléées sont parallèles les unes aux autres, elles résultent de la fusion de plusieurs cellules mononucléées, les myoblastes, au cours du développement embryonnaire ou en cas de régénération musculaire dans le tissu adulte. Les fibres musculaires squelettiques contiennent donc de nombreux noyaux, situés en périphérie, sous la membrane plasmique nommée sarcolemme. Le sarcolemme présente de fines invaginations tubulaires (tubules transverses ou tubules T) réparties régulièrement le long de la fibre musculaire. Le cytoplasme de la fibre musculaire, ou sarcoplasme, renferme les organites responsables de son fonctionnement comme les mitochondries, le réticulum endoplasmique et le cytosquelette. Ce dernier constitue l'armature cellulaire et est constitué essentiellement d'éléments contractiles, les myofibrilles. Le sarcoplasme abrite aussi des réserves importantes de glycogène ainsi que de la myoglobine,

fournisseur d'oxygène de la fibre musculaire striée. La fibre musculaire possède un réticulum sarcoplasmique (RS) qui constitue une réserve de calcium nécessaire à la contraction musculaire. Deux sacs sarcoplasmiques entourent chaque tubule T pour former une triade. La triade permet le passage du signal nerveux et la libération du calcium. Chaque fibre musculaire comprend un grand nombre de myofibrilles parallèles qui parcourent toute la longueur de la cellule et qui occupent environ 80 % de son volume. Chaque myofibrille est en effet constituée de myofilaments, qui correspondent à des filaments fins d'actine associés à la tropomyosine et la troponine (régulant la contraction *via* les ions Ca^{2+}) et à des filaments épais constitués de myosine, organisés eux-mêmes par des filaments intermédiaires et des protéines de liaison de l'actine (Figure 3). Les myofilaments sont disposés selon une organisation géométrique très rigoureuse. Cet assemblage crée une chaîne d'unités contractiles répétitives appelées sarcomères. Le sarcomère est la plus petite unité contractile de la fibre musculaire. Sur la longueur de chaque myofibrille, il existe une alternance de bandes foncées et claires. Les bandes foncées sont appelées bande A étant donné qu'elles polarisent la lumière visible. Cependant, les bandes claires nommées bande I, sont non polarisantes. Chaque bande A est coupée en son milieu par une rayure claire (zone H). Chaque zone H est divisée en deux par une ligne sombre, la strie M. Au milieu de la bande I, se trouve une zone plus foncée (strie Z). La région d'une myofibrille comprise entre deux stries Z successives représente le sarcomère. Dans une fibre musculaire intacte, les bandes des myofibrilles sont presque parfaitement alignées et se poursuivent sur toute la longueur de la cellule cela peut expliquer notamment le fait que l'ensemble de la cellule paraît strié.

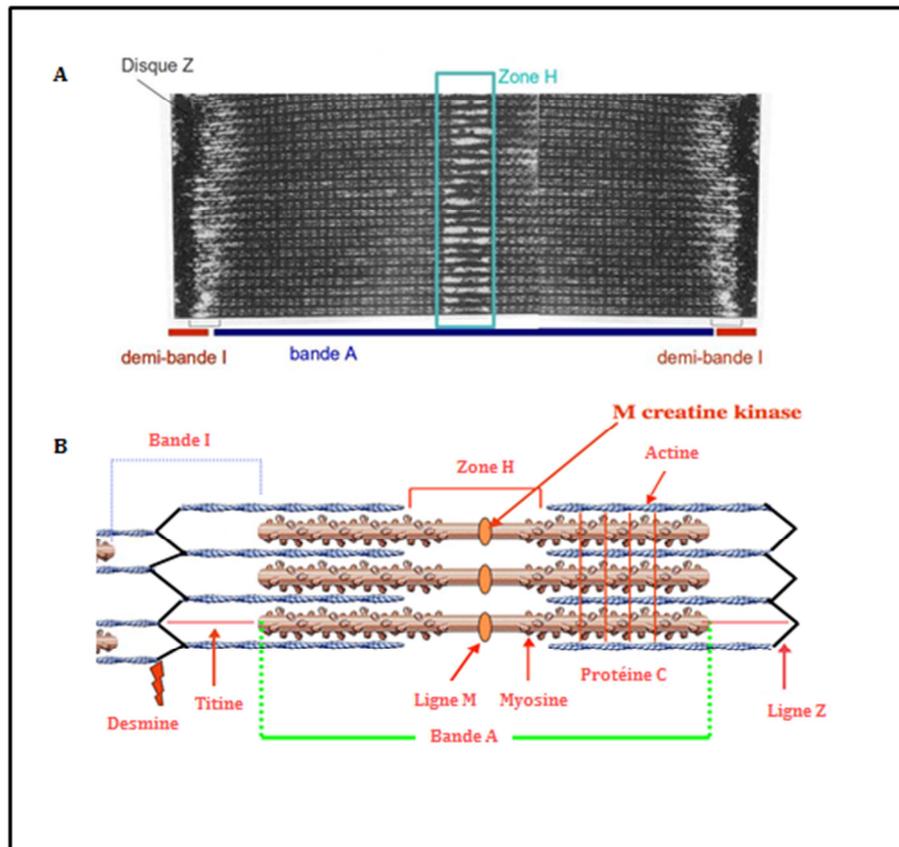


Figure 3: Le sarcomère, unité motrice.

A) Micrographie électronique de l'organisation ultrastructurale des sarcomères. Chaque bande I est séparée en son milieu par un disque fin, le disque Z (pour *Zwischenscheibe*). La bande A comprend une zone centrale plus claire nommée zone H pour Hell = clair. **B)** Représentation schématique simplifiée des sarcomères. Le sarcomère est composé par des filaments fins (principalement d'actine), ancrés au niveau des disques Z et des filaments épais (principalement de la myosine) qui constituent la bande A. (D'après *A Personal & Professional Networking Site for Doctors & Medical Students Worldwide*).

I.1.2.2 Caractéristiques fonctionnelles du muscle squelettique

Le muscle squelettique possède certaines propriétés particulières. Ces propriétés sont l'élasticité, la contractilité, l'extensibilité, l'excitabilité et la plasticité. L'excitabilité, par définition, est la possibilité de percevoir un stimulus et d'y répondre. Dans le cas du muscle squelettique, le stimulus est de nature chimique, un neurotransmetteur, l'acétylcholine qui est libérée par la terminaison nerveuse motrice. La réponse à ce stimulus, est la propagation d'un

courant électrique (potentiel d'action) le long de la membrane de la fibre musculaire, le sarcolemme, qui sera à l'origine de la contraction musculaire. La contractilité, est la faculté de se contracter avec force suite à un stimulus approprié. Cette caractéristique est spécifique du tissu musculaire. L'élasticité, est la capacité qu'ont les fibres musculaires de s'étirer et de reprendre leur longueur de repos, après l'étirement. L'extensibilité, est la possibilité d'étirement. Lorsque les fibres musculaires se contractent, elles raccourcissent, mais lorsqu'elles sont détendues, on peut les étirer au-delà de leur longueur de repos. Le muscle se caractérise également par sa plasticité. Il a la propriété de modifier sa structure selon le travail qu'il effectue et il s'adapte au type d'effort selon le type d'entraînement effectué.

I.1.2.3 Diversité des fibres musculaires

I.1.2.3.1 Histoire de la fibre musculaire

Au cours des années 1960 et pour la première fois les chercheurs ont réussi à classer les fibres musculaires en plusieurs groupes. Cette époque constitue la première étape clé dans l'histoire de la fibre musculaire (Figure 4). Les fibres sont extrêmement hétérogènes grâce à leurs différentes caractéristiques anatomiques, physiologiques et biochimiques. La plupart des muscles des vertébrés sont composés de proportions variables de différents types de fibres (lentes et rapides) qui déterminent la force et la durée de contraction du muscle. La nature des fibres musculaires diffère principalement par leur composition en myosine. En effet, plusieurs isoformes de chaînes lourdes de myosine (MyHC pour Myosin Heavy Chain) sont exprimées au cours du développement des mammifères. Chez la souris, on a identifié plusieurs gènes de MyHC localisés en clusters sur le chromosome 11 et 14 : deux gènes de MyHC cardiaque (MyHC- α , MyHC- β) et six de MyHC squelettique (MyHC-embryonnaire, MyHC-périnatale, MyHC-II a, MyHC-II b, MyHC-II x /d, MyHC-extraoculaire) [2]. Ces différentes isoformes ont permis la classification des fibres musculaires en deux principaux types (Tableau 1) [3].

Type de fibre	Isoforme de MyHC	Activité ATPasique	Métabolisme	Vitesse de contraction	Couleur
I	I β (1935 AA)	Faible	Oxydatif	Lente	Rouge
II	II a (1912 AA) II x (1942 AA) II b (1939 AA)	Forte	Glycolytique	Rapide	blanc

Tableau 1: Caractéristiques des fibres musculaires chez la souris [3].

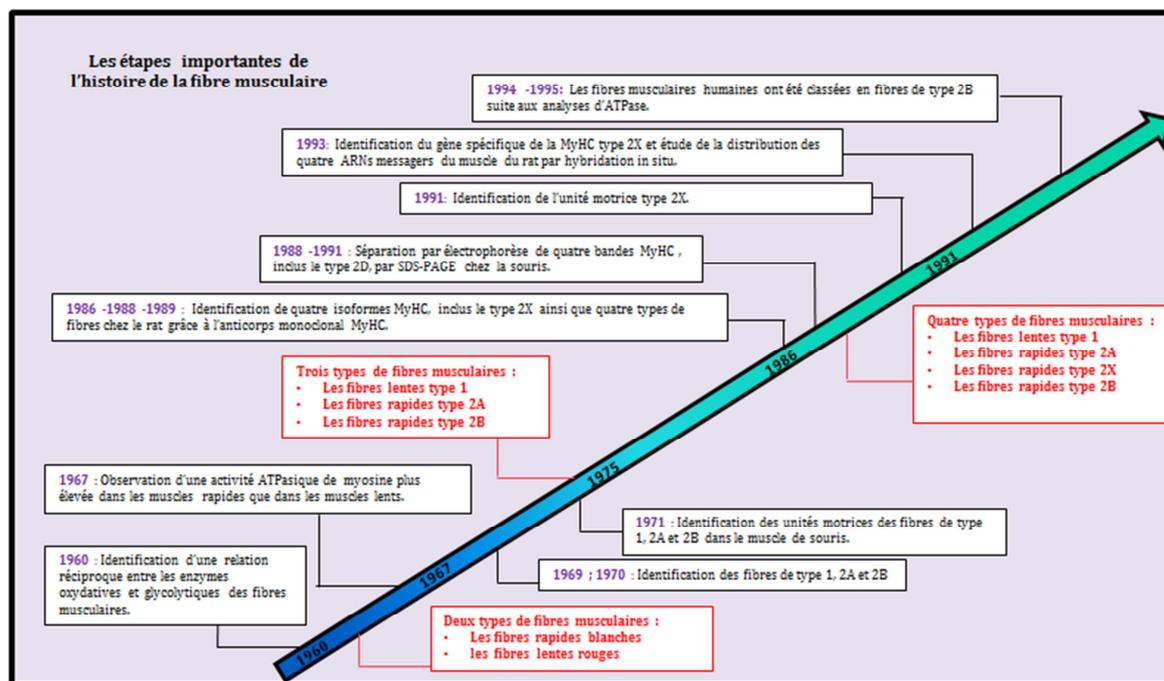


Figure 4: Les étapes importantes de l'histoire de la fibre musculaire [4].

1.1.2.3.2 Les différents types de fibres

Les types de fibres diffèrent dans leur morphologie, leurs propriétés contractiles et biochimiques. chez la souris adulte, on distingue quatre principaux types de fibres musculaires, classées en deux groupes majoritaires, les fibres lentes et les fibres rapides (Tableau 1) [5] [6].

- ✿ **Les fibres lentes de types I** : fibres à vitesse de contraction lente. Elles ont une faible teneur en glycogène, une composition élevée en enzymes oxydatives et une forte densité en mitochondries. Elles sont riches en myoglobine et en capillaires sanguins. Elles présentent une grande résistance à la fatigue. Ces fibres à fonction tonique sont retrouvées dans les muscles de la posture.

- ✿ **Les fibres rapides de type II** : fibres à contraction rapide, sont réparties en fibres de type II a (riches en enzymes oxydatives et résistantes à la fatigue) et en fibres de types II b et II d/x (riches en enzymes glycolytiques et rapidement fatigables).

La différence de vitesse de contraction de ces fibres est due aux propriétés de leurs protéines contractiles et en particulier la myosine. Celle-ci est formée de deux chaînes lourdes et de quatre chaînes légères, codées par plusieurs gènes [5] [7] [8]. Les différents types de fibres musculaires ont été identifiés par différentes méthodes basées sur l'étude de l'activité ATPasique de la myosine, sur l'électrophorèse ou sur l'immunohistochimie. On retrouve plusieurs isoformes de MyHC :

- La MyHC embryonnaire (MyHC emb) exprimée précocement, dès 9.5 jours de vie embryonnaire (E 9.5) chez la souris, au niveau des fibres musculaires immatures, les fibres adultes en sont totalement dépourvues [9].
- La MyHC néonatale, ou périnatale, exprimée à partir de E 10.5 avec un pic au (5^e jour Post-natal (P5))[9].
- La MyHC I est l'isoforme lente de la MyHC, elle s'exprime dès E 10.5 dans les fibres musculaires primaires [10].
- La MyHC II, isoforme rapide qui s'exprime dans les fibres secondaires à partir de E 13.5 [10].

Chez les mammifères, les fibres primaires expriment les isoformes embryonnaires et MHC I dès leur formation. Quelques fibres primaires, généralement localisées à la périphérie des muscles, expriment également l'isoforme néonatale à la fin de leur formation. À l'inverse, les fibres secondaires expriment, dès leur formation, les MyHC emb et MyHC néonatale mais n'expriment pas la MyHC I à l'exception des fibres du muscle lent, le soleus. Après la naissance, les isoformes embryonnaires et néonatales de la MyHC sont progressivement remplacées par les isoformes

adultes : MyHC de type II a, II x et II b [11], ce qui confère à chaque fibre musculaire des propriétés de contraction particulières.

Les fibres musculaires sont des structures dynamiques ayant une grande plasticité et capable d'adapter leur phénotype en fonction de différentes conditions comme la diminution de l'activité neuromusculaire, l'altération du profil hormonal et le vieillissement. La transition entre les différents types d'isoformes est réversible et se fait selon le schéma suivant : MyHC I β \leftrightarrow MyHC II a \leftrightarrow MyHC II d \leftrightarrow MyHC II b [8] [12].

Plusieurs études ont démontré l'implication de différentes voies de signalisation dans l'acquisition des phénotypes des fibres. Une voie de signalisation dépendante du calcium et faisant intervenir la calcineurine, semblerait être impliquée dans l'expression des gènes définissant le phénotype lent, *via* le facteur de transcription NFAT. Par ailleurs, la voie de signalisation Ras/MAPK/ERK jouerait aussi un rôle dans la régulation de l'expression des gènes responsables des phénotypes des fibres musculaires. En effet, l'activation constitutive de Ras active la voie MAPK (ERK) et mime les effets des neurones moteurs lents sur l'expression des gènes de la myosine. Cependant, un mutant dominant négatif Ras inhibe l'effet des neurones moteurs lents. La voie MAPK (ERK) est donc impliquée *in vivo* dans la différenciation-dépendante de l'activité neurale des fibres musculaires lents [13].

Nous nous intéressons plus tard à la voie de signalisation calcineurine/NFAT ainsi qu'à sa contribution au développement du muscle squelettique.

I.1.3 Myogenèse primaire et secondaire

Au cours du développement embryonnaire, les fibres musculaires squelettiques sont formées à partir de deux vagues successives de myogenèse, qui correspondent à la myogenèse primaire et à la myogenèse secondaire [14]. Chez la souris, la myogenèse primaire commence à 11 jours de la vie embryonnaire et se caractérise par la formation de fibres musculaires primaires à partir des myoblastes embryonnaires qui fusionnent pour former les myotubes de première génération ou myotubes primaires [15]. Autour des myotubes primaires, on retrouve des cellules souches mononucléées. Chaque myotube primaire s'isole en s'entourant de quelques

cellules souches. Une membrane basale commune les entoure. C'est à l'intérieur de cette membrane que se développent les myotubes secondaires. Les myotubes secondaires (ou fœtaux) se multiplient puis fusionnent pour former les fibres secondaires. Les fibres primaires sont généralement lentes, mais elles peuvent être converties en fibres rapides [16], tandis que les fibres secondaires peuvent être lentes ou rapides [17] [18]. La formation des myotubes primaires débute avant la mise en place d'une innervation fonctionnelle. La myogenèse primaire est indépendante de l'innervation, au moins dans son commencement. En effet, une dénervation précoce ne modifie pas le nombre de myotubes formés. Cependant, la myogenèse secondaire, elle, est nerf-dépendante, la dénervation inhibant la formation des myotubes secondaires [19, 20].

Dans la partie précédente, nous avons souligné les caractéristiques du muscle squelettique et émerger également les différents types de fibres. Il convient donc, à ce stade de parler de la construction du muscle squelettique.

I.2 Construction du muscle squelettique

La myogenèse se définit comme l'ensemble des étapes requises à la formation de la fibre musculaire au cours du développement embryonnaire ou lors de la régénération musculaire. Les données qui seront présentées dans ce manuscrit porteront sur la myogenèse squelettique chez les vertébrés et sur la myogenèse des muscles du tronc et des membres chez les mammifères et plus particulièrement chez la souris. Etudier la mise en place et les mécanismes de la myogenèse implique tout d'abord une bonne compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la mise en place des somites, les structures dont dérivent les muscles squelettiques. En effet, la spécialisation et la régionalisation progressive des somites entraînent la mise en place progressive de différents lignage musculaires incluant le lignage épaxial à l'origine des muscles du dos, le lignage hypaxial à l'origine de la musculature ventrolatérale ainsi que la migration de précurseurs myogéniques à l'origine des muscles des membres (Figure 5).

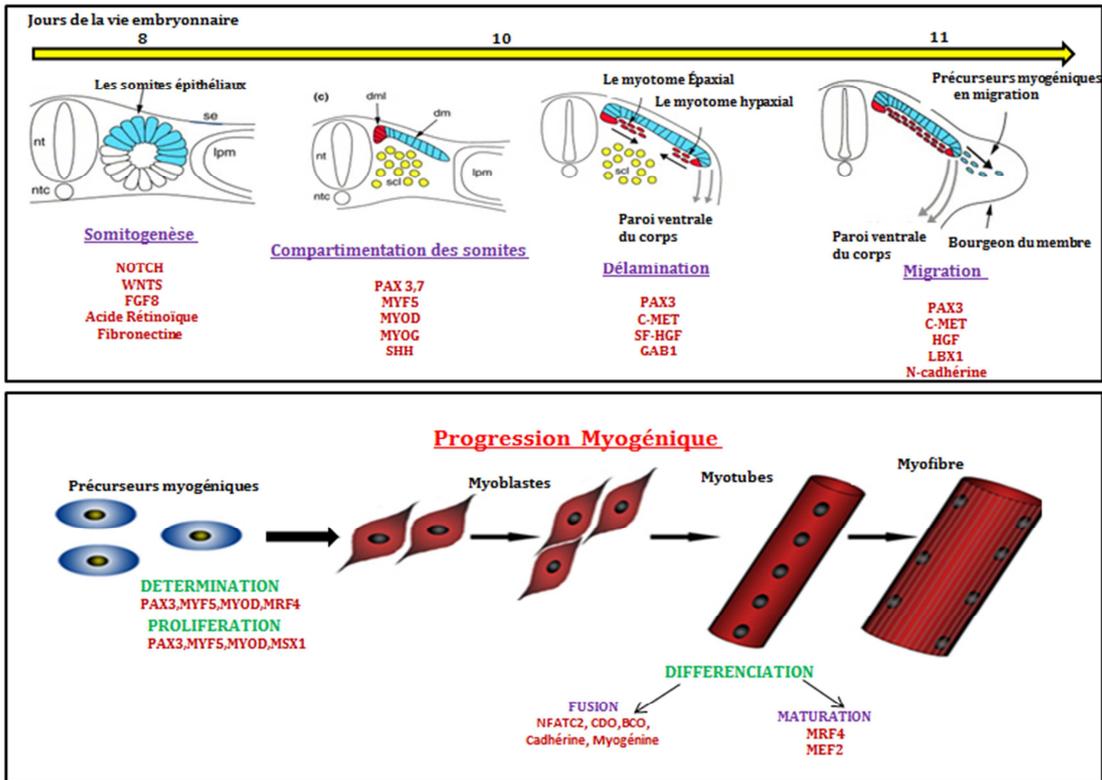


Figure 5: Représentation schématique de la myogenèse squelettique du membre chez les vertébrés.

La myogenèse se déroule en plusieurs étapes. Les cellules initialement présentes dans les somites donnent en partie, les fibres musculaires. Plusieurs acteurs sont impliqués dans les différentes étapes de la myogenèse. Les principaux gènes et voies de signalisation sont notés. Ils sont également cités dans la suite de ce manuscrit (Modifié de *Current Opinion in Genetics & Development* 2003, 13:413–422 et *Neuromuscular Disorders* 12 : 438-446 et [35]).

I.2.1 La somitogenèse

Chez les vertébrés, les somites représentent les premières unités métamérisées de l'embryon [21, 22]. La somitogenèse est une étape clé indispensable à la myogenèse (Figure 6). Les somites sont des structures épithéliales, segmentées et répétitives dérivant du mésoderme paraxial. Ils se forment suivant un axe antéro-postérieur, de part et d'autre du tube neural et de la notochorde. Au cours de la somitogenèse, le mésoderme paraxial présomitique (PSM) se segmente progressivement en somites épithéliaux symétriques bilatéralement selon un axe

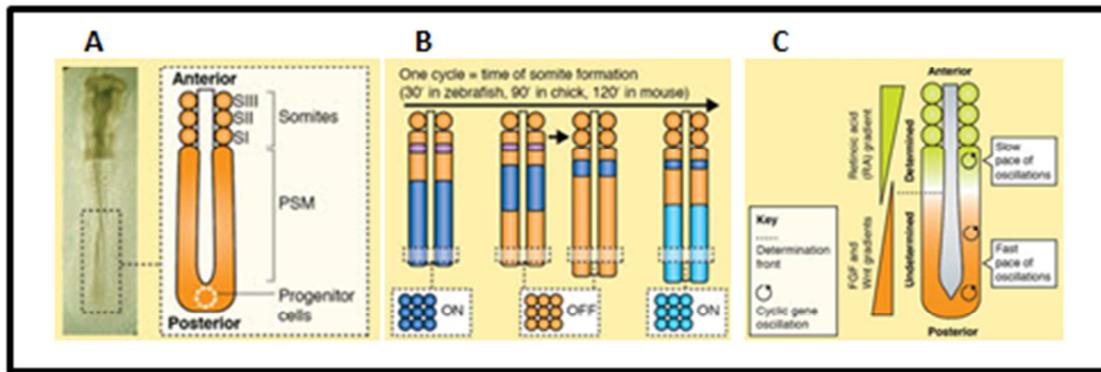


Figure 7: Somitogenèse : Modèle de "Clock and Wavefront" [33].

A) Représentation schématique de la segmentation du mésoderme présomitique en somites selon un axe antéro-postérieur chez un embryon de poulet à deux jours de développement. **B)** L'horloge de segmentation correspond à des vagues périodiques de transcription de gènes (en bleu) dans le mésoderme présomitique au cours de la formation des somites. **C)** Le front de détermination en pointillé est fixé par les gradients antagonistes FGF8/Wnt et RA. Les cellules ayant franchi ce front de détermination sont segmenté et expriment les gènes de segmentation. PSM (Presomitic Mesoderm), RA (Retonic Acid).

I.2.2 Devenir des cellules somitiques et acquisition de l'identité myogénique

Les somites se forment selon une progression antéro-postérieure. Les somites antérieurs donc sont les premiers à être formés, ils sont plus développés que les somites postérieurs. Les cellules des somites nouvellement formés sont multipotentes, elles sont à l'origine des cellules de la lignée myogénique ainsi que de plusieurs types cellulaires. Leur destinée est guidée par les signaux émis de leur environnement tissulaire immédiat, tel que le tube neural, la notochorde, l'ectoderme dorsal et le mésoderme latéral. [34] [35, 36]. Des molécules comme les Wnts, FGFs, IGFs, Shh, et BMPs sont clairement impliquées dans la différenciation somitique et la spécialisation myogénique. Ces différents signaux contrôlent en effet le devenir des cellules somitiques en favorisant ou en inhibant la myogenèse (Figure 8).

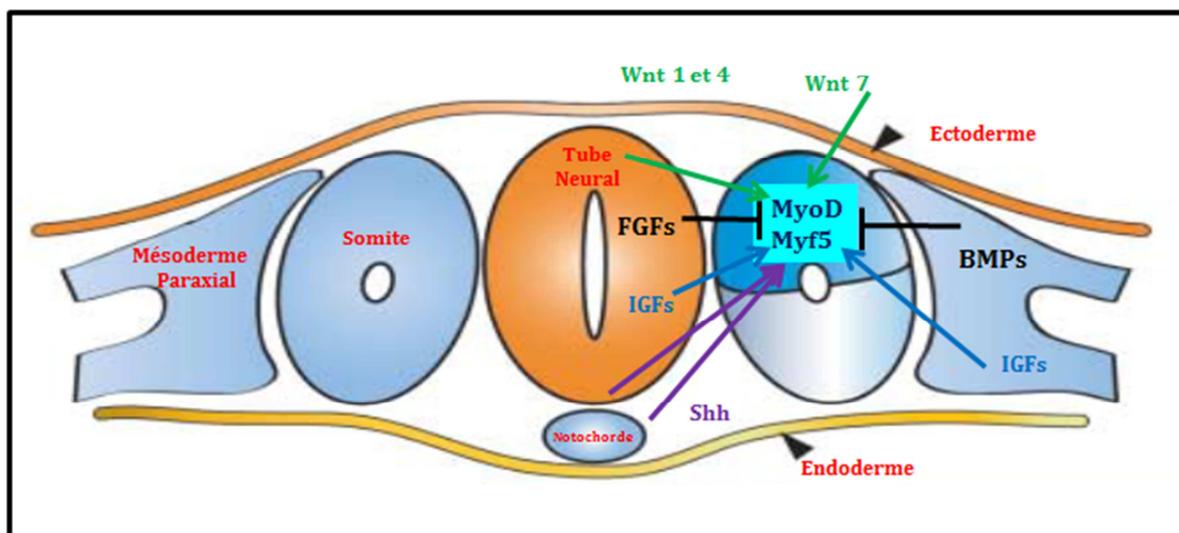


Figure 8 : Signaux contrôlant la détermination des cellules somitiques en progéniteurs musculaires.

La régulation de la myogenèse au niveau des somites est assurée par de nombreux signaux provenant des structures environnantes (tube neural, notochorde, mésoderme, ectoderme). Ces signaux inhibent (FGFs, BMPs), ou favorisent (Wnt 1,4,7, Shh, IGFs) la détermination des cellules somitiques en progéniteurs musculaires.

La compartimentation des somites aboutit à la formation d'une structure ventrale, le sclérotome et d'une structure dorsale, le dermomyotome (figure 9). Le sclérotome se développe en cartilage et en os formant les vertèbres et les côtes [37]. Le dermomyotome héberge les précurseurs cellulaires de la lignée dermique et de la lignée myogénique [32]. Il est à l'origine du derme et du myotome qui donne naissance à la musculature du tronc [38] [39]. Le dermomyotome est caractérisé par l'expression spécifique des gènes *Pax3* et *Pax7* [40] [41, 42]. De manière plus précise, le dermomyotome se régionalise en deux parties à l'origine de lignages myogéniques différents. Le dermomyotome dorso-médian donne naissance aux muscles épaxiaux (ou primaxiaux) dont les muscles profonds du dos [38] [43] [44]. Les précurseurs cellulaires de la couche dorso-médiane migrent en dessous du dermomyotome pour former le myotome épaxial. Le dermomyotome ventrolatéral donne naissance aux muscles hypaxiaux (ou abaxiaux) comprenant les muscles de la ceinture abdominale des membres et du diaphragme. Les os et les tendons des membres ont pour origine le mésenchyme des membres qui dérive de la somatopleure (un feuillet externe des lames latérales). Les précurseurs musculaires de la langue et du larynx dérivent aussi de cette partie hypaxiale du dermomyotome. La couche

ventrolatérale subit le même évènement que la couche dorso-médiane et forme le myotome hypaxial (Figure 10). C'est ainsi que les premières masses musculaires apparaissent sous le dermomyotome. Des cellules myogéniques précurseurs exprimant *Pax3/Pax7* se détachent de leur bordure hypaxiale du dermomyotome et migrent vers les bourgeons des membres antérieurs et postérieurs. Notons qu'un quatrième compartiment somitique nommé le syndetome, a été également identifié. Il dérive du sclérotome et se localise entre le sclérotome et le myotome. Il est à l'origine des tendons des muscles du tronc [45].

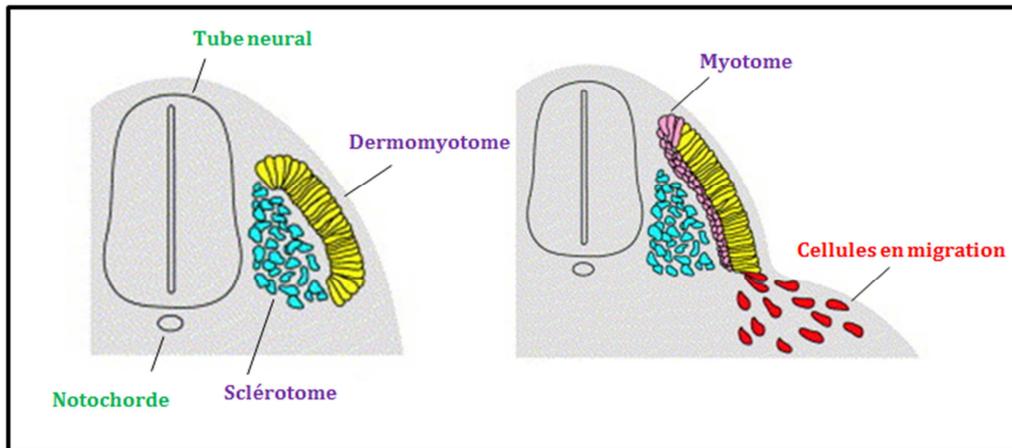


Figure 9 : Représentation schématique des précurseurs somitiques en développement [46].

A) Les somites se compartimentent en dermomyotome (en jaune) et en sclérotome (en bleu). **B)** Mise en place du myotome et des précurseurs myogéniques à l'origine de la musculature des membres : des cellules délaminent de la bordure dorso-médiane et ventrolatérale du dermomyotome et migrent sous celui-ci pour former le myotome (en rose), une autre rangée de cellules se décrochent de la bordure ventrolatérale et migrent vers les bourgeons des membres (en rouge) à 9.5 jours de la vie embryonnaire.

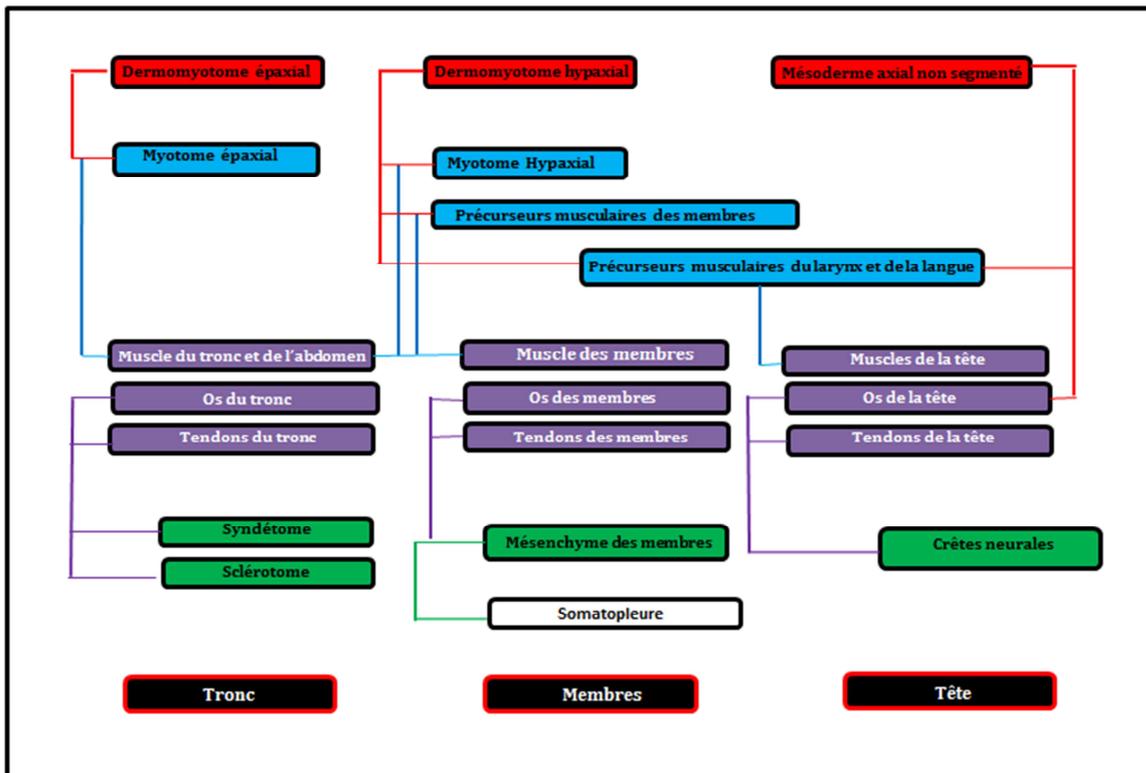


Figure 10 : Origines des muscles squelettiques, des tendons et des os chez les vertébrés.

I.2.3 Les facteurs Pax3 et Pax7

Les somites présentent différents types cellulaires dont certains sont identifiables par l'expression des marqueurs moléculaires spécifiques. Parmi ces facteurs, Pax3 et Pax7 qui sont des facteurs de transcription à homéo-domaine [47, 48].

Ils sont indispensables à la survie des progéniteurs musculaires puisque les souris doublement invalidées pour ces gènes présentent un défaut quasi-total en cellules musculaires [49] [47] [50]. Les modèles d'inactivation totale et conditionnelle de Pax3 montrent l'implication de ce facteur dans la musculature hypaxiale et surtout épaxiale [42, 51-53]. En effet, les progéniteurs des muscles des membres de ces mutants sont incapables de migrer vers les bourgeons des muscles des membres [54]. Pax3 est requis pour la segmentation des somites, la formation du dermomyotome [55] [56, 57] et le développement de la musculature du membre [58] [42, 57, 59]. La protéine Pax3 est essentielle pour la spécification myogénique en amont de MyoD [60] et l'expression des facteurs myogéniques MyoD et Myf5 [61, 62]. Pax7 est nécessaire pour le

maintien de cellules satellites adultes [63-65]. Il intervient également dans la myogenèse du tronc et des membres. Les progéniteurs Pax7+ assurent le développement musculaire jusqu'à la taille adulte du muscle [48] [65, 66].

I.2.4 Détachement et migration des progéniteurs musculaires impliqués dans la formation des muscles des membres

Les précurseurs cellulaires du dermomyotome ventrolatéral exprimant *Pax3/Pax7* se détachent de leur bordure hypaxiale et commencent à migrer vers les bourgeons des membres antérieurs et postérieurs. Ce processus de délamination et de migration est orchestré par l'expression de nombreux facteurs. Parmi ces facteurs, le couple HGF/SF qui est un facteur de croissance des hépatocytes (Hepatocyte Growth Factor, HGF)/ SF (Scatter Factor) produit par les cellules mésenchymateuses des bourgeons des membres et son récepteur à activité tyrosine Kinase *c-met* jouent un rôle clé. En effet, les souris mutées pour les gènes *c-met* et *HGF/SF* sont dépourvues de tous les muscles des membres, du diaphragme et de la langue [67]. Le ligand du récepteur à activité tyrosine kinase *c-met*, HGF/SF est caractérisé comme un facteur de dissociation des cellules épithéliales en culture [68]. Ce facteur est essentiel pour la migration des cellules au cours du développement musculaire. Il contrôle la délamination des précurseurs cellulaires migrant du dermomyotome [67] [69]. Il a également été démontré, qu'une mutation du gène *Gab1*, un autre ligand de *c-met* altère aussi la migration des précurseurs cellulaires myogéniques vers les bourgeons des membres [70]. Le gène *c-met* est un des gènes cibles de *Pax3* [71]. Il est exprimé fortement dans la partie latérale du dermomyotome. *Pax3* active donc *c-met* et contrôle la délamination des précurseurs musculaires ainsi que leur migration [71] [60] [41, 72]. De plus, la migration des cellules myogéniques est contrôlée par l'expression du gène *Lbx1* [73]. Son expression est induite avant la délamination des cellules et est maintenue au cours de la migration puis elle diminue lors de la différenciation myogénique [74] [43] [75]. *Lbx1* est un facteur de transcription à homéodomaine, il est exprimé dans les précurseurs musculaires en migration et au niveau des sites de détachement dans le dermomyotome latéral [43] [73]. En effet, chez les souris mutantes pour *Lbx1*, les précurseurs cellulaires se forment et délaminent du dermomyotome, mais sont incapables de migrer correctement [76] [77]. Il a été

montré que *Pax3* agit en amont de *Lbx1* puisqu' aucun transcrit de ce gène n'est détectable dans des souris *Spotch* invalidées pour le gène *Pax3* [74] [43]. D'autres acteurs sont impliqués dans le processus de migration comme la fibronectine [78] et la M-cadhérine [79]. Le détachement et la migration des précurseurs musculaires sont des prérequis indispensables à la myogenèse. Le facteur de transcription *Lbx1* ainsi que le récepteur c-met et ses ligands HGF/SF et GAB1 sont des éléments capitaux du détachement et de la migration des précurseurs musculaires. *Pax3* est donc un acteur principal permettant leur expression. De plus la MEC joue un rôle indispensable au cours de ce processus à travers l'une de ses composantes, la fibronectine. Suite à leur migration, les précurseurs vont subir différentes étapes de différenciation afin d'évoluer vers la fibre musculaire.

I.2.5 Progression myogénique

Une fois que la migration des cellules musculaires est achevée, ces dernières progressent dans une voie de détermination et de prolifération intense au niveau des bourgeons des membres afin de se différencier en sortant du cycle cellulaire. Ensuite elles fusionnent en myotubes multinucléés et enfin subissent une étape de maturation afin de devenir des fibres musculaires fonctionnelles. Ce sont des étapes décisives qui se déroulent lors de deux phases, la myogenèse primaire (embryonnaire) et secondaire (fœtale).

Dans cette partie du manuscrit, je présente ces différentes étapes ainsi que le rôle des acteurs essentiels qui sont mis en jeu.

I.2.5.1 Expression des facteurs myogéniques au cours de l'ontogenèse musculaire

Les différentes étapes allant de la prolifération des précurseurs musculaires jusqu'à la formation de la fibre musculaire, sont contrôlées par un réseau de facteurs de transcription, parmi lesquels les facteurs de régulation myogénique (MRFs). Ce sont des facteurs de la superfamille des facteurs de transcription à domaine bHLH (basic-Helix-Loop-Helix) [80] [81, 82] (Figure 11). La famille des MRFs comprend les protéines MyoD [83], Myf5 [84], Myogénine [85] et MRF4 [86]. Ce sont des facteurs spécifiques du muscle squelettique. En 1987, Davis et *al.* ont isolé le premier gène de la famille des MRFs, MyoD [83]. L'identification du gène *MyoD*,

capable de convertir des fibroblastes en cellules musculaires s'est poursuivie dans les années ultérieures par la découverte des trois autres membres de cette famille, tous capables d'induire une conversion myogénique et d'initier le programme myogénique *in vitro* [82] et également *in vivo* [87]. Ces facteurs à domaine bHLH comportent une région basique qui permet la fixation à l'ADN, au niveau d'une boîte appelée boîte E (E-box) dont la séquence consensus CANNTG est présente dans les promoteurs des gènes spécifiques du muscle squelettique [88] [80] [89]. Les facteurs myogéniques se caractérisent par leur capacité à former des hétérodimères avec d'autres facteurs de transcription inhibant ou favorisant ainsi leur liaison à l'ADN [90] [91] [80]. Le profil d'expression des gènes codant pour les MRFs a fait l'objet de plusieurs études (figure 12). Des expériences d'hybridation *in situ* réalisées chez la souris ont montré que le premier transcrite codant pour un facteur myogénique est l'ARNm Myf-5. Il est détecté à E8 au niveau de quelques cellules du somite en formation. Lors de la formation du dermomyotome et du sclérotome [92]. Myf5 est localisé dans la région cranio-médiane du dermomyotome puis les transcrits Myf5 sont détectés aux cellules du myotome. L'expression de Myf5 est suivie par celle de la myogénine. Les ARNm myogénine sont détectés au niveau des cellules en cours de différenciation du myotome, qui commencent à apparaître à E 8.5. L'activation de MyoD est observée aux alentours de E 10.5 [93]. Le troisième facteur myogénique, MRF4 est détecté à E 9 dans le myotome rostral. Son expression est biphasique. Le taux de mRNAs MRF4 chute rapidement à E 10.5 au moment où les transcrits MyoD commencent à apparaître au niveau du myotome rostral. Les ARNm MRF4 commencent à réapparaître dans toutes les masses musculaires à E14.5. Ce facteur est prédominant au niveau des muscles post-nataux. Les bourgeons de membre se forment 24 h après l'apparition des premiers somites. Au niveau du membre antérieur, les transcrits Myf-5 ne sont pas détectés avant E 10.5. À E11.5 les gènes myogéniques et MyoD sont rapidement régulés positivement. L'apparition des ARNm MRF4 est plus tardive (E14.5) et n'est pas biphasique.

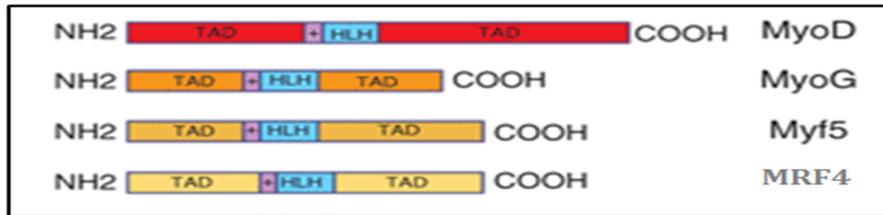


Figure 11 : Représentation schématique de la structure des quatre facteurs myogéniques.

La région basique (+) responsable de la liaison aux boîtes E (E-box), et le domaine bHLH (Basic Helix-Loop-Helix) permettant l'homo- ou bien l'hétérodimérisation avec d'autres facteurs à domaine HLH, sont indiqués. Ils correspondent à des régions présentant de très fortes homologues de séquences entre les quatre facteurs. À l'extrémité N-terminale et C-terminale, un domaine de transactivation est présent (TAD : Transactivation Domain) (D'après Manuel AFV Gonçalves et al 2011).

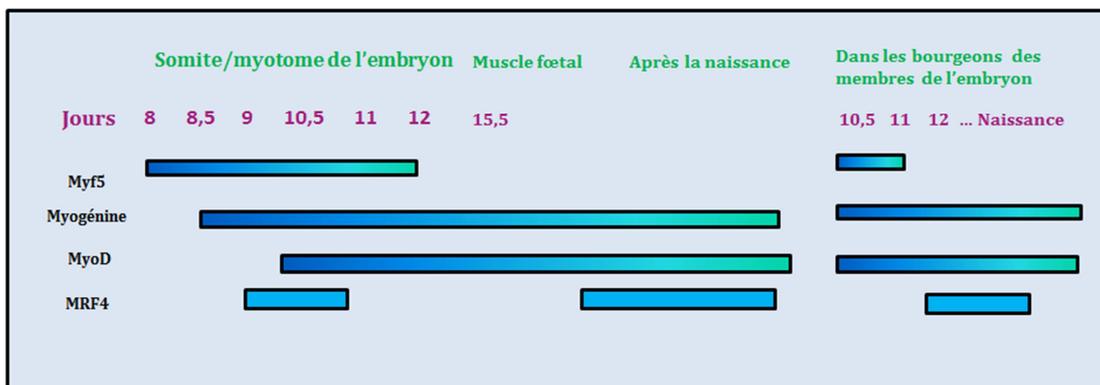


Figure 12 : Représentation schématique de la cinétique d'expression des facteurs myogéniques de la famille MyoD, au cours du développement musculaire chez la souris [94].

Ces résultats sont obtenus à partir d'hybridations *in situ* réalisées sur des embryons de souris.

I.2.5.2 Effets de l'inactivation des gènes codant pour les facteurs myogéniques

Les précurseurs musculaires migrent à partir du dermomyotome vers les bourgeons des membres. Une fois arrivés à leur destination, ils commencent à transcrire *Myf5* et *MyoD* [95]. Plusieurs expériences ont été réalisées afin de comprendre l'implication fonctionnelle des différents facteurs myogéniques dans les différentes étapes de la myogenèse (Figure 5, 13). Les

souris homozygotes *myod* (-/-) ont un développement musculaire normal, mais le taux d'ARNm Myf5 est augmenté de trois à quatre fois par rapport à un témoin *myod* (+/+), ce qui suggère que Myf-5 pourrait remplacer l'absence de MyoD. Comme pour les mutants *myod* (-/-), l'analyse histologique aussi bien que l'analyse des transcrits est normale chez les souris mutantes *myf-5* (-/-) qui présentent un développement musculaire normal. Chez les mutants *myf5* (-/-), la formation des muscles est cependant retardée. L'activation de MyoD dépendrait directement ou indirectement de l'expression correcte de Myf-5, car chez les souris *myf-5* (-/-) l'expression de MyoD est retardée. Ces résultats suggèrent néanmoins que MyoD peut se substituer à l'absence de Myf-5 pour un développement musculaire normal. On observe chez les souris *myf5* (-/-) un retard dans la formation du myotome et une légère perte des muscles épaxiaux. Alors, chez les souris *myod* (-/-) c'est le développement des muscles hypaxiaux qui est retardé. Ces gènes contrôlent donc la spécification musculaire précoce des lignages épaxiaux et hypaxiaux [96, 97] [98]. La réalisation de double mutants *myod* (-/-) ; *myf-5* (-/-) montre clairement l'implication de ces deux facteurs dans les phases précoces de la myogenèse au niveau de la détermination des myoblastes et leurs rôles fonctionnellement redondants. En effet, ces doubles mutants sont caractérisés par une absence complète de myoblastes et de muscles différenciés. L'activation de l'expression de ces deux gènes est contrôlée par les molécules des voies de signalisation émises des tissus environnants, comme les molécules Wnts (Wingless type) sécrétées par l'ectoderme dorsal et la partie dorsale du tube neural et les molécules Shh (Sonic Hedgehog) sécrétée par la plaque du plancher qui correspond à la partie ventrale du tube neural [35]. Les facteurs Myogénine et MRF4 sont indispensables à la différenciation des myotubes et à la formation des fibres musculaires, respectivement. Les souris mutantes *myogénine* (-/-) sont immobiles et meurent rapidement après la naissance. Ceci est dû à une absence de différenciation musculaire. Un nombre normal de myoblastes est observé, mais très peu de fibres musculaires. Ces observations indiquent un rôle essentiel pour la myogénine au niveau de la différenciation terminale *in vivo*, caractérisée par la transition des myoblastes aux myotubes. Les mutants *mrf4* (-/-) sont caractérisés par un développement musculaire normal mais par une expression de la myogénine trois fois supérieure à la normale ce qui suggère que la myogénine pourrait compenser l'absence de MRF4 chez ces mutants. Cependant, les doubles mutants *mrf4* (-/-) *myogénine* (-/-) n'indiquent aucune redondance fonctionnelle entre ces deux gènes puisque ces mutants présentent le même phénotype que la souris *myogénine* (-/-). En particulier, le niveau de fibres musculaires résiduelles présentent chez la souris *myogénine* (-/-) semble non affecté par l'addition de la mutation MRF4 montrant que ni la myogénine, ni MRF4 n'est absolument

requis pour la différenciation myoblastique. Il apparait donc que MyoD et/ou Myf-5 sont apparemment capables d'activer le programme de différenciation musculaire quoique de manière moins efficace. Les doubles mutants *myf-5 (-/-); myogénine (-/-)* montrent un profil similaire aux souris *myogénine (-/-)*. De manière surprenante, les doubles mutants *mrf4 (-/-); myod (-/-)* montrent un phénotype similaire à la souris *myogénine (-/-)* alors que les mutations individuelles MRF4 et MyoD n'avaient qu'un effet limité sur la myogenèse. Comme la myogénine est exprimée dans ces double mutants *mrf4 (-/-); myod (-/-)*, on peut conclure que la myogénine seule est incapable d'assurer la différenciation de la cellule musculaire *in vivo*. Une explication, peut-être un peu simpliste, est de dire qu'un niveau seuil de facteurs myogéniques est nécessaire à l'activation des gènes de structure musculaire : l'élimination de deux facteurs, rendrait impossible cette activation. De toute façon, cette interprétation n'est pas générale puisque l'inactivation de MRF4 et de Myf-5 chez la souris entraîne une musculature squelettique presque normale. Toutefois, les souris triples mutantes *myf5 (-/-); myod (-/-); mrf4 (-/-)* ne développent pas de muscles et sont condamnées à la mort après la naissance. Chez la souris, le remplacement de *myf-5* par la région codante de la myogénine dans le but d'exprimer la myogénine sous le contrôle transcriptionnel de Myf5 (« Knock-in ») montre des individus homozygotes viables et caractérisés par l'absence d'anomalies des côtes normalement observées chez la souris *myf-5 (-/-)*. Ces résultats suggèrent que la myogénine puisse compenser la fonction précoce de Myf-5 *in vivo* et entraîne la mise en place des cellules myogéniques au niveau du myotome de l'embryon.

Dans un travail de 2004, Kassar-Duchossoy et al ont cependant été amenés à redéfinir l'implication des différents facteurs myogéniques dans la mise en place du programme myogénique : chez les doubles mutants *myod (-/-); myf-5 (-/-)* où l'expression de MRF4 n'est pas compromise, il y a formation de tissu musculaire. Ce résultat contredit l'idée jusque-là admise suivant laquelle l'identité myogénique était uniquement conférée par MyoD et Myf5 et identifie pour la première fois, MRF4 comme un facteur de détermination musculaire. Dans le schéma proposé par ces auteurs, Myf-5 et MRF4 agissent en amont de MyoD pour diriger la conversion des cellules embryonnaires pluripotentes en cellules musculaires.

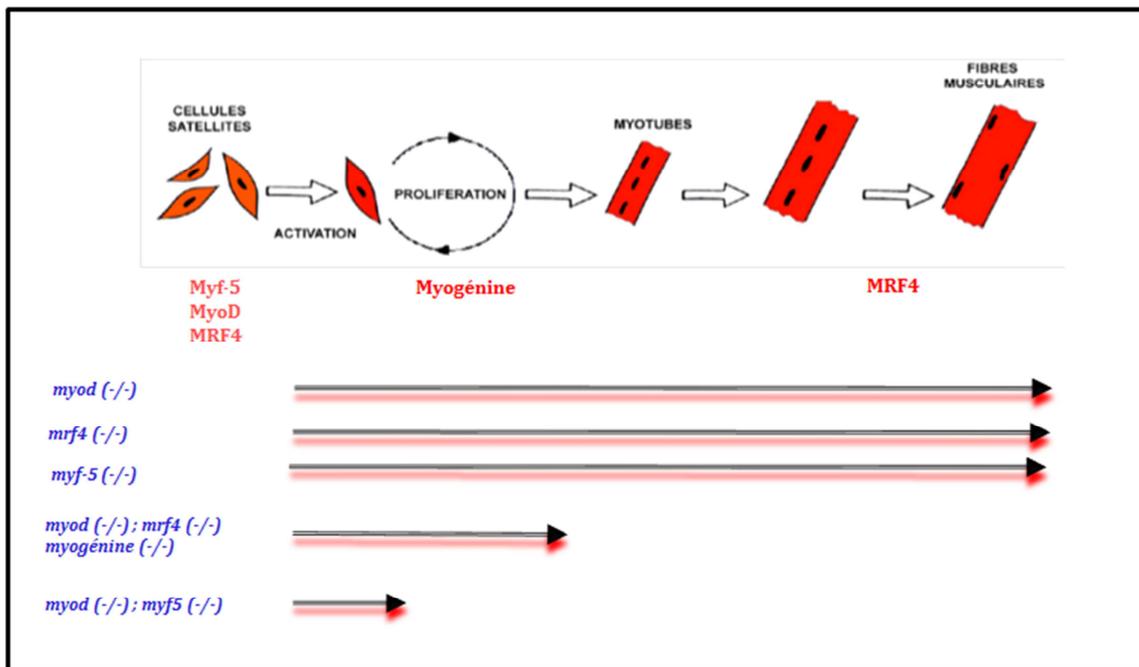


Figure 13: Résultats des invalidations des gènes MRFs chez la souris.

I.2.5.3 Prolifération des myoblastes

Avant que les précurseurs musculaires commencent à se différencier, ils subissent une étape de prolifération intense dans le but d'engendrer un nombre suffisant de cellules pour la formation du muscle. Une fois différenciées les fibres musculaires ne se divisent plus. Ce processus de prolifération est orchestré par un groupe de facteurs de régulation. Les intégrines membranaires, récepteurs d'adhésion cellulaire semblaient jouer un rôle important dans la prolifération des myoblastes ainsi que dans leur différenciation [99, 100] [101] (Tableau 2).

D'autres facteurs sont aussi impliqués dans la régulation de la prolifération. Le facteur Msx1, qui est exprimé dans les précurseurs lors de la migration inhibe la différenciation musculaire et active la prolifération des cellules musculaires [102, 103]. Des études réalisées chez la souris ont démontré l'intervention des facteurs Myf5 et MyoD dans la régulation du cycle cellulaire [104]. De plus, Pax3 semblerait aussi être impliqué dans le maintien de la phase de prolifération [32]. Les récepteurs FGF favoriseraient eux aussi la prolifération des myoblastes de même que

leur migration vers les bourgeons des membres [105] [106]. Certains facteurs de cette famille sont aussi capables d'induire la différenciation par exemple FGFR1 [107]. D'autres comme FGFR4 sont indispensables à l'arrêt de la prolifération des myoblastes. Cet arrêt sera directement suivi par l'expression des gènes musculaires [108]. Les facteurs de croissance, TGF β sont capables de maintenir des cellules dans un état prolifératif et indifférencié en inhibant l'expression des marqueurs principaux de la différenciation myogénique [109, 110].

Prolifération des myoblastes	Différenciation des myoblastes
Pax3 ; c-Met ; Msx1 FGF4 ; FGF6 ; FGF2	FGFR1 ; FGFR4 ; FGF8

Tableau 2: Exemple des facteurs impliqués dans la prolifération et la différenciation des myoblastes.

I.2.5.4 Arrêt de la prolifération et levée de l'inhibition de la différenciation : la sortie du cycle cellulaire et l'activation de la différenciation

Les données présentées dans la partie précédente soulignent la relation serrée entre les deux étapes de prolifération et de différenciation des cellules musculaires. En effet la différenciation est engagée une fois que les cellules quittent le cycle cellulaire et commencent à produire les protéines spécifiques du muscle. Cet engagement dans une voie de différenciation est contrôlé par la balance entre les régulateurs positifs et négatifs du cycle cellulaire [111]. En 1999, Zhang et al ont montré que l'expression des gènes CDkn1a (p21) et Cdkn1c (p57) régule la sortie du cycle cellulaire. Ces gènes codent pour des inhibiteurs de kinases dépendantes de la cycline (CKI) [112]. Ils activent la protéine Rb, dont la forme hypophosphorylée favorise la différenciation cellulaire [113].

L'expression de cyclines est aussi régulée par le facteur myogénique MyoD qui s'implique également dans l'arrêt du cycle cellulaire [114]. Le passage vers la différenciation est aussi repéré par l'inhibition des régulateurs négatifs de la différenciation myogénique, comme le gène *Gdf8* codant pour la myostatine, un facteur de croissance membre de la famille des TGF β [115].

La voie de signalisation Notch joue un rôle important dans la transition des cellules musculaires vers la différenciation. En effet elle inhibe l'expression de MyoD et de la Myogénine, elle inhibe donc la différenciation via l'inhibition de ces deux facteurs myogéniques [116] [117]. La voie Notch maintient donc les progéniteurs cellulaires dans un état de prolifération constituant ainsi une source cellulaire qui forme à la fin du développement fœtal la réserve de cellules satellites. Ces dernières seront impliquées dans la croissance et la régénération du muscle au cours de la vie adulte [118, 119] [97, 98]. Les protéines à homéodomaine Six représentent un bon exemple d'inhibiteur de la différenciation. Il a été montré qu'une mutation du gène *Six1* entraîne un défaut de myogenèse, ce qui révèle un rôle positif de cette protéine au cours du développement du muscle [120].

I.2.5.5 Activation du programme myogénique

Les MRFs sont des acteurs centraux de la différenciation myogénique. Myf5 et MyoD sont exprimés dans les myoblastes en division. L'activation de la Myogénine et de MRF4 est ensuite indispensable à la différenciation musculaire. De ce fait chacun des facteurs définit des rôles bien spécifiques (Figure 12, 13). Il a été montré que la myogénine joue un rôle crucial strictement dans la différenciation terminale des myotubes puisque les souris invalidées pour le gène de la myogénine ont des défauts de développement musculaire dus à l'absence des myotubes [121] [122]. Cependant, les souris mutantes *myogénine (-/-)* expriment normalement MyoD. La myogénine n'est pas donc requise pour l'expression de ce gène de détermination myogénique et pour les phases précoces de la myogenèse [123]. Elle est primordiale pour l'induction de la différenciation terminale des cellules musculaires, en aval des actions de MyoD et de Myf5. Comme nous l'avons vu précédemment, le facteur myogénique MRF4 se caractérise par un profil d'expression biphasique. Ce qui évoque des rôles plus complexes au cours des différentes phases de la myogenèse. Les transcrits *Mrf4* sont exprimés dans les cellules en fin de différenciation. Leur expression est donc nécessaire à la différenciation terminale des cellules musculaires [55] [124]. Une diminution de l'expression de gènes spécifiques du muscle a été observée chez les souris invalidées pour le gène *Mrf4* comme par exemple celui de la chaîne lourde de la myosine embryonnaire. Cependant, ces animaux présentent une augmentation du taux de la myogénine [125]. D'autres facteurs régulent aussi l'expression des protéines spécifiques de la différenciation terminale des myoblastes comme par exemple les facteurs de la

famille MEF2 qui s'associent avec les facteurs myogéniques pour induire l'expression des gènes spécifiques du muscle et initier la différenciation terminale des myoblastes [126].

I.2.5.6 Fusion des myoblastes en myotubes

Comme nous l'avons vu précédemment, les processus de prolifération et de différenciation sont régulés par des facteurs de croissance, des molécules de signalisation extracellulaire et par des composants de la matrice extracellulaire. Ceci est d'autant plus marqué au cours de l'étape de fusion des myoblastes, un phénomène qui, nécessite un contact entre les cellules. Ce mécanisme comprend plusieurs étapes (A) alignement des myoblastes, (B) reconnaissance et adhésion intercellulaires des myoblastes avoisinants, (C, D) association entre les deux membranes plasmiques, (E, F) fusion des myoblastes, (G) formation des myotubes [127] (Figure 14).

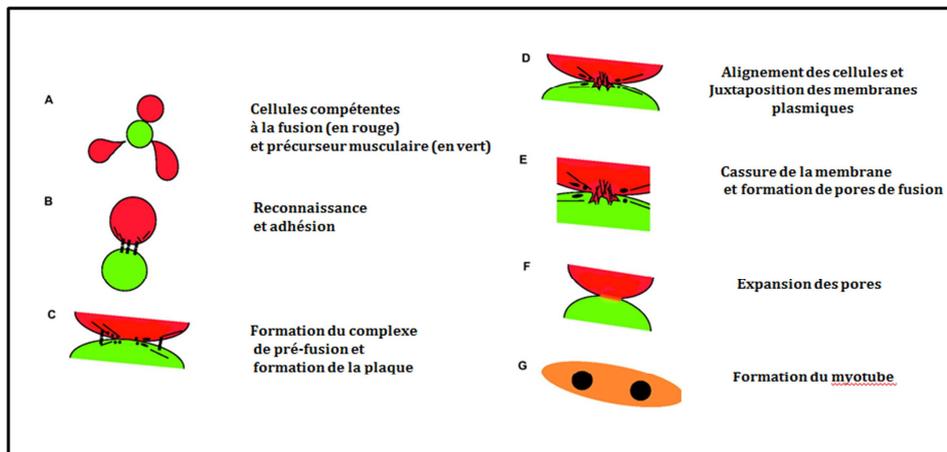


Figure 14 : Un modèle de fusion des myoblastes chez un embryon de drosophile [128].

A) Une cellule compétente pour la fusion (CCF, rouge) étend des filopodes jusqu'au précurseur musculaire (vert). **B)** la CCF reconnaît et s'attache au précurseur. **C)** Des vésicules se forment par paires (complexe de pré-fusion) le long des membranes des deux cellules. **D)** Alignement des cellules. **E)** Les membranes se « cassent », ce qui s'accompagne de la formation de pores de fusion. **F)** Un myotube multinucléé est formé.

I.2.5.6.1 Les interactions cellulaires

Pour fusionner, les myoblastes doivent atteindre une densité convenable aux contacts cellulaires. Ce processus est nommé « effet de communauté » [129]. Plusieurs facteurs impliqués dans ce phénomène ont été décrits chez plusieurs organismes (Tableau3).

Le contact cellulaire constitue une étape cruciale du phénomène de fusion cellulaire [130]. Parmi les molécules mises en jeu au cours de ce mécanisme, les molécules d'adhésion cellulaire (CAM pour Cell Adhesion Molecule). En effet, la plupart des protéines initiées appartiennent à la superfamille Ig (IgSF) et à la famille des cadhérines. Les cadhérines sont impliquées dans les adhésions cellulaires [131]. La N-cadhérine codée par le gène *Cdh2* est exprimé tout au long de la myogenèse depuis le stade somites jusqu'à la formation des myofibres innervées, en passant par les myoblastes en fusion, ainsi que, pendant la régénération au stade adulte [130]. Les études réalisées sur des souris invalidées pour le gène *Cdh2* ont montré l'importance de la N-cadhérine au cours de la détermination myogénique, ainsi que durant la différenciation des progéniteurs musculaires [132]. En effet, la N-cadhérine favorise la différenciation, de même la sortie du cycle cellulaire et l'expression des protéines spécifiques du muscle [130]. Les souris *Cdh2* (-/-) meurent avant dix jours embryonnaires faute de somites désorganisés [133]. Il a également été démontré *in vivo* que la N-cadhérine n'est pas essentielle pour la myogenèse. Vraisemblablement son absence est compensée par d'autres cadhérines [130] [] telles que les M-cadhérines et d'autres membres de la famille des cadhérines. La M-cadhérine serait également impliquée dans les interactions cellulaires. Elle est exprimée dans le myotome et dans les masses musculaires précoces [134] [135]. Des peptides ou des anticorps bloquant la capacité d'interaction de la M-cadhérine inhibent la formation de myotubes dans la lignée L6 de rat, un résultat similaire étant obtenu par l'utilisation d'ARNi spécifique de ces ARNm [136]. Les souris invalidées pour *Cdh15* (-/-) (le gène qui code pour la M-cadhérine) sont viables et ne présentent pas de défauts dans le développement musculaire [137]. Mais là encore, une compensation par d'autres cadhérines pourrait expliquer ce résultat [137]. Des protéines appartenant à la superfamille des immunoglobulines sont aussi impliquées dans la myogenèse. Parmi ces protéines, *Ncam1* qui est une molécule d'adhésion neuronale [138]. Plusieurs isoformes de cette protéine ont été décrites dans le muscle : deux isoformes transmembranaires de 140 et de 155 kDa et une isoforme à ancre GPI de 125 kDa [139]. Il a été démontré chez la souris que l'isoforme de 125 kDa facilite la fusion des myoblastes [140]. *In vivo*, l'ARNm de *Ncam1* est présent dans les somites et son expression est régulée tout au long de la myogenèse [141]. Cependant, les souris « K.O. » pour *Ncam1* ne présentent pas là aussi de défaut significatif de la

myogénèse[142][121][143][122][144], ce qui suggère que Ncam1 ne jouerait qu'un rôle modéré dans la myogénèse ou que d'autres CAMs corrigerait sa fonction. D'autres molécules de la superfamille des immunoglobulines, participent également aux interactions cellulaires antérieures à la fusion des myoblastes tels que les récepteurs de surface de type Cdo. Ces récepteurs s'associent pour former un complexe transmembranaire. Ce dernier stimule des facteurs myogéniques à domaine bHLH, en augmentant leur hétérodimérisation avec des protéines E [145]. Cependant, chez les souris *cdo* (-/-), la myogénèse est retardée ce qui indique, que Cdo n'est pas essentiel pour le développement musculaire [145]. La surexpression de la néogrine, une autre protéine appartenant aux immunoglobulines dans les cellules murines C2C12 favorise la formation des myotubes, tandis que sa sous-expression l'inhibe [146]. Cette protéine augmente aussi la transcription des facteurs appartenant aux familles bHLH et NFAT décrits comme des facteurs indispensables au cours de différentes étapes de la myogénèse dont la fusion des myoblastes [146, 147].

I.2.5.6.2 Le Remodelage du cytosquelette

Dans un premier temps, le remodelage du cytosquelette a été mis en évidence par l'observation, en microscopie électronique, des myoblastes avant et après leur fusion [148]. En effet des études réalisées sur des myoblastes de souris *in vitro* ont permis la visualisation des changements dans le cytosquelette d'actine [149] [150, 151] [152]. Il a été également montré que la dynamique des filaments d'actine [153] est cruciale pour la fusion entre myoblastes et entre myoblastes et myotubes [154, 155]. De plus en plus les données démontrent l'importance du remodelage tout au long du processus de fusion. Ainsi la présence d'un inhibiteur de la polymérisation d'actine dans le milieu de culture de myoblastes C2C12 en différenciation bloque la fusion des myoblastes [156]. Les microtubules sont aussi impliqués dans ce processus. Deux facteurs d'échange de nucléotides guaniliques (GEF), interviennent également dans la fusion. La sous-expression des gènes *gef* dans les C2C12 provoque une inhibition de la fusion [157]. De nombreuses études soulignent donc le rôle central des protéines de remodelage du cytosquelette au cours de la fusion des myoblastes [158]. Pourtant les modifications du cytosquelette ne constituent qu'une étape au cours des événements de fusion des myoblastes. Elles sont complétées par les réarrangements membranaires qui sont nécessaires et indispensables pour la suite du mécanisme de fusion.

Myoblastes	Myotubes naissants	Myotubes matures
ADAM12, Intégrine β 1, calpaine/calpastatine, cavéoline3, Calmoduline	ADAM12, FKHR, GRP-94, Ca-channels, Prostaglandine E1	NFATc2 ; Prostaglandine F2, IL-4

Tableau 3: Liste des molécules impliquées dans la fusion des myoblastes chez les mammifères [147].

I.2.6 Expression des facteurs Myf5 et MyoD et la régénération musculaire

La régénération est la capacité à restaurer l'intégrité structurale et fonctionnelle d'un tissu ou d'un organe après sa destruction ou sa perte. Des études récentes ont mis en évidence des cellules souches non musculaires capables de participer à la régénération du muscle. La cellule satellite est donc aujourd'hui définie comme le progéniteur musculaire principal chez l'adulte. Les cellules satellites dérivent de cellules souches embryonnaires provenant du somite. Elles apparaissent en fin de myogenèse foetale et se positionnent sur la fibre sous la membrane basale. Au repos, les cellules satellites adultes expriment Pax7 et sont dans un état quiescent, c'est-à-dire en arrêt mitotique. Elles réceptionnent et intègrent les signaux provenant du microenvironnement qui les entoure, aussi appelé « niche ». Lors d'un stress musculaire tel qu'un effort physique important conduisant à une hypertrophie musculaire, ou lors de lésions musculaires, les cellules satellites vont passer du stade quiescent à un stade activé. Après plusieurs cycles de prolifération, la majorité d'entre elles se différencie et fusionne pour réparer les myofibres endommagées et former des nouvelles fibres (Figure 16). Les différents acteurs et les mécanismes orchestrant la régénération sont similaires à ceux régulant la myogenèse durant le développement.

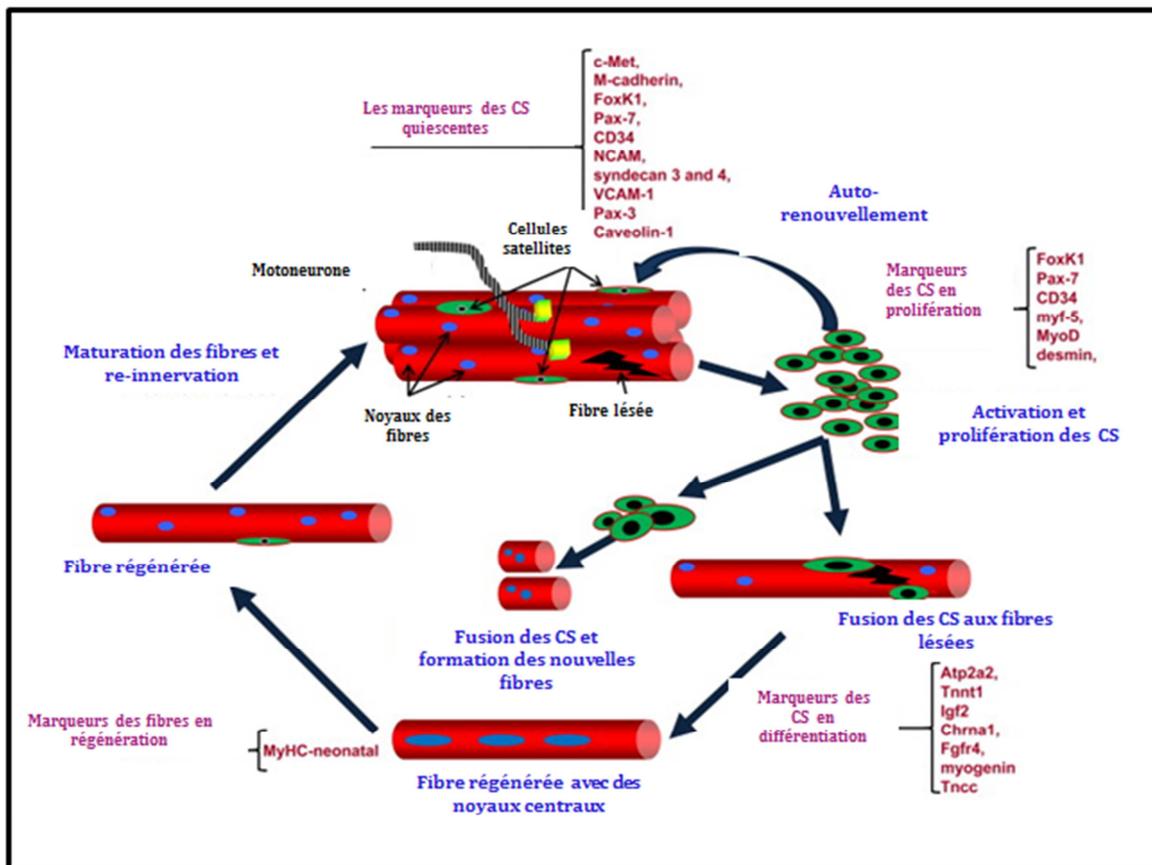


Figure 15 : Représentation schématique de la régénération musculaire [159].

Suite à une lésion, les cellules satellites sont activées et entrent en phase de prolifération. Cette phase se caractérise par l'expression des facteurs Myf5 et MyoD. Au cours de la prolifération, certaines divisions se font d'une façon asymétrique ou symétrique et génèrent également des cellules destinées à maintenir le pool initial des cellules satellites. La phase proliférative est suivie d'une différenciation terminale des myoblastes qui fusionnent soit entre eux, soit avec les fibres endommagées. La régénération s'achève avec la relocalisation des noyaux à la périphérie des fibres. Plusieurs marqueurs ont été identifiés pour chaque étape de la régénération.

Lors de l'activation des cellules satellites, l'expression de Myf5 est fortement augmentée et est très rapidement suivie par celle de MyoD. L'activation de ce facteur myogénique est très rapide elle intervient avant les premiers signes de division cellulaire, dans les 12h qui suivent l'activation de la régénération. En revanche, MyoD n'a jamais été détecté dans les cellules satellites quiescentes. [160] Il s'avère jouer un rôle crucial dans le processus de la régénération. Les souris déficientes en MyoD présentent un déficit sévère de la régénération [161]. MyoD est essentiel pour induire la différenciation des CS dans le muscle en régénération. La plupart des myoblastes exprimant MyoD s'engage dans une voie de différenciation. Cependant, une partie de

ces cellules sont capables de retourner à l'état de quiescence et de participer à l'auto-renouvellement du pool des CS via l'inhibition du facteur MyoD [162]. MyoD aurait deux rôles principaux. D'une part, il serait essentiel pour la sortie du cycle cellulaire en activant les inhibiteurs du cycle Rb et p21 [104]. D'autre part, il permettrait l'activation des gènes spécifiques du muscle comme la myogénine.

II La voie de signalisation calcineurine/ NFAT

La voie de signalisation calcineurine/NFAT (Nuclear Factor of Activated T Cells) est impliquée dans de multiples aspects du développement du muscle squelettique. La calcineurine (CaN), une sérine/thréonine (Ser/Thr) phosphatase Ca^{2+} - dépendant, est un facteur clé de cette voie. Elle est capable de déphosphoryler une large gamme de protéines [163]. Parmi ses substrats les plus importants, les membres de la famille NFAT.

II.1 La calcineurine

La calcineurine (CaN), identifiée initialement comme un inhibiteur de l'activité calmoduline-dépendante de la phospho-diesterase des nucléotides cycliques [164] a été isolée pour la première fois en 1978 par Klee et al, qui lui ont par la suite donné son nom en raison de sa localisation neuronale et de sa capacité à fixer le calcium [165] [166]. La véritable fonction de la CaN a été définie une dizaine d'année plus tard par Liu et al comme étant la molécule cible des deux immunosuppresseurs ; la cyclosporine (CsA) et la tacrolimus (FK506) [167]. Des études réalisées par la suite ont révélé le rôle majeur de la CaN dans la transduction des signaux calcium Ca^{2+} -dépendants.

II.1.1 Les propriétés de la calcineurine

La calcineurine connue également sous le nom de « phosphatase 2B, PP2B » est une sérine/thréonine phosphatase Ca^{2+} -dépendant. Elle est activée par la présence de Ca^{2+} et de la calmoduline (CaM). La calcineurine est un hétéro-dimère très conservé chez tous les eucaryotes. Elle est constituée d'une sous-unité dite catalytique, la calcineurine A (CaN A) de 60 kDa environ et d'une sous-unité dite régulatrice, la calcineurine B (CaN B) de 19 kDa.

II.1.2 Structure de la calcineurine

Le site actif de la calcineurine est localisé dans la sous-unité catalytique d'environ 60 kDa. La CaN A est constituée d'un domaine catalytique homologue à celui des sérine/thréonine

phosphatases qui est suivi en C-terminal par trois domaines régulateurs spécifiques à la CaN A (Figure 18) ; un domaine de liaison à la CaN B, un domaine de liaison à la calmoduline (CaM) et un domaine auto-inhibiteur. En absence de Ca^{2+} et de CaM, l'activité enzymatique de la calcineurine est bloquée par la formation d'une hélice α masquant le site de fixation de l'enzyme à son substrat [168]. On retrouve trois isoformes de la CaN A : les isoformes ubiquitaires α et β , et l'isoforme γ exprimée dans les testicules [169].

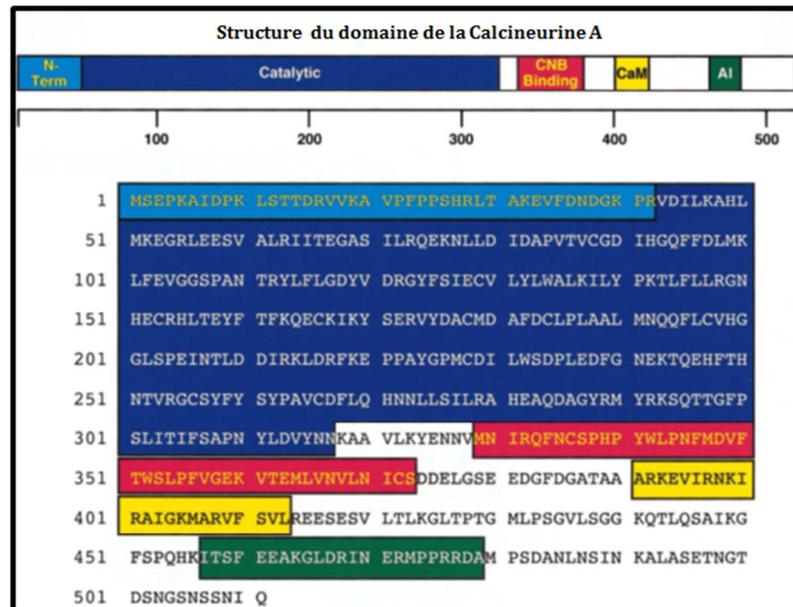


Figure 16 : Structure et séquence du domaine de la calcineurine A [170].

La séquence des acides aminés représente l'isoforme de la calcineurine A du rat. CaM (calmoduline) ; CaN B (calcineurine B) ; AI (Auto-Inhibiteur).

La CaN B est constituée de quatre motifs « EF-hand » sur lesquels se fixe le Ca^{2+} avec différentes affinités. Du côté N-terminal, les sites 1 et 2, nommés sites régulateurs, fixent le Ca^{2+} avec une faible affinité et en fonction de sa concentration intracellulaire. Cependant, les sites 3 et 4 du côté C-terminal nommés sites de structure, fixent le Ca^{2+} avec une affinité élevée afin de stabiliser la structure de l'hétéro-dimère. La CaN B contient également un site de myristoylation du côté N-terminal dont le rôle est encore débattu. Chez les mammifères, on trouve deux isoformes de la CaN B ; l'isoforme ubiquitaire B1 et l'isoforme B2 uniquement présent dans les testicules avec la CaN A γ .

II.1.3 Distribution tissulaire de la calcineurine

Chez les mammifères, on trouve la calcineurine dans la plupart des tissus et dans différents types cellulaires. Elle est présente en quantité élevée dans le cerveau. En outre, la CaNA et la CaNB ont été observées dans les tissus adipeux, dans le cœur, dans le muscle squelettique, les testicules et le sperme et également dans d'autres tissus. Les variations de distribution dépendent essentiellement des isoformes de chaque sous-unité. Concernant sa localisation cellulaire, la CaN est majoritairement cytoplasmique, où elle peut être liée à la membrane plasmique ou, comme dans les neurones, aux éléments du cytosquelette [171, 172]. Elle a également été localisée dans le noyau des spermatozoïdes ou des lymphocytes T en association avec le facteur de transcription NFAT [173] [174].

II.2 La famille NFAT

La famille des facteurs NFATs est représentée par des protéines impliquées dans la régulation de l'expression de gènes codant pour des cytokines, des récepteurs de surface cellulaire et des facteurs de transcription [175]. NFAT a été identifié pour la première fois dans les lymphocytes T comme un facteur nucléaire de liaison au récepteur ARRE-2 du promoteur de l'interleukine 2 (IL-2). Toutefois, l'expression des protéines de la famille NFAT ne se limite pas aux lymphocytes T. Les membres de la famille sont exprimés dans la plupart des types cellulaires [176, 177]. En effet, l'expression des protéines NFAT est ubiquitaire. On retrouve les membres de la famille NFAT dans plusieurs tissus comme les neurones, le système immunitaire, le cartilage, les muscles squelettiques, le système cardio-vasculaire, le thymus, la rate, le cœur, les testicules, dans les cellules T et B, les cellules NK, les mastocytes et les monocytes. Les protéines NFATs sont activées par la stimulation de différents récepteurs couplée à la mobilisation du calcium. Ceux-ci permettent l'activation de plusieurs enzymes intracellulaires tels que la calcineurine et la calmoduline qui sont des régulateurs majeurs en amont des protéines NFAT [178]. La famille NFAT est composée de cinq membres : NFAT1 (également connu sous le nom NFATp ou NFATc2), NFAT2 (également connu sous le nom NFATc ou NFATc1), NFAT3 (également connu sous le nom NFATc4), NFAT4 (également connu sous le nom NFATx ou NFATc3) et NFAT5. Quatre de ces protéines sont régulées par la voie de signalisation Ca^{2+} /calcineurine.

II.2.1 Structure des protéines NFATs

Il existe plusieurs isoformes des protéines NFATs. Elles sont issues de différents épissages alternatifs ou de l'utilisation des promoteurs alternatifs (figure 19). Cependant, on distingue deux régions de séquences homologues communes à toutes les isoformes ; le domaine de liaison à l'ADN nommé **DNA Binding Domain** (DBD) [179] et la région d'homologie NFAT dite **NFAT Homology Sequence** (NHR) [180]. Le site de liaison à l'ADN composé de 400 à 700 acides aminés possède un domaine similaire au domaine Rel des protéines NF- κ B, appelé **Rel Similarity Domain** (RSD) ou **Rel Homology Domain** (RHD) de par sa structure tridimensionnelle et sa façon à se lier à l'ADN par l'intermédiaire des boucles (figure 20) [179] [181] [182]. La déphosphorylation de NFAT au niveau de son domaine régulateur (Figure 20) par la calcineurine activée permet sa translocation au noyau [183]. Le domaine régulateur contient une séquence connue correspondant à une séquence de localisation nucléaire, **Nuclear Localization Sequence** (NLS) qui est primordiale pour l'import nucléaire des protéines NFATs. Les régions localisées en dehors de la région de liaison à l'ADN et du domaine régulateur sont peu conservées. Du côté N-terminal on retrouve un domaine de transactivation dit **Transactivation Domain** (TAD) d'environ 100 acides aminés. [184]. À l'extrémité C-terminale et au niveau du domaine de liaison à l'ADN dit **DNA Binding Domain** (DBD) une séquence hautement conservée entre les différents isoformes NFAT est observée.

II.2.2 Liaison de NFATc2 à l'ADN

Le domaine minimal de liaison à l'ADN de NFATc2 d'environ 190 acides aminés correspond presque exactement au domaine N-terminal de NF- κ B p50. Ce domaine contient la boucle de reconnaissance hautement conservée (RFRYxCEG) des protéines de la famille Rel, représenté dans la famille NFAT par la séquence fortement conservée de RAHYETEG chaque résidu souligné est susceptible de se lier à l'ADN. Les protéines NFATs sont monomériques en solution et se lient à l'ADN sous forme de monomères.

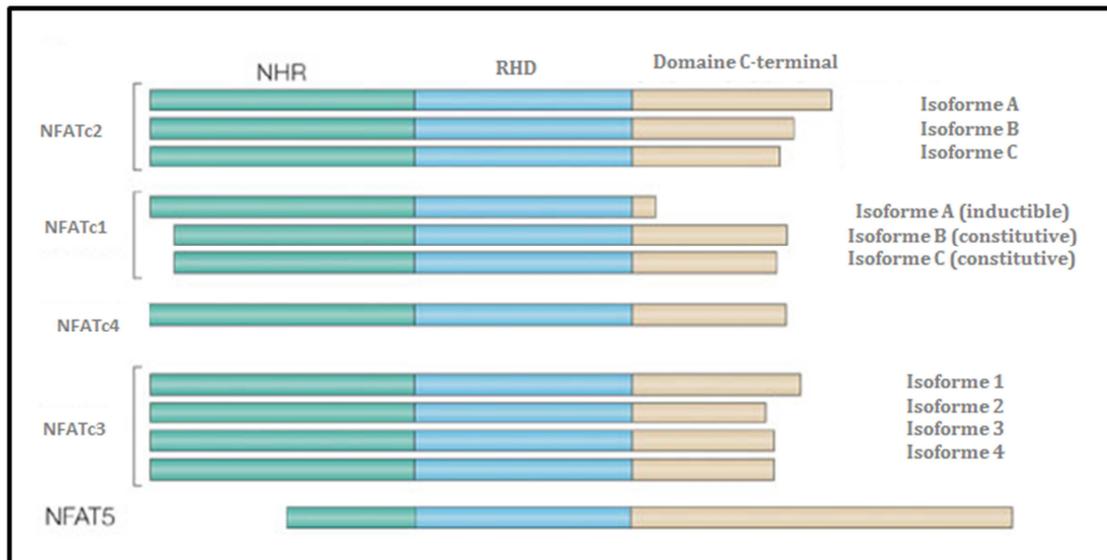


Figure 17 : Structure des différentes isoformes NFATs [185].

Les protéines sont alignées en fonction de leur domaine RHD (Rel Homology Domain), qui contient le motif de liaison à l'ADN. La région N-terminale est également conservée parmi les différentes protéines NFATs. Les protéines NFATc2, NFATc1, NFATc3 sont régulées par la voie Ca^{2+} /calcineurine et présentent plusieurs isoformes issues des épissages alternatifs. La protéine NFATc1 se présente sous deux isoformes, inductible et constitutive. (RHD) REL Homology Domain; (NHR) NFAT-Homology Region.

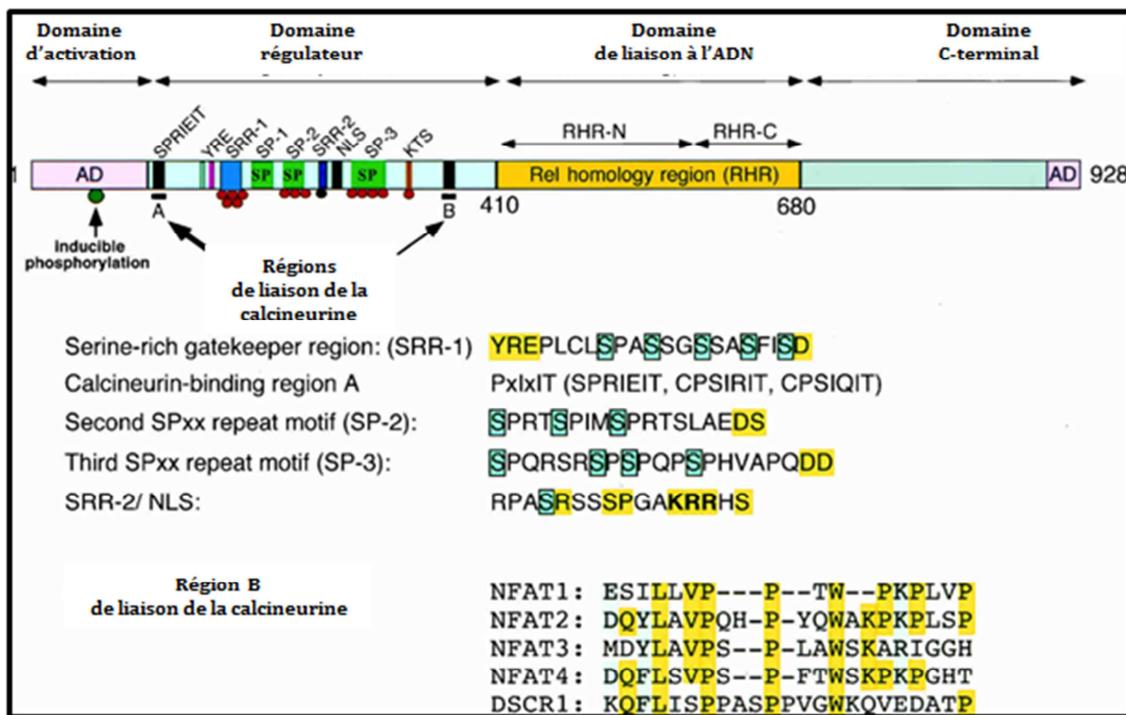


Figure 18: Structure globale de la protéine NFATc2 [186].

La structure de l'isoforme NFATc2 comprend un domaine d'activation (AD), un site de liaison à l'ADN, un domaine C-terminal ainsi qu'un domaine de régulation qui est le site de phosphorylation et d'interaction avec la calcineurine. Le domaine de régulation comprend deux régions impliquées dans la liaison à la calcineurine, une région de liaison à la CaN A constituée d'une séquence PxIxIT conservée dans toutes les protéines NFATs et une région de liaison à la CaN B qui est le site du signal de localisation nucléaire, NLS. Les cercles rouges indiqués sur les régions SRR-1, SP-2, SP-3 montrent les groupes de phosphates supprimés par la calcineurine, le cercle noir dans la région SRR-2 n'est pas sensible à la déphosphorylation par la calcineurine. Les séquences phosphorylées de ces régions sont représentées par les boîtes bleues, d'autres résidus conservés sont surlignés en jaune, le noyau du signal de localisation nucléaire (KRR) apparaît en gras. Les séquences de la région liant la calcineurine B des protéines NFATs humaines montrent les régions conservées entre les différentes isoformes NFATs et la protéine DSCR1.

II.2.3 Activation des protéines NFATs

Trois étapes caractérisent l'activation des protéines NFATs : la déphosphorylation, la translocation nucléaire et l'augmentation de l'affinité à l'ADN. Dans les cellules au repos, les protéines NFATs sont phosphorylées, résident dans le cytoplasme et présentent une faible affinité à l'ADN. Suite à un stimulus, une augmentation du taux de calcium est observée. Celle-ci déclenche une déphosphorylation rapide des protéines NFATs et leur translocation dans le noyau pour plusieurs heures. Les protéines déphosphorylées possèdent une affinité élevée à l'ADN. Toutefois, la voie de signalisation calcineurine/NFAT peut être inhibée par différentes

molécules, à titre d'exemple, la cyclosporine A (CsA) et la tacrolimus (FK506), inhibiteurs classiques de la calcineurine.

Dans les cellules en repos, les protéines NFATs se lient à la calcineurine inactive par l'intermédiaire de leur domaine régulateur conservé. En effet, selon l'affinité, ces interactions peuvent être soit transitoires, soit stables. L'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} cause l'activation de la calmoduline qui se lie à une région proche de l'extrémité C-terminale de la calcineurine, déplace le domaine auto-inhibiteur de celle-ci et expose son site actif. La calcineurine activée déphosphoryle les protéines NFATs des groupements phosphates associées à plusieurs sites de leur domaine régulateur.

II.3 Inhibition de la voie calcineurine/ NFAT

Au cours des dernières décennies, plusieurs inhibiteurs de la voie calcineurine/NFAT ont été découverts. Ceux-ci diffèrent par leur mode d'action, leur structure chimique et leurs effets inhibiteurs. On distingue les petites molécules inhibitrices telles que la cyclosporine A (CsA) et le FK506. Ces drogues ciblent directement la calcineurine [187] [188]. D'autre part, des inhibiteurs ne ciblant pas directement la calcineurine ont été identifiés comme les BTPs 3,5-Bis (trifluorométhyl)pyrazoles et la Trifluoperazine. De même, il existe des peptides inhibiteurs comme le peptide PxlIT et le peptide LxVP (Figure 21).

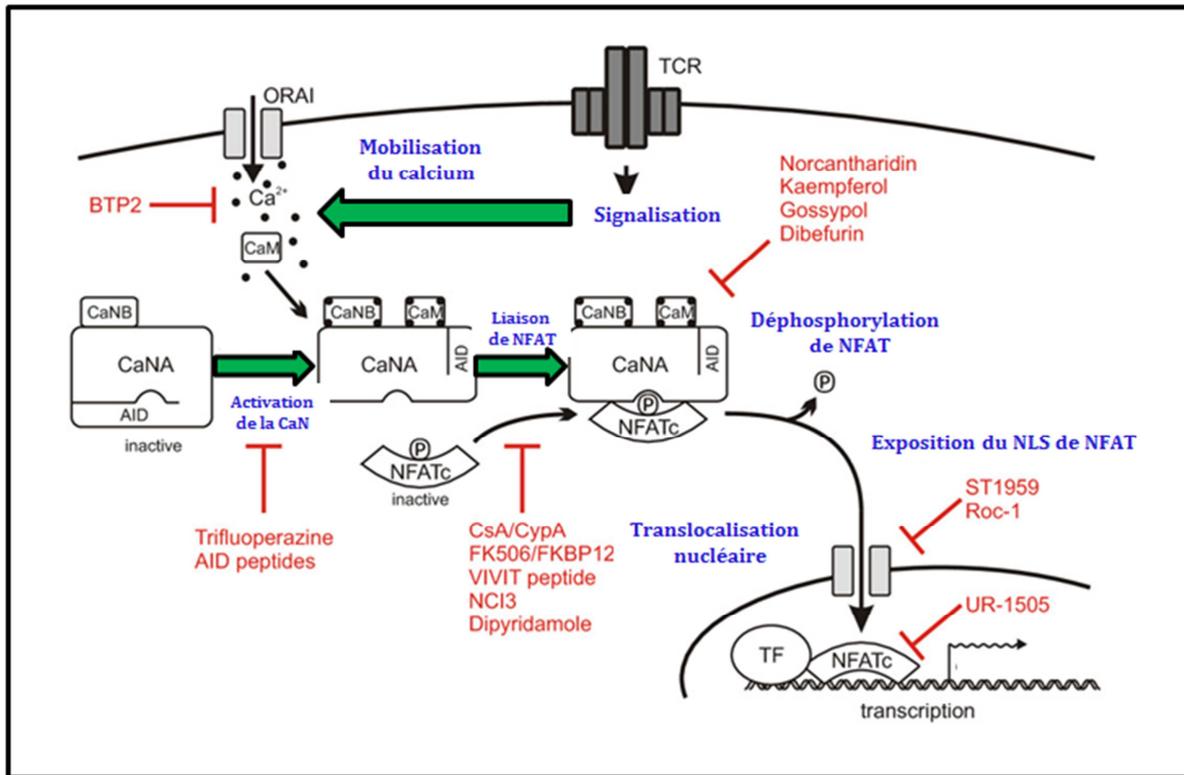


Figure 19 : L'inhibition de la voie de la calcineurine-NFAT à différents niveaux [189].

Les récepteurs induisent l'entrée du Ca^{2+} dans la cellule. L'activation de la calcineurine se fait par la liaison de la calmoduline (CaM) et de la sous-unité B de la calcineurine (CaNB) aux ions Ca^{2+} et se traduit par un changement de conformation de la sous-unité (CaNA). La calcineurine activée se lie à la protéine NFATc via les motifs PxIxIT et LxVP et déphosphoryle le facteur de transcription. NFATc déphosphorylé expose sa séquence de localisation nucléaire (NLS) et est transloqué dans le noyau où il se lie à des séquences d'ADN appropriées. NFATc exerce ses effets de transactivation en se liant à un autre facteur de transcription (TF). NFATc est désactivé par rephosphorylation qui cause son export dans le cytosol. Les différentes étapes de cette voie sont la cible de certains composés qui engendrent la suppression de l'expression des gènes dépendant de NFATc. Une sélection des inhibiteurs les plus importants et les mieux caractérisés de la voie de signalisation calcineurine/NFATc est indiquée (en rouge) à leur point d'interférence. AID: autoinhibitory domain of calcineurin A; TCR: T cells Receptor.

II.4 La voie calcineurine/NFAT et le développement

II.4.1 Rôles des protéines NFAT dans le développement de différents systèmes

Les facteurs NFATs s'avèrent jouer un rôle crucial dans le développement de plusieurs types cellulaires. La voie de signalisation NFAT contrôle plusieurs étapes du développement de différents systèmes tels que le système musculo-squelettique, vasculaire et adipeux.

Dans les chondrocytes adultes, NFATc2 agit comme un régulateur négatif de la formation du cartilage au niveau des articulations. Les souris âgées *nfatc2* (-/-) présentent une mobilité articulaire faible due à la formation abusive du cartilage causée par les proliférations et les différenciations des chondrocytes non contrôlées [190]. Les protéines NFATs sembleraient également réguler la différenciation adipocytaire *in vitro* [191].

Des études ont montré l'importance des facteurs NFATs dans le système cardio-vasculaire. À l'état embryonnaire, l'expression de NFATc1 est observée au niveau cardiaque [192, 193]. Son expression devient limitée aux cellules destinées à la formation des valves cardiaques à partir de 11 jours et demi du développement embryonnaire. Les souris *nfatc1* (-/-) présentent un développement anormal des valves cardiaques et des anomalies du septum cardiaque. De même, les souris double mutantes pour NFATc3/c4 présentent une désorganisation des vaisseaux sanguins conduisant à la mort embryonnaire précoce [194].

La voie de signalisation calcineurine/NFAT régule aussi la formation du muscle squelettique. Il a été montré que le facteur NFATc3 est impliqué dans la formation des myofibres. En effet, les souris *nfatc3* (-/-) présentent des défauts dans la formation des myofibres primaires, les premières cellules musculaires multinucléées [195]. D'autre part, NFATc2 joue un rôle dans la croissance post-natale du muscle squelettique. Les souris *nfatc2* (-/-) forment des cellules musculaires multinucléées de petite taille. Cela est dû à un défaut dans le recrutement et / ou la fusion des cellules myogéniques avec les cellules musculaires multinucléées naissantes [196]. En

outre, l'expression de Myf5 dans « des cellules de réserve », une sous-population quiescente de cellules myogéniques qui partagent des caractéristiques communes avec les cellules satellites, est aussi régulée par la voie calcineurine/NFAT *in vitro* [197].

II.4.2 Rôle de la voie calcineurine dans le développement du muscle squelettique

La voie de signalisation calcineurine/NFAT régule différents aspects de l'expression des gènes spécifiques du muscle. La voie de signalisation calcineurine est impliquée dans la différenciation des myoblastes. *In vitro*, l'expression ectopique de la forme active de la calcineurine semble stimuler la différenciation et l'hypertrophie des myocytes tandis que les souris mutantes pour NFATc3 montrent une aplasie due apparemment aux défauts du développement musculaire embryonnaire [195]. Des études récentes ont révélé un rôle clé de la voie de signalisation calcineurine dans l'activation des gènes musculaires spécifiques associés au phénotype des muscles lents. Le traitement des souris avec l'inhibiteur CsA induit une réduction des fibres musculaires lentes et une augmentation des fibres rapides chez l'adulte [198]. En revanche, l'expression de la forme activée de la calcineurine sous le contrôle du promoteur spécifique du muscle squelettique induit une augmentation du nombre des fibres lentes et une diminution du nombre des fibres rapides chez la souris adulte [199].

II.4.3 Rôles du facteur NFATc3 dans le développement musculaire

Le calcium est un régulateur crucial de la physiologie du muscle squelettique. La calcineurine est activée par la concentration élevée du calcium intracellulaire. Un certain nombre d'études démontrent que la calcineurine joue un rôle régulateur dans l'adaptation du muscle squelettique et la régénération musculaire par sa capacité à promouvoir la différenciation des myotubes [200] [195]. Dans des cultures de cellules C2C12, il a été montré que l'activité de la calcineurine augmente au cours de la différenciation myogénique. Cette activation se traduit par la translocation nucléaire spécifique de NFATc3. De plus, l'expression forcée de la calcineurine activée améliore la formation des myotubes [201]. Ces résultats

montrent l'implication de la voie de signalisation NFATc3 dans la régulation de la différenciation des cellules du muscle squelettique et la formation des myotubes. Ces observations in vitro sont cohérents avec le phénotype musculaire des souris *nfatc3* (-/-), qui présente une masse musculaire réduite à cause de la diminution du nombre de fibres musculaires [195].

INTRODUCTION AU TRAVAIL

Le travail exposé dans ce manuscrit a pour objectif d'identifier les mécanismes cellulaires et moléculaires contrôlant la formation et la spécification du muscle squelettique durant la myogenèse. Nous avons focalisé notre étude sur le rôle de la voie de signalisation calcineurine/NFAT dans ces processus cellulaires au cours de l'embryogenèse chez la souris.

La myogenèse est un processus fondamental qui conduit à l'établissement de l'un des tissus les plus abondants chez les mammifères, le tissu musculaire. De ce fait, la compréhension des mécanismes impliqués dans son élaboration est essentielle. Au cours du développement des vertébrés, la formation et la croissance des muscles squelettiques se font par phases successives de myogenèse embryonnaire (primaire) et fœtal (secondaire). Les muscles squelettiques du tronc et des membres des vertébrés dérivent des somites, qui sont des blocs segmentaires de mésoderme paraxial se formant de chaque côté du tube neural. Les jeunes somites se différencient dorsalement pour former le dermomyotome qui génère le muscle squelettique et les cellules dermiques et ventralement pour former le sclérotome qui est à l'origine des côtes, de la colonne vertébrale et du cartilage. Par la suite, les progéniteurs des lignages myogéniques se différencient en myocytes qui fusionnent entre eux pour former les premières fibres.

La myogenèse se met en place grâce à un réseau de facteurs de transcription parmi lesquels les facteurs myogéniques à domaine bHLH: MyoD, Myf5, MRF4 et la myogénine. L'expression spatio-temporelle de chaque facteur myogénique varie selon les espèces et dépend du type musculaire, de l'origine du muscle ainsi que du type de myogenèse. Plusieurs expériences ont été réalisées afin de comprendre l'implication fonctionnelle des différents facteurs myogéniques au cours de ce processus. Des études ont suggéré que Myf5 et MyoD agissent en amont de la myogénine et d'une manière redondante. En effet, Les souris doubles mutantes *myf5* (-/-) ; *myod* (-/-) présentent un défaut complet dans la formation des muscles squelettiques tandis que la myogenèse est normale chez les souris simples mutantes pour MyoD [202]. Contrairement aux souris déficientes pour les autres facteurs myogéniques, les mutants myogénine débutent une myogenèse normale, mais développent plus tard, des défauts dans la différenciation des myocytes en myotubes. [121, 122]. Plusieurs études montrent également l'implication de MRF4 dans la différenciation terminale [125] [203]. De plus, des études plus récentes suggèrent sa participation à la myogenèse embryonnaire [97].

La voie calcium/calcalcineurine est impliquée dans de nombreux processus biologiques, notamment dans la myogenèse. La calcineurine est un régulateur important de la physiologie du muscle. En effet, le traitement de myoblastes avec un inhibiteur de la calcineurine en culture, inhibe la fusion des myoblastes et donc la formation de myotubes [204]. Les facteurs de transcription de la famille NFAT sont des protéines cibles de la calcineurine. L'expression forcée d'une forme constitutivement active de la calcineurine se traduit par une accélération de la formation des myotubes, accompagnée de la translocation spécifique de NFATc3 dans le noyau [201].

L'isoforme NFATc2 est également transloquée dans le noyau des cellules musculaires lorsque la voie de signalisation calcineurine/NFAT est active. Cependant, la translocation dans le noyau de NFATc2 n'est observée qu'après la fusion initiale des myoblastes en myotubes [204]. Par ailleurs, les quatre isoformes NFAT sont impliquées dans la spécification des fibres musculaires matures via l'activation de l'expression des différentes chaînes lourdes de la myosine (MyHC). Les MyHC sont des protéines constituant le sarcomère, élément contractile du muscle squelettique. D'une part, des études ont montré que l'expression de la MyHC II b serait sous contrôle de l'expression de NFATc4 tandis que l'expression de la MyHC I est contrôlée par l'expression concomitante des quatre protéines NFAT (NFATc1-c4) [4]. Il a aussi été montré que NFATc1 favorise le phénotype musculaire lent dans les muscles matures [205]. D'autre part, des études *in vitro* ont montré que le promoteur de la MyHC embryonnaire possède des boîtes E sur lesquelles MyoD est capable de se fixer pour ainsi activer l'expression de la MHC emb [206].

En 2008, mon laboratoire d'accueil a identifié un nouveau partenaire des protéines NFAT : il a été montré que la coopération de MyoD avec le facteur de transcription NFATc3 joue un rôle essentiel dans la myogenèse primaire [207]. Dans des cultures de myoblastes en différenciation, MyoD coopère avec NFATc3 pour activer l'expression de la myogénine. *In vivo*, la coopération de MyoD avec NFATc3 joue un rôle spécifique dans la différenciation des somites. En effet, les embryons *myod* (-/-); *nfatc3* (-/-) présentent des somites exprimant très faiblement la myogénine à E10.5, alors que l'expression de la myogénine n'est pas affectée dans les somites des embryons simple mutants. En culture, MyoD coopère également avec une autre isoforme des protéines NFAT : NFATc2, pour activer la transcription de la myogénine [207]. En revanche, le taux d'expression de la myogénine n'est pas modifié dans les somites des embryons de souris *myod* (-/-); *nfatc2* (-/-) à E10.5 et E11.5. Toutefois, l'interaction de NFATc2 avec MyoD

est unique, puisque les domaines d'interaction sont différents de ceux impliqués dans l'interaction NFATc3/MyoD. L'implication physiologique du complexe NFATc2/MyoD est totalement inconnue, mais est probablement cruciale puisque la double délétion *myod* : *nfatc2* est létale, bien que les souris *myod* (-/-) et *nfatc2* (-/-) soient fertiles. Alors que le complexe NFATc3/MyoD est impliqué dans le processus de myogenèse primaire, ces observations suggèrent que MyoD et NFATc2 pourraient coopérer in vivo au cours des étapes ultérieures de la myogenèse.

Au regard de l'importance de cette voie de signalisation au sein du système musculaire et du fait de l'étroite interaction entre les facteurs NFATc2 et MyoD, nous nous sommes posé plusieurs questions :

- ✿ **Les facteurs MyoD et NFATc2, pourraient-ils coopérer in vivo au cours de la myogenèse secondaire?**
- ✿ **Quelles sont les causes du décès des embryons *myod* (-/-); *nfatc2* (-/-) à la naissance?**
- ✿ **Quels sont les effets de la double délétion *myod* (-/-); *nfatc2* (-/-) sur le phénotype des fibres musculaires ?**

RÉSULTATS

I Analyse des profils d'expression génique des facteurs myogéniques et des facteurs NFATs par hybridation *in situ* au cours du développement embryonnaire chez la souris

Nous présentons dans cette partie des résultats le profil d'expression des différents facteurs de la famille MyoD ainsi que celui des facteurs NFAT. Il convient donc, de préciser le principe et la technique de l'hybridation *in situ* sur embryon entier.

I.1 Principe de l'hybridation *in situ* (HIS) sur embryon entier

L'hybridation *in situ* est une technique qui permet d'étudier la localisation spatiale et temporelle d'un ARNm spécifique au cours du développement. La détection de l'ARNm d'intérêt se fait grâce à un ARNc antisens (ARN complémentaire de l'ARN en question). Pour synthétiser l'ARNc antisens, on utilise un ADNc cloné dans un vecteur d'expression (Figure 22) qui contient des séquences promotrices auxquelles une ARN polymérase peut se fixer pour copier le brin approprié de l'ADNc en ARN antisens ou en ARN sens. Ce dernier ne pouvant pas s'hybrider avec l'ARNm sera utilisé comme témoin négatif. Par la suite, l'ARN synthétisé est marqué grâce à un nucléotide modifié. On utilise de l'uridine conjuguée à la digoxigénine qui est un composé synthétisé par les plantes et qui n'est pas retrouvé dans les cellules animales. L'ARN antisens marqué à la digoxigénine est incubé avec l'embryon pendant plusieurs heures puis l'excès de sonde marquée est ensuite éliminé par des lavages successifs de manière à ne laisser que la sonde hybridée avec l'ARNm. L'embryon est ensuite incubé avec un anticorps dirigé contre la digoxigénine. Cet anticorps est associé de manière covalente à la phosphatase alcaline. L'hybridation *in situ* peut être réalisée aussi sur une coupe histologique.

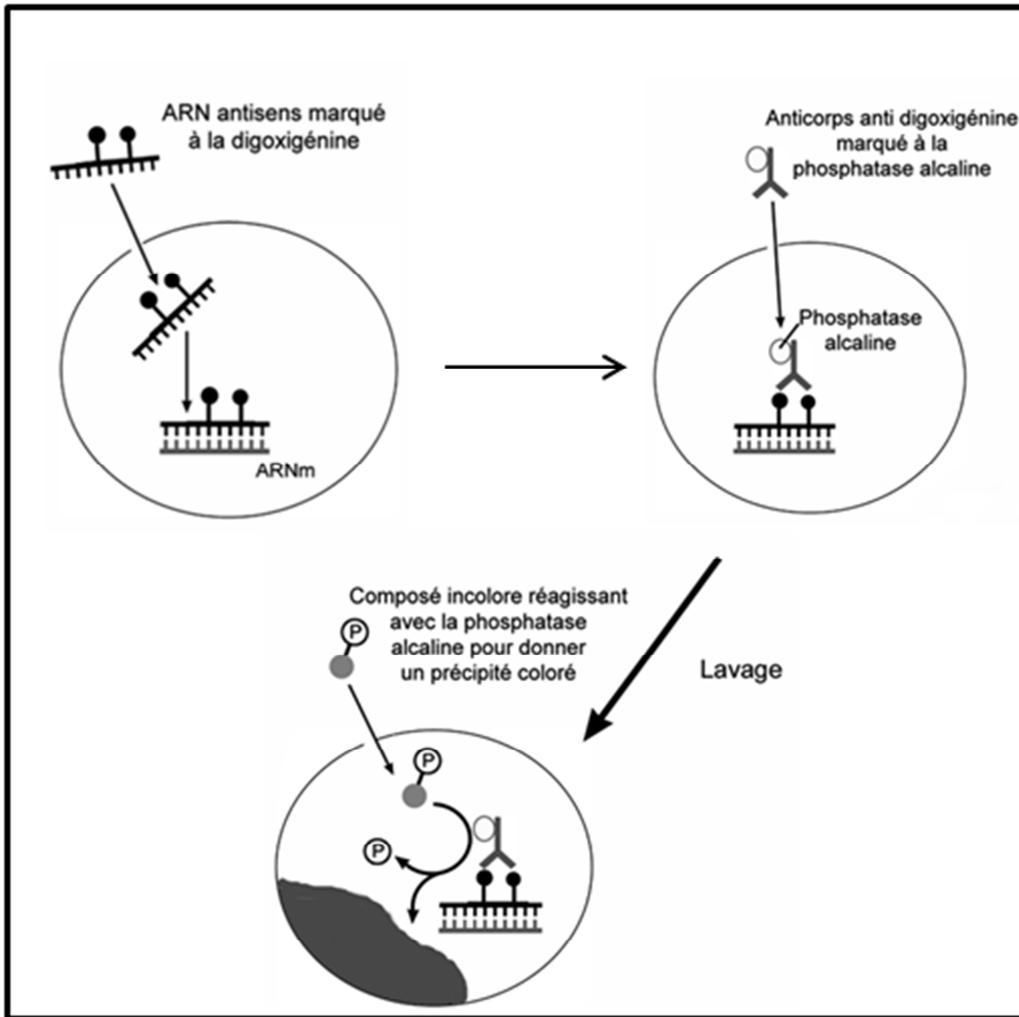


Figure 20 : Hybridation in situ sur embryon entier.

L'ARN antisens est marqué en utilisant de l'uridine conjuguée à la digoxigénine (D'après *Bases cellulaires et moléculaires du développement. Méthodes et exercices* Christophe Chanoine, Ellipses 2007).

I.1.1 Conditions de manipulation :

Avant de commencer l'expression d'HIS, il faut établir un environnement dépourvu d'ARNases. Les ARNases sont des enzymes résistantes et ubiquitaires capables de dégrader la molécule d'ARN. Des procédures de laboratoire très strictes sont à respecter lors de ce type de manipulation pour éviter la contamination des tissus comme le port de gants pendant toute la durée de l'expérience, l'utilisation de matériel « ARNases free », c'est-à-dire qui ont subi des traitements permettant la destruction des ARNases et la stérilisation de toute la verrerie et de tout le matériel possible utilisé pendant l'expérience.

I.1.2 Le choix des sondes :

Les sondes constituent un critère essentiel pour la réussite de l'expérience. Les sondes utilisées sont des simples brins d'ARN (ribosondes), résultant de la transcription *in vitro* d'un morceau d'ADNc cloné dans un plasmide bactérien. La synthèse de ces derniers est effectuée à partir du gène d'intérêt cloné dans le vecteur pSC-A ou bien dans le vecteur pBluescript (Figure 23). Le vecteur est ensuite linéarisé par des enzymes de restriction en fonction du fragment cloné (tableau 5). Le vecteur sert de matrice pour la synthèse de la sonde ARN anti-sens. La conception d'une sonde optimale repose sur les paramètres suivants :

✿ La proportion de la sonde en guanine et cytosine (% GC)

Les paires GC sont plus stables que les paires A-T/U. En effet, les bases G et C sont liées par trois liaisons hydrogène quand les bases A et T/U ne sont liées que par deux. Pour cette raison, une sonde avec un contenu élevé en bases G et C est plus stable qu'une sonde dans laquelle les bases A et T prédominent et il faudra plus d'énergie pour séparer les deux brins de l'hybride. Il existe une relation linéaire entre la stabilité des hybrides d'acides nucléiques et le ratio AT : GC. Ainsi, au moment de la conception de la sonde, on essaiera autant que possible de trouver un compromis respectant un pourcentage optimal de GC.

✿ La longueur de la sonde

La longueur de la sonde est un élément important. En général, les sondes longues permettent l'obtention d'hybrides plus stables et spécifiques. En effet, dans le cas d'un hybride long, les deux brins sont maintenus ensemble par plus de liaisons hydrogène et en conséquence plus d'énergie est nécessaire pour dénaturer les deux brins. Cependant, plus la sonde est longue plus le risque d'avoir des appariements non spécifiques augmente. En conséquence, il faut trouver un compromis entre ces deux facteurs.

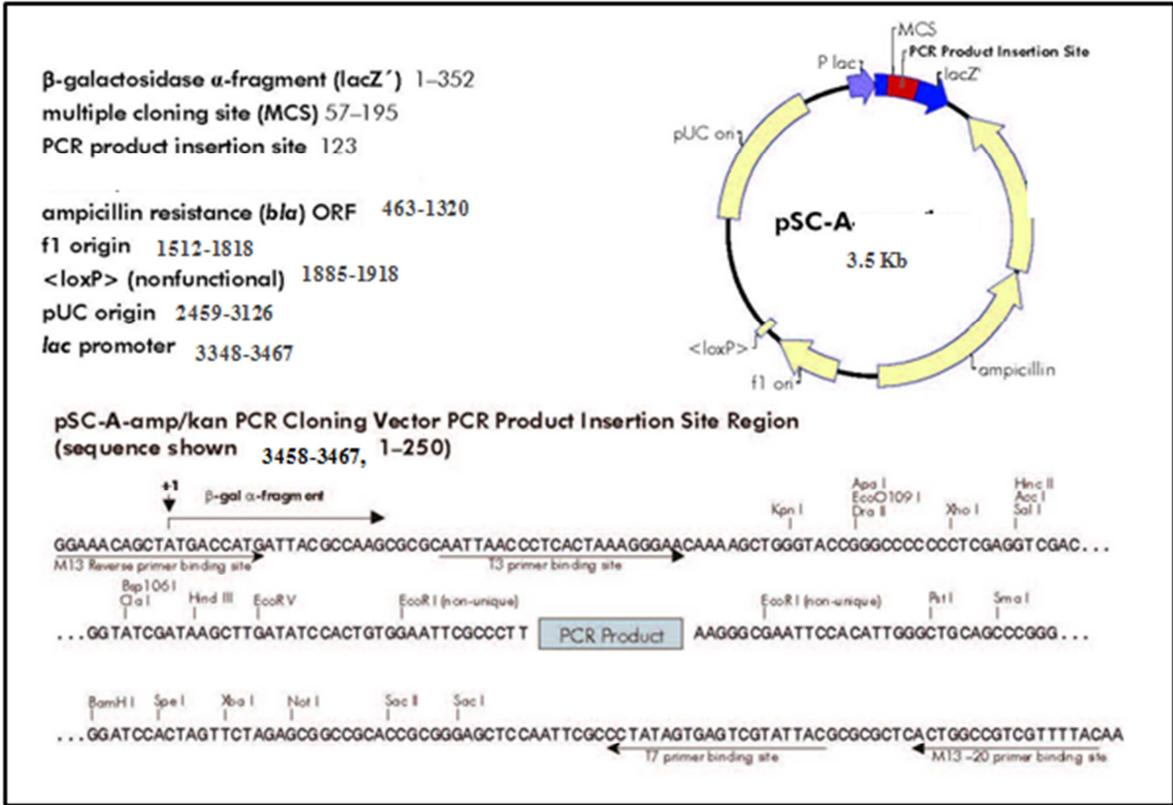


Figure 21 : Carte du plasmide pSC-A.

Sonde	Vecteur	Description
NFATc1	pSC-A	Fragment d'ADNc de souris (519 bp). Antisens linéarisé par SmaI, T3. Résistance à l'ampicilline
NFATc2	pSC-A	Fragment d'ADNc de souris (524 bp). Antisens linéarisé par SmaI, T3. Résistance à l'ampicilline
NFATc3	pSC-A	Fragment d'ADNc de souris (436 bp). Antisens linéarisé par EcoRV, T7. Résistance à l'ampicilline
NFATc4	pSC-A	Fragment d'ADNc de souris (456 bp). Antisens linéarisé par BglII, T7. Résistance à l'ampicilline
Myf5	pBluescript	Antisens linéarisé par Ball- ApaI. Résistance à l'ampicilline
MyoD	pVZCIIa-MyoD1	Fragment d'ADNc MyoD1 (1000 bp) Résistance à l'ampicilline
Myogénine	pBluescript (N13-65-7)	Résistance à l'ampicilline

Tableau 4: les différentes sondes utilisées.

La sonde est synthétisée par une ARN polymérase (T3, T7 ou SP6) pendant 2h à 37°C en présence d'un inhibiteur de RNase pour protéger les sondes synthétisées et de la DNase RQ1 pour dégrader les doubles et simples brins ADN. Les sondes sont ensuite reprises dans du tampon d'hybridation (50 % formamide (v/v), 5X SSC PH 4.5, 0.1% Tween 20, 0.5% CHAPS, 50 µg/mL yeast tRNA, 50 µg/mL héparine, 5 Mm EDTA, Blocking powder).

I.1.3 Étapes de l'hybridation in situ

L'hybridation est effectuée sur des embryons témoins d'E9.5, E10.5 et E11.5. Les embryons sont fixés par du paraformaldéhyde (PFA) 4 % dans une solution de Phosphate Buffer Saline (PBS) et conservés dans du méthanol. Les sondes ARN MyoD, Myf5, Myogénine, MRF4, NFATc1, NFATc2, NFATc3 et NFATc4 déjà synthétisées et marquées à la digoxigénine (DIG) sont utilisées. Les embryons sont réhydratés en solution 50 % éthanol, 30 % éthanol pendant 5 min à chaque fois puis lavés 5 min dans une solution PBT (0.1 % Tween 20). Ils sont ensuite traités 15 min à la Protéinase K (10 µg/ mL), pour augmenter l'accessibilité aux ARNm cibles.

La réaction est stoppée par deux lavages de 5 min dans une solution 2 mg/mL de glycine PBT pour bloquer l'effet de la protéinase K puis lavés 5min en PBT. Ils sont ensuite fixés par du PFA 4%/ glutaraldéhyde 0.2 % dans du PBT pendant 20 min puis lavés 5min en PBT. Une pré-hybridation à 70°C est effectuée dans un tampon approprié (50 % formamide (v/v), 5X SSC pH 4.5, 0.1% Tween 20, 0.5% CHAPS, 50 µg/mL yeast tRNA, 50 µg/mL héparine, 5 Mm EDTA, Blocking powder (400 mg/10 ml)) pendant une heure. Elle est suivie par l'hybridation (sonde à 1µg/mL dans du tampon de pré-hybridation) à 70°C sur la nuit sous agitation. C'est l'étape pendant laquelle la sonde est mise en contact avec l'embryon, permettant ainsi l'hybridation de la sonde aux ARNm cibles.

Les embryons sont lavés 10 min à 70°C dans la solution I de pré-hybridation (50 % formamide (v/v), 5X SSC pH 4.5, 0.1% Tween 20, 0.5% CHAPS, 50 µg/mL yeast tRNA, 50 µg/mL héparine, 5 Mm EDTA, Blocking powder (400 mg/ 10 ml)) ensuite dans une solution II (2X SSC pH 4.5) trois fois 10 min à 70°C et enfin dans une solution III (CHAPS/SSC) deux fois 30 min à 70°C. Un traitement à la RNase (100µg/mL) 1h à 37°C est réalisé. Puis ils sont lavés dans du MAB (100mM acide maléique, 5 M NaCl) deux fois 10 min à température ambiante puis deux fois 10 min à 70°C. Les embryons sont ensuite lavés dans une solution TBST (5M NaCl, 1M KCl, 1M Tris/HCl, 100% Tween 20, 2mM Levamisole, pH 7,5) et préincubés dans du 10 % de sérum de mouton inactivé pendant 4 h à température ambiante sous agitation. Finalement ils sont incubés toute la nuit à 4°C dans une solution d'anticorps anti-DIG (1/5^e) diluée dans 1 % de sérum de mouton inactivé.

Une série de lavages de 1h en MAB est effectuée tout au long du troisième jour. Le but de cette étape est d'éliminer toute hybridation non spécifique produisant un bruit de fond et masquant

les hybridations spécifiques. Les embryons sont ensuite lavés avec une solution de NTMT (MgCl₂ 1 M, NaCl 5M, 1 M Tris/HCl pH 9.5, Tween 20)/ levamisole 2mM et coloré en BM purple / levamisole 2mM. La coloration est arrêtée par des lavages de 5min en PBS et les embryons sont conservés à 4°C dans du PBT.

I.2 Etude des domaines d'expression des facteurs myogéniques et des facteurs NFATs par hybridation in situ sur embryon murin in toto.

I.2.1 Domaine d'expression des facteurs MyoD et NFATc2

Nous avons analysé les domaines d'expression des facteurs de transcription NFATc2 et de MyoD à E10.5 et E11.5 au cours de la myogenèse primaire dans des embryons de souris témoins (Figure 24). MyoD est exprimé faiblement dans les somites à E10.5, alors que son expression est importante à E11.5 au niveau des somites ainsi qu'au niveau des bourgeons de membres antérieur et postérieur et au niveau du cou. NFATc2 n'est exprimé à E10.5 qu'au niveau du bourgeon des membres antérieurs et à E11.5 qu'au niveau du bourgeon des membres postérieurs.

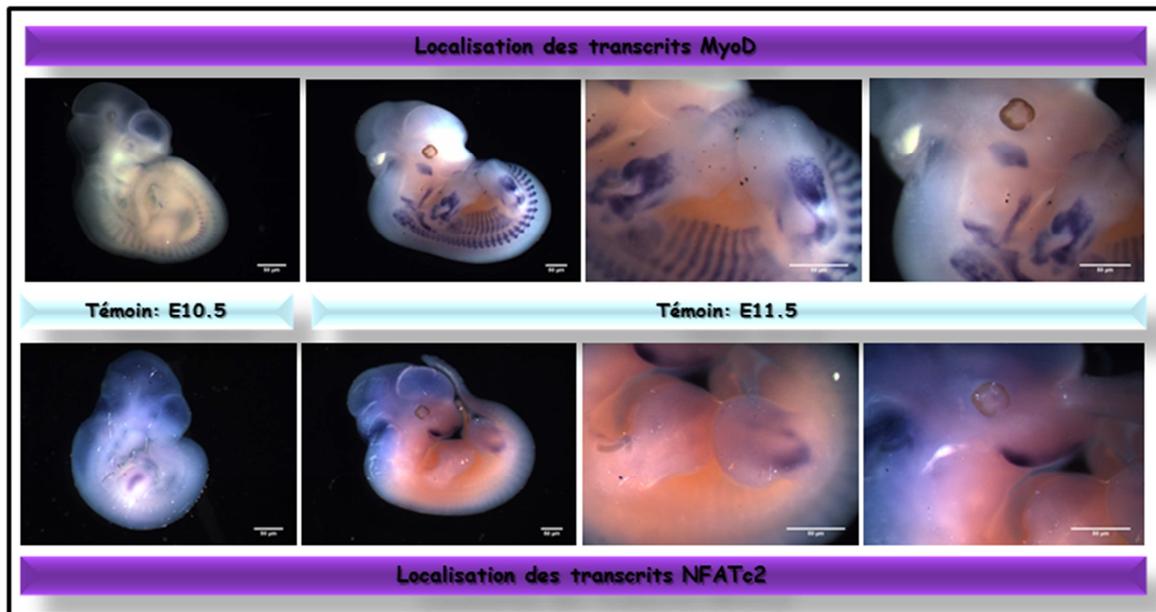


Figure 22 : Localisation des transcrits MyoD et NFATc2 par hybridation in situ dans des embryons témoins à 10.5 et 11.5 de la vie embryonnaire, barre d'échelle (50µm).

I.2.2 Expression des autres facteurs myogéniques et des autres membres de la famille NFAT

La réalisation d'hybridation in situ sur embryon entier avec les sondes NFATc1 et NFATc4 nous permettra de comparer ces domaines d'expression avec ceux obtenus précédemment pour NFATc2 (figure 25). L'expression de NFATc1 est limitée au cœur et à l'espace intersomitique à E9.5. Cette dernière progresse à E10.5 sur l'axe de l'os maxillaire et des arcades mandibulaires et hyoïdes. Elle est très facilement présente dans les zones de condensations précartilagineuses qui donneront naissance aux doigts à E11.5. NFATc4 n'est pas exprimé à E9.5. Son expression est observée dans les bourgeons de membres antérieur et postérieur à E10.5 dans les somites et au niveau de l'os maxillaire et des arcades mandibulaires et hyoïdes. À 11.5, l'expression de NFATc4 est difficilement détectable au niveau du bourgeon des membres antérieurs et postérieurs.

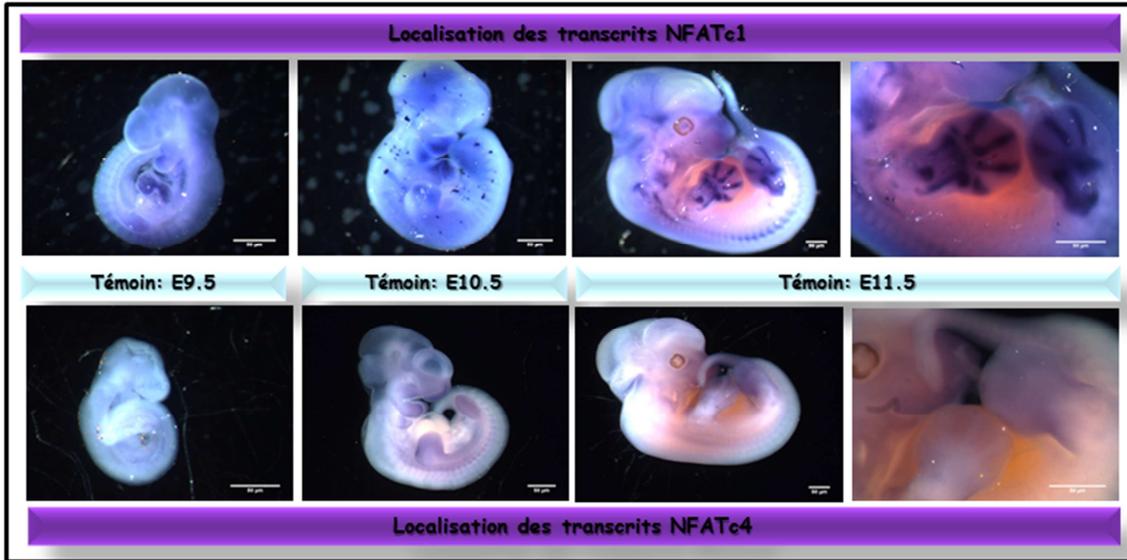


Figure 23 : Localisation des transcrits NFATc1 et NFATc4 par hybridation in situ dans des embryons témoins à 9.5, 10.5 et 11.5 jours de la vie embryonnaire, barre d'échelle (50µm).

L'expression des facteurs myogéniques Myf5 et la myogénine est détectée au niveau des somites à E9.5 et E10.5. À E11.5 l'expression de Myf5 est forte dans la région caudale. L'expression de la myogénine s'étend dans les régions antérieures et postérieures des bourgeons de membre à ce stade du développement (Figure 26).

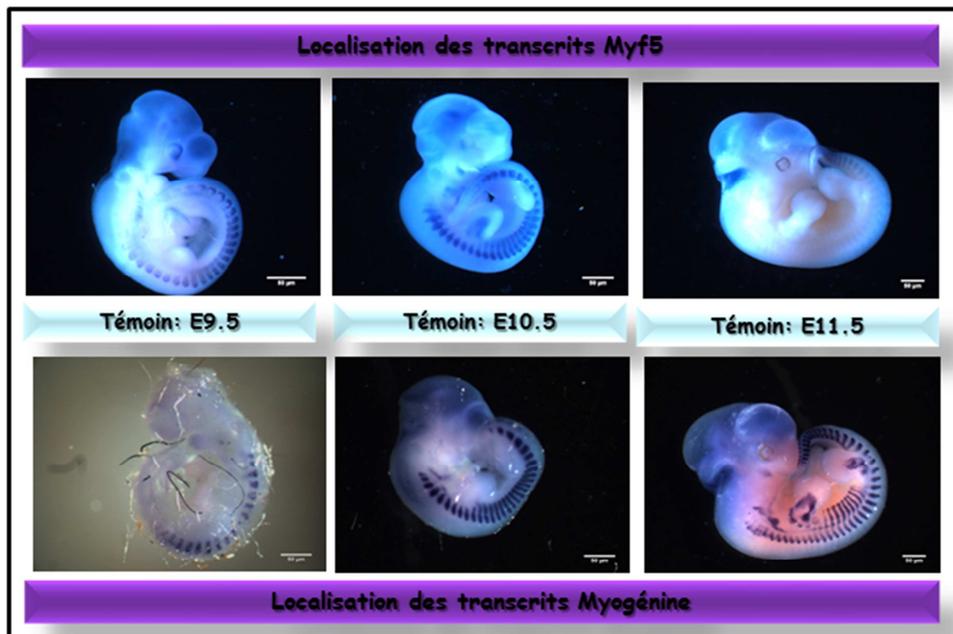


Figure 24 : Localisation des transcrits Myf5 et de la myogénine par hybridation in situ dans des embryons témoins à 9.5, 10.5 et 11.5 jours de la vie embryonnaire, barre d'échelle (50µm).

I.3 Conclusion

Au cours de l'embryogenèse, les domaines d'expression des MRFs et des facteurs NFATs ont pu être visualisés par hybridation in situ entre E9.5 et E11.5 au cours de la myogenèse primaire.

L'avantage de cette technique est de pouvoir observer l'expression spatio-temporelle des gènes. Cependant, la très faible expression de certains transcrits peut rendre délicate l'étude des domaines d'expression par hybridation in situ. D'une manière générale, l'accumulation des transcrits NFATs est beaucoup plus faible que celles des facteurs myogéniques.

Si l'expression de NFATc2 et NFATc4 est particulièrement faible au niveau des somites comparativement à celle de NFATc1, il apparaît que l'accumulation des ARNm NFATc2 est relativement importante dans les bourgeons de membres, dans des zones exprimant les facteurs myogéniques et donc correspondant à des muscles en formation. Cette observation est à mettre en relation avec l'analyse présentée dans notre article sur l'implication du complexe MyoD/NFATc2 dans la myogenèse.

II NFATc2 régule spécifiquement l'expression de la chaîne lourde néonatale de myosine en coopération avec MyoD au cours de la myogenèse chez la souris (article)

II.1 Introduction

Le muscle strié squelettique présente une grande diversité structurale et fonctionnelle, montrée par les différents types de fibres qui le composent. Ces types de fibres diffèrent dans leur morphologie, leurs propriétés contractiles et biochimiques. Chez les souris, on distingue quatre types de fibres musculaires exprimées au cours de la vie adulte et réparties en deux groupes majoritaires, les fibres lentes de type I et les fibres rapides de type II a, II b et II d/x. Par ailleurs, on retrouve deux isoformes de MyHC exprimées au cours du développement: la MyHC embryonnaire et la MyHC néonatale. Une transition entre ces isoformes et les isoformes adultes se produit au cours de la vie postnatale et dans les muscles adultes en régénération.

De nombreuses études ont souligné l'implication de la voie de signalisation calcineurine/NFAT dans la spécification des fibres musculaires adultes. Cependant, son rôle dans l'établissement du phénotype musculaire au cours de l'embryogenèse reste peu connu. Il a été montré que les quatre isoformes NFATc1-c4 sont exprimées dans le muscle squelettique adulte et que la combinaison de ces membres détermine la spécification de chaque type de fibre par régulation de l'expression des différentes isoformes de myosine [4]. En 2008, un nouveau paradigme de la transcription a été démontré [207], où une protéine NFAT pourrait coopérer spécifiquement avec un MRF : en effet, l'isoforme, NFATc3, coopère avec MyoD pour activer l'expression de la myogénine au cours de la somitogenèse. Ce rôle est spécifique du complexe NFATc3/MyoD puisque les souris mutantes *myod* (-/-); *nfatc2* (-/-) ne présentent aucune modification de l'expression de la myogénine au cours de la somitogenèse.

Nous présentons dans la deuxième partie des résultats un nouveau réseau contrôlant l'expression d'une isoforme particulière de myosine. Nous montrons *in vivo* que les muscles des embryons mutants *myod* (-/-); *nfatc2* (-/-) sont dépourvus de MyHC néonatale tandis que les simples mutants ne sont pas affectés par l'absence combinée de ces deux protéines. L'interaction physique *in vitro* entre les deux protéines est spécifique et ces deux protéines sont requises pour activer l'expression de la MyHC néonatale. Notre travail exposé dans le papier démontre pour la première fois que la voie calcineurine/NFATc2 joue un rôle important dans la construction précoce de la fibre musculaire en régulant l'expression de la MHC néonatale et en coopération avec MyoD.

II.2 Article

A new role for the calcineurin/NFAT pathway in the myofiber establishment through the NFATc2/MyoD complex during mouse myogenesis

Nissrine DAOU¹, Sylvie LECOLLE¹, Bruno DELLA GASPERA, Frédéric CHARBONNIER, Christophe CHANOINE², Anne-Sophie ARMAND²

Centre d'Etude de la Sensori-Motricité, UMR 8194 CNRS, Université Paris Descartes, Centre Universitaire des Saints-Pères, 45 rue des Saints-Pères, F-75270 Paris Cedex 06, France.

¹ **These authors contributed equally to this work**

² **Corresponding authors:** Anne-Sophie Armand and Christophe Chanoine, CESEM, UMR 8194, Université Paris Descartes, Centre Universitaire des Saints-Pères, 45 rue des Saints-Pères, F-75270 Paris Cedex 06, France. Tel/Fax : 01 42 86 21 19. E-mail : anne-sophie.armand@parisdescartes.fr; christophe.chanoine@parisdescartes.fr

Key words: MyoD, NFAT, myogenesis, calcineurin, skeletal muscle, myogenic regulatory factors, myosin heavy chain

Running title: MyoD /NFATc2 controls neoMHC

Manuscript information:

Abstract: 180 words

Body text: 8711 words

5 Figures, 2 Supplementary Figures, 1 Table, 1 Supplementary Table

ABSTRACT

The calcineurin/NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells) signaling pathway is involved in the modulation of the adult muscle fiber type, but its implication in the establishment of the muscle phenotype remains elusive. Here, we show that the NFAT member NFATc2 cooperates with the basic helix-loop-helix transcription factor MyoD to induce the expression of a specific myosin heavy chain (MHC) isoform, the neonatal one, during embryogenesis. We found this cooperation to be crucial, since *myod/nfatc2* double null mice die at birth, with a dramatic reduction of the major neonatal MHC isoform normally expressed at birth in skeletal muscles, such as limb and intercostal muscles, whereas its expression is unaffected in myofibers mutated for either factor alone. Using gel shift and chromatin immunoprecipitation assays, we identified NFATc2 bound to the *neonatal mhc* gene, whereas NFATc1 and NFATc3 would preferentially bind the *embryonic mhc* gene. We provide evidence that MyoD synergistically cooperates with NFATc2 at the *neonatal mhc* promoter. Altogether, our findings demonstrate that the calcineurin/NFAT pathway plays a new role in establishing the early muscle fiber type in immature myofibers during embryogenesis.

INTRODUCTION

Vertebrate skeletal muscles contain a heterogeneous population of muscle fibers. Depending on their contraction properties and the expression of activity-dependent genes, mammalian skeletal muscle fibers are classified into four types, including slow or type I and three subtypes of fast or type II fibers, type IIa, IIx and IIb (Brooke and Kaiser, 1970). Each fiber type is defined by the expression of specific isoforms of myosin heavy chains (MHC) (Schiaffino and Reggiani, 1996). The specification of mature fiber types is modulated by neural and hormonal influences but their early appearance and diversification takes place during the developmental and early post-natal life independently of neural influences (Condon et al., 1990). In contrast to the adult MHC isoforms expressed throughout adult life, the embryonic (emb MHC) and neonatal (neo MHC) MHC isoforms are only expressed in immature myofibers, during development and in regenerating adult muscle fibers in all muscles (Allen and Leinwand, 2001; Lyons et al., 1990). In these immature myofibers, as well as in cultured myotubes, all MHC isoforms are expressed in a cell autonomous manner, independently from the nerve activity. After birth and in regenerating muscle fibers, a switch from expression of embryonic and neonatal MHC to adult MHC occurs such as developmental MHC proteins (emb MHC and neo MHC) represent only 1% of the total MHC proteins 20 days after birth (Allen and Leinwand, 2001). As the expression pattern of each MHC isoform is different in time and in myofiber nature, the signaling pathways and transcriptional regulators of each MHC isoform are probably different.

One of the major modulators of the specification of the adult muscle fiber type is the calcineurin/NFAT signaling pathway. Calcineurin is a Ser/Thr phosphatase, whose activity is regulated by the intracellular concentration of Ca^{2+} . Once activated, calcineurin

dephosphorylates transcription factors, such as members of the NFAT (Nuclear Factors of Activated T-cells) family, allowing NFAT to translocate to the nucleus where it cooperates with other transcription factors to induce transcription of target genes. Five NFAT genes have been identified, NFATc1-c4 and NFAT5 (Rao et al., 1997). Only the NFATc1-c4 are regulated by calcineurin. All four NFATc have been shown to be expressed in adult skeletal muscles at the RNA and protein levels (Calabria et al., 2009). Combination of these four NFAT family members determines the nerve activity-dependent specification of each adult fiber type by differentially regulating the expression of the MHC isoforms (Calabria et al., 2009): type I MHC is expressed as all four NFAT members are actively translocated; type IIb MHC is expressed in muscle cells with nuclear NFATc4 alone. These findings suggest that all four NFAT family members play a special role in modulating the adult myofiber types in response to the nerve activity and that an increased activation of the calcineurin/NFAT pathway promotes the slow gene program, as also been suggested by previous studies (Chin et al., 1998; Naya et al., 2000). Among the NFAT members, NFATc1 would play a crucial role in regulating this muscle slow phenotype, since not only NFATc1 would activate the expression of the slow MHC isoform (type I MHC), but also down-regulates the type IIb MHC expression in adult myofibers (Schiaffino, 2010). Altogether, these results suggest a central role of the calcineurin/NFAT pathway in the activity-dependent specification of the adult muscle fiber type. However its role in the establishment of the muscle phenotype remains elusive, particularly during embryogenesis.

Muscle fiber formation is under the control of muscle specific transcription factors, the myogenic regulatory factors (MRF): MyoD, Myf5, MRF4 and myogenin. In concert with many cofactors, these basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factors direct the

expression of muscle specific genes, via their DNA binding elements, E-boxes (Buckingham, 1996). E-boxes are found in promoters of many muscle specific genes, including the MHC isoforms (Beylkin et al., 2006; Wheeler et al., 1999). Some in vitro studies suggest that MyoD would preferentially activate the emb MHC isoform, whereas the neo MHC expression would better be regulated by the calcineurin/NFAT pathway (Beylkin et al., 2006).

We previously demonstrated a new transcriptional paradigm where NFAT proteins could cooperate with MRF (Armand et al., 2008). One NFAT isoform, NFATc3, cooperates with MyoD to activate myogenin expression during somitogenesis, a specific role for NFATc3/MyoD, since a *myod/nfatc2* deletion does not induce any modification in myogenin expression in somites. In contrast to *nfatc3*^{-/-} mice characterized by a decrease in the adult myofiber number (Kegley et al., 2001), the reduction of muscle mass in *nfatc2* null mice is probably due to a defect in skeletal muscle growth (Horsley et al., 2001). Indeed NFATc2 regulates the growth of nascent myotubes in primary cultures, by promoting the fusion of myoblasts to pre-existing myotubes (Horsley et al., 2001; Horsley et al., 2003), time corresponding to the establishment of the early specification of myofibers. As both MRF and NFAT transcription factors are involved in the regulation of the different MHC isoform expression and given that NFATc2 promotes the growth of myotubes, we hypothesize that cooperations between NFAT and MRF proteins could be one of the keys to acquire the myofiber phenotype.

In this study, we provide a new regulatory network controlling the expression of one particular MHC isoform during embryogenesis. We show that the calcineurin/NFATc2 signaling pathway controls the neonatal MHC isoform expression in vivo, since hindlimb skeletal muscle myofibers of double null *myod/nfatc2* E18.5 embryos are devoid of neonatal

MHC, the major isoform expressed in muscle cells at birth, whereas neo MHC expression is unaffected in muscles with single null mutations for either *nfatc2* or *myod*. In vitro, the physical interaction between these two transcription factors is specific and both proteins are required on the promoter to activate synergistically the expression of neo MHC. Overall, this study demonstrates that the calcineurin/NFATc2 pathway plays a critical role in the establishment of the muscle cell fiber type during embryogenesis, by regulating specifically the neo MHC isoform in cooperation with MyoD.

MATERIALS AND METHODS

Animals. *myod* and *nfatc2* null mice were generously provided by Shahragim Tajbakhsh (Paris, France) and Laurie Glimcher (Boston, US) and were described previously (Hodge et al., 1996; Rudnicki et al., 1993). Double null *myod/nfatc2* mice were generated by cross-breeding single knockout mice. All protocols were performed according to institutional guidelines and approved by local Animal Care and Use Committees.

Cell culture, transfections. Cell culture of C2C12 and COS7 cells was described previously (Armand et al., 2008). Transfections were performed using Fugene HD (Roche Applied Science) and the dual luciferase system (Promega). Small interfering RNA (NFATc2, Dharmacon; MyoD, Dharmacon) transfections were performed using DharmaFECT3 (Dharmacon). Total RNAs and proteins were extracted 2 and 3 days after transfections respectively.

Primary myoblasts were isolated from hindlimb muscles of E18.5 WT, *myod*^{-/-}, *nfatc2*^{-/-} or *myod*^{-/-};*nfatc2*^{-/-} embryos. In brief, muscles were partly digested during 1 hour 30 minutes in DMEM medium containing 0.5 mg/mL collagenase (Sigma) and 3.5 mg/mL dispase (Gibco).

Supernatants were filtered through a 40 μ m cell strainer. Cells were pre-plated during 4 hours, centrifuged, washed and counted. For differentiation assays, cells were plated on Matrigel (Sigma) coated dishes in IMDM Glutamax (Invitrogen) supplemented with 1% chick embryo extract (Sera laboratories), 20% fetal bovine serum (Invitrogen) and gentamycin at 0.05 mg/mL for 4 days prior differentiation. Differentiation was induced by switching to differentiation medium (DM) (IMDM, with gentamycin and 2% horse serum (Invitrogen)). Fusion index was calculated as the percentage of nuclei inside myotubes with more than two nuclei relative to the total number of nuclei in myoblasts and myotubes.

Cloning. NFATc2 constructs were inserted in frame into pBind (Promega) and pCDNA3.1/V5/His (Invitrogen) vectors. Expression vectors for an activated mutant of CnA or deletion fragments for MyoD were described previously (Armand et al., 2008). MyoD, NFATc2 and NFATc3 expression vectors are a kind gift from J. Molkenin and E. Olson. Detailed information about vectors and oligo sequences is available upon request.

Chromatin immunoprecipitations. Chromatin IP were performed as described in detail previously (Armand et al., 2008), using C2C12 cells cultured either in proliferating medium or in differentiation medium for 96 hours. Precleared chromatin was immunoprecipitated with 5 μ g of monoclonal anti-NFATc3 (sc-8405X, Santa Cruz), polyclonal anti-NFATc2 (sc-13034X, Santa Cruz), monoclonal anti-NFATc2 (sc-7296X, Santa Cruz), polyclonal anti-NFATc1 (sc-1789, Santa Cruz), monoclonal anti-MyoD (sc-760, Santa Cruz), polyclonal anti-MyoD (sc-304X, Santa Cruz) or a polyclonal anti-NFATc2 (kind gift from JM Redondo, Madrid, Spain). One tenth of the immunoprecipitated DNA and input DNA (from extracts before immunoprecipitation) was analyzed using real-time PCR reactions on an ABI Prism

7700 apparatus (Applied Biosystems). Oligos used for the PCR amplifications were as described in supplementary table 1.

Nuclear extracts and electrophoretic mobility shift assay. C2C12 cells were transfected with expression vectors for MyoD, NFATc2 and a constitutive activated form of calcineurin and cultured 48h in proliferating medium. Nuclear extracts were prepared as described previously (Martínez-Martínez et al., 1997). Cells were re-suspended in 600 μ L of ice-cold buffer A (10 mM HEPES, pH 7.6, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 0.75 mM spermidine, 0.15 mM spermine, 1 mM dithiothreitol, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mM Na₂MoO₄, 1 μ g/mL pepstatin, and leupeptin and aprotinin at 2 μ g/mL each). After 15 minutes on ice, cells were lysed with 0.6% (v/v) Nonidet P-40. The nuclear pellet was extracted with 50 μ L of buffer C (20 mM HEPES, pH 7.6, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mM Na₂MoO₄, 1 μ g/mL pepstatin, and leupeptin and aprotinin at 4 μ g/mL each). Nuclear extracts were collected and stored at -80°C. Protein concentration was determined by Bradford assay (Bio-Rad).

Gel retardation assays were performed as in Martínez-Martínez *et al.* (Martínez-Martínez et al., 1997). Nuclear extracts (5 μ g) were incubated with 1 μ g of poly(dI-dC) in DNA binding buffer (2% (w/v) polyvinylethanol, 2.5% (v/v) glycerol, 10 mM Tris, pH 8, 0.5 mM dithiothreitol) on ice for 15 minutes. Then, 100 000 cpm of ³²P-labelled double stranded oligonucleotides was added and incubated at room temperature for 30 minutes. In competition experiments, a 20-fold molar excess of unlabeled homologous oligonucleotides was added to the binding reaction mixture prior to the probe. The DNA-protein complexes were resolved by electrophoresis on a 4% non denaturing polyacrylamide gel. The following sequences of

the nucleotides used as probes in EMSAs were: the NFAT site N2 from the *neo mhc* promoter (N2 neo: 5'-gatcCCAATGGTGGAGACTCAGCATA-3'), the NFAT site N3 from the *neo mhc* promoter (N3 neo: 5'-gatcACAAATAAGGAAAGTGAGTTGC-3'), the NFAT site N3 from the *emb mhc* promoter (N3 emb: 5'-gatcGGATTATATTCCCAGTGCTGAA -3'). The pairs of complementary synthetic oligonucleotides were annealed and labeled with the Klenow fragment of the DNA polymerase I.

Supershift assays were performed by incubating nuclear extracts for 15 minutes at 4°C prior to the addition of the probe with either negative control rabbit anti-mouse Gal4 (Santa Cruz), or monoclonal anti-NFATc2 (sc-7296X, Santa Cruz).

Isolation and purification of total RNA and real-time PCR. Primers were designated to detect the different transcripts for MyoD, NFATc2, the neo, emb, type I, IIa, IIb, and IIx MHC isoforms (see supplementary table 1) (Richard et al., 2011). Total RNA was isolated using TRIzol reagent (Invitrogen). One µg of RNA was used as template for Superscript reverse transcriptase II (Promega). For real-time RT-PCR, the ABI Prism 7700 (Applied Biosystems) and SYBR Green (Applied Biosystems) were used as described in detail previously (Armand et al., 2004).

Antibodies. Antibodies used were: sarcomeric MHC (MF20, monoclonal, 1/100), embryonic MyHC (F1.652, monoclonal, 1/20 in IHC or 1/200 in WB), and neonatal MyHC (N3.36, monoclonal, 1/20 in IHC or 1/200 in WB) antibodies from Developmental Studies Hybridoma Bank (Iowa University); V5 (monoclonal, 1/1000) from Invitrogen; Gal4 (monoclonal, 1/2500) from Santa Cruz; GAPDH (monoclonal, 1/5000) from Millipore; slow type I MyHC (NCL-MHCS, monoclonal, 1/20 in IHC or 1/200 in WB), all fast type II MyHC (NCL-MHCf,

monoclonal, 1/20 in IHC or 1/200 in WB) from Leica; desmin (monoclonal, 1/200) antibody from Dako; GFP (rabbit polyclonal, 1/250) antibody from Abcam.

Secondary antibodies used for immunohistochemistry were AlexaFluor anti-mouse or anti-rabbit 488 or 549 (1/200, Jackson ImmunoResearch).

Histological analysis and immunofluorescence. For structural analysis, E14.5 and E18.5 hindlimb, intercostal and cardiac muscles were fixed with 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Sections (7 μm) were cut and stained with hematoxylin and eosin, or incubated with antibodies against the different MHC isoforms. Sections were rehydrated and epitopes demasked in 4 times 5 minutes boiling pH 2 citric acid (except for neonatal MHC detection, pH 6 citric acid) prior incubation overnight at room temperature with the primary antibody diluted in 1% BSA.

For cryostat sections, unfixed *tibialis anterior* (TA) were directly frozen in cold isopentane and 10 μm transverse cryostat sections were realized and incubated with the appropriate antibodies. For GFP staining, sections were fixed 20 minutes in 4% paraformaldehyde, treated with PBS/Triton X-100 0.5% for 2 minutes, then incubated 1 hour in 4% goat serum in 4% BSA/PBS/Tween 0.1% and overnight with the antibody, diluted in PBS/Triton X-100 0.5%. For neo MHC staining, muscle sections were fixed 20 minutes at room temperature in acetone and immersed in blocking solution containing 4% BSA in PBS/Tween 0.1%, prior incubation overnight at room temperature with the primary antibody diluted in 2% BSA/PBS/Tween 0.1%.

Electroporation. *Tibialis anterior* (TA) of 5 day old WT mice were injected with 4U hyaluronidase 2 hours prior injections of 10 μg of scrambled siRNA or 5 μg siRNAs directed

against MyoD or NFATc2 and 5 μ g of scrambled siRNA, or 5 μ g of each NFATc2 and MyoD siRNAs, combined with 10 μ g of a GFP expression plasmid. Six 65V/cm pulses of 60 ms, with 100 ms interval were applied. Muscles were collected 5 days after gene delivery.

Immunocytochemistry. Myotubes were fixed in 4% paraformaldehyde, permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 5 minutes, and incubated with primary antibodies diluted in 20 mM Tris, 155 mM NaCl, 2 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, pH 7.5. At the end, nuclei were stained with Bis-benzimide (Sigma) and cells were mounted.

Co-immunoprecipitation assays. V5/His tagged MyoD or NFATc2 constructs were immunoprecipitated using Ni-NTA beads (Invitrogen), followed by Western blotting procedures as described in detail previously (Armand et al., 2004).

Western blot analysis. Muscles were frozen and total protein extracts were prepared in lysis buffer plus protease inhibitors as described in detail previously (Armand et al., 2011). To detect MHC proteins, the lysis buffer is composed of 20 mM sodium phosphate pH 7, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1% NP40, 10% glycerol, phosphatase and protease inhibitors. 40 to 80 μ g of each protein lysate or immunoprecipitated proteins were separated on 7.5 to 12% SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane, and probed with the indicated antibodies prior the corresponding horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies and ECL detection.

Statistical analysis. The results are presented as means \pm s.e.m. Statistical analyses were performed using INSTAT 3.0 software (GraphPad, San Diego) and Student's t-test or ANOVA followed by Tukey's post-test when appropriate. Statistical significance was accepted at a P value < 0.05.

RESULTS

NFATc2 and MyoD cooperate to specifically induce the expression of the neonatal MHC isoform during embryonic myogenesis

In order to study a potential cooperation between NFATc2 and MyoD *in vivo*, we produced a mouse model combining defective alleles for both genes. Although *myod* null and *nfatc2* null mice were fertile, the genotypic distribution of the *myod:nfatc2* double null pups does not conform to Mendel's Law: the prevalence of *myod:nfatc2* double mutant pups is about 85% less than expected at birth (Table 1), whereas it is in accordance with the Mendel's Law in double mutant embryos at E10.5 (data not published), suggesting embryonic or neonatal lethality. The collection of lungs from wild-type, *nfatc2* null, *myod* null and double null mutants at birth revealed that double mutants were not able to breath, since their lungs were the only ones sinking to the bottom of the tube, indicating that alveoli had never inflated (Fig. S1A). The morphology of hearts dissected from newborn mice seems similar in each genotype (Fig. S1B). These observations suggest that NFATc2 and MyoD could cooperate *in vivo* and that this cooperation is crucial for the embryo to live.

As MyoD expression is restricted to the skeletal muscle tissue, we decided to focus the analysis of the MyoD/NFATc2 cooperation during skeletal myogenesis. To describe the myogenic defects in *myod/nfatc2* double mutants, immunochemistry experiments using desmin antibodies were performed on sections of hindlimbs from wild-type, *myod*, *nfatc2*, and *myod/nfatc2* mutant embryos collected at different developmental time points: from the end of primary myogenesis until birth (E14.5 and E18.5) and the morphology of muscle fibers

was analyzed. These double mutant muscle fibers displayed atrophy at E14.5 and E18.5 (Fig. 1). However, the atrophy observed in double mutant embryos is not specific from the double mutation, since the *myod/nfatc2* double null limb muscles were atrophied to the same extent as *nfatc2* null muscles, whereas limb muscles from *myod* null mice were not significantly different from wild-type muscles (Fig. 1A,B). These results showed that the reduction of size of the *myod/nfatc2* mutant myofibers is not due to the combined absence of MyoD and NFATc2 but is only caused by the lack of NFATc2 protein, which is consistent with previous studies showing that the growth of multinucleated muscle cells is regulated by a NFATc2-dependent pathway (Horsley et al., 2001).

As it has been reported that the calcineurin/NFAT signaling pathway is involved in the acquisition of the adult myofiber phenotype (Calabria et al., 2009), and given that the myogenic regulatory factors of the MyoD family might regulate MHC expression, we next analyzed the potential changes of myofiber typology in *myod/nfatc2* mutant muscles during embryogenesis (Fig. 2). Remarkably, we observed by Western blot a dramatic decrease of neo MHC protein in E18.5 muscles collected from *myod/nfatc2* double mutants, whereas emb, type I and type II MHC were similarly accumulated in E18.5 hindlimb muscles from mice of each genotype (Fig. 2A). By immunohistochemistry on transverse sections of posterior limb muscles from wild-type, *myod*, *nfatc2* and *myod/nfatc2* mutant embryos, the neonatal MHC protein was barely detected in limb and intercostal muscles of *myod*^{-/-}:*nfatc2*^{-/-} embryos at E14.5 and E18.5 (Figs. 2B, S2), whereas it was expressed in roughly 25 to 50% of the WT and *myod* null myofibers and in 15 to {Citation}30% *nfatc2* null myofibers from E14.5 and E18.5 embryos respectively (Fig. 2C). In contrast, almost all limb myofibers from embryos of each genotype were expressing the embryonic MHC isoform (Fig. 2D) and the percentage of

fibers expressing the type I MHC isoform was similar in all WT and mutant muscles at E18.5, with a significant decrease in type I expressing myofibers from E14.5 *myod/nfatc2* double mutants, suggesting a delay in the expression of this MHC isoform (Fig. 2E). Altogether, these results show that MyoD and NFATc2 cooperate during secondary myogenesis to specifically induce the expression of the neonatal MHC isoform.

NFATc2 and MyoD are required for neonatal MHC expression in postnatal and cultured muscle cells

At birth, the neonatal isoform is the major MHC isoform expressed in hindlimb muscles (Allen and Leinwand, 2001). Between 5 to 20 days after birth, its expression decreases to disappear completely in adult muscles (Allen and Leinwand, 2001). To verify whether MyoD and NFATc2 could regulate the neonatal MHC isoform in muscle fibers after birth as during embryogenesis, we electroporated *tibialis anterior* (TA) of 5 day old wild-type mice with either a scrambled siRNAs or siRNAs directed against MyoD, NFATc2 or combination of both siRNAs. To verify the efficiency of electroporation, we electroporated siRNAs in combination with a GFP expressing plasmid (Fig. 2G). 4 days after electroporation, we observed by Western blot and immunohistochemistry a decrease of neo MHC expression in TA electroporated with both NFATc2 and MyoD siRNAs, compared to TA electroporated with either a scrambled siRNA or with NFATc2 or MyoD siRNA alone (Fig. 2F,H).

To verify the cooperative effect of MyoD and NFATc2 on the neonatal MHC expression in culture, we isolated myoblasts from E18.5 WT, *myod*, *nfatc2* and *myod/nfatc2* mutant embryos. Plated at high density, these myoblasts were able to form proper, myogenin positive myotubes whatever the genotype is (Fig. 3A). The percentage of myotubes expressing the

neonatal MHC isoform was similar in all cell cultures after 3 days in differentiation medium (Fig. 3D). However, when cultured 6 days in differentiation medium, the proportion of neo MHC positive myotubes from *myod/nfatc2* double mutant embryos was much smaller than in *myod* or *nfatc2* single mutant cultures (approximately 5% vs 25 and 20%) and in WT cultures (more than 35%), whereas the percentage of myotubes expressing the emb MHC isoform is similar in single and double mutant myotubes after both 3 and 6 days in differentiation medium (Fig. 3C). No significant difference of the fusion index was observed in any cell culture experiment (Fig. 3B), indicating that decrease of neonatal MHC content in *myod/nfatc2* double mutant cell cultures at 6 days of differentiation is not caused by an impaired myotube fusion. To test the differentiation state of myotubes, we determined the distribution of myotubes with equivalent numbers of nuclei (Fig. 3E). If WT myotubes were clearly more matured than single mutant myotubes, the *myod/nfatc2* null myotubes were roughly at the same stage of differentiation than *myod* null and *nfatc2* null myotubes. Indeed around 40% of the WT myotubes had 2 to 5 nuclei, 3 and 6 days after allowing myoblasts to differentiate, whereas myotubes with 2 to 5 nuclei represent more than 60% of *nfatc2* null myotubes and more than 75% of the *myod* null and *myod/nfatc2* double null myotubes at both differentiation time points (Fig. 3E).

Combined together, these results demonstrate the essential role for NFATc2 and MyoD to cooperatively regulate the neonatal MHC expression, in culture and in vivo, during embryogenesis and after birth.

NFATc2 cooperates with MyoD and not with Myf5 to activate the promoter of neo mhc.

To better characterize the cooperation between NFATc2 and MyoD, we analyzed whether forced overexpression of calcineurin/NFAT and MyoD or Myf5 could activate the promoter of the *embryonic* or the *neonatal mhc*. Transient co-transfection assays were performed with luciferase reporters driven by the promoters of either *emb mhc*, *neo mhc* or *type I mhc* (Fig. 4A). Luciferase activity was induced in C2C12 cells cultured in proliferation medium and transfected with MyoD or Myf-5, NFATc2 or NFATc3, and combinations thereof. Combined transfections of MyoD with either NFATc2 or NFATc3 were required to get the maximal transcriptional activation of *emb* and *type I mhc* promoters, whereas transfection of MyoD with NFATc2, and not NFATc3, was the best combination to get the maximal induction of the *neo* MHC luciferase activity compared to C2C12 cells transfected with the luciferase reporters alone (Fig. 4A). Myf5 overexpression was overall much less efficient than MyoD to activate all three promoters in combination with any NFAT isoform, suggesting a specific regulation of the neonatal MHC expression by NFATc2 and MyoD.

We next tested whether endogenous NFATc2 and MyoD could regulate the endogenous expression of the different MHC isoforms. To do so, we first precisely analyzed their expression in differentiating C2C12 cells (Fig. 4B). The embryonic, type I, IIx and IIb isoforms of MHC were detected by qPCR soon after the cells were switched to differentiation medium (DM). The neonatal and type IIa MHC isoforms were detected later in these cultured cells, after 4 days of differentiation. Transcripts of most of the MHC isoforms were highly accumulated in C2C12 cells after 7 days of differentiation, except type IIa MHC isoform mRNA. To test the in vitro effect of either MyoD or NFATc2 on the expression of the MHC isoforms, differentiating C2C12 cells were transfected with small interfering RNA (siRNA) directed against either MyoD, NFATc2 or both at day 4 of differentiation and the MHC

isoform transcripts were collected and analyzed after 6 days of differentiation. These transfection assays resulted in the specific down-regulation of the neonatal MHC isoform in cells transfected with both MyoD and NFATc2 siRNA, confirming a regulation of this isoform by the cooperation of both transcription factors (Fig. 4C).

NFATc2 and MyoD directly activate the neonatal mhc promoter

To define the mechanisms behind the regulation of the neonatal and embryonic MHC expression by calcineurin/NFAT signaling, we searched for enhancers that might regulate in vivo these two MHC isoforms. Using rVista program, we identified several regions conserved between human and mouse, that we tested by chromatin immunoprecipitation. Three putative NFAT consensus binding sites ((T/A)GGAAA) were identified in the most proximal 1.2-kb region of the *neo mhc* promoter and designated N1, N2 and N3 (Fig. 5A). In the 0.7-kb proximal and in the first intron of the *neo mhc* gene, a series of conserved E-boxes were identified and named E1 to E11. In the 0.7-kb proximal region and in the first intron of the *emb mhc* gene, three NFAT consensus binding sites and six E-boxes were identified and designated as N1, N2, N3 and E1 to E6 respectively.

C2C12 myoblasts were cultured either in proliferation medium (PM) or were differentiating for 4 days, differentiation time point where both embryonic and neonatal MHC begins to be expressed (Fig. 4B). The resultant nuclear fractions were immunoprecipitated using specific antibodies to NFATc2 (Fig 5B), NFATc1 (Fig. 5C), NFATc3 (Fig. 5D) or MyoD (Fig. 5E), and associated DNA was purified. Using specific primers to the different conserved regions in the

neonatal and *embryonic mhc* gene by real time PCR, we observed a very interesting difference in the occupancy of each NFAT isoform on each *emb* and *neo mhc* gene, in proliferating and differentiating C2C12 cells. NFATc2 was barely detected on the *embryonic mhc* gene in both proliferating and differentiating C2C12 cells (Fig. 5B). However, both c and d amplicons were observed to be significantly enriched in differentiating C2C12 cells, demonstrating the presence of endogenous NFATc2 in the most proximal region of the *neonatal mhc* promoter. In the two genic regions covered by these amplicons, two putative NFAT binding sites, N2 and N3, were identified (Fig. 5A). Conversely, chromatin immunoprecipitation analyses carried out with antibodies against either NFATc1 (Fig. 5C) or NFATc3 (Fig. 5D) demonstrated that NFATc1 and NFATc3 were bound on the *emb mhc* first intron (amplicon e') in proliferating C2C12 myoblasts, but both proteins were absent from the *neo mhc* promoter in proliferating and differentiating C2C12 cells, indicating a specific role for NFATc2 in the transcriptional control of the *neo mhc* gene. One putative NFAT binding site (N3) was identified in the DNA region, corresponding to amplicon e' on the *emb mhc* gene. ChIP experiments performed with an antibody against MyoD demonstrated the constitutive presence of MyoD in both *emb* (amplicon d') and *neo mhc* (amplicon g) first introns in proliferating and differentiating C2C12 cells (Fig. 5E).

To test whether NFATc2 could bind the sequences identified as NFAT binding elements in the *neo* and *emb mhc* genes, we performed an electrophoretic mobility shift assay with nuclear extracts of C2C12 cells transfected with MyoD, NFATc2 and a constitutive activated form of calcineurin, and using radiolabeled DNA probes of N2 and N3 *neo* and N3 *emb* sites identified in amplicons c, d and e' respectively (Fig. 6A). NFATc2 specifically bound the NFAT like sequence N2 from the *neonatal mhc* promoter, since a specific complex was

supershifted by a specific anti-NFATc2 antibody. In contrast, NFATc2 failed to bind N3 neo and N3 emb, since no complex was supershifted with the anti-NFATc2 antibody. Further evidence on the specificity of NFATc2 binding was provided by competition experiments using a 20-fold molar excess of homologous oligonucleotide (Fig. 6A). Taken together, these results indicate that NFATc2 specifically regulates the *neonatal mhc* gene by direct transcriptional activation and unambiguously show that endogenous NFATc2 is present on the proximal *neonatal mhc* promoter and endogenous MyoD on the first intron of the *neonatal mhc* gene *in vivo*. This supports the idea that NFATc2 and the bHLH transcription factor MyoD may cooperate to activate specifically the neonatal MHC transcription.

NFATc2 physically interacts with MyoD

Given that NFATc2 and MyoD synergistically cooperate to directly activate neo MHC expression, we tested by co-immunoprecipitation assays whether NFATc2 was able to physically interact with MyoD, as NFATc3 does (Armand et al., 2008). To map the MyoD binding site(s) on NFATc2, we generated a panel of NFATc2 deletion mutants (Fig. 6B). A C-terminal V5/His tagged full length MyoD and Gal4-NFATc2 deletion constructs were co-expressed in COS7 cells and MyoD-immunoprecipitated with Ni-NTA beads, specific for the C-terminal His-tag on MyoD. The presence of Gal4-NFATc2 deletion mutants after IP was detected by Western blotting against Gal4 (Fig. 6D). The C-terminal transactivation domain (residues 680-927) and the DNA binding Rel homology domain of NFATc2 (residues 407-679) are both sufficient to physically interact with MyoD (Fig. 6D).

Next, to map the NFATc2 binding site on MyoD, co-immunoprecipitation assays were performed by using extracts from COS7 cells overexpressing epitope-tagged derivatives of MyoD. A series of MyoD deletion mutants coupled to Gal4 were co-expressed with a C-terminal His/V5-tagged full-length NFATc2 and a constitutive activated mutant of calcineurin to ensure NFAT to be translocated into the nucleus (Fig. 6C). NFATc2-V5/His was co-immunoprecipitated with Ni-NTA beads, and interacting MyoD mutants were identified by Western blot using an antibody against Gal4. Residues 125-166, corresponding to the HLH domain of MyoD, are required for this interaction (Fig. 6E).

These experiments demonstrate that NFATc2 and MyoD can physically interact in cell culture. We would like to notice that NFATc2 and MyoD interaction is unique since the interacting domains are different from those involved in the NFATc3/MyoD interaction (Armand et al., 2008).

Collectively, these data confirm that the neonatal MHC isoform expression is induced *in vitro* and *in vivo*, in embryonic and in postnatal muscle fibers, by a cooperative interaction between MyoD and calcineurin/NFATc2 signalling.

DISCUSSION

Calcineurin/NFAT pathway regulates the acquiring of the myofiber phenotype during embryogenesis.

In contrast to the implication of the calcineurin/NFAT pathway in the specification of the adult muscle fiber type that is no more debated, little is known about its involvement in the establishment of the muscle phenotype, particularly during the embryonic and perinatal periods. The calcineurin/NFAT pathway is considered as the best characterized signaling pathway mediating the neural activity in mature myofibers (Calabria et al., 2009). The MHC isoform expression would depend on the combination of translocated NFAT isoforms, type I MHC being regulated by the cooperation of all four NFAT members, whereas type IIb MHC is expressed in adult myofibers that accumulate in their nuclei only one NFAT isoform NFATc4. If it is clear that the calcineurin/NFAT pathway regulates the maintenance of the slow muscle phenotype in adult muscles, its involvement in the establishment of the muscle phenotype during embryogenesis is ambiguous. In transgenic mice overexpressing the calcineurin inhibitor MCIP1, hindlimb muscles have the same muscle phenotype as WT ones at birth (Oh et al., 2005). In these muscles, the expression of developmental (emb MHC and neo MHC) and adult (type I, IIa, IIb, IIx MHC) MHC is similar to WT muscles from E14.5 to 7 days after birth, suggesting that the calcineurin/NFAT pathway would not modulate, nor establish the muscle type specification in immature myofibers. An in vitro study suggested instead that promoters of both developmental *mhc* genes, *emb mhc* and *neo mhc*, could be under the control of MRFs and the calcineurin pathway (Beylkin et al., 2006). Despite contradictory results, the authors proposed a differential transcriptional mechanism, where MyoD would preferentially regulate emb MHC expression, and the calcineurin/NFAT

pathway, the neo MHC expression. Here, we provide the first evidence that the calcineurin/NFAT pathway plays a crucial role in establishing the muscle phenotype during embryogenesis. We demonstrate that the NFAT member NFATc2, in cooperation with MyoD, is required for neo MHC expression during late stages of embryogenesis, from E14.5 to E18.5. We also show that this regulatory mechanism is conserved during early post-natal development, since neo MHC expression was highly affected in myofibers electroporated 5 days after birth with a combination of siRNAs directed against MyoD and NFATc2 (Fig. 2F,H). Previous studies described NFATc2 as a major regulator of skeletal muscle growth during secondary myogenesis (Horsley et al., 2001). NFATc2 has been shown to promote the fusion of myoblasts with neighboring myotubes by directly activating its target gene, interleukin-4 (Horsley et al., 2003). We now show that NFATc2 plays an additional role in muscle development during secondary myogenesis, by controlling the expression of another target gene: the neo MHC and that this regulation requires its bHLH partner MyoD. This MHC isoform is an important one, the major MHC isoform at birth, since it represents 65% of the total MHC expressed at that time (Allen and Leinwand, 2001). As this MHC isoform is absent from *myod/nfatc2* double null hindlimb and intercostal muscles, it is possible that these muscles have difficulties to contract due to a global deficit in myosin, and this could participate to the lethality of double null mice at birth. These combined observations point to the crucial role of the calcineurin/NFAT signaling in the establishment of the muscle fiber type in immature myofibers (this work), as well as in its maintenance in mature myofibers (Calabria et al., 2009).

Are specific NFAT/MRF complex involved in fine regulations of MHC expression?

NFATc1 has been shown to maintain the slow muscle phenotype by activating type I MHC expression and down-regulating type IIb MHC in mature myofibers (Schiaffino, 2010). Here, we show that NFATc2 is involved in the regulation of the neo MHC expression in immature myofibers. In line with these observations, we propose that the other NFATs could contribute to the maintenance and the establishment of the other embryonic and fast phenotypes. By chromatin immunoprecipitation, we show in this work that only NFATc2 and MyoD bind the *neo mhc* promoter in differentiating C2C12 cells (Fig. 5). The other NFATc proteins, NFATc1 and NFATc3 were found on the promoter of the *emb mhc* gene in proliferating C2C12 cells, whereas NFATc2 never binds this promoter in our experimental conditions. These results suggest that NFATc1 and NFATc3 would preferentially regulate the *emb* MHC expression whereas NFATc2 is specifically involved in the regulation of the neo MHC isoform. They also suggest a differential activation of each MHC isoform by different combination of NFATc expression during muscle development.

Furthermore, NFATc proteins activate their target genes in cooperation with other transcription factors, such as MyoD (Armand et al., 2008), MEF2 (van Oort et al., 2006, 2), GATA4 (Molkentin et al., 1998)... By cooperating with different partners, we could hypothesize that the calcineurin/NFAT pathway could regulate different MHC isoforms: developmental and adult MHC, slow and fast isoforms. Among the NFAT partners, the myogenic factors would play an important role. We have previously shown that the NFATc3 isoform is able to interact with MyoD to regulate myogenin expression in somites, during early myogenesis (Armand et al., 2008). We now demonstrate that another NFAT isoform, NFATc2, is also able to interact with MyoD, but this complex has a completely different role

since it specifically regulates the neo MHC expression during secondary myogenesis. Furthermore, each complex is unique, since the interacting domains involved in the interaction between NFATc2 and MyoD (this work) are different from those involved in the MyoD/NFATc3 interaction (Armand et al., 2008). MyoD is able to interact with NFATc3 via its basic domain whereas its HLH domain is necessary for MyoD to interact with NFATc2. Similarly, the N-terminal region of NFATc3 is required for NFATc3 to interact with MyoD and here, we show that NFATc2 interacts with MyoD via its C-terminal domain. So, MyoD/NFATc2 complex is as unique as MyoD/NFATc3, despite the homology in the sequence of both NFATc3 and NFATc2. It is then tempting to speculate that the other NFATc isoforms could interact with other myogenic factors, forming original MRF/NFATc complexes when both proteins are expressed and active in the nucleus. These original complexes would probably be involved in many different myogenic processes, since MRFs are differentially expressed and are involved in different specific myogenic steps. Moreover, we show in this work that Myf5 is not able to efficiently cooperate with NFATc2 nor NFATc3 to activate the expression of neo MHC (Fig. 4A). The muscle phenotype of *myod/nfatc2* double null mice also suggest that no other MRF/NFATc complex than MyoD/NFATc2 is able to ensure the activation of neo MHC expression in embryonic muscles. So the other MRF/NFATc complexes would likely be involved in different other myogenic processes and we could hypothesize that they could regulate different MHC isoforms, to build a mosaic muscle.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Marielle Saclier and Meryem Baghdadi for their early involvement in this project as M2 and rotation students. We would like to thank Laurie Glimcher and Sharagim

Tajbakhsh for providing mouse models. We are grateful to Suzie Lefebvre for helpful discussions and critical readings.

FUNDING

This work was supported by grants from the Association Française contre les Myopathies (AFM13958)

REFERENCES

- Allen, D. L. and Leinwand, L. A.** (2001). Postnatal myosin heavy chain isoform expression in normal mice and mice null for IId or IId myosin heavy chains. *Dev. Biol.* **229**, 383–395.
- Armand, A.-S., Lécolle, S., Launay, T., Pariset, C., Fiore, F., Della Gaspera, B., Birnbaum, D., Chanoine, C. and Charbonnier, F.** (2004). IGF-II is up-regulated and myofibres are hypertrophied in regenerating soleus of mice lacking FGF6. *Exp. Cell Res.* **297**, 27–38.
- Armand, A.-S., Bourajjaj, M., Martínez-Martínez, S., el Azzouzi, H., da Costa Martins, P. A., Hatzis, P., Seidler, T., Redondo, J. M. and De Windt, L. J.** (2008). Cooperative synergy between NFAT and MyoD regulates myogenin expression and myogenesis. *J. Biol. Chem.* **283**, 29004–29010.
- Armand, A.-S., Laziz, I., Djeghloul, D., Lécolle, S., Bertrand, A. T., Biondi, O., De Windt, L. J. and Chanoine, C.** (2011). Apoptosis-inducing factor regulates skeletal muscle progenitor cell number and muscle phenotype. *PLoS ONE* **6**, e27283.
- Beylkin, D. H., Allen, D. L. and Leinwand, L. A.** (2006). MyoD, Myf5, and the calcineurin pathway activate the developmental myosin heavy chain genes. *Dev. Biol.* **294**, 541–553.
- Brooke, M. H. and Kaiser, K. K.** (1970). Muscle fiber types: how many and what kind? *Arch. Neurol.* **23**, 369–379.

- Buckingham, M.** (1996). Skeletal muscle development and the role of the myogenic regulatory factors. *Biochem. Soc. Trans.* **24**, 506–509.
- Calabria, E., Ciciliot, S., Moretti, I., Garcia, M., Picard, A., Dyar, K. A., Pallafacchina, G., Tothova, J., Schiaffino, S. and Murgia, M.** (2009). NFAT isoforms control activity-dependent muscle fiber type specification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 13335–13340.
- Chin, E. R., Olson, E. N., Richardson, J. A., Yang, Q., Humphries, C., Shelton, J. M., Wu, H., Zhu, W., Bassel-Duby, R. and Williams, R. S.** (1998). A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes Dev.* **12**, 2499–2509.
- Condon, K., Silberstein, L., Blau, H. M. and Thompson, W. J.** (1990). Differentiation of fiber types in aneural musculature of the prenatal rat hindlimb. *Dev. Biol.* **138**, 275–295.
- Hodge, M. R., Ranger, A. M., Charles de la Brousse, F., Hoey, T., Grusby, M. J. and Glimcher, L. H.** (1996). Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in NF-ATp-deficient mice. *Immunity* **4**, 397–405.
- Horsley, V., Friday, B. B., Matteson, S., Kegley, K. M., Gephart, J. and Pavlath, G. K.** (2001). Regulation of the growth of multinucleated muscle cells by an NFATC2-dependent pathway. *J. Cell Biol.* **153**, 329–338.
- Horsley, V., Jansen, K. M., Mills, S. T. and Pavlath, G. K.** (2003). IL-4 acts as a myoblast recruitment factor during mammalian muscle growth. *Cell* **113**, 483–494.
- Kegley, K. M., Gephart, J., Warren, G. L. and Pavlath, G. K.** (2001). Altered primary myogenesis in NFATC3(-/-) mice leads to decreased muscle size in the adult. *Dev. Biol.* **232**, 115–126.
- Lyons, G. E., Ontell, M., Cox, R., Sassoon, D. and Buckingham, M.** (1990). The expression of myosin genes in developing skeletal muscle in the mouse embryo. *J. Cell Biol.* **111**, 1465–1476.
- Martínez-Martínez, S., Gómez del Arco, P., Armesilla, A. L., Aramburu, J., Luo, C., Rao, A. and Redondo, J. M.** (1997). Blockade of T-cell activation by dithiocarbamates involves novel mechanisms of inhibition of nuclear factor of activated T cells. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 6437–6447.
- Molkentin, J. D., Lu, J. R., Antos, C. L., Markham, B., Richardson, J., Robbins, J., Grant, S. R. and Olson, E. N.** (1998). A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* **93**, 215–228.
- Naya, F. J., Mercer, B., Shelton, J., Richardson, J. A., Williams, R. S. and Olson, E. N.** (2000). Stimulation of slow skeletal muscle fiber gene expression by calcineurin in vivo. *J. Biol. Chem.* **275**, 4545–4548.

- Oh, M., Rybkin, I. I., Copeland, V., Czubryt, M. P., Shelton, J. M., van Rooij, E., Richardson, J. A., Hill, J. A., De Windt, L. J., Bassel-Duby, R., et al.** (2005). Calcineurin is necessary for the maintenance but not embryonic development of slow muscle fibers. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 6629–6638.
- Rao, A., Luo, C. and Hogan, P. G.** (1997). Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 707–747.
- Richard, A.-F., Demignon, J., Sakakibara, I., Pujol, J., Favier, M., Strohlic, L., Le Grand, F., Sgarioto, N., Guernec, A., Schmitt, A., et al.** (2011). Genesis of muscle fiber-type diversity during mouse embryogenesis relies on Six1 and Six4 gene expression. *Dev. Biol.* **359**, 303–320.
- Rudnicki, M. A., Schnegelsberg, P. N., Stead, R. H., Braun, T., Arnold, H. H. and Jaenisch, R.** (1993). MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* **75**, 1351–1359.
- Schiaffino, S.** (2010). Fibre types in skeletal muscle: a personal account. *Acta Physiologica* **199**, 451–463.
- Schiaffino, S. and Reggiani, C.** (1996). Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol. Rev.* **76**, 371–423.
- Van Oort, R. J., van Rooij, E., Bourajjaj, M., Schimmel, J., Jansen, M. A., van der Nagel, R., Doevendans, P. A., Schneider, M. D., van Echteld, C. J. A. and De Windt, L. J.** (2006). MEF2 activates a genetic program promoting chamber dilation and contractile dysfunction in calcineurin-induced heart failure. *Circulation* **114**, 298–308.
- Wheeler, M. T., Snyder, E. C., Patterson, M. N. and Swoap, S. J.** (1999). An E-box within the MHC IIB gene is bound by MyoD and is required for gene expression in fast muscle. *Am. J. Physiol.* **276**, C1069–1078.

FIGURES LEGENDS

Fig. 1: Atrophy in double null limb muscles. **A** Immunofluorescence analysis of desmin positive myofibers on transverse sections of hindlimbs from WT and *myod*^{-/-}:*nfatc2*^{-/-} E14.5 and E18.5 embryos. Bar = 60µm. **B** Quantitation of fiber cross sectional area (CSA) specifies the atrophy of myofibers in *nfatc2*^{-/-} and *myod/nfatc2* double null muscles compared to WT and *myod*^{-/-} muscles. * indicates P<0.05 vs WT. Data represent means ±S.E.M. Three to five embryos of each genotype were analyzed.

Fig. 2: NFATc2 and MyoD are required for neonatal MHC expression in mouse developing myofibers. **A** Western blot analyses of E18.5 hindlimb muscles collected from WT, *nfatc2*^{-/-}, *myod*^{-/-} and *myod*^{-/-}:*nfatc2*^{-/-} indicate that double null muscles are specifically deficient in one single MHC type: the neonatal one. **B** Immunofluorescent analysis of neonatal MHC positive myofibers on transverse sections of hindlimbs from WT and *myod*^{-/-}:*nfatc2*^{-/-} E14.5 and E18.5 embryos. Bar = 40 µm. Quantification of myofibers expressing the neonatal (**C**), the embryonic (**D**) and type I (**E**) MHC in WT, *myod* null, *nfatc2* null and *myod/nfatc2* double null E14.5 and E18.5 hindlimb muscles confirms an important deficiency of neonatal MHC positive fibers in double null embryos at both E14.5 and E18.5. Data represent means ±S.E.M. Three to five animals of each genotype were analyzed. * indicates P<0.01 vs WT. *n.s.*, not significant. **F-H** MyoD and NFATc2 are necessary for the expression of neo MHC in post-natal muscles. TA from 5-day old mice were electroporated with scrambled siRNA or siRNA directed against MyoD, NFATc2 or both siRNAs, in combination with a GFP expression plasmid (n=3 per condition). Electroporation efficiency was controlled

by visualizing TA using a light (up) or fluorescence (down) microscope (G). * non electroporated muscles. Muscles collected 5 days after gene delivery were analyzed by immunofluorescence on serial sections using antibodies against GFP or neo MHC (F), or by Western blot to detect neo, emb, type I MHC and GAPDH (H). Arrows in F point out non electroporated myofibers. Bar = 50µm.

Fig. 3: NFATc2 and MyoD are required for neonatal MHC expression in primary cultured differentiating myotubes. **A** Differentiated WT, *nfatc2*^{-/-}, *myod*^{-/-} and *myod*^{-/-}:*nfatc2*^{-/-} myocytes plated at high density and grown for 6 days in differentiating medium were detected by immunostaining for myogenin (red), neonatal MHC (green). Total nuclei were stained with Bis-benzimide. Bar = 100 µm. **B** After 3 and 6 days in culture, the myoblast fusion index was similar in WT, simple and double mutant primary cultures suggesting that NFATc2 and MyoD are not involved in the early differentiation process. Quantification of myotubes expressing the embryonic (**C**) or the neonatal (**D**) MHC in WT, *myod* null, *nfatc2* null and *myod/nfatc2* double null primary cultures confirms an important deficiency of neonatal MHC positive myotubes in double null primary muscle cells cultured for 6 days in differentiation medium. * indicates P<0.05 vs WT. At least 100 myotubes in three different cell culture experiments were analyzed. **E** After 3 and 6 days in differentiation medium, the distribution of myotubes with equivalent numbers of nuclei was similar in single and double mutant cell cultures. Primary myotubes were clearly more mature in WT cell cultures compared to single and double mutant cultures. At least 200 myotubes in three independent cell culture experiments were analyzed. *n.s.*, not significant. * indicates P<0.05 vs WT.

Fig. 4: NFAT transcriptional activity is involved in the neonatal MHC expression. **A** co-transfection assays in C2C12 cells cultured for 48h in PM using emb MHC-luc, neo MHC-luc or MHC I-luc vectors and the indicated expression vectors demonstrates a synergistic cooperation between MyoD and either NFATc2 or NFATc3. Data represent the mean \pm S.E.M. of three independent experiments. **B** C2C12 myoblasts were cultured in differentiation medium (DM) for indicated time period and the different MHC isoforms (emb, neo, type I, IIa, IIb and IIx) were analyzed by real-time PCR. **C** C2C12 cells were cultured in DM and transfected, 4 days after the switch in DM, with scrambled small interfering RNA (siRNA) or siRNA directed against NFATc2, MyoD or both siRNAs. 2 days after the transfection, MyoD, NFATc2 and MHC isoforms transcripts were analyzed by real-time PCR. * indicates $P < 0.01$ vs scrambled siRNA (n=3).

Fig. 5: Identification of NFAT consensus binding sites and E-boxes in neonatal and embryonic mhc promoters. **A** Schematic presentation of chromosome 11 specific regions in the mouse *Myh8* gene (*neo mhc*) (-1.2 to +1.5 kb) and the mouse *Myh3* gene (*emb mhc*) (-0.7 to +2 kb) and location of NFAT binding sites (N1, N2, N3) and E-boxes (E1 to E11). Grey rectangles on the genes represent each CHIP amplicon amplified by PCR, designated as *a* to *i* on the *neo mhc* gene and *a'* to *f'* on the *emb mhc* gene. The specific mouse sequence of the NFAT binding sites and E-boxes identified in the amplicons enriched by any CHIP is indicated above the figure with the aligned corresponding human sequence. **B to E** Chromatin immunoprecipitation (CHIP) assays were performed on C2C12 cells grown in PM or DM with

antibodies for NFATc2 (B), NFATc1 (C), NFATc3 (D) and MyoD (E). Bars represent fold enrichment of amplicons, normalized to input controls obtained with primers spanning a non coding region 3' of the *myogenin* gene. Three independent ChIP assays with three different antibodies directed against NFATc2 and two different against MyoD were performed. * indicates $P < 0.01$. *n.s.*, not significant.

Fig. 6. Identification of the NFAT binding sites bound by NFATc2 on the *neo mhc* promoter and mapping of NFATc2 and MyoD interaction. **A** Nuclear extracts from C2C12 cells transfected with MyoD, NFATc2 and a constitutive activated form of calcineurin were analyzed by electrophoretic mobility shift assay. Gel shift assays were performed using radiolabelled oligonucleotide probes of the NFAT-like sites N2 neo and N3 neo from *Myh8* promoter and of the NFAT-like site N3 emb inside the first intron of the *Myh3* gene in the presence or absence of 0.8 μ g of antibodies for NFATc2 or Gal4 (control Ab). A 20 fold molar excess of unlabeled oligonucleotide was added to the binding reaction mixtures to determine the specific binding. Complexes are indicated by arrows, and the retarded complex on N2 neo is indicated by arrowheads. **B, C** Schematic overview of Gal4-NFATc2 (B) and Gal4-MyoD (C) deletion constructs and their ability to bind MyoD or NFATc2, respectively. **D** Protein extracts from COS7 cells transfected with MyoD-V5-His, empty vector (Gal4), and Gal4-NFATc2 deletion constructs were immunoprecipitated (IP) with Ni-NTA beads and subjected to Western blot (WB) using an anti-Gal4 antibody. **E** Protein extracts from COS7 cells transfected with NFATc2-V5-His, empty vector (Gal4), and Gal4-MyoD deletion constructs were immunoprecipitated with NiNTA beads and subjected to Western blot using an anti-Gal4 antibody.

Fig. S1: *myod/nfatc2* double null mice die at birth with respiratory defects. **A** Lungs were dissected out from newborn mice and dropped in water. All lungs float except the *myod*^{-/-}:*nfatc2*^{-/-} lungs that sink to the bottom, indicating that they were not inflated with air. **B** Representative H&E stained four-chamber view of hearts dissected from newborn mice of indicated genotypes. No obvious cardiac phenotype was observed in any transgenic mice. Bar = 750 μm.

Fig. S2: MyoD and NFATc2 are required for neo MHC expression in intercostal muscles at E18.5. Transverse cryosections of intercostal muscles were immunostained with neo MHC antibodies, demonstrating that *myod/nfatc2* double null intercostal muscles are deficient in neo MHC proteins. Bar = 40 μm.

Table 1: Mendel distribution

MyoD:NFATc2	MyoD NFATc2 x MyoD NFATc2		Expected
	+/- +/- x +/- +/-		
	<i>Number</i>	<i>%</i>	<i>%</i>
+/+ +/+	4	4,2	6,3
+/- +/+	19	20,0	12,5
-/- +/+	2	2,1	6,3
+/+ +/-	15	15,8	12,5
+/+ -/-	4	4,2	6,3
+/- +/-	32	33,7	25
+/- -/-	12	12,6	12,5
-/- +/-	6	6,3	12,5
-/- -/-	1	1,1	6,3
Total:	95		

Supplementary table 1: Primers:

		Sequence (5'-3') Forward primer	Sequence (5'-3') Reverse primer
Chromatin IP	Amplicon a	AATGAGGGGATGGAAGATGA	CCAGACTTTGAGGGTGCATT
	Amplicon b	TACGACATCCCTGCCTTCAT	CGGAAAGAAAAGAGAAAATGC
	Amplicon c	ATCCCCATGCTATCTCTCC	CTCATCCTTGGAGCCTGACT
	Amplicon d	AGTCAGGCTCCAAGGATGAG	CTGTGCTGCCAAAGATCAGA
	Amplicon e	TCTGATCTTTGGCAGCACAG	GCGGAGATAGGGTGTGAGG
	Amplicon f	GCTTGAGGGTAGGGAACTT	CCAGGCTTCAGTGAGGGTAA
	Amplicon g	TTTTTGAGGGACGGCTTGTA	GGAGGCTTGGCATGAAATAG
	Amplicon h	GAACCAGGGCAGTGCTAAGT	CCATTGTTGCTCAAACCAA
	Amplicon i	CAAAGCCATGTTTCCTTCT	CTCGCCAGAATCTTGACTCC
	Amplicon a'	TGGACCAGGAAAGAGAGGAA	AGCAGGACCAACAAGCAAGT
	Amplicon b'	TGATTTACAGGTGGGATGG	CGTATTTTTGCGCGTTGCC
	Amplicon c'	TCAAGGCGTTCTCAAGGAAT	GTCCCCTGTTTATTCTGTGG
	Amplicon d'	CCATACGTCCACAAGTCTG	AAGCCTGCCTTCTCCGTTA
	Amplicon e'	GTTTGCTTACCCGTGC	GCAATGAATGGAAGCCTCTC
	Amplicon f'	GTGCTGAACCTTGTGTGAA	TCCATCTCGGTGTCGCTACT
Control amplicon	TCCTGGATTACTGTCAAGC	AACGAGTCTATGAGGGTAAG	
qRT-PCR	NFATc2.2	ATCTACCCAGATCAGTATGG	TCAGGAGTATACCATTCTC
	MyoD	GGCTCTCTGCTCCTTGA	AGTAGGGAAGTGTGCGTGCT
	Emb MHC	GCAAAGACCCGTGACTTACCTCTAG	GCATGTGAAAAGTGATACGTGG
	neo MHC	GTCACGCAATGCAGAAGAGA	CAGGTCCTTACCCTCTGTT
	MHC I	AGGGCGACCTCAACGAGAT	CAGCAGACTCTGGAGGCTCTT
	MHC IIa	CCAAGAAAGGTGCCAAGAAG	CGGGAGTCTTGGTTTCATTG
	MHC IIb	GCTTGAAAACGAGGTGGAAA	CCTCCTCAGCCTGTCTCTTG
	MHC IIx	CGGTGGTGGAAAGAAAGG	CAGGAGTCTTGGTTTCATT
	26S	AGGAGAAACAACGGTCGTGCCAAA	GCGCAAGCAGGTCTGAATCGTG

Fig 1

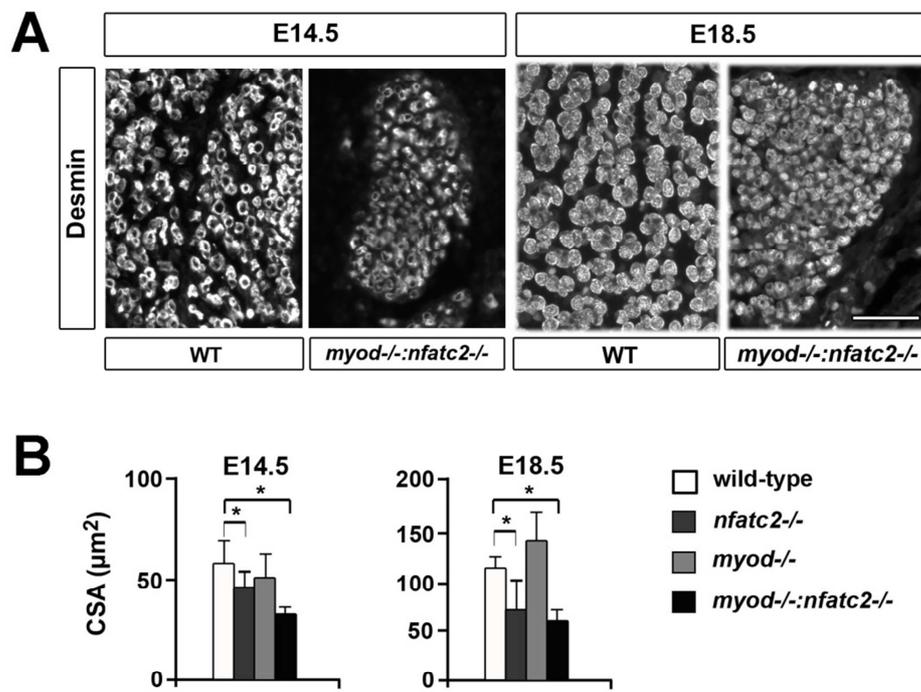


Fig 2

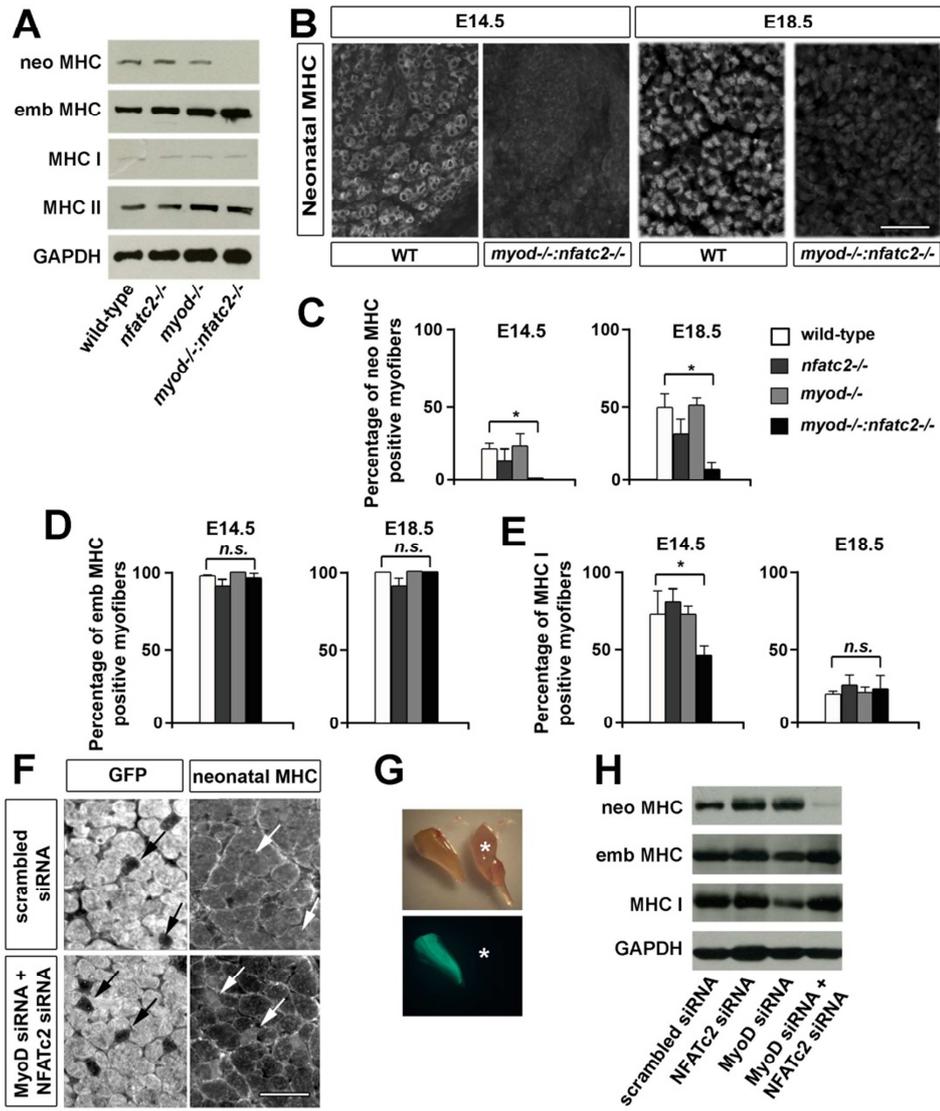


Fig 3

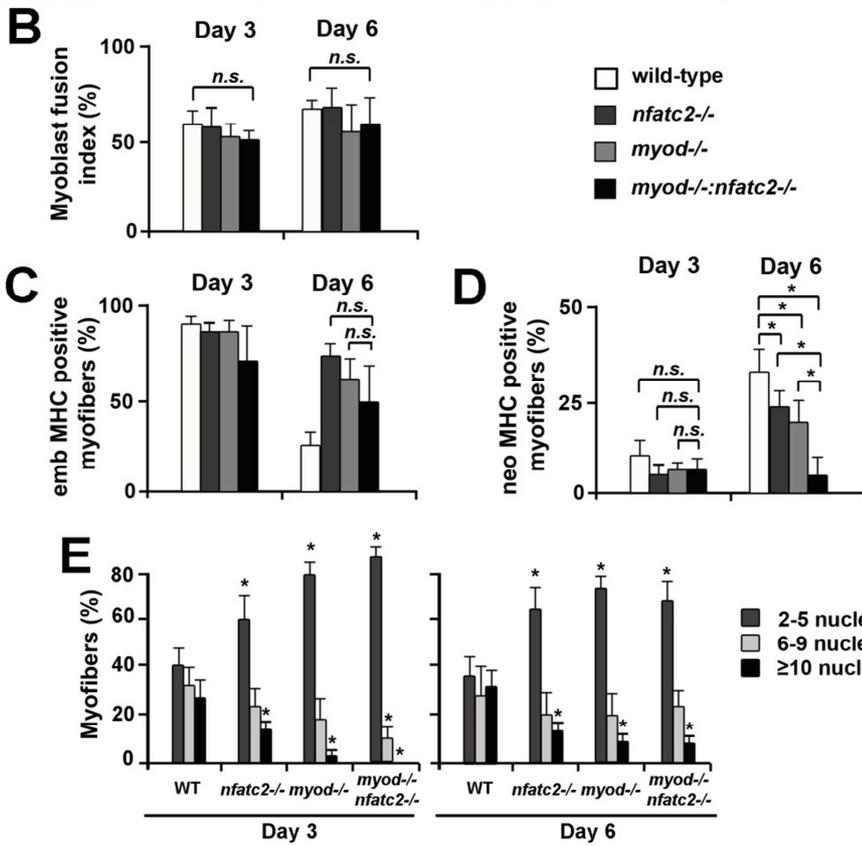
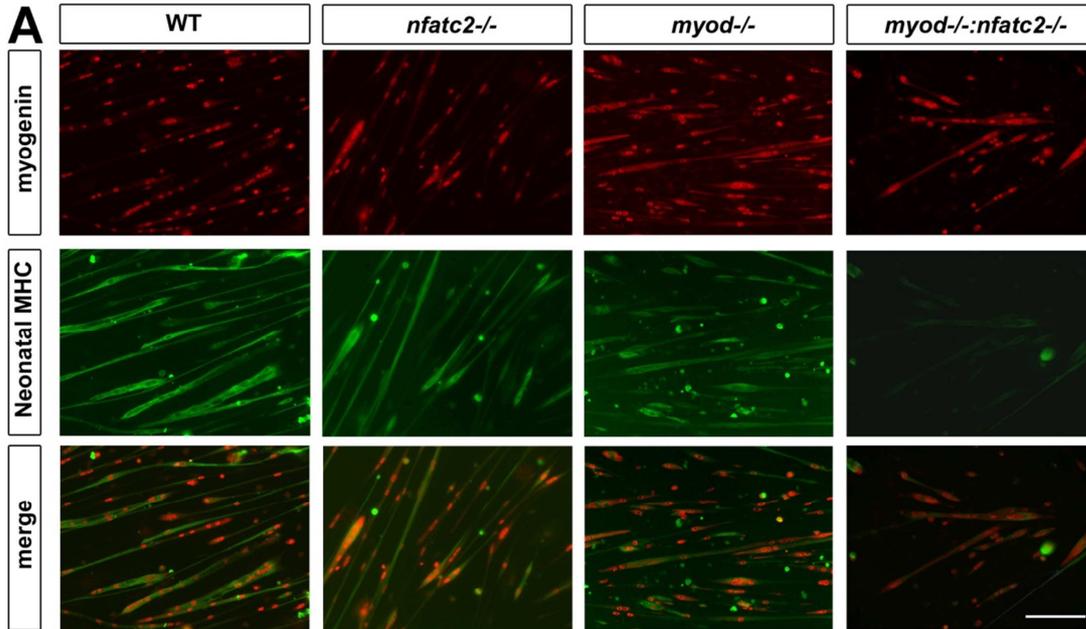


Fig 5

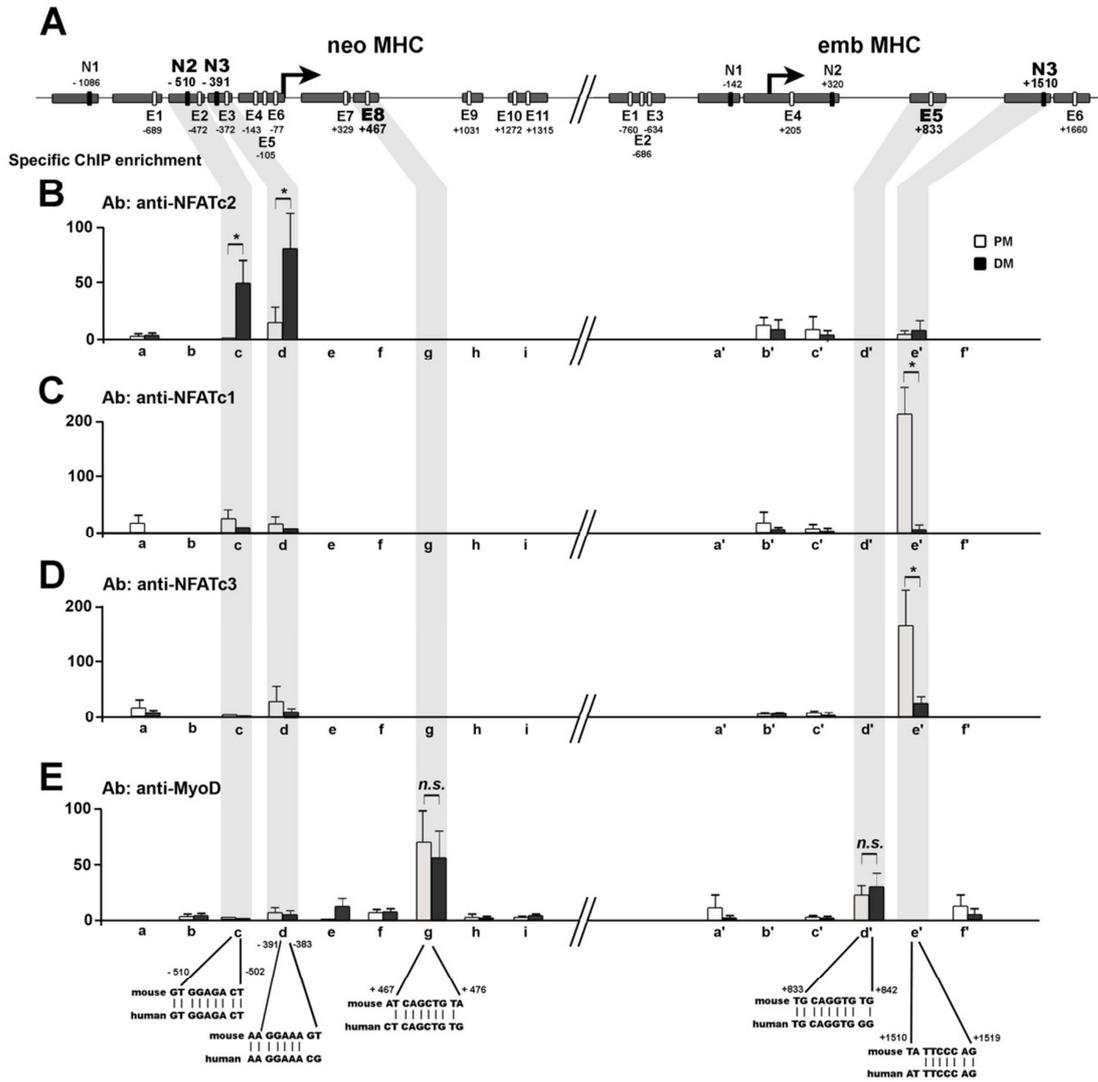


Fig 6

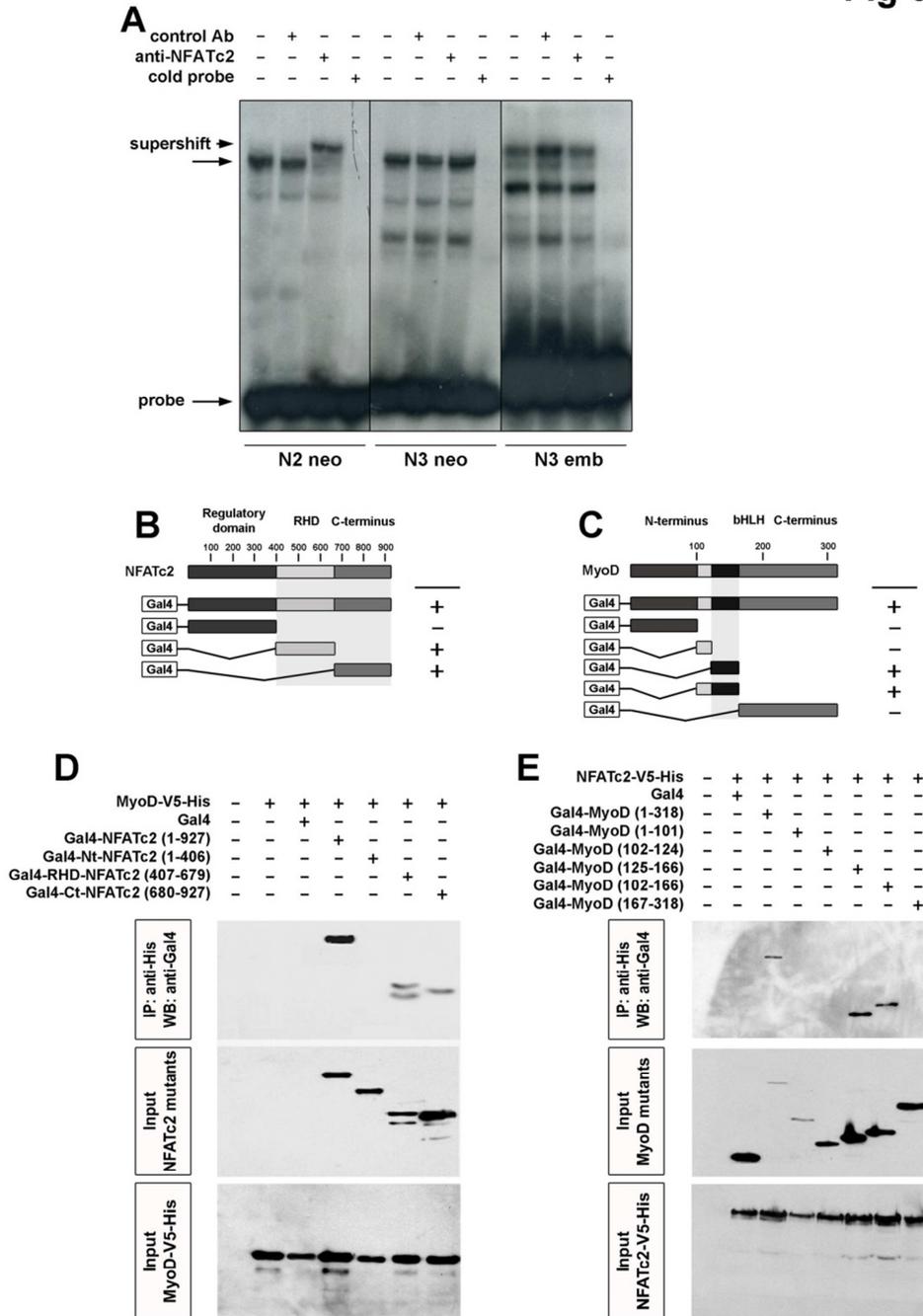


Fig S1

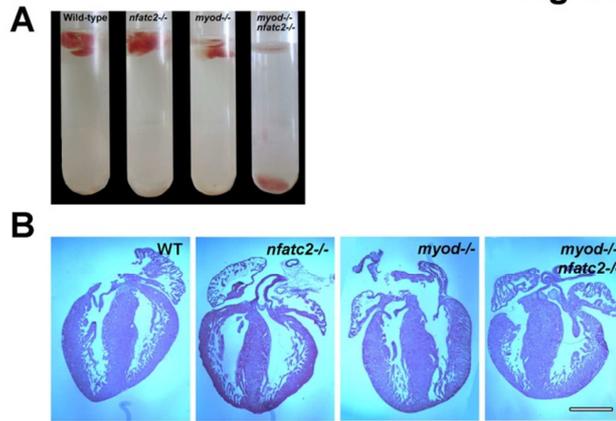
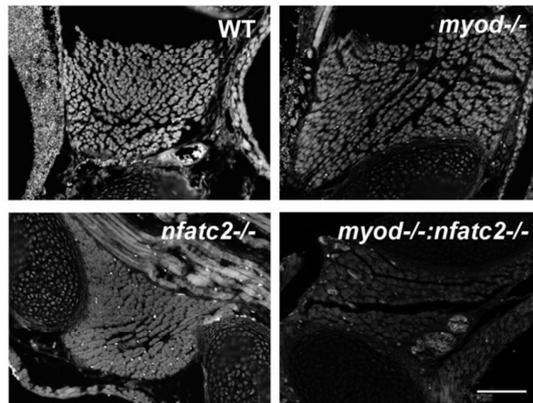


Fig S2



II.3 Conclusion

L'article précédent montre que l'isoforme NFATc2 coopère avec MyoD pour induire spécifiquement l'expression de la chaîne lourde néonatale la myosine (MHCneo), *in vitro* aussi bien qu'*in vivo*. L'interaction NFATc2/MyoD est spécifique et cruciale puisque les souris double mutantes *myod* (-/-); *nfatc2* (-/-) meurent à la naissance avec une réduction spectaculaire de l'expression de la MHCneo, principale isoforme de la myosine exprimée à la naissance, alors que l'expression de cette chaîne lourde de la myosine n'est pas affectée chez les simples mutants. Par des analyses d'immunoprécipitation de la chromatine et de retard sur gels, nous avons montré que les isoformes NFATc1 et NFATc3 se lient de manière préférentielle au gène codant la chaîne lourde embryonnaire de la myosine (MHC emb). Les résultats exposés dans le papier ont mis en évidence pour la première fois le rôle de la voie de signalisation calcineurine/NFAT dans la mise en place du système contractile au cours de la myogenèse squelettique.

III L'absence d'expression de MyoD et de NFATc2 se caractérise par une aplasie musculaire au cours de la myogenèse secondaire

Nous présentons dans cette troisième partie, des résultats complémentaires à l'article précédent concernant le phénotype musculaire des embryons *myod* (-/-); *nfatc2* (-/-) au niveau des membres postérieurs au cours de la myogenèse secondaire. Avant de présenter les résultats obtenus, arrêtons-nous d'abord sur la technique d'immunohistochimie utilisée.

III.1 Analyse histologique et immunofluorescence

L'immunohistochimie est réalisée sur des muscles de membres postérieurs des embryons témoins, simple mutants *myod* (-/-), *nfatc2* (-/-) et double mutants *myod* (-/-); *nfatc2* (-/-) à E14.5 et à E18.5. Les embryons sont fixés par du paraformaldéhyde (PFA) 4 % et ensuite inclus dans de la paraffine. Des coupes de 6 µm sont effectuées au microtome. Elles sont réhydratées dans deux bains de toluène durant 10 minutes chacun, un bain d'éthanol 100% et un bain d'éthanol 95 % de 3 minutes chacun. Elles seront mises à bouillir, une fois 10 minutes et trois fois 5 minutes, dans de l'acide citrique à pH 6. Cette étape de démasquage des épitopes permet un remodelage de la structure tridimensionnelle et des charges portées par la protéine rendant ainsi possible l'interaction avec l'anticorps primaire. Après refroidissement, les coupes sont lavées une fois dans du PBS et une saturation des sites non spécifiques se fait par le biais d'une incubation de 30 minutes avec du PBS/BSA (1%). Après une nuit d'exposition à l'anticorps primaire, les coupes sont lavées trois fois dans du PBS pendant 10 minutes et incubées avec l'anticorps secondaire durant 45 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Cet anticorps est couplé ou à l'Alexa 488 (vert) dilués au 1/200e dans du PBS/BSA (1%). Trois nouveaux lavages de 10 minutes au PBS sont nécessaires pour éliminer l'excédent d'anticorps, et

les lames sont séchées et montées avec du Vectashield. Les coupes soient observées au microscope à fluorescence.

III.2 Étude du phénotype musculaire des embryons double mutants *myod* (-/-) ; *nfatc2* (-/-)

Dans le but d'analyser in vivo l'interaction entre le facteur myogénique MyoD et NFATc2, on a croisé des souris *myod* (-/-) avec des souris *nfatc2* (-/-). Les souris double mutantes ne présentent pas de phénotype particulier à E11.5 mais malheureusement elles meurent à la naissance. Pour l'instant, ces observations suggèrent que l'interaction MyoD/NFATc2 est cruciale pour la survie de l'embryon.

Pour décrire les défauts myogéniques des souris double mutantes, j'ai réalisé des séries d'expériences d'immunohistochimie avec un anticorps anti-desmine qui met en évidence toutes les fibres musculaires issues de la myogenèse primaire et secondaire sur des coupes de muscles de membres postérieurs d'embryons témoins, *myod* (-/-), *nfatc2* (-/-) et *myod* (-/-) ; *nfatc2* (-/-) à différents stades du développement ; à la fin de la myogenèse primaire ainsi qu' à la naissance (entre E14.5 et E18.5). L'analyse de la morphologie des fibres (nombre) est ensuite effectuée en comptant le nombre des fibres musculaires à E14.5 et E18.5 au niveau des membres postérieurs. On observe à E14.5 comme à E18.5 une diminution marquée du nombre des fibres des embryons double mutants (50% de fibres en moins) comparée aux embryons témoins et simple mutants. (Figure 27).

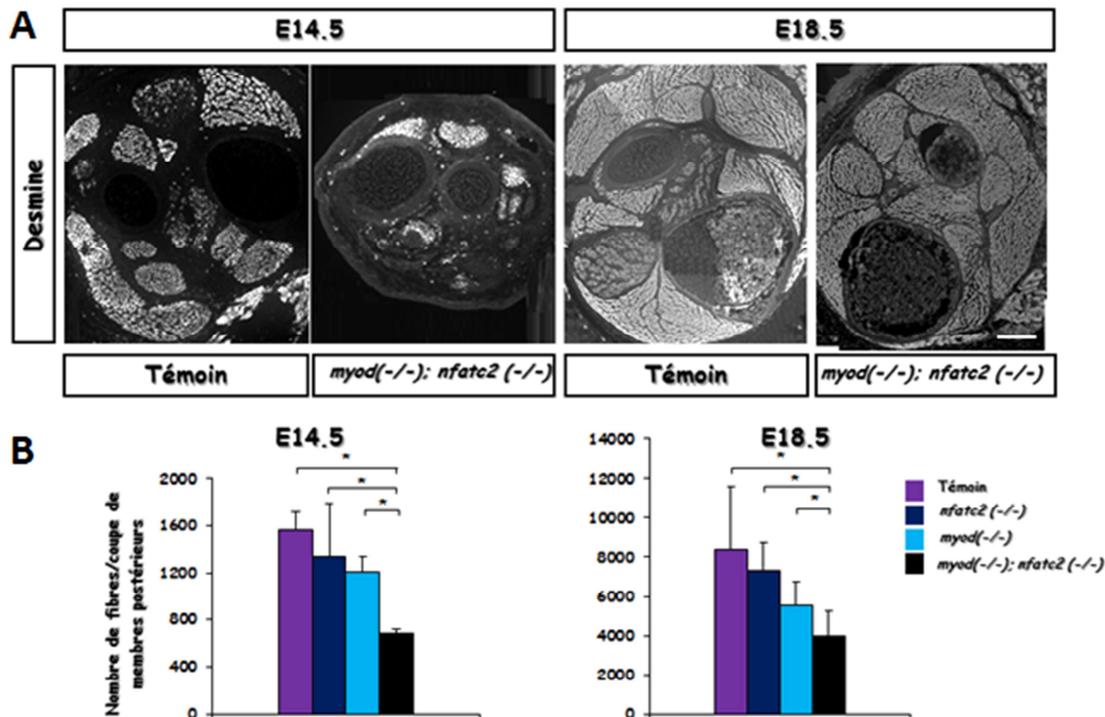


Figure 25: Aplasie des fibres musculaires des membres postérieurs des embryons *myod* (-/-); *nfatc2* (-/-).

A) Analyses d'immunofluorescence des fibres desmine positives sur des coupes transversales de membres postérieurs chez des embryons témoins et *myod* (-/-); *nfatc2* (-/-) à E14.5 et E18.5. **B)** Diminution du nombre (aplasie) des fibres desmine positives à E14.5 et à E18.5 chez les embryons *myod* (-/-); *nfatc2* (-/-) comparé à celui des témoins et des simple mutants.

Ces résultats montrent que l'aplasie est causée par l'absence de l'expression de NFATc2 et de MyoD [196].

III.3 Conclusion

Sur la base des résultats observés et compte tenu des analyses discutées, on peut conclure que l'aplasie observée au niveau des membres postérieurs est spécifique de la double mutation, démontrant ainsi la spécificité de l'interaction entre MyoD et NFATc2 dans l'acquisition du nombre correct des fibres musculaires durant l'embryogenèse.

CONCLUSION GÉNÉRALE

La myogenèse est contrôlée par un réseau bien ordonné de facteurs de transcription aboutissant à l'expression des membres de la famille MyoD. Les facteurs MRFs sont capables d'interagir avec d'autres partenaires dans le but d'activer la transcription de plusieurs gènes cibles. Parmi ces partenaires, les protéines musculaires LIM activent la différenciation musculaire en favorisant la liaison des MRFs à l'ADN ; les protéines de la famille MEF2 jouent un rôle primordial dans la myogenèse des muscles squelettiques, cardiaques et lisses [208] [126].

La voie de signalisation calcineurine/NFAT est aussi impliquée dans plusieurs aspects du développement du muscle squelettique. De nombreuses études mettent en évidence le rôle de la calcineurine dans la régulation de l'adaptation et la régénération du muscle post-natal ou adulte [195] [200]. En revanche, le rôle de la calcineurine au cours de la myogenèse embryonnaire est méconnu. L'analyse des fibres musculaires adultes des souris mutantes *nfatc3*^{-/-} et *nfatc2*^{-/-} a suggéré que NFATc3 serait probablement impliqué dans la régulation de la myogenèse primaire, alors que NFATc2 participerait plutôt à la régulation de la fusion des cellules musculaires au cours de la myogenèse secondaire [195] [4, 200].

Les premiers travaux initiés au laboratoire avant mon arrivée ont permis d'identifier un nouveau type de cofacteur de MyoD : les facteurs de transcription de la famille NFAT. MyoD coopère physiquement et génétiquement avec l'isoforme NFATc3. [207]. Chez la souris, l'interaction entre MyoD et NFATc3 est essentielle *in vivo* pour l'expression somitique de la myogénine au cours de la myogenèse primaire. Afin de tester si MyoD est capable d'interagir avec d'autres isoformes des protéines NFAT, nous avons réalisé des expériences de co-immunoprécipitation. Nous avons ainsi pu mettre en évidence l'interaction physique de MyoD avec NFATc2. À ce stade de notre étude, il convenait de définir l'implication physiologique du complexe MyoD/NFATc2 dans la myogenèse. L'interaction MyoD/NFATc2 semble être cruciale puisque la double mutation *myod* : *nfatc2* est létale.

C'est dans ce contexte que j'ai débuté mes travaux de thèse en février 2010. Une étude réalisée en 1998 par Abbott et al a montré le profil d'expression de chaque isoforme NFAT dans une culture primaire de myoblastes humains [204]. Dans ces cellules, trois protéines NFAT sont

exprimées, NFATc1, NFATc2 et NFATc3. Parmi ces facteurs, NFATc2 et NFATc3 sont des éléments clés impliqués dans la myogenèse [207] [196] [200] [195]. Comme le profil d'expression des facteurs de transcription NFATs n'a jamais été étudié *in vivo* chez les mammifères, j'ai donc analysé, dans un premier temps, leur expression au cours de la myogenèse précoce. Par des expériences d'hybridation *in situ* sur embryons entiers, nous avons analysé l'accumulation des transcrits des différentes isoformes NFAT au cours des stades précoces de la myogenèse à E9.5, E10.5 et E11.5 chez des embryons témoins. Contrairement aux protéines NFAT, le profil d'expression des facteurs myogéniques a été bien décrit au cours du développement, de la régénération ainsi qu'en culture. Comparée au profil d'expression bien connu des facteurs myogéniques, l'accumulation des transcrits NFATs est beaucoup plus faible. Il apparaît aussi que l'accumulation des ARNm NFATc4 et NFATc2 est relativement faible au niveau des somites comparée à celle de NFATc1. L'accumulation de NFATc2 est considérable dans les bourgeons de membres, dans des régions similaires à celles qui expriment les facteurs myogéniques et en conséquence pouvant correspondre à des zones de muscles en formation. La co-localisation de MyoD et de NFATc2 nous permet de supposer que le complexe MyoD/NFATc2 pourrait être impliqué dans la myogenèse.

Dans un second temps, nous avons étudié les mécanismes moléculaires et cellulaires régulés par le complexe MyoD/NFATc2, conduisant à la formation du muscle. Pour cela, nous avons analysé finement le phénotype musculaire des souris *myod (-/-); nfatc2 (-/-) in vivo*. Nous avons démontré par des expériences d'immunohistochimie réalisées chez des souris témoins, simple mutantes et double mutantes à E14.5 et E18.5 au cours de la myogenèse secondaire que les muscles des membres des souris *myod (-/-); nfatc2 (-/-)* ont deux fois moins de fibres musculaires (phénomène d'aplasie musculaire) que les muscles des membres des embryons témoins et simple mutants. Aucune étude réalisée auparavant n'a montré l'implication de MyoD ou de NFATc2 dans un phénomène d'aplasie. Ces résultats montrent pour la première fois l'implication de ces facteurs de transcription dans la mise en place du nombre correct de fibres musculaires dans les membres. Les fibres des souris *myod (-/-); nfatc2 (-/-)* sont également de taille réduite (phénomène d'atrophie musculaire) par rapport aux souris témoins aux deux temps de développement embryonnaire étudiés. Néanmoins, la diminution du diamètre des fibres double mutantes semble similaire à celle des fibres des souris *nfatc2 (-/-)* à E18.5. Il

semble donc que la réduction de la taille des fibres ne soit pas due à l'absence conjuguée de NFATc2 et MyoD mais seulement à l'absence d'expression du facteur de transcription NFATc2.

D'autre part, nous nous sommes intéressés à l'expression des différentes isoformes de la chaîne lourde de la myosine (MyHC) dans les muscles des embryons double mutants *myod* (-/-); *nfatc2* (-/-). En effet, il a été montré que la voie de signalisation calcineurine/NFAT joue un rôle majeur dans la modulation de l'expression des différentes MyHC au niveau des muscles adultes. L'expression combinée des différentes isoformes des protéines NFAT serait à l'origine de l'expression de chacune des isoformes adultes des MyHC [4]. En effet, l'expression de la MyHC II b serait sous contrôle de l'expression de NFATc4 tandis que l'expression de la MyHC I est contrôlée par l'expression concomitante des quatre isoformes des protéines NFAT (NFATc1-c4). En 2010, l'équipe Schiaffino a montré que NFATc1 maintient le phénotype musculaire lent dans les muscles matures par activation de l'expression de la MyHC I et par répression de la MyHC II [205]. Nos analyses *in vivo* et en culture ont révélé pour la première fois une spécificité de transactivation de la MyHC néonatale par le complexe NFATc2/MyoD. La MyHC néonatale est totalement absente des muscles des membres postérieurs des embryons *nfatc2* (-/-); *myod* (-/-) à E14.5 et est quasi-absente à E18.5. Nos analyses montrent que cette chute de l'expression de la MyHC néonatale n'est pas due à un problème de fusion des myoblastes en myotubes, puisque l'index de fusion des myoblastes primaires en culture est identique quel que soit le génotype des cellules. Par des expériences d'immunoprécipitation de chromatine, on a montré que MyoD (via les boîtes E) et NFATc2 se fixent sur le promoteur de la *MyHC néonatale*. Nos résultats ont montré que NFATc2 et MyoD coopèrent ensemble pour activer spécifiquement la transcription de la MyHC néonatale. D'autre part, nos résultats suggèrent que NFATc1 et NFATc3 pourraient réguler l'expression de la MyHC embryonnaire. Ces observations nous amènent à penser que les mécanismes mis en jeu pour mettre en place la typologie des fibres sont différents. Nous pouvons envisager que d'autres facteurs myogéniques pourraient interagir avec d'autres protéines NFAT et que ces nouveaux complexes pourraient être impliqués dans l'expression d'autres isoformes MyHC et dans différents processus myogéniques en fonction du facteur myogénique exprimé.

En conclusion, j'ai donc mis en évidence pour la première fois le rôle d'une isoforme NFAT, NFATc2, dans les étapes tardives de la myogenèse au cours du développement embryonnaire et durant la vie postnatale. Les souris doubles mutantes *myod* (-/-); *nfatc2* (-/-) présentent une aplasie et sont dépourvues de la MyHC néonatale à la naissance. Il est probable que le changement des propriétés contractiles des muscles des membres postérieurs ainsi que le phénomène d'aplasie soient la cause du décès des embryons *myod* (-/-); *nfatc2* (-/-) à la naissance. Comme le nombre de fibres est déjà diminué à E14.5, nous avons supposé que ce phénomène d'aplasie commence au cours de la myogenèse primaire des embryons double mutants *myod* (-/-); *nfatc2* (-/-) et pourrait donc être causé par des anomalies touchant des stades précoces du développement. Il serait donc intéressant de décrire le phénotype musculaire des souris *myod* (-/-); *nfatc2* (-/-) à des stades plus précoces de l'embryogenèse, afin de comprendre quel est le processus myogénique affecté par l'absence concomitante d'expression de MyoD et de NFATc2 : la migration des cellules progénitrices musculaires des somites aux membres, la détermination des cellules progénitrices en myoblastes, la fusion des myoblastes en myotubes...

Cette étude souligne l'importance d'étudier les interactions protéine-protéine dans la régulation des différents processus cellulaires. En effet, nous pouvons montrer que l'interaction MyoD/NFAT peut contrôler la différenciation ou la maturation des fibres selon l'isoforme NFAT impliquée dans cette interaction protéique. Il est possible que d'autres complexes MRF/NFAT soient présents et fonctionnels. La comparaison spatio-temporelle des profils d'expression des facteurs myogéniques et des NFAT au cours de l'embryogenèse pourrait nous permettre d'évaluer la possibilité que de tels complexes puissent se former et jouer un rôle dans la mise en place du tissu musculaire. Comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires contrôlant la mise en place du système contractile permettrait d'améliorer le rétablissement des fibres lésées lors d'une pathologie ou à la suite d'une lésion.

BIBLIOGRAPHIE

1. Brown RP, Delp MD, Lindstedt SL, Rhomberg LR, Beliles RP: **Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic models.** *Toxicology and industrial health* 1997, **13**(4):407-484.
2. Gulick J, Subramaniam A, Neumann J, Robbins J: **Isolation and characterization of the mouse cardiac myosin heavy chain genes.** *J Biol Chem* 1991, **266**(14):9180-9185.
3. Hughes SM, Chi MM, Lowry OH, Gundersen K: **Myogenin induces a shift of enzyme activity from glycolytic to oxidative metabolism in muscles of transgenic mice.** *The Journal of cell biology* 1999, **145**(3):633-642.
4. Calabria E, Ciciliot S, Moretti I, Garcia M, Picard A, Dyar KA, Pallafacchina G, Tothova J, Schiaffino S, Murgia M: **NFAT isoforms control activity-dependent muscle fiber type specification.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009, **106**(32):13335-13340.
5. Pette D, Vrbova G: **Neural control of phenotypic expression in mammalian muscle fibers.** *Muscle & nerve* 1985, **8**(8):676-689.
6. Plaghki L: **[Regeneration and myogenesis of striated muscle].** *Journal de physiologie* 1985, **80**(2):51-110.
7. Schiaffino S, Serrano AL, Jerkovic R, Di Lisi R, Murgia M: **Neural regulation of myosin gene expression in regenerating skeletal muscle.** *Acta physiologica Scandinavica* 1998, **163**(3):S11-15.
8. Windisch A, Gundersen K, Szabolcs MJ, Gruber H, Lomo T: **Fast to slow transformation of denervated and electrically stimulated rat muscle.** *The Journal of physiology* 1998, **510** (Pt 2):623-632.
- 9.
10. Lu BD, Allen DL, Leinwand LA, Lyons GE: **Spatial and temporal changes in myosin heavy chain gene expression in skeletal muscle development.** *Developmental biology* 1999, **216**(1):312-326.
11. Bottinelli R, Betto R, Schiaffino S, Reggiani C: **Maximum shortening velocity and coexistence of myosin heavy chain isoforms in single skinned fast fibres of rat skeletal muscle.** *Journal of muscle research and cell motility* 1994, **15**(4):413-419.
12. Pette D, Staron RS: **Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions.** *Microscopy research and technique* 2000, **50**(6):500-509.
13. Murgia M, Serrano AL, Calabria E, Pallafacchina G, Lomo T, Schiaffino S: **Ras is involved in nerve-activity-dependent regulation of muscle genes.** *Nature cell biology* 2000, **2**(3):142-147.
14. Ontell M, Hughes D, Bourke D: **Morphometric analysis of the developing mouse soleus muscle.** *The American journal of anatomy* 1988, **181**(3):279-288.
15. Kelly AM, Zacks SI: **The histogenesis of rat intercostal muscle.** *The Journal of cell biology* 1969, **42**(1):135-153.
16. Blagden CS, Hughes SM: **Extrinsic influences on limb muscle organisation.** *Cell and tissue research* 1999, **296**(1):141-150.
17. Wigmore PM, Evans DJ: **Molecular and cellular mechanisms involved in the generation of fiber diversity during myogenesis.** *International review of cytology* 2002, **216**:175-232.

18. Zhang M, McLennan IS: **Primary myotubes preferentially mature into either the fastest or slowest muscle fibers.** *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 1998, **213**(1):147-157.
19. McLennan IS: **Neurogenic and myogenic regulation of skeletal muscle formation: a critical re-evaluation.** *Progress in neurobiology* 1994, **44**(2):119-140.
20. DiMario JX, Stockdale FE: **Both myoblast lineage and innervation determine fiber type and are required for expression of the slow myosin heavy chain 2 gene.** *Developmental biology* 1997, **188**(1):167-180.
21. Ordahl CP, Le Douarin NM: **Two myogenic lineages within the developing somite.** *Development* 1992, **114**(2):339-353.
22. Christ B, Jacob HJ, Jacob M: **Experimental analysis of the origin of the wing musculature in avian embryos.** *Anatomy and embryology* 1977, **150**(2):171-186.
23. Cooke J, Zeeman EC: **A clock and wavefront model for control of the number of repeated structures during animal morphogenesis.** *Journal of theoretical biology* 1976, **58**(2):455-476.
24. Pourquie O: **Vertebrate segmentation: from cyclic gene networks to scoliosis.** *Cell* 2011, **145**(5):650-663.
25. Gibb S, Maroto M, Dale JK: **The segmentation clock mechanism moves up a notch.** *Trends in cell biology* 2010, **20**(10):593-600.
26. Palmeirim I, Henrique D, Ish-Horowicz D, Pourquie O: **Avian hairy gene expression identifies a molecular clock linked to vertebrate segmentation and somitogenesis.** *Cell* 1997, **91**(5):639-648.
27. Ferjentsik Z, Hayashi S, Dale JK, Bessho Y, Herreman A, De Strooper B, del Monte G, de la Pompa JL, Maroto M: **Notch is a critical component of the mouse somitogenesis oscillator and is essential for the formation of the somites.** *PLoS genetics* 2009, **5**(9):e1000662.
28. Herrgen L, Ares S, Morelli LG, Schroter C, Julicher F, Oates AC: **Intercellular coupling regulates the period of the segmentation clock.** *Current biology : CB* 2010, **20**(14):1244-1253.
29. Ozbudak EM, Lewis J: **Notch signalling synchronizes the zebrafish segmentation clock but is not needed to create somite boundaries.** *PLoS genetics* 2008, **4**(2):e15.
30. Gibb S, Zagorska A, Melton K, Tenin G, Vacca I, Trainor P, Maroto M, Dale JK: **Interfering with Wnt signalling alters the periodicity of the segmentation clock.** *Developmental biology* 2009, **330**(1):21-31.
31. Gomez C, Pourquie O: **Developmental control of segment numbers in vertebrates.** *Journal of experimental zoology Part B, Molecular and developmental evolution* 2009, **312**(6):533-544.
32. Buckingham M, Bajard L, Chang T, Daubas P, Hadchouel J, Meilhac S, Montarras D, Rocancourt D, Relaix F: **The formation of skeletal muscle: from somite to limb.** *Journal of anatomy* 2003, **202**(1):59-68.
33. Maroto M, Bone RA, Dale JK: **Somitogenesis.** *Development* 2012, **139**(14):2453-2456.
34. Bryson-Richardson RJ, Currie PD: **The genetics of vertebrate myogenesis.** *Nature reviews Genetics* 2008, **9**(8):632-646.
35. Buckingham M: **Skeletal muscle formation in vertebrates.** *Current opinion in genetics & development* 2001, **11**(4):440-448.
36. Christ B, Brand-Saberi B: **Limb muscle development.** *The International journal of developmental biology* 2002, **46**(7):905-914.

37. Yusuf F, Brand-Saberi B: **The eventful somite: patterning, fate determination and cell division in the somite.** *Anatomy and embryology* 2006, **211 Suppl 1**:21-30.
38. Christ B, Ordahl CP: **Early stages of chick somite development.** *Anatomy and embryology* 1995, **191**(5):381-396.
39. Gossler A, Hrabe de Angelis M: **Somitogenesis.** *Current topics in developmental biology* 1998, **38**:225-287.
40. Jostes B, Walther C, Gruss P: **The murine paired box gene, Pax7, is expressed specifically during the development of the nervous and muscular system.** *Mechanisms of development* 1990, **33**(1):27-37.
41. Williams BA, Ordahl CP: **Pax-3 expression in segmental mesoderm marks early stages in myogenic cell specification.** *Development* 1994, **120**(4):785-796.
42. Goulding M, Lumsden A, Paquette AJ: **Regulation of Pax-3 expression in the dermomyotome and its role in muscle development.** *Development* 1994, **120**(4):957-971.
43. Dietrich S, Abou-Rebyeh F, Brohmann H, Bladt F, Sonnenberg-Riethmacher E, Yamaai T, Lumsden A, Brand-Saberi B, Birchmeier C: **The role of SF/HGF and c-Met in the development of skeletal muscle.** *Development* 1999, **126**(8):1621-1629.
44. Li WC, Yu WY, Quinlan JM, Burke ZD, Tosh D: **The molecular basis of transdifferentiation.** *Journal of cellular and molecular medicine* 2005, **9**(3):569-582.
45. Brent AE, Schweitzer R, Tabin CJ: **A somitic compartment of tendon progenitors.** *Cell* 2003, **113**(2):235-248.
46. Birchmeier C, Brohmann H: **Genes that control the development of migrating muscle precursor cells.** *Current opinion in cell biology* 2000, **12**(6):725-730.
47. Buckingham M: **Skeletal muscle progenitor cells and the role of Pax genes.** *Comptes rendus biologies* 2007, **330**(6-7):530-533.
48. Horst D, Ustanina S, Sergi C, Mikuz G, Juergens H, Braun T, Vorobyov E: **Comparative expression analysis of Pax3 and Pax7 during mouse myogenesis.** *The International journal of developmental biology* 2006, **50**(1):47-54.
49. Relaix F, Rocancourt D, Mansouri A, Buckingham M: **A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells.** *Nature* 2005, **435**(7044):948-953.
50. Tajbakhsh S: **Skeletal muscle stem and progenitor cells: reconciling genetics and lineage.** *Experimental cell research* 2005, **306**(2):364-372.
51. Bober E, Brand-Saberi B, Ebensperger C, Wilting J, Balling R, Paterson BM, Arnold HH, Christ B: **Initial steps of myogenesis in somites are independent of influence from axial structures.** *Development* 1994, **120**(11):3073-3082.
52. Daston G, Lamar E, Olivier M, Goulding M: **Pax-3 is necessary for migration but not differentiation of limb muscle precursors in the mouse.** *Development* 1996, **122**(3):1017-1027.
53. Tremblay P, Dietrich S, Mericskay M, Schubert FR, Li Z, Paulin D: **A crucial role for Pax3 in the development of the hypaxial musculature and the long-range migration of muscle precursors.** *Developmental biology* 1998, **203**(1):49-61.
54. Borycki AG, Li J, Jin F, Emerson CP, Epstein JA: **Pax3 functions in cell survival and in pax7 regulation.** *Development* 1999, **126**(8):1665-1674.
55. Tajbakhsh S, Buckingham M: **The birth of muscle progenitor cells in the mouse: spatiotemporal considerations.** *Current topics in developmental biology* 2000, **48**:225-268.

56. Schubert FR, Tremblay P, Mansouri A, Faisst AM, Kammandel B, Lumsden A, Gruss P, Dietrich S: **Early mesodermal phenotypes in splotch suggest a role for Pax3 in the formation of epithelial somites.** *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 2001, **222**(3):506-521.
57. Relaix F, Rocancourt D, Mansouri A, Buckingham M: **Divergent functions of murine Pax3 and Pax7 in limb muscle development.** *Genes & development* 2004, **18**(9):1088-1105.
58. Franz T: **The Splotch (Sp1H) and Splotch-delayed (Spd) alleles: differential phenotypic effects on neural crest and limb musculature.** *Anatomy and embryology* 1993, **187**(4):371-377.
59. Bober E, Franz T, Arnold HH, Gruss P, Tremblay P: **Pax-3 is required for the development of limb muscles: a possible role for the migration of dermomyotomal muscle progenitor cells.** *Development* 1994, **120**(3):603-612.
60. Tajbakhsh S, Rocancourt D, Cossu G, Buckingham M: **Redefining the genetic hierarchies controlling skeletal myogenesis: Pax-3 and Myf-5 act upstream of MyoD.** *Cell* 1997, **89**(1):127-138.
61. Maroto M, Reshef R, Munsterberg AE, Koester S, Goulding M, Lassar AB: **Ectopic Pax-3 activates MyoD and Myf-5 expression in embryonic mesoderm and neural tissue.** *Cell* 1997, **89**(1):139-148.
62. Bajard L, Relaix F, Lagha M, Rocancourt D, Daubas P, Buckingham ME: **A novel genetic hierarchy functions during hypaxial myogenesis: Pax3 directly activates Myf5 in muscle progenitor cells in the limb.** *Genes & development* 2006, **20**(17):2450-2464.
63. Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, Rudnicki MA: **Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells.** *Cell* 2000, **102**(6):777-786.
64. Oustanina S, Hause G, Braun T: **Pax7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells but not their specification.** *The EMBO journal* 2004, **23**(16):3430-3439.
65. Relaix F, Montarras D, Zaffran S, Gayraud-Morel B, Rocancourt D, Tajbakhsh S, Mansouri A, Cumano A, Buckingham M: **Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells.** *The Journal of cell biology* 2006, **172**(1):91-102.
66. Sambasivan R, Tajbakhsh S: **Skeletal muscle stem cell birth and properties.** *Seminars in cell & developmental biology* 2007, **18**(6):870-882.
67. Bladt F, Riethmacher D, Isenmann S, Aguzzi A, Birchmeier C: **Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud.** *Nature* 1995, **376**(6543):768-771.
68. Birchmeier C, Gherardi E: **Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase.** *Trends in cell biology* 1998, **8**(10):404-410.
69. Maina F, Casagrande F, Audero E, Simeone A, Comoglio PM, Klein R, Ponzetto C: **Uncoupling of Grb2 from the Met receptor in vivo reveals complex roles in muscle development.** *Cell* 1996, **87**(3):531-542.
70. Sachs M, Brohmann H, Zechner D, Muller T, Hulsken J, Walther I, Schaeper U, Birchmeier C, Birchmeier W: **Essential role of Gab1 for signaling by the c-Met receptor in vivo.** *The Journal of cell biology* 2000, **150**(6):1375-1384.
71. Epstein JA, Shapiro DN, Cheng J, Lam PY, Maas RL: **Pax3 modulates expression of the c-Met receptor during limb muscle development.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996, **93**(9):4213-4218.

72. Yang XM, Vogan K, Gros P, Park M: **Expression of the met receptor tyrosine kinase in muscle progenitor cells in somites and limbs is absent in Splotch mice.** *Development* 1996, **122**(7):2163-2171.
73. Jagla K, Dolle P, Mattei MG, Jagla T, Schuhbauer B, Dretzen G, Bellard F, Bellard M: **Mouse Lbx1 and human LBX1 define a novel mammalian homeobox gene family related to the Drosophila lady bird genes.** *Mechanisms of development* 1995, **53**(3):345-356.
74. Mennerich D, Schafer K, Braun T: **Pax-3 is necessary but not sufficient for lbx1 expression in myogenic precursor cells of the limb.** *Mechanisms of development* 1998, **73**(2):147-158.
75. Dietrich S, Schubert FR, Healy C, Sharpe PT, Lumsden A: **Specification of the hypaxial musculature.** *Development* 1998, **125**(12):2235-2249.
76. Schafer K, Braun T: **Early specification of limb muscle precursor cells by the homeobox gene Lbx1h.** *Nature genetics* 1999, **23**(2):213-216.
77. Brohmann H, Jagla K, Birchmeier C: **The role of Lbx1 in migration of muscle precursor cells.** *Development* 2000, **127**(2):437-445.
78. Brand-Saberi B, Krenn V, Grim M, Christ B: **Differences in the fibronectin-dependence of migrating cell populations.** *Anatomy and embryology* 1993, **187**(1):17-26.
79. Brand-Saberi B, Gamel AJ, Krenn V, Muller TS, Wilting J, Christ B: **N-cadherin is involved in myoblast migration and muscle differentiation in the avian limb bud.** *Developmental biology* 1996, **178**(1):160-173.
80. Olson EN, Klein WH: **bHLH factors in muscle development: dead lines and commitments, what to leave in and what to leave out.** *Genes & development* 1994, **8**(1):1-8.
81. Rudnicki MA, Jaenisch R: **The MyoD family of transcription factors and skeletal myogenesis.** *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 1995, **17**(3):203-209.
82. Weintraub H, Davis R, Tapscott S, Thayer M, Krause M, Benezra R, Blackwell TK, Turner D, Rupp R, Hollenberg S *et al*: **The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage.** *Science* 1991, **251**(4995):761-766.
83. Davis RL, Weintraub H, Lassar AB: **Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts.** *Cell* 1987, **51**(6):987-1000.
84. Braun T, Buschhausen-Denker G, Bober E, Tannich E, Arnold HH: **A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts.** *The EMBO journal* 1989, **8**(3):701-709.
85. Edmondson DG, Olson EN: **A gene with homology to the myc similarity region of MyoD1 is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program.** *Genes & development* 1989, **3**(5):628-640.
86. Rhodes SJ, Konieczny SF: **Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family.** *Genes & development* 1989, **3**(12B):2050-2061.
87. Santerre RF, Bales KR, Janney MJ, Hannon K, Fisher LF, Bailey CS, Morris J, Ivarie R, Smith CK, 2nd: **Expression of bovine myf5 induces ectopic skeletal muscle formation in transgenic mice.** *Molecular and cellular biology* 1993, **13**(10):6044-6051.
88. Lassar AB, Buskin JN, Lockshon D, Davis RL, Apone S, Hauschka SD, Weintraub H: **MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer.** *Cell* 1989, **58**(5):823-831.
89. Sabourin LA, Rudnicki MA: **The molecular regulation of myogenesis.** *Clinical genetics* 2000, **57**(1):16-25.

90. Blackwell TK, Weintraub H: **Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection.** *Science* 1990, **250**(4984):1104-1110.
91. Murre C, McCaw PS, Vaessin H, Caudy M, Jan LY, Jan YN, Cabrera CV, Buskin JN, Hauschka SD, Lassar AB *et al*: **Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence.** *Cell* 1989, **58**(3):537-544.
92. Ott MO, Bober E, Lyons G, Arnold H, Buckingham M: **Early expression of the myogenic regulatory gene, myf-5, in precursor cells of skeletal muscle in the mouse embryo.** *Development* 1991, **111**(4):1097-1107.
93. Sassoon D, Lyons G, Wright WE, Lin V, Lassar A, Weintraub H, Buckingham M: **Expression of two myogenic regulatory factors myogenin and MyoD1 during mouse embryogenesis.** *Nature* 1989, **341**(6240):303-307.
94. Buckingham M: **Making muscle in mammals.** *Trends in genetics : TIG* 1992, **8**(4):144-148.
95. Tajbakhsh S, Buckingham ME: **Mouse limb muscle is determined in the absence of the earliest myogenic factor myf-5.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994, **91**(2):747-751.
96. Kablar B, Krastel K, Ying C, Asakura A, Tapscott SJ, Rudnicki MA: **MyoD and Myf-5 differentially regulate the development of limb versus trunk skeletal muscle.** *Development* 1997, **124**(23):4729-4738.
97. Kassam-Duchossoy L, Gayraud-Morel B, Gomes D, Rocancourt D, Buckingham M, Shinin V, Tajbakhsh S: **Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:Myod double-mutant mice.** *Nature* 2004, **431**(7007):466-471.
98. Rudnicki MA, Braun T, Hinuma S, Jaenisch R: **Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development.** *Cell* 1992, **71**(3):383-390.
99. Liu J, Burkin DJ, Kaufman SJ: **Increasing alpha 7 beta 1-integrin promotes muscle cell proliferation, adhesion, and resistance to apoptosis without changing gene expression.** *American journal of physiology Cell physiology* 2008, **294**(2):C627-640.
100. Menko AS, Boettiger D: **Occupation of the extracellular matrix receptor, integrin, is a control point for myogenic differentiation.** *Cell* 1987, **51**(1):51-57.
101. Sastry SK, Lakonishok M, Thomas DA, Muschler J, Horwitz AF: **Integrin alpha subunit ratios, cytoplasmic domains, and growth factor synergy regulate muscle proliferation and differentiation.** *The Journal of cell biology* 1996, **133**(1):169-184.
102. Houzelstein D, Auda-Boucher G, Cheraud Y, Rouaud T, Blanc I, Tajbakhsh S, Buckingham ME, Fontaine-Perus J, Robert B: **The homeobox gene Msx1 is expressed in a subset of somites, and in muscle progenitor cells migrating into the forelimb.** *Development* 1999, **126**(12):2689-2701.
103. Odelberg SJ, Kollhoff A, Keating MT: **Dedifferentiation of mammalian myotubes induced by msx1.** *Cell* 2000, **103**(7):1099-1109.
104. Kitzmann M, Fernandez A: **Crosstalk between cell cycle regulators and the myogenic factor MyoD in skeletal myoblasts.** *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2001, **58**(4):571-579.
105. Edom-Vovard F, Bonnin MA, Duprez D: **Misexpression of Fgf-4 in the chick limb inhibits myogenesis by down-regulating Frk expression.** *Developmental biology* 2001, **233**(1):56-71.

106. Webb SE, Lee KK, Tang MK, Ede DA: **Fibroblast growth factors 2 and 4 stimulate migration of mouse embryonic limb myogenic cells.** *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 1997, **209**(2):206-216.
107. Templeton TJ, Hauschka SD: **FGF-mediated aspects of skeletal muscle growth and differentiation are controlled by a high affinity receptor, FGFR1.** *Developmental biology* 1992, **154**(1):169-181.
108. Marics I, Padilla F, Guillemot JF, Scaal M, Marcelle C: **FGFR4 signaling is a necessary step in limb muscle differentiation.** *Development* 2002, **129**(19):4559-4569.
109. Brand-Saberi B, Christ B: **Genetic and epigenetic control of muscle development in vertebrates.** *Cell and tissue research* 1999, **296**(1):199-212.
110. Florini JR, Ewton DZ, Magri KA: **Hormones, growth factors, and myogenic differentiation.** *Annual review of physiology* 1991, **53**:201-216.
111. Walsh K, Perlman H: **Cell cycle exit upon myogenic differentiation.** *Current opinion in genetics & development* 1997, **7**(5):597-602.
112. Matsuoka S, Edwards MC, Bai C, Parker S, Zhang P, Baldini A, Harper JW, Elledge SJ: **p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene.** *Genes & development* 1995, **9**(6):650-662.
113. Zacksenhaus E, Jiang Z, Chung D, Marth JD, Phillips RA, Gallie BL: **pRb controls proliferation, differentiation, and death of skeletal muscle cells and other lineages during embryogenesis.** *Genes & development* 1996, **10**(23):3051-3064.
114. Kitzmann M, Carnac G, Vandromme M, Primig M, Lamb NJ, Fernandez A: **The muscle regulatory factors MyoD and myf-5 undergo distinct cell cycle-specific expression in muscle cells.** *The Journal of cell biology* 1998, **142**(6):1447-1459.
115. Joulia-Ekaza D, Cabello G: **Myostatin regulation of muscle development: molecular basis, natural mutations, physiopathological aspects.** *Experimental cell research* 2006, **312**(13):2401-2414.
116. Kuroda K, Tani S, Tamura K, Minoguchi S, Kurooka H, Honjo T: **Delta-induced Notch signaling mediated by RBP-J inhibits MyoD expression and myogenesis.** *The Journal of biological chemistry* 1999, **274**(11):7238-7244.
117. Shawber C, Nofziger D, Hsieh JJ, Lindsell C, Bogler O, Hayward D, Weinmaster G: **Notch signaling inhibits muscle cell differentiation through a CBF1-independent pathway.** *Development* 1996, **122**(12):3765-3773.
118. Schuster-Gossler K, Cordes R, Gossler A: **Premature myogenic differentiation and depletion of progenitor cells cause severe muscle hypotrophy in Delta1 mutants.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007, **104**(2):537-542.
119. Vasyutina E, Lenhard DC, Birchmeier C: **Notch function in myogenesis.** *Cell cycle* 2007, **6**(12):1451-1454.
120. Laclef C, Hamard G, Demignon J, Souil E, Houbron C, Maire P: **Altered myogenesis in Six1-deficient mice.** *Development* 2003, **130**(10):2239-2252.
121. Hasty P, Bradley A, Morris JH, Edmondson DG, Venuti JM, Olson EN, Klein WH: **Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene.** *Nature* 1993, **364**(6437):501-506.
122. Nabeshima Y, Hanaoka K, Hayasaka M, Esumi E, Li S, Nonaka I, Nabeshima Y: **Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect.** *Nature* 1993, **364**(6437):532-535.

123. Venuti JM, Morris JH, Vivian JL, Olson EN, Klein WH: **Myogenin is required for late but not early aspects of myogenesis during mouse development.** *The Journal of cell biology* 1995, **128**(4):563-576.
124. Valdez MR, Richardson JA, Klein WH, Olson EN: **Failure of Myf5 to support myogenic differentiation without myogenin, MyoD, and MRF4.** *Developmental biology* 2000, **219**(2):287-298.
125. Zhang W, Behringer RR, Olson EN: **Inactivation of the myogenic bHLH gene MRF4 results in up-regulation of myogenin and rib anomalies.** *Genes & development* 1995, **9**(11):1388-1399.
126. Yun K, Wold B: **Skeletal muscle determination and differentiation: story of a core regulatory network and its context.** *Current opinion in cell biology* 1996, **8**(6):877-889.
127. Wakelam MJ: **The fusion of myoblasts.** *The Biochemical journal* 1985, **228**(1):1-12.
128. Abmayr SM, Pavlath GK: **Myoblast fusion: lessons from flies and mice.** *Development* 2012, **139**(4):641-656.
129. Gurdon JB, Lemaire P, Kato K: **Community effects and related phenomena in development.** *Cell* 1993, **75**(5):831-834.
130. Krauss RS, Cole F, Gaio U, Takaesu G, Zhang W, Kang JS: **Close encounters: regulation of vertebrate skeletal myogenesis by cell-cell contact.** *Journal of cell science* 2005, **118**(Pt 11):2355-2362.
131. Borghi N, James Nelson W: **Intercellular adhesion in morphogenesis: molecular and biophysical considerations.** *Current topics in developmental biology* 2009, **89**:1-32.
132. Cinnamon Y, Ben-Yair R, Kalcheim C: **Differential effects of N-cadherin-mediated adhesion on the development of myotomal waves.** *Development* 2006, **133**(6):1101-1112.
133. Radice GL, Rayburn H, Matsunami H, Knudsen KA, Takeichi M, Hynes RO: **Developmental defects in mouse embryos lacking N-cadherin.** *Developmental biology* 1997, **181**(1):64-78.
134. Moore R, Walsh FS: **The cell adhesion molecule M-cadherin is specifically expressed in developing and regenerating, but not denervated skeletal muscle.** *Development* 1993, **117**(4):1409-1420.
135. Rosenberg P, Esni F, Sjodin A, Larue L, Carlsson L, Gullberg D, Takeichi M, Kemler R, Semb H: **A potential role of R-cadherin in striated muscle formation.** *Developmental biology* 1997, **187**(1):55-70.
136. Zeschnigk M, Kozian D, Kuch C, Schmoll M, Starzinski-Powitz A: **Involvement of M-cadherin in terminal differentiation of skeletal muscle cells.** *Journal of cell science* 1995, **108** (Pt 9):2973-2981.
137. Hollnagel A, Grund C, Franke WW, Arnold HH: **The cell adhesion molecule M-cadherin is not essential for muscle development and regeneration.** *Molecular and cellular biology* 2002, **22**(13):4760-4770.
138. Ditlevsen DK, Povlsen GK, Berezin V, Bock E: **NCAM-induced intracellular signaling revisited.** *Journal of neuroscience research* 2008, **86**(4):727-743.
139. Walsh FS, Parekh RB, Moore SE, Dickson G, Barton CH, Gower HJ, Dwek RA, Rademacher TW: **Tissue specific O-linked glycosylation of the neural cell adhesion molecule (N-CAM).** *Development* 1989, **105**(4):803-811.
140. Suzuki M, Angata K, Nakayama J, Fukuda M: **Polysialic acid and mucin type o-glycans on the neural cell adhesion molecule differentially regulate myoblast fusion.** *The Journal of biological chemistry* 2003, **278**(49):49459-49468.

141. Lyons GE, Moore R, Yahara O, Buckingham ME, Walsh FS: **Expression of NCAM isoforms during skeletal myogenesis in the mouse embryo.** *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 1992, **194**(2):94-104.
142. Charlton CA, Mohler WA, Blau HM: **Neural cell adhesion molecule (NCAM) and myoblast fusion.** *Developmental biology* 2000, **221**(1):112-119.
143. Cremer H, Lange R, Christoph A, Plomann M, Vopper G, Roes J, Brown R, Baldwin S, Kraemer P, Scheff S *et al*: **Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning.** *Nature* 1994, **367**(6462):455-459.
144. Rafuse VF, Polo-Parada L, Landmesser LT: **Structural and functional alterations of neuromuscular junctions in NCAM-deficient mice.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2000, **20**(17):6529-6539.
145. Cole F, Zhang W, Geyra A, Kang JS, Krauss RS: **Positive regulation of myogenic bHLH factors and skeletal muscle development by the cell surface receptor CDO.** *Developmental cell* 2004, **7**(6):843-854.
146. Kang JS, Yi MJ, Zhang W, Feinleib JL, Cole F, Krauss RS: **Netrins and neogenin promote myotube formation.** *The Journal of cell biology* 2004, **167**(3):493-504.
147. Horsley V, Pavlath GK: **Forming a multinucleated cell: molecules that regulate myoblast fusion.** *Cells, tissues, organs* 2004, **176**(1-3):67-78.
148. Fulton AB, Prives J, Farmer SR, Penman S: **Developmental reorganization of the skeletal framework and its surface lamina in fusing muscle cells.** *The Journal of cell biology* 1981, **91**(1):103-112.
149. Swailes NT, Colegrave M, Knight PJ, Peckham M: **Non-muscle myosins 2A and 2B drive changes in cell morphology that occur as myoblasts align and fuse.** *Journal of cell science* 2006, **119**(Pt 17):3561-3570.
150. Duan R, Gallagher PJ: **Dependence of myoblast fusion on a cortical actin wall and nonmuscle myosin IIA.** *Developmental biology* 2009, **325**(2):374-385.
151. Nowak SJ, Nahirney PC, Hadjantonakis AK, Baylies MK: **Nap1-mediated actin remodeling is essential for mammalian myoblast fusion.** *Journal of cell science* 2009, **122**(Pt 18):3282-3293.
152. Stadler B, Blattler TM, Franco-Obregon A: **Time-lapse imaging of in vitro myogenesis using atomic force microscopy.** *Journal of microscopy* 2010, **237**(1):63-69.
153. Kawamura K, Takano K, Suetsugu S, Kurisu S, Yamazaki D, Miki H, Takenawa T, Endo T: **N-WASP and WAVE2 acting downstream of phosphatidylinositol 3-kinase are required for myogenic cell migration induced by hepatocyte growth factor.** *The Journal of biological chemistry* 2004, **279**(52):54862-54871.
154. Jansen KM, Pavlath GK: **Mannose receptor regulates myoblast motility and muscle growth.** *The Journal of cell biology* 2006, **174**(3):403-413.
155. Horsley V, Pavlath GK: **Prostaglandin F2(alpha) stimulates growth of skeletal muscle cells via an NFATC2-dependent pathway.** *The Journal of cell biology* 2003, **161**(1):111-118.
156. Richardson BE, Nowak SJ, Baylies MK: **Myoblast fusion in fly and vertebrates: new genes, new processes and new perspectives.** *Traffic* 2008, **9**(7):1050-1059.
157. Pajcini KV, Pomerantz JH, Alkan O, Doyonnas R, Blau HM: **Myoblasts and macrophages share molecular components that contribute to cell-cell fusion.** *The Journal of cell biology* 2008, **180**(5):1005-1019.

158. Abramovici H, Gee SH: **Morphological changes and spatial regulation of diacylglycerol kinase-zeta, syntrophins, and Rac1 during myoblast fusion.** *Cell motility and the cytoskeleton* 2007, **64**(7):549-567.
159. Carosio S, Berardinelli MG, Aucello M, Musaro A: **Impact of ageing on muscle cell regeneration.** *Ageing research reviews* 2011, **10**(1):35-42.
160. Cornelison DD, Wold BJ: **Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells.** *Developmental biology* 1997, **191**(2):270-283.
161. Megeney LA, Kablar B, Garrett K, Anderson JE, Rudnicki MA: **MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle.** *Genes & development* 1996, **10**(10):1173-1183.
162. Zammit PS, Golding JP, Nagata Y, Hudon V, Partridge TA, Beauchamp JR: **Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal?** *The Journal of cell biology* 2004, **166**(3):347-357.
163. Morioka M, Hamada J, Ushio Y, Miyamoto E: **Potential role of calcineurin for brain ischemia and traumatic injury.** *Progress in neurobiology* 1999, **58**(1):1-30.
164. Wang JH, Desai R: **A brain protein and its effect on the Ca²⁺-and protein modulator-activated cyclic nucleotide phosphodiesterase.** *Biochemical and biophysical research communications* 1976, **72**(3):926-932.
165. Ek-Rylander B, Bill P, Norgard M, Nilsson S, Andersson G: **Cloning, sequence, and developmental expression of a type 5, tartrate-resistant, acid phosphatase of rat bone.** *The Journal of biological chemistry* 1991, **266**(36):24684-24689.
166. Enan E, Matsumura F: **Specific inhibition of calcineurin by type II synthetic pyrethroid insecticides.** *Biochemical pharmacology* 1992, **43**(8):1777-1784.
167. Gagliardino JJ, Krinks MH, Gagliardino EE: **Identification of the calmodulin-regulated protein phosphatase, calcineurin, in rat pancreatic islets.** *Biochimica et biophysica acta* 1991, **1091**(3):370-373.
168. Kissinger CR, Parge HE, Knighton DR, Lewis CT, Pelletier LA, Tempczyk A, Kalish VJ, Tucker KD, Showalter RE, Moomaw EW *et al*: **Crystal structures of human calcineurin and the human FKBP12-FK506-calcineurin complex.** *Nature* 1995, **378**(6557):641-644.
169. Muramatsu T, Kincaid RL: **Molecular cloning and chromosomal mapping of the human gene for the testis-specific catalytic subunit of calmodulin-dependent protein phosphatase (calcineurin A).** *Biochemical and biophysical research communications* 1992, **188**(1):265-271.
170. Rusnak F, Mertz P: **Calcineurin: form and function.** *Physiological reviews* 2000, **80**(4):1483-1521.
171. Yakel JL: **Calcineurin regulation of synaptic function: from ion channels to transmitter release and gene transcription.** *Trends in pharmacological sciences* 1997, **18**(4):124-134.
172. Ferreira A, Kincaid R, Kosik KS: **Calcineurin is associated with the cytoskeleton of cultured neurons and has a role in the acquisition of polarity.** *Molecular biology of the cell* 1993, **4**(12):1225-1238.
173. Moriya M, Fujinaga K, Yazawa M, Katagiri C: **Immunohistochemical localization of the calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase, calcineurin, in the mouse testis: its unique accumulation in spermatid nuclei.** *Cell and tissue research* 1995, **281**(2):273-281.
174. Shibasaki F, Price ER, Milan D, McKeon F: **Role of kinases and the phosphatase calcineurin in the nuclear shuttling of transcription factor NF-AT4.** *Nature* 1996, **382**(6589):370-373.

175. Crabtree GR: **Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation.** *Science* 1989, **243**(4889):355-361.
176. Rao A, Luo C, Hogan PG: **Transcription factors of the NFAT family: regulation and function.** *Annual review of immunology* 1997, **15**:707-747.
177. Crabtree GR, Olson EN: **NFAT signaling: choreographing the social lives of cells.** *Cell* 2002, **109 Suppl**:S67-79.
178. Weiss A, Littman DR: **Signal transduction by lymphocyte antigen receptors.** *Cell* 1994, **76**(2):263-274.
179. Jain J, Burgeon E, Badalian TM, Hogan PG, Rao A: **A similar DNA-binding motif in NFAT family proteins and the Rel homology region.** *The Journal of biological chemistry* 1995, **270**(8):4138-4145.
180. Luo C, Burgeon E, Carew JA, McCaffrey PG, Badalian TM, Lane WS, Hogan PG, Rao A: **Recombinant NFAT1 (NFATp) is regulated by calcineurin in T cells and mediates transcription of several cytokine genes.** *Molecular and cellular biology* 1996, **16**(7):3955-3966.
181. Nolan GP: **NF-AT-AP-1 and Rel-bZIP: hybrid vigor and binding under the influence.** *Cell* 1994, **77**(6):795-798.
182. Chytil M, Verdine GL: **The Rel family of eukaryotic transcription factors.** *Current opinion in structural biology* 1996, **6**(1):91-100.
183. Luo C, Shaw KT, Raghavan A, Aramburu J, Garcia-Cozar F, Perrino BA, Hogan PG, Rao A: **Interaction of calcineurin with a domain of the transcription factor NFAT1 that controls nuclear import.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996, **93**(17):8907-8912.
184. Luo C, Burgeon E, Rao A: **Mechanisms of transactivation by nuclear factor of activated T cells-1.** *The Journal of experimental medicine* 1996, **184**(1):141-147.
185. Macian F: **NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function.** *Nature reviews Immunology* 2005, **5**(6):472-484.
186. Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A: **Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT.** *Genes & development* 2003, **17**(18):2205-2232.
187. Schreiber SL, Crabtree GR: **The mechanism of action of cyclosporin A and FK506.** *Immunology today* 1992, **13**(4):136-142.
188. Dumont FJ, Staruch MJ, Koprak SL, Siekierka JJ, Lin CS, Harrison R, Sewell T, Kindt VM, Beattie TR, Wyvratt M *et al*: **The immunosuppressive and toxic effects of FK-506 are mechanistically related: pharmacology of a novel antagonist of FK-506 and rapamycin.** *The Journal of experimental medicine* 1992, **176**(3):751-760.
189. Sieber M, Baumgrass R: **Novel inhibitors of the calcineurin/NFATc hub - alternatives to CsA and FK506?** *Cell communication and signaling : CCS* 2009, **7**:25.
190. Ranger AM, Gerstenfeld LC, Wang J, Kon T, Bae H, Gravallesse EM, Glimcher MJ, Glimcher LH: **The nuclear factor of activated T cells (NFAT) transcription factor NFATp (NFATc2) is a repressor of chondrogenesis.** *The Journal of experimental medicine* 2000, **191**(1):9-22.
191. Ho IC, Kim JH, Rooney JW, Spiegelman BM, Glimcher LH: **A potential role for the nuclear factor of activated T cells family of transcriptional regulatory proteins in adipogenesis.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, **95**(26):15537-15541.

192. de la Pompa JL, Timmerman LA, Takimoto H, Yoshida H, Elia AJ, Samper E, Potter J, Wakeham A, Marengere L, Langille BL *et al*: **Role of the NF-ATc transcription factor in morphogenesis of cardiac valves and septum.** *Nature* 1998, **392**(6672):182-186.
193. Ranger AM, Grusby MJ, Hodge MR, Gravallesse EM, de la Brousse FC, Hoey T, Mickanin C, Baldwin HS, Glimcher LH: **The transcription factor NF-ATc is essential for cardiac valve formation.** *Nature* 1998, **392**(6672):186-190.
194. Graef IA, Chen F, Chen L, Kuo A, Crabtree GR: **Signals transduced by Ca(2+)/calcineurin and NFATc3/c4 pattern the developing vasculature.** *Cell* 2001, **105**(7):863-875.
195. Kegley KM, Gephart J, Warren GL, Pavlath GK: **Altered primary myogenesis in NFATC3(-/-) mice leads to decreased muscle size in the adult.** *Developmental biology* 2001, **232**(1):115-126.
196. Horsley V, Friday BB, Matteson S, Kegley KM, Gephart J, Pavlath GK: **Regulation of the growth of multinucleated muscle cells by an NFATC2-dependent pathway.** *The Journal of cell biology* 2001, **153**(2):329-338.
197. Friday BB, Pavlath GK: **A calcineurin- and NFAT-dependent pathway regulates Myf5 gene expression in skeletal muscle reserve cells.** *Journal of cell science* 2001, **114**(Pt 2):303-310.
198. Serrano AL, Murgia M, Pallafacchina G, Calabria E, Coniglio P, Lomo T, Schiaffino S: **Calcineurin controls nerve activity-dependent specification of slow skeletal muscle fibers but not muscle growth.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001, **98**(23):13108-13113.
199. Naya FJ, Mercer B, Shelton J, Richardson JA, Williams RS, Olson EN: **Stimulation of slow skeletal muscle fiber gene expression by calcineurin in vivo.** *The Journal of biological chemistry* 2000, **275**(7):4545-4548.
200. Horsley V, Jansen KM, Mills ST, Pavlath GK: **IL-4 acts as a myoblast recruitment factor during mammalian muscle growth.** *Cell* 2003, **113**(4):483-494.
201. Dellung U, Tureckova J, Lim HW, De Windt LJ, Rotwein P, Molkentin JD: **A calcineurin-NFATc3-dependent pathway regulates skeletal muscle differentiation and slow myosin heavy-chain expression.** *Molecular and cellular biology* 2000, **20**(17):6600-6611.
202. Rudnicki MA, Schnegelsberg PN, Stead RH, Braun T, Arnold HH, Jaenisch R: **MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle.** *Cell* 1993, **75**(7):1351-1359.
203. Patapoutian A, Yoon JK, Miner JH, Wang S, Stark K, Wold B: **Disruption of the mouse MRF4 gene identifies multiple waves of myogenesis in the myotome.** *Development* 1995, **121**(10):3347-3358.
204. Abbott KL, Friday BB, Thaloor D, Murphy TJ, Pavlath GK: **Activation and cellular localization of the cyclosporine A-sensitive transcription factor NF-AT in skeletal muscle cells.** *Molecular biology of the cell* 1998, **9**(10):2905-2916.
205. Schiaffino S: **Fibre types in skeletal muscle: a personal account.** *Acta physiologica* 2010, **199**(4):451-463.
206. Beylkin DH, Allen DL, Leinwand LA: **MyoD, Myf5, and the calcineurin pathway activate the developmental myosin heavy chain genes.** *Developmental biology* 2006, **294**(2):541-553.
207. Armand AS, Bourajjaj M, Martinez-Martinez S, el Azzouzi H, da Costa Martins PA, Hatzis P, Seidler T, Redondo JM, De Windt LJ: **Cooperative synergy between NFAT and MyoD regulates myogenin expression and myogenesis.** *The Journal of biological chemistry* 2008, **283**(43):29004-29010.

208. Arnold HH, Winter B: **Muscle differentiation: more complexity to the network of myogenic regulators.** *Current opinion in genetics & development* 1998, **8**(5):539-544.

REMERCIEMENTS

Ce travail n'aurait pu être mené à son terme sans l'aide et le soutien de très nombreuses personnes.

Je tiens à exprimer mes remerciements à mon directeur de thèse, Christophe CHANOINE et à Anne-Sophie ARMAND pour leur investissement dans l'encadrement de mon travail, pour leurs conseils et pour leurs remarques très pertinentes sur mon rapport de thèse qui ont contribué énormément à son amélioration.

Je remercie le Docteur Vidal de m'avoir permis de réaliser ce travail au sein du laboratoire CESeM.

Je voudrais signifier ma profonde reconnaissance au Docteur Lefebvre qui a accepté de présider mon jury de thèse.

J'adresse mes remerciements au Professeur Beaudry et au Professeur Movassat d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse. Merci pour leurs conseils, leurs critiques et leurs commentaires.

Je souhaiterais exprimer ma gratitude au Professeur Frédéric CHARBONNIER. Tout au long de ce travail, j'ai bénéficié de son appui total et constant particulièrement dans les moments difficiles. Je le remercie également pour ses multiples encouragements et pour sa confiance. Qu'il en soit remercié chaleureusement.

Je tiens à exprimer ma plus sincère gratitude au Professeur Charbel MASSAD pour son soutien et son aide malgré ses occupations professionnelles multiples. Il est également assuré de ma sincère reconnaissance.

J'adresse mes remerciements au Professeur Claire LEGAY qui m'a grandement soutenu et aidé en qualité de co-directrice de l'école doctorale B3MI.

Mes remerciements s'adressent à Sylvie Lécolle pour sa participation directe et précieuse à cette thèse de doctorat pour qu'elle soit réalisée et qu'elle aboutisse.

J'adresse mes remerciements à Bruno DELLA GASPERA de s'être rendu disponible pour la pré-soutenance, de m'avoir prodigué maints conseils. Je remercie aussi pour le rôle particulier qu'il a joué au cours de ces trois années de thèse grâce à ses explications sur le développement et ses commentaires sur mon travail. Je le remercie surtout d'avoir partagé avec moi ses connaissances, sa pédagogie et son expérience.

Durant ces trois années de thèse, j'ai eu la chance de rencontrer de nombreuses personnes attachantes : que toutes soient remerciées pour les bons moments partagés. Je remercie infiniment Olivier pour son aide, Julien G pour son humour. Un grand merci à Delphine et GG pour leur aide et pour tout, absolument TOUT le reste. Julien B. et Martin, merci pour vos encouragements. Françoise, merci pour ton soutien et tes conseils. Mehdi, courage, ton travail sera récompensé. Marielle et Meryem, merci pour votre participation au projet !

Mes pensées dépassent largement les mots alors tout simplement merci à Sarah, Mehrnaz,, Dominique, Philippe, Sophie, Evelyne, Carole, Gemna, Emeline, Nyoucha, Céline, Walid, Julia, Camille, Séverine, Intissar, Julien M. et Joël.

Ma reconnaissance va à ceux qui ont plus particulièrement assuré le soutien affectif de ce travail. Amina! Ah bella !!! Qu'aurais-je fait si tu n'avais pas été là. Vois-tu comment j'aurais terminé cette thèse ? Je n'oublierai JAMAIS les nombreux cafés et tisanes que nous avons partagés ensemble. « **Merci** » du plus profond du cœur. Farah, Un grand **MERCI** à ton amitié dévouée, ta complicité et aux moments partagés sans lesquelles ces deux dernières années n'auraient pas du tout été les mêmes. Merci d'avoir joué le rôle de relectrice du document final, Merci pour tes efforts indéfectibles ces deux derniers mois. Ronza, **MERCI** de t'être rendu disponible ces derniers mois. Merci pour ta jovialité, ton optimisme toujours rassurant qui m'a beaucoup aidé. Je suis ravie d'avoir appris à tes côtés. Jennifer, " *Thank you for being there for me through some of the most difficult times*". Manel, merci mille fois de ta gentillesse et ton soutien sans borne.

A présent je me retourne sur mon passé, et je me dis que la « *petite Nesrine* » de *Deir-el kamar* (Liban), a eu beaucoup de chances. De l'Ecole des sœurs « Saint-Joseph de l'apparition », au Lycée officiel de *Kfarhim*; ensuite de l'Université Libanaise de *Beyrouth* à l'Université Aix Marseilles-II et à présent l'Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité.

Qui aurait cru ? C'est vrai ! Et ça je le dois tout d'abord à ma petite famille « **DAOU** », mais surtout à mes parents. Cher Papa, couturier avec des moyens financiers assez modestes a réussi à nous guider tous les jours. Merci pour la confiance que tu nous as accordé. Même loin de toi tu continues de te préoccuper de nous et de notre confort. Très chère maman, malgré mon éloignement depuis de nombreuses années, ta tendresse, ton amour et tes prières m'ont porté et m'ont guidé tous les jours. Merci pour avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Neemat et hiba, mes chères sœurs, Ça a été long, très long, mais voilà ... Je vous remercie profondément pour tous les sacrifices que vous avez acceptés de consentir pour mon jeune être. Vous m'êtes indispensables et vitales ! Ce travail n'aurait jamais été possible sans votre soutien. « *Na3na3, hebbou, 7ebkon ana* »

« Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent du bonheur ; elles sont les charmants jardiniers par qui nos âmes sont fleuries »

N.

RÉSUMÉ

La voie de signalisation calcineurine/NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells) est très largement impliquée dans plusieurs aspects du développement et des pathologies du muscle squelettique. De nombreuses études ont souligné son implication dans la spécification des fibres musculaires adultes. Cependant, son rôle dans l'établissement du phénotype musculaire au cours de l'embryogenèse reste peu connu. Il faut noter que certains travaux suggèrent une implication de NFATc3 dans le nombre de fibres musculaires alors que l'isoforme NFATc2 pourrait être impliquée dans la taille des fibres musculaires. Les facteurs myogéniques (MRF) de la famille MyoD (incluant MyoD, Myf5, MRF4 et la myogénine) sont des facteurs de transcription à domaine bHLH (basic-Helix-Loop-Helix) clés pour la myogenèse squelettique. L'étude de leurs partenaires protéiques est essentielle pour bien comprendre la régulation de l'expression des gènes musculaires. Un nouveau paradigme de la transcription a été démontré (Armand *et al.* 2008), où une protéine NFAT pourrait coopérer spécifiquement avec un MRF : en effet, l'isoforme, NFATc3, coopère avec MyoD pour activer l'expression de la myogénine au cours de la somitogenèse. Ce rôle est spécifique du complexe NFATc3/MyoD puisque les souris mutantes *myod* (-/-) ; *nfatc2* (-/-) ne présentent aucune modification de l'expression de la myogénine au cours de la somitogenèse.

L'objectif de ce travail est d'étudier l'implication du complexe NFATc2/MyoD dans la myogenèse chez la souris. Nous montrons que l'isoforme NFATc2 coopère avec MyoD pour induire spécifiquement l'expression de la chaîne lourde néonatale la myosine (MHCneo), *in vitro* aussi bien qu'*in vivo*. Cette coopération est spécifique et cruciale puisque les souris double mutantes *myod* (-/-) ; *nfatc2* (-/-) meurent à la naissance avec une réduction spectaculaire de l'expression de la MHCneo, principale isoforme de la myosine exprimée à la naissance, alors que l'expression de cette chaîne lourde de la myosine n'est pas affectée chez les simples mutants. Par des analyses d'immunoprécipitation de la chromatine et de retard sur gels, nous avons montré que les isoformes NFATc1 et NFATc3 se lient de manière préférentielle au gène codant la chaîne lourde embryonnaire de la myosine (MHCemb).

Ce travail, qui met en évidence pour la première fois le rôle de la voie de signalisation calcineurine/NFAT dans la construction précoce de la fibre musculaire au cours de l'embryogenèse, montre aussi l'implication spécifique du complexe NFATc2/MyoD dans le contrôle du nombre de fibres musculaires au cours de l'embryogenèse.