



**HAL**  
open science

## Régulation de la différenciation du muscle strié squelettique par la voie let-7 – E2F5

Jérémie Kropp

► **To cite this version:**

Jérémie Kropp. Régulation de la différenciation du muscle strié squelettique par la voie let-7 – E2F5. Biologie moléculaire. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA11T090 . tel-01184550

**HAL Id: tel-01184550**

**<https://theses.hal.science/tel-01184550>**

Submitted on 16 Aug 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.

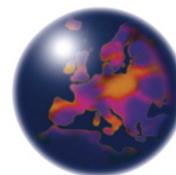
L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Comprendre le monde,  
construire l'avenir®



www.cnrs.fr



ÉCOLE DOCTORALE  
CANCÉROLOGIE

UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 418 :  
DE CANCÉROLOGIE

Laboratoire : *Laboratoire Epigénétique et Cancer CNRS FRE3377, DSV, iBiTec-S, SBIGeM, CEA Saclay*

**THÈSE**

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

par

**Jérémie KROPP**

Régulation de la différenciation du muscle strié squelettique  
par la voie let-7 -E2F5

Date de soutenance : 08/12/2014

Composition du jury :

Directeur de thèse :  
Co-directeur de thèse :

Annick HAREL-BELLAN  
Anna POLESSKAYA

DR (Université Paris Sud)  
CR (Université Paris Sud)

Rapporteurs :

Slimane AIT-SI-ALI  
Julie DUMONCEAUX

DR (Université Paris Diderot Paris 7)  
DR (Université Pierre et Marie Curie)

Examineurs :

François DAUTRY  
Pascale GUICHENEY  
Yegor VASSETZKY

DR (Université Paris Sud)  
DR (Université Pierre et Marie Curie)  
DR (Université Paris Sud)

*A ma famille,*

# Régulation de la différenciation du muscle strié squelettique par la voie let-7-E2F5

---

## Sommaire

<b>Liste des figures.....</b>	<b>6</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>7</b>
<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>8</b>
<b>Remerciements .....</b>	<b>10</b>
<b>Résumé.....</b>	<b>14</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>16</b>
<b>I) La différenciation du muscle strié squelettique.....</b>	<b>17</b>
A) Le muscle strié squelettique.....	17
1) Les différents tissus musculaires.....	17
2) Organisation du muscle squelettique.....	17
a) Les cellules musculaires striées .....	17
b) Les cellules satellites .....	20
3) La différenciation musculaire.....	21
a) Facteurs de transcription régulant positivement la différenciation musculaire .....	21
1) Les MRF, régulateurs essentiels de la différenciation musculaire .....	21
2) La famille MEF2, cofacteurs importants des MRF .....	23
b) Activation de la différenciation musculaire par des facteurs externes : importance des facteurs de croissance IGF.....	24
c) La détermination myogénique.....	27
d) La différenciation terminale .....	28
1) Sortie du cycle cellulaire.....	28
2) Activation du programme myogénique .....	29
4) Régénération musculaire .....	31
B) Répresseurs de la différenciation musculaire.....	31
1) Facteurs de transcription inhibant la différenciation musculaire .....	32

a)	La famille ID, régulatrice de l'activité des MRF .....	32
b)	Autres répresseurs transcriptionnels .....	34
2)	Répresseurs non transcriptionnels .....	35
a)	HMOX1, répresseur de myomiRs .....	35
b)	La cycline D1 .....	37
3)	Facteurs de croissance de la superfamille TGF- $\beta$ .....	38
a)	TGF- $\beta$ .....	38
b)	La myostatine .....	39
<b>II)</b>	<b>Le facteur de transcription E2F5 .....</b>	<b>43</b>
A)	Introduction .....	43
B)	La famille E2F .....	43
1)	Les facteurs E2F, régulateurs importants du cycle cellulaire .....	43
2)	Membres de la famille E2F .....	44
3)	E2F5, un répresseur transcriptionnel associé à la différenciation cellulaire .....	47
4)	Mécanisme d'action des facteurs E2F .....	48
5)	Régulation de l'activité des facteurs E2F .....	50
C)	Fonctions et cibles des facteurs E2F .....	51
D)	Rôle de E2F5 dans la différenciation cellulaire .....	52
E)	E2F5 dans le muscle squelettique .....	53
<b>III)</b>	<b>Les miARN let-7 .....</b>	<b>57</b>
A)	Introduction .....	57
B)	Biogénèse et mode d'action des miARN let-7 .....	59
1)	Biogénèse des miARN let-7 et des miARN .....	59
2)	Le complexe miRISC .....	61
3)	Reconnaissance de l'ARNm cible .....	63
4)	Mécanisme d'action des miARN let-7 et des miARN .....	65
a)	Inhibition de la traduction .....	65
b)	Clivage de l'ARNm .....	66
c)	Dégradation de l'ARNm .....	66
d)	Quel mécanisme final ? .....	68
e)	Modes d'action non canoniques .....	69
5)	Mécanismes de régulation de l'expression des miARN let-7 .....	69
C)	La famille let-7 : rôles dans le développement et conservation .....	71
1)	Découverte de let-7 comme un gène hétérochronique .....	71
2)	La famille let-7, une famille de miARN conservée dans le règne animal .....	72
D)	Fonctions et cibles des miARN let-7 chez les mammifères .....	75

E) Rôle des miARN let-7 dans la différenciation cellulaire .....	76
F) Rôle des miARN let-7 et des miARN dans la différenciation musculaire .....	79
1) miARN impliqués dans la différenciation musculaire et leurs cibles .....	79
2) Les miARN let-7, nouveaux répresseurs de la différenciation musculaire.....	81
3) Interactions des miARN let-7 avec des longs ARN non codants lors de la différenciation musculaire .....	82
<b>IV) Pathologies associées aux let-7 et à E2F5 .....</b>	<b>84</b>
A) Let-7 - E2F5 et cancer.....	84
1) Les miARN Let-7, suppresseurs de tumeur .....	84
2) E2F5, une protéine oncogène .....	85
B) Les miARN let-7 dans les maladies cardiovasculaires .....	85
C) Let-7 - E2F5 et maladies musculaires.....	86
<b>RESULTATS.....</b>	<b>88</b>
Article 1 .....	89
Article 2 (Article de recherche principal).....	103
Résultats supplémentaires .....	123
Article 3 .....	138
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>139</b>
Phénotype d'hypertrophie dû à l'inhibition des miARN let-7 .....	140
Cibles des miARN let-7 dans les myoblastes et myotubes .....	141
Le TAP-Tar, une technique biochimique pour purifier les cibles des miARN let-7.....	143
Action anti-différenciation des miARN let-7 .....	144
Voies régulées par les miARN let-7 lors de la différenciation musculaire .....	145
Répression d'inhibiteurs de la différenciation musculaire par les miARN let-7 .....	146
Expression des miARN let-7 au cours de la différenciation musculaire.....	147
Les miARN let-7 retardent la différenciation musculaire en ciblant E2F5 et ses multiples cibles.....	148
Partenaires de E2F5 dans la myogénèse.....	151
Régulation de l'activité de E2F5 au cours de la différenciation musculaire.....	151
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>156</b>
<b>PERSPECTIVES .....</b>	<b>159</b>
<b>REFERENCES .....</b>	<b>162</b>

## Liste des figures

Figure 1. Organisation et structure du muscle squelettique chez l'homme.....	19
Figure 2. Modèle simplifié de la régulation de la myogénèse par les MRF.....	23
Figure 3. Représentation schématique de la voie IGF/AKT/MTOR.....	26
Figure 4. Mécanisme d'inhibition de la différenciation musculaire par ID.....	34
Figure 5. Mécanisme d'inhibition de la différenciation musculaire par HMOX1.....	37
Figure 6. Phénotypes résultants de mutations dans le gène codant pour la myostatine.....	41
Figure 7. Les différents membres de la famille E2F.....	46
Figure 8. Action des différents facteurs E2F durant le cycle cellulaire.....	48
Figure 9. Mécanismes simplifiés de l'action des facteurs E2F.....	49
Figure 10. La biogénèse des miARN.....	60
Figure 11. Représentation schématique du clivage d'un ARNm guidé par le miRISC.....	62
Figure 12. Interactions d'un miARN avec sa cible ARNm.....	64
Figure 13. Mécanismes de régulation des ARNm par les miARN.....	67
Figure 14. Mécanismes de régulation des miARN let-7 par LIN28.....	70
Figure 15. Membres de la famille let-7 chez <i>C.elegans</i> et chez l'homme.....	73
Figure 16. Interconnexions entre les miARN let-7 et leurs cibles.....	76
Figure 17. Variations d'expression des gènes les plus significativement surexprimés dans les myoblastes miR-98 KD (différenciation précoce).....	127
Figure 18. Quantification des expériences de double perte de fonction miR-98/siARN contre des gènes significativement surexprimés dans les myoblastes miR-98 KD.....	129
Figure 19. Validation par RT-qPCR des variations de l'expression des gènes observées sur puces Affymetrix dans des myoblastes miR-98 KD (différenciation précoce).....	130
Figure 20. Expériences de CHIP de E2F4 et E2F5 dans des myoblastes à 1 et 2 jours de différenciation.....	132
Figure 21. Principe de la technique de TAP-Tar.....	133
Figure 22. Résultats d'expériences de TAP-Tar de let-7g et de miR-20a.....	134
Figure 23. Mécanisme possible de régulation de la différenciation musculaire par la voie let-7 - E2F5.....	150
Figure 24. Sites conservés pour des familles de miARN dans le 3'UTR de E2F5 (humain).154	

## Liste des tableaux

Tableau 1. Gènes cibles des facteurs E2F.....	52
Tableau 2. Rôle et régulation des facteurs E2F dans la différenciation musculaire .....	56
Tableau 3. Membres de la famille let-7 impliqués dans la différenciation cellulaire et leurs cibles.....	78
Tableau 4. miARN ayant un rôle important dans la différenciation musculaire .....	80
Tableau 5. Variations d'expression des gènes de la voie interféron significativement surexprimés dans les myoblastes miR-98 KD.....	124
Tableau 6. Variations d'expression des facteurs de transcription pro-différenciation musculaire dans les myoblastes miR-98 KD. ....	125

## Liste des abréviations

3'UTR : région 3' non traduite (3' untranslated region)

5'UTR : région 5' non traduite (5' untranslated region)

ACVR2B: activin receptor type 2B

ADN : acide désoxyribonucléique

AGO : Argonaute

ARN : acide ribonucléique

bHLH : basic Helix-Loop-Helix

BMP : Bone Morphogenetic Protein

CDK : kinase dépendante des cyclines (Cyclin-Dependent Kinase)

CBP : CREB-binding protein

CCND1 : cycline D1

ChIP : immunoprécipitation de chromatine (Chromatin ImmunoPrecipitation)

CKI : inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines (Cyclin-dependent Kinase Inhibitor)

Ct: C-terminal

DGCR8: DiGeorge Critical syndrome Region 8

DP : dimerization partner

GW182 : glycine-tryptophane protéine de 182 kDa

HAT : histone acétylase

HDAC : histone désacétylase

HLH : Helix-Loop-Helix

HMGA2 : High Mobility group AT-hook 2

HMOX1 : Heme Oxygenase 1

ID : inhibitor of DNA-binding

IFI27 : interferon-alpha inducible protein 27

IGF : insulin growth factor

IL6 : interleukin 6

KD: knockdown

LNA : Locked Nucleic Acid

lncRNA : long ARN non-codant (long non-coding RNA)

MCK : créatine kinase musculaire (Muscle Creatine Kinase)

MEF2 : Myocyte Enhancer Factor 2  
MHC : chaîne lourde de la myosine (Myosin Heavy Chain)  
miARN : microARN  
MRF : Myogenic Regulatory Factor  
MSTN : myostatine  
MTOR : mammalian target of rapamycin  
MYF5 : myogenic factor 5  
MYOD : myogenic differentiation 1  
MYOR : myogenic repressor  
NES : signal d'export nucléaire (Nuclear Export Signal)  
NLS : signal de localisation nucléaire (Nuclear Localization Signal)  
nt: nucléotide  
PAX : Paired box  
PCAF : p300/CBP associated factor  
PI3K : phosphatidylinositol-3 kinase  
RB : protéine du rétinoblastome  
(mi)RISC : (mi)RNA-induced silencing complex  
RT-qPCR: PCR quantitative couplée à une transcription inverse (quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)  
S6K : p70S6 kinase  
siARN : petit ARN interférent (small interfering RNA)  
SRF : facteur de réponse au sérum  
TAP-Tar : Tandem Affinity Purification of miRNA target  
TGF : transforming growth factor

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie les Dr Slimane Ait-Si-Ali et Dr Julie Dumonceaux d'avoir accepté d'être mes rapporteurs et de corriger mon manuscrit. Je remercie également le Dr François Dautry d'avoir accepté d'être le président de mon jury de thèse ainsi que les Dr Pascale Guicheney et Dr Yegor Vassetzky d'en être les examinateurs. Slimane, merci également de m'avoir aidé pour les CHIP.

Je remercie particulièrement ma directrice de thèse Annick pour m'avoir accueilli, soutenu et donné l'opportunité de faire ma thèse dans son laboratoire. Merci encore de m'avoir permis de prolonger mon contrat, et pour ce congrès en Italie qui était très intéressant et me laissera de très bons souvenirs.

Un énorme merci à ma co-directrice de thèse Anna pour m'avoir encadré et permis de mener à bien mon projet de thèse durant ces quatre années. Merci pour ton aide, ton soutien et tes conseils pendant ces quatre années de thèse. Merci également de m'avoir permis de changer de projet de thèse en début de 2<sup>ème</sup> année, ce qui m'a permis de publier des résultats très intéressants. Sans toi, l'aboutissement de mon projet de thèse aurait été très difficile.

Un énorme merci à Cindy. Ton aide, tes conseils et nos discussions durant ma thèse ont été précieux pour m'aider à avancer dans mon projet. Si ce dernier a abouti, c'est en grande partie grâce à toi. Ta bonne humeur et nos pauses-café vont me manquer, tu as été une collègue idéale. Je te souhaite bon courage et bon épanouissement dans ton nouveau labo.

Merci à Guillaume pour tes conseils sur les analyses statistiques de mes résultats, ta bonne humeur et tes blagues. Je compte sur toi pour bien t'occuper des lapins du CEA en mon absence. Promis tu apprendras davantage à parler croate à ma prochaine soirée ☺.

Nadya, merci pour ton aide sur toute la partie bio-informatique de mon projet. Julien, merci pour tes conseils sur les ChIP, je te souhaite de trouver vite un bon post-doc à Boston. Merci à Mouloud, tu m'as beaucoup aidé au début de ma thèse sur le TAP-Tar, je te souhaite de bien réussir dans ton labo. Mathieu, c'était un plaisir d'être ton collègue. Merci encore de m'avoir aidé à réparer le site de mon journal. Bon courage pour la suite de ton projet. Thaiz, merci pour ta gentillesse et ta bonne humeur, c'était un plaisir d'être ton voisin de bureau, je te souhaite bonne chance dans ton postdoc. Merci à Sylvain et bon courage dans ton nouveau métier, j'espère qu'il y aura des discussions aussi profondes là-bas que lors de nos pauses-café. Je penserai à toi chaque fois que je verrai des pétales de rose. Eugène, la thèse n'est qu'une longue série de souffrances inutiles menant inévitablement à des perspectives professionnelles bouchées ☺, bon courage avec la tienne.

Merci également à l'ensemble des collègues qui sont (ou sont passés) au Laboratoire Epigénétique et Cancer : Gueorgui, Regina, Irina, Cornelia, Marie, Mélanie, Selim, Sylvain Cuvellier, Neri, Ziad, Julie, Elena, Emilie, Aurélie, Massimo, Pascal, Barbara, Maya, Linda, Maarja-Liisa, Andrei, Marie-Annie, Leslie-Ann... C'était un vrai plaisir de travailler avec vous, toujours dans une super ambiance.

Merci aux membres du labo de Michel Werner avec qui j'ai bien sympathisé durant ma thèse, et dont certains sont devenus des amis. Fanny, merci pour ta bonne humeur constante et pour ces nombreuses soirées rock. Bonne chance pour ton postdoc au Canada. Peut être qu'on pourrait commercialiser notre fameux calendrier ;-)? Thomas, bonne chance pour la fin de thèse (rendras tu hommage à Borat lors de ton pot de thèse?). Camille (Cibot), je croise les doigts pour la fin de ta thèse! Camille (Benoist), je suis sûr que le PSG peut encore viser la 4<sup>ème</sup> place cette année ☺. Nuno, merci pour toutes ces discussions, ta gentillesse, et de m'avoir ramené de nombreuses fois à Paris, ainsi que pour ton aide apportée lors de la soutenance.

Manu, merci pour ces pauses-café riches en enseignements philosophiques et en conseils. Je tâcherai d'en appliquer certains (pas tous) cette année! Je pense que tu devrais sincèrement donner des séminaires.

Je remercie également l'ensemble des collègues du SBIGeM avec qui il était toujours agréable de discuter autour d'un café : Isaline, Jérémy, Clément, Camille, Cristelle, Jean-Baptiste, May, Pauline, Véronique, François, Nicolas, Catherine, Chantal, Adrien, Michel, Céline, Agathe, Arthur, Wala, Islam, Guillaume, Pierre, Cyril, Julie, Gwenaëlle... (j'en oublie sûrement)

Un merci particulier au Dr Pierre-Antoine Defossez, qui m'avait conseillé le laboratoire du Dr Annick Harel-Bellan, il y a maintenant 5 ans, alors que je cherchais à faire une thèse dans le domaine des miARN. Un second merci particulier à mon professeur de SVT de Terminale S, Mr Salomon, qui m'a transmis sa passion pour la biologie et m'a motivé à poursuivre dans cette voie. Sans lui, j'aurais peut être fait des études de mathématiques.

Un grand merci à mes parents et mon frère, pour leur infinie gentillesse et leur soutien constant, ainsi qu'à l'ensemble de ma famille : Mamie Odile, Tonton Dédé, Janine, Elise, Florent, Gabriel, Alain, Olivier, Pierre... J'ai été très heureux que vous (et mes amis) veniez assister à ma thèse. Une pensée émue pour mon grand-père Jean, malheureusement parti trop tôt au début de ma thèse.

Merci au soutien sans faille de mes amis durant ces quatre années de thèse : Pierre aka Boc Maxima (merci pour ton amitié et nos nombreuses discussions), Sophie (merci pour les nombreux conseils et discussions à propos de ma thèse), Julien dit « Jean-Eude de la Stachemou » (merci de soutenir les motards et le Mariage pour Tous), Laetitia (merci d'avoir permis à l'action Red Bull d'exploser), Guillaume (merci de faire le « bon choix » dans quelques mois !), Nicolas, Lukobu, Vincent, Nabila, Valentin, Julze, Matze, Baptiste, Ivana, Greg (pour notre passion commune des BN), Buldo, Caro, Catherine alias Baroudeuse, Alexis, Sabrina, Charly, Anne-So, Stéphanie, Boos, Rocco, Clara, Hélène, Ophélie, Samuel, William, Ewa, Scarlett, Guillaume S, Sanja, Christin, Greti, Lucie... Merci aussi à ma troupe de théâtre, Les Petits Chantiers, en particulier Bertrand et Catherine, ainsi qu'à ma guitare et mon piano, de m'avoir permis de créer et de me défouler durant ma thèse. Une pensée également pour Julien Doré qui risque désormais de se faire appeler « Docteur » par ses groupies.

Un grand merci au Ministère de la recherche et à l'AFM d'avoir financé ma thèse. Merci également à la compagnie Exiqon et à Niels Frandsen pour les LNA.

Un merci à l'association (et de ses fondateurs) « Le Prisme à Idées », en particulier Mathieu, Francesca, et Marine, de m'avoir permis de découvrir le journalisme scientifique. Cette activité à côté de ma thèse m'a énormément plu et a été très enrichissante. Je compte bien continuer à pratiquer le journalisme après ma thèse. Merci à l'Université Paris-Sud d'avoir financé cette mission doctorale de deux ans.

Je remercie le RER B pour m'avoir permis de « voyager dans le futur », un trajet de 20 min me faisant parfois, de manière surprenante, arriver à destination 2h plus tard. Merci aussi à tous ceux qui m'ont servi de taxi lorsque je finissais très tard les manips 😊.

Une pensée bouleversée pour mon ordinateur portable Lenovo, décédé en plein milieu de la rédaction de ma thèse. Tu as choisi le « bon moment » pour partir.

Enfin, je remercie Dieu (ou Chuck Norris, ou le hasard, selon les croyances), d'avoir créé les machines aussi incroyables que sont les êtres vivants. Penser que des milliards d'années d'évolution aient pu modeler des organismes aussi complexes à partir de quelques molécules organiques me donne le tournis. Ma thèse, n'est certes qu'une minuscule pierre apportée à un gigantesque édifice, mais elle m'aura permis de réaliser à quel point la régulation de la différenciation musculaire est un processus complexe. Quoique très fondamentaux, j'espère que mes résultats serviront un jour à des applications médicales.

## Résumé

La différenciation terminale du muscle strié squelettique est un processus extrêmement complexe qui implique une sortie définitive des myoblastes du cycle cellulaire coordonnée à l'activation d'un programme génétique spécifique. Durant la différenciation musculaire les myoblastes vont fusionner en larges myotubes multinucléés. Ce processus est régulé à différents niveaux : au niveau transcriptionnel mais aussi post-transcriptionnel notamment par les microARN (miARN). Ces petits ARN non-codants (20-24 nucléotides) entraînent clivage ou arrêt de la traduction de l'ARN messager (ARNm) ciblé. Dans le laboratoire, un crible pangénomique utilisant des inhibiteurs de miARN dans des myoblastes humains a permis de mettre en évidence 63 miARN régulant la différenciation du muscle strié squelettique. L'inhibition de l'un d'entre eux, miR-98, appartenant à la famille let-7, entraîne une forte accélération du processus de différenciation ainsi qu'une hypertrophie des myotubes. A l'inverse, les miARN let-7 ectopiques retardent la différenciation. Les miARN let-7, sont parmi les premiers miARN décrits dans la littérature, et notamment connus pour réguler des processus de développement et de différenciation cellulaire. Ils sont aussi dérégulés dans de nombreux cancers où il agissent plutôt comme des suppresseurs de tumeur. Certaines études ont reporté des rôles des miARN let-7 dans le muscle, mais leur rôle dans la différenciation du muscle n'avait jamais été étudié.

Lors de ma thèse, j'ai cherché à comprendre comment miR-98 retarde la différenciation du muscle strié squelettique. Des analyses transcriptomiques dans des myoblastes où ce miARN a été inhibé ont montré la perturbation de l'expression de 240 gènes. Parmi eux, j'ai montré que le répresseur transcriptionnel E2F5 est important pour la régulation de la différenciation musculaire via miR-98, et est directement ciblé par ce miARN. L'inhibition de E2F5 permet de rétablir un niveau de différenciation normal malgré l'inhibition de miR-98. E2F5 est un régulateur important du cycle cellulaire. Sa fonction dans le muscle n'avait pas encore été explorée. Mes résultats montrent que E2F5 accélère le processus de différenciation. J'ai ensuite montré que E2F5 peut réguler directement des gènes répresseurs de la différenciation musculaire, comme *IDI* et *HMOX1*, et indirectement des répresseurs de la voie TGF- $\beta$ , expliquant son action sur la différenciation.

Au final, miR-98 régule la différenciation du muscle strié squelettique en agissant directement sur l'expression de E2F5, et indirectement sur ses multiples cibles. Mes résultats

ont ainsi mis en évidence une nouvelle voie de régulation de la différenciation musculaire : la voie let-7 - E2F5.

Mots-clés: microARN, let-7, miR-98, différenciation du muscle strié squelettique, E2F5

# INTRODUCTION

## I) La différenciation du muscle strié squelettique

Dans notre laboratoire, nous nous intéressons à la différenciation terminale myogénique. Pour l'étudier, nous utilisons comme modèles des lignées de myoblastes (myoblastes humains LHCN (Zhu et al., 2007) et murins C2C12) qui peuvent différencier *in vitro* et former des myotubes.

### A) Le muscle strié squelettique

#### 1) Les différents tissus musculaires

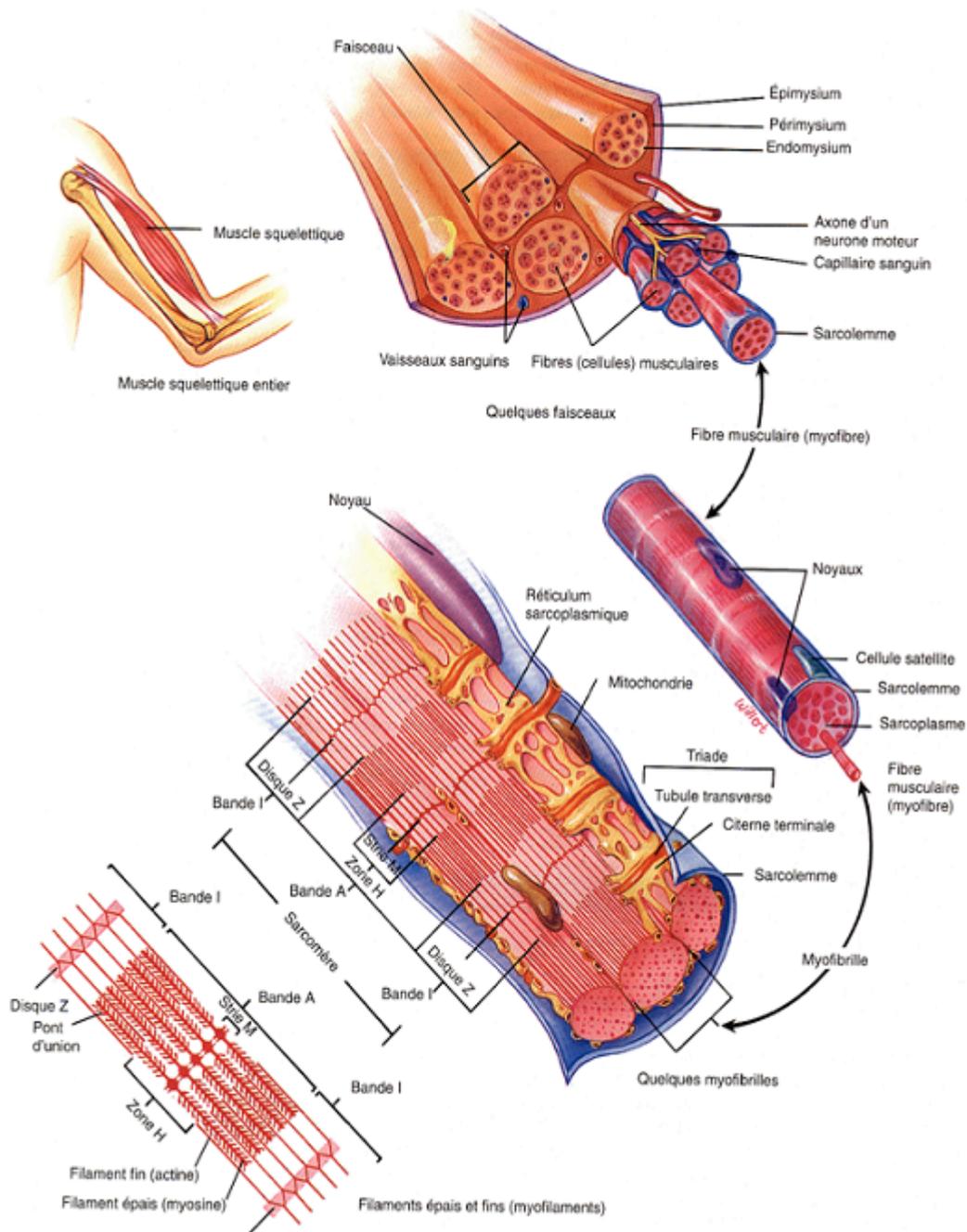
Trois types musculaires sont présents dans notre organisme : le muscle lisse, le muscle cardiaque et le muscle strié squelettique. Ces différents types musculaires sont constitués par la même unité cellulaire de base : le myocyte. Notre objet d'étude correspond donc ici au muscle strié squelettique (humain et murin). Les muscles squelettiques représentent environ la moitié de notre masse corporelle. Sous contrôle du système nerveux volontaire, ces muscles permettent la motricité ainsi que le maintien de la posture du corps. Le muscle squelettique est aussi impliqué dans la thermogénèse (production de chaleur), le stockage d'énergie (réserve de glycogène), et est un réservoir d'acides aminés qui seront relâchés dans le sang en cas de jeûne. Plus récemment, des études ont montré que le muscle joue aussi un rôle d'organe endocrinien par la sécrétion de « myokines », hormones qui agissent sur le muscle, le foie, ou encore le tissu adipeux (Pratesi et al., 2013).

#### 2) Organisation du muscle squelettique

##### a) Les cellules musculaires striées

La fibre musculaire (encore appelée myofibre ou myocyte) constitue la cellule musculaire striée fonctionnelle (**Figure 1**). Le processus de formation d'une fibre musculaire implique au départ des cellules progénitrices du muscle ayant pour origine les somites (Tajbakhsh, 2003). Ces progéniteurs musculaires vont être soumis à une étape de

détermination myogénique qui va les convertir en myoblastes. Ces myoblastes sont des cellules souches qui peuvent encore proliférer mais sont déterminées, et ont donc uniquement la faculté de se différencier en muscle. Ils vont ensuite se différencier en myotubes. Pour cela ils vont sortir de manière irréversible du cycle cellulaire puis fusionner en de larges cellules multinuclées, qui expriment alors des protéines spécifiques du muscle comme la créatine kinase (MCK) et la chaîne lourde la myosine (MHC). Une fois sortis du cycle, les myotubes multinuclés vont ensuite donner naissance à des fibres musculaires matures, de forme allongée et d'un diamètre de 10 à 100  $\mu\text{m}$  et dont la longueur peut atteindre jusque 10 cm (**Figure 1**).



**Figure 1. Organisation et structure du muscle squelettique chez l'homme**

Extrait de (Tortora and Grabowski, 1994)

Les myofibrilles, provenant de la fusion de dizaines de myoblastes, ont un cytoplasme (ou sarcoplasme) caractérisé par la présence de milliers de myofibrilles, en position centrale de la fibre alors que les noyaux prennent une position périphérique. Les myofibrilles sont de longs cylindres allongés dans le sens de la cellule et sont elles-mêmes formées par la succession régulière de petits cylindres appelés sarcomères, éléments contractiles de la fibre. Les sarcomères, qui donnent leur aspect strié au muscle, sont constitués de deux types de filaments de protéines contractiles : les filaments fins d'actine et les filaments épais de myosine, orientés selon l'axe de la myofibrille. Les sarcomères vont se raccourcir

grâce à un cycle de liaison-dissociation entre actine et myosine, en présence d'une concentration élevée de calcium, ce qui permet in fine la contraction musculaire. La myofibre subit également une innervation par des axones de la moelle épinière lors de sa maturation, formant une jonction neuromusculaire. L'arrivée d'un potentiel d'action au niveau de la terminaison nerveuse d'un de ces neurones permet la libération massive d'ions calcium stockés dans le réticulum et entraîne la contraction musculaire. La fibre musculaire est aussi délimitée par sa membrane plasmique appelée sarcolemme, elle-même entourée par une membrane basale. Le cytoplasme de la myofibre, lui, comprend en plus d'un réticulum, de très nombreuses mitochondries et du glycogène, réserves énergétiques de la cellule.

Une autre population de cellules, quiescentes, s'associe ensuite aux fibres musculaires durant leur maturation : les cellules satellites.

### *b) Les cellules satellites*

Observées et nommées ainsi pour la première fois au début des années 60 (Mauro, 1961), les cellules satellites sont de petites cellules mononuclées qui sont localisées entre la fibre musculaire et sa lame basale (**Figure 1**). Leur proportion est très faible par rapport au nombre de noyaux dans une myofibre. Ces cellules souches musculaires, qui ont pour origine les somites (Armand, 1983), remplissent des rôles essentiels dans la régénération (après blessure, absence de fonctionnement, dénervation du muscle), la croissance, le renouvellement (homéostasie) ou encore l'hypertrophie musculaire due à l'exercice physique (voir page 31). Une cellule satellite est quiescente mais après activation (dans le cas d'une lésion par exemple), cette dernière va proliférer et fusionner avec des fibres musculaires existantes. Les cellules satellites peuvent également fusionner entre elles pour former de nouvelles fibres musculaires. Leur division asymétrique leur permet de maintenir la population de cellules quiescentes initiale (Kuang et al., 2007; Rocheteau et al., 2012).

### 3) La différenciation musculaire

#### a) *Facteurs de transcription régulant positivement la différenciation musculaire*

##### 1) Les MRF, régulateurs essentiels de la différenciation musculaire

La détermination, la différenciation puis la maturation des fibres musculaires nécessitent un remodelage de l'expression de nombreux gènes. Ces changements sont régulés par divers facteurs de transcription qui vont agir de façon coordonnée. Parmi eux, les MRF (myogenic regulatory factors) jouent un rôle primordial, au cœur de la détermination et de la différenciation musculaire (Figure 2).

En 1979, l'utilisation de la 5-azacytidine a montré que des fibroblastes peuvent être convertis en myoblastes (Taylor and Jones, 1979). Ce composé modifie l'expression génique, et le transfert d'ADN génomique de cellules traitées à l'azacytidine dans des fibroblastes induit leur conversion en myoblastes. Cela laissait suggérer l'existence de facteurs capables d'induire la différenciation musculaire (Lassar et al., 1986). C'est ainsi que dès la fin des années 1980, MYOD (myogenic differentiation 1, ou MYF3) a été le premier MRF découvert, en tant que facteur capable de convertir des fibroblastes en myoblastes, grâce à des expériences d'hybridation soustractive (Davis et al., 1987). MYOD est exprimé uniquement dans le muscle squelettique. Introduit dans diverses lignées non myogéniques, comme des chondrocytes, des adipocytes, des fibroblastes ou encore des neurones, MYOD entraîne leur différenciation en myoblastes (Choi et al., 1990; Weintraub and Tapscott, 1989). MYOD a ainsi la capacité d'induire seul une reprogrammation des cellules vers un destin myogénique.

Peu après cette découverte, des expériences de criblage de banques de cDNA musculaires avec des sondes MYOD ont permis d'identifier trois autres facteurs similaires à MYOD, qui forment ainsi la famille des MRF :

-MYF5 (Braun et al., 1989)

-Myogénine (ou MYF1) (Edmondson and Olson, 1989; Wright et al., 1989)

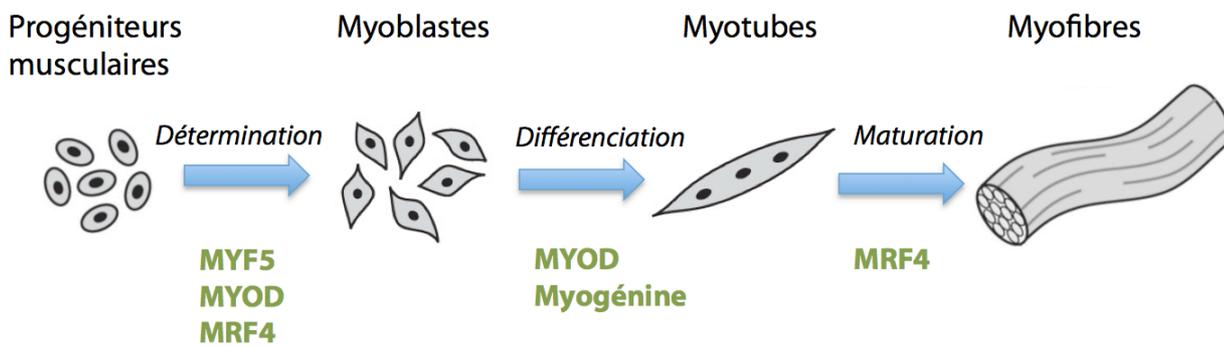
-MRF4 (encore appelée MYF6 ou herculine) (Rhodes and Konieczny, 1989)

Tous ces MRF sont capables d'induire la différenciation musculaire lorsqu'ils sont exprimés de manière ectopique dans diverses lignées cellulaires.

Les MRF font partie de la superfamille des facteurs de transcription à domaine basic helix-loop-helix (bHLH). Ces derniers contiennent un domaine basique, leur permettant de lier une courte séquence d'ADN consensus CANNTG appelée « boîte E » (E-box) (Blackwell and Weintraub, 1990; Lassar et al., 1989). Cette boîte E est présente dans de nombreux promoteurs et amplificateurs (enhancers) de gènes spécifiques au muscle (Lassar et al., 1989). Cela permet une activation spécifique des gènes musculaires par les MRF.

Pour activer la transcription au niveau de ces boîtes E, les MRF agissent sous forme de dimères avec d'autres protéines bHLH : les protéines E. Les MRF sont ainsi actifs en tant qu'hétérodimères (et dans une moindre mesure en tant qu'homodimères) en s'associant principalement avec les protéines E E12, E47 (produits du même gène *E2A*) ou encore HEB (Lassar et al., 1991; Murre et al., 1989; Shirakata et al., 1993). Cette interaction favorise leur liaison à l'ADN ainsi que l'activation de la transcription (Lassar et al., 1991; Murre et al., 1989). Les protéines E sont ubiquitaires, contrairement aux MRF qui sont exprimées spécifiquement dans le muscle. Alors que de nombreuses études *in vitro* ont montré l'importance de la coopération entre MYOD et E12/E47 pour l'activation des gènes musculaires, la réelle nécessité d'E12/E47 pour la différenciation musculaire est moins claire. L'inhibition d'E12/E47 a en effet été à la fois montrée comme réprimant (Lassar et al., 1991) ou étant sans effet sur la différenciation musculaire (Zhuang et al., 1992). Cette dernière observation pourrait s'expliquer par une redondance de fonction avec d'autres protéines E. Parmi elles, HEB semblerait être de première importance pour la différenciation musculaire (Parker et al., 2006). Exprimée dans diverses lignées musculaires, son inhibition entraîne un blocage de la différenciation musculaire. Alors que les protéines E s'associent avec les MRF pour réguler positivement leur action, d'autres bHLH et HLH, comme ID1 ou TWIST, inhibent l'action des MRF en formant des hétérodimères avec eux ou avec les protéines E (voir page 32).

De très nombreuses boîtes E étant présentes dans le génome, on peut se demander comment les MRF « reconnaissent » les boîtes E des gènes musculaires parmi tant d'autres. Cette spécificité des MRF à activer les gènes musculaires serait due en partie à deux résidus alanine et thréonine spécifiques dans leur région basique, appelées « code myogénique », qui les distingue des autres bHLH (Brennan et al., 1991a; Davis et al., 1990; Winter et al., 2000). Cette région particulière leur permettrait notamment de coopérer avec un cofacteur positif : MEF2 (Black et al., 1998).



**Figure 2. Modèle simplifié de la régulation de la myogénèse par les MRF**

Lors du développement embryonnaire, les progéniteurs musculaires vont exprimer MYF5, MYOD et MRF4, ce qui va les « déterminer » en myoblastes, c'est à dire les restreindre à un destin myogénique. Ces myoblastes vont sortir du cycle cellulaire, se différencier et fusionner en larges myotubes. MYOD intervient dans l'arrêt de la croissance et active le programme myogénique avec la myogénine. En plus d'agir dans la détermination, MRF4 est un facteur important pour la maturation des myotubes en myofibres, unités fonctionnelles du muscle strié contractile.

## 2) La famille MEF2, cofacteurs importants des MRF

Les MRF n'agissent en effet pas seuls pour activer la transcription des gènes musculaires et coopèrent avec divers cofacteurs. Ils sont notamment « assistés » par les protéines Myocyte enhancer factor 2 (MEF2), régulateurs transcriptionnels importants de la différenciation musculaire (Black and Olson, 1998). Parmi les cofacteurs des MRF, cette coopération MRF-MEF2 a été la mieux caractérisée.

MEF2 a été à l'origine découvert comme un facteur liant l'élément amplificateur du gène *MCK* (Gossett et al., 1989). Absent lorsque les myoblastes prolifèrent, MEF2 augmente rapidement lorsque la différenciation musculaire est induite. Chez les vertébrés, la famille *MEF2* comprend quatre gènes : *MEF2A*, *MEF2B*, *MEF2C* et *MEF2D* (Black and Olson, 1998). Les MEF2 font partie de la famille des facteurs de transcription MADS-box (MCM1, agamous, déficiens, serum response factor). Cette famille comprend entre autres le facteur de réponse au sérum (SRF), facteur de transcription essentiel pour l'activation des gènes musculaires et la différenciation (Soulez et al., 1996).

Contrairement aux MRF, les MEF2 sont ubiquitaires, à l'exception de MEF2C qui est spécifique de quelques tissus dont le muscle squelettique (Black and Olson, 1998). Quant à

son mode d'action, MEF2 se lie préférentiellement à une zone riche en A/T : CTA(A/T)<sub>4</sub>TAG. Ce site MEF2 se retrouve dans les éléments régulateurs de nombreux gènes musculaires (Black and Olson, 1998; Gossett et al., 1989).

Plusieurs éléments ont suggéré une coopération entre les MRF et MEF2 dans l'activation de la transcription des gènes musculaires. Premièrement, MEF2 se lie directement à des MRF comme MYOD ou la myogénine (Kaushal et al., 1994), avec lesquels il agit en synergie pour activer des promoteurs comprenant à la fois boîtes E et sites MEF2 (Molkentin et al., 1995; Naidu et al., 1995). De plus, dans le génome, ces sites MEF2 se retrouvent souvent à proximité de boîtes E dans les promoteurs et amplificateurs des gènes musculaires (Wasserman and Fickett, 1998). Quant à son effet sur la différenciation musculaire, MEF2 n'est pas capable d'activer seul la différenciation, mais il augmente la différenciation lorsqu'il est surexprimé *in vitro* avec d'autres MRF (Molkentin et al., 1995).

Les MEF2 ne sont pas les seuls cofacteurs qui agissent avec MYOD. Pour activer la transcription de ses gènes cibles, MYOD recrute divers co-activateurs qui vont entraîner des changements dans la structure de la chromatine. Des histones acétylases (HAT) comme CREB-binding protein (CBP)/p300 et PCAF (p300/CBP associated-factor) coopèrent avec MYOD, leur activité étant nécessaire pour la différenciation musculaire (Polesskaya et al., 2001; Puri et al., 1997a, 1997b). Ces HAT entraînent par acétylation des histones une structure locale « ouverte » de la chromatine, et donc une activation de la transcription. PCAF et CBP/p300 acétylent aussi directement MYOD, augmentant ainsi son activité (Polesskaya et al., 2000; Sartorelli et al., 1999). Les complexes de remodelage de la chromatine SWI/SNF (SWItch/Sucrose NonFermentable), recrutés par MYOD, jouent aussi un rôle important dans l'activation de la transcription des gènes musculaires et sont requis pour la différenciation musculaire (de la Serna et al., 2001).

MYOD, ainsi que MEF2, peuvent également s'associer à des corépresseurs : les histones désacétylases (HDAC), ce qui entraîne la répression de certains loci du génome (Berkes and Tapscott, 2005).

### *b) Activation de la différenciation musculaire par des facteurs externes : importance des facteurs de croissance IGF*

La prolifération et la différenciation musculaire sont régulées par de nombreux facteurs de croissance externes, permettant au muscle de réagir et de s'adapter à son

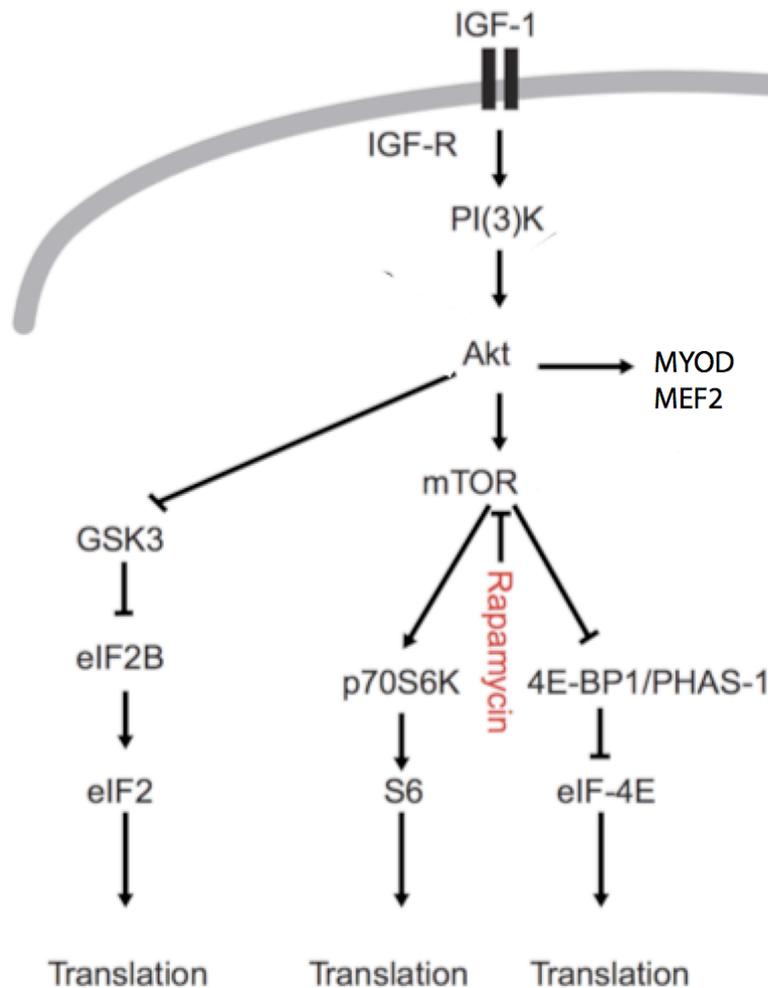
environnement. Par exemple, en cas de blessure ou d'exercice musculaire intense, le muscle va pouvoir se régénérer ou s'hypertrophier en réponse à ces facteurs, qui entraînent activation, prolifération et différenciation des cellules satellites qui vont venir majoritairement fusionner avec des fibres musculaires préexistantes. Ces signaux vont stimuler par des cascades de signalisation l'expression de gènes nécessaires à la différenciation du muscle strié, en agissant notamment sur l'activité des MRF.

Parmi ces signaux, les facteurs de croissance IGF (insulin-like growth factors), dont IGF1 (insulin-like growth factor 1), jouent un rôle clé dans la régénération et l'hypertrophie, stimulant à la fois la prolifération et la différenciation musculaire. Sécrété par les cellules musculaires ou d'autres types cellulaires environnants (monocytes/macrophages, cellules endothéliales) (Zanou and Gailly, 2013), IGF1 stimule la différenciation musculaire en agissant sur la voie PI3K (phosphatidylinositol-3 kinase)/AKT (Bodine et al., 2001; Rommel et al., 2001) (Figure 3). AKT va ensuite augmenter la synthèse protéique : il active la kinase MTOR (mammalian target of rapamycin) par phosphorylation. MTOR va inhiber PHAS-1, régulateur négatif de l'initiation, et stimuler la p70S6 kinase (S6K1 ou p70S6K). Cette sérine/thréonine kinase va par la suite augmenter la traduction en phosphorylant la protéine ribosomale S6 (RPS6). Cette activation de S6K1 est nécessaire pour que les fibres musculaires aient une taille normale, comme l'ont montré des expériences de délétion chez la souris (Ohanna et al., 2005). Cependant, S6K1 stimule l'hypertrophie en agissant uniquement sur le volume cellulaire, et non sur la myogénèse terminale (Erby and Chen, 2001; Ohanna et al., 2005).

Dans le cadre de ma thèse, j'ai justement trouvé un homologue de *S6K1*, *S6K2*, comme une potentielle cible importante de miR-98 dans la différenciation musculaire. *S6K2* est encore mal étudié. S'il phosphoryle également RPS6 et est activé par MTOR, il semblerait avoir des effecteurs et des fonctions distinctes de *S6K1* (Pardo and Seckl, 2013). L'augmentation de *S6K2* en absence de miR-98 pourrait en partie expliquer l'hypertrophie musculaire observée. Alors que de précédentes études montrent clairement que *S6K1* n'est pas indispensable à la myogénèse, mes résultats montrent que son homologue *S6K2* est nécessaire à la différenciation musculaire, confirmant une différence de fonction avec *S6K1* (voir partie Discussion).

IGF1 active la différenciation musculaire en agissant positivement via AKT sur les activités transcriptionnelles de MYOD et MEF2, stimulant l'activation du programme myogénique (Kaneko et al., 2002; Serra et al., 2007; Tamir and Bengal, 2000; Xu and Wu,

2000). Dans certaines conditions, IGF1 peut avoir un effet différent sur les myoblastes, stimulant la prolifération et empêchant une sortie précoce du cycle cellulaire (Foulstone et al., 2001; Héron-Milhavet et al., 2006).



**Figure 3. Représentation schématique de la voie IGF/AKT/MTOR**

Adaptée de (Rommel et al., 2001). La voie IGF est activatrice de la différenciation musculaire. La liaison d'IGF-1 à son récepteur (IGF-R) active PI3K puis AKT. Ce dernier va augmenter la traduction protéique en réprimant GSK3 (glycogen synthetase kinase 3) et en activant MTOR. MTOR agit sur la traduction en stimulant notamment p70S6K (S6K). AKT n'agit pas uniquement sur la traduction et favorise également la différenciation musculaire en stimulant les activités transcriptionnelles de MYOD et MEF2.

### *c) La détermination myogénique*

La détermination myogénique est une étape essentielle de la myogénèse. Lors de celle-ci, les progéniteurs musculaires multipotents vont devenir des cellules unipotentes à destinée myogénique : les myoblastes.

La détermination est orchestrée par deux MRF, MYOD et MYF5, qui sont essentiels pour cette étape. En effet, des souris double mutantes pour ces facteurs n'ont pas de muscle squelettique, en raison d'une absence de myoblastes (Rudnicki et al., 1993). Sans MYF5, les précurseurs musculaires migrent de façon aberrante, ne deviennent pas des myoblastes et adoptent d'autres destins cellulaires (Tajbakhsh et al., 1996). Plus récemment, l'importance de MRF4 dans la détermination a été montrée. En l'absence de MYF5 et MYOD, le muscle squelettique peut se former si MRF4 reste exprimé (Golub et al., 2004). La myogénine, importante pour la différenciation musculaire, ne semble pas quant à elle être essentielle dans la détermination. Des souris knockout pour la myogénine présentent de gros défauts et meurent à la naissance mais ont tout de même une population de myoblastes (Hasty et al., 1993; Nabeshima et al., 1993).

Au niveau de l'embryon, cette détermination débute lors de la formation du myotome qui exprime fortement MYOD et MYF5, MYF5 étant le premier MRF activé (Buckingham and Rigby, 2014). Les précurseurs qui migrent dans les bourgeons de membres restent indéterminés jusqu'à ce qu'ils arrivent à destination, où ils commencent alors à se déterminer en exprimant MYF5 et MYOD. Les myoblastes vont proliférer, afin de créer une population suffisante pour former les muscles de l'embryon puis du fœtus, ainsi qu'une population de réserve qui servira à la croissance et à la régénération musculaire après la naissance.

Les MRF ne sont pas les seuls à agir dans la détermination myogénique. La protéine NOTCH, qui contrôle une voie de signalisation entre les cellules adjacentes, y joue aussi un rôle primordial. En effet, son récepteur DELTA1 est présent à la surface de quelques cellules de la crête neurale. Ces dernières, lors de leur migration, vont toucher des cellules dermomyotomales : seules celles en contact avec ces cellules exprimant DELTA1 vont adopter un destin myogénique (Rios et al., 2011).

#### d) *La différenciation terminale*

Une fois déterminés, les myoblastes vont subir une étape de différenciation dite « terminale ». Pour cela, ils sortent du cycle cellulaire, activent un programme de gènes spécifique au muscle et fusionnent en de larges myotubes.

##### 1) Sortie du cycle cellulaire

Comme dans de nombreux autres types cellulaires, dans le muscle squelettique, la prolifération et la différenciation sont mutuellement exclusives. Pour s'accomplir, la différenciation terminale du muscle strié nécessite que les myoblastes arrêtent de proliférer et sortent du cycle cellulaire. Cette sortie du cycle est une étape clé précoce et irréversible. Le cycle cellulaire est découpé en plusieurs stades qui sont par ordre temporel : G1-S-G2-M (voir page 47). Cette progression dans le cycle cellulaire est notamment contrôlée par les complexes cyclines/CDK (voir ci-dessous).

La « décision » des myoblastes de continuer à proliférer ou de sortir du cycle et de commencer à différencier implique une modification de la balance entre les régulateurs positifs et négatifs du cycle cellulaire (Walsh and Perlman, 1997). Ainsi certaines cyclines, comme la cycline A, D1, ou D2 (mais pas les cyclines D3 et E), ainsi que leurs partenaires, kinases dépendantes des cyclines (CDK), tous activateurs du cycle cellulaire, vont diminuer durant la différenciation musculaire. Des répresseurs du cycle cellulaire, comme les inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines (CKI) p21, p57, p27, et la protéine du rétinoblastome (RB) vont à l'inverse être induits pendant la myogénèse terminale.

RB est un régulateur important du cycle cellulaire et de la différenciation cellulaire. Découvert en tant que premier gène suppresseur de tumeur, *RB* est un répresseur des facteurs de transcription E2F. Ces derniers activent de nombreux gènes importants pour la prolifération cellulaire. Pour que les myoblastes puissent proliférer et progresser dans le cycle cellulaire en passant la transition G1->S, les complexes cyclines/CDK inactivent RB par phosphorylation, le dissociant des facteurs E2F. RB, sous sa forme active hypophosphorylée, est essentiel pour l'arrêt de la prolifération nécessaire à la différenciation terminale. Son importance a été notamment montrée par des embryons de souris génétiquement modifiées pour exprimer faiblement RB. Ces derniers présentent de nombreux défauts musculaires et

des myotubes aux noyaux polyploïdes, indiquant un défaut de sortie du cycle (Zacksenhaus et al., 1996). *In vitro*, des myocytes délétés pour RB peuvent se différencier et fusionner en myotubes, mais ne sortent pas du cycle cellulaire (Novitch et al., 1996).

Les CKI p21 et p57 sont deux autres acteurs importants dans la sortie du cycle cellulaire, qu'ils favorisent en inhibant les CDK et en activant donc RB (Wang and Walsh, 1996). L'expression forcée de p21 dans des myoblastes en culture suffit à déclencher la sortie du cycle, même en présence de sérum (Guo et al., 1995). Cependant, *in vivo* p21 ne semble pas être essentiel pour la myogénèse, dans la mesure où des souris mutantes pour *p21* sont tout à fait viables (Deng et al., 1995). Cela suggère une redondance de fonction entre les CKI dans la différenciation musculaire, confirmée par le fait que des souris doubles mutantes *p21/p57* présentent, elles, de sévères défauts musculaires (Zhang et al., 1999b).

Les MRF, dont MYOD et la myogénine, en plus d'activer le programme myogénique, jouent aussi un rôle dans l'arrêt de la croissance. Exprimé de manière ectopique dans différentes lignées non musculaires, MYOD réprime le cycle cellulaire (Crescenzi et al., 1990; Sorrentino et al., 1990). Cette inhibition est indépendante de sa capacité à lier l'ADN et activer les gènes musculaires. MYOD agit sur l'arrêt de la croissance en induisant notamment les gènes clés pour la sortie du cycle, que sont *RB*, *p21* et *p57* (Busanello et al., 2012; Halevy et al., 1995; Martelli et al., 1994; Vaccarello et al., 2006). Il est intéressant de noter que RB est un co-activateur de MYOD (Gu et al., 1993; Novitch et al., 1996; Sellers et al., 1998). On voit donc que les principaux acteurs de l'arrêt de la croissance (MRF, RB, CKI, cyclines) sont connectés, formant une boucle de régulation positive permettant la sortie du cycle. MYOD induit p21 et p57 qui inactivent les cyclines/CDK, cela active RB, qui lui-même agit positivement sur MYOD.

## 2) Activation du programme myogénique

Durant la différenciation musculaire, un programme génétique spécifique au muscle va être activé. De nombreux gènes importants pour la différenciation, la structure et le fonctionnement de la cellule musculaire vont ainsi être induits.

Ce programme myogénique complet est extrêmement complexe et nécessite l'activation temporelle de nombreux gènes. Il peut être initié par un seul facteur de transcription : MYOD. D'autres MRF et cofacteurs interviennent dans l'activation du

programme myogénique, mais ce sont surtout les cibles de MYOD qui ont été les plus étudiées, d'abord individuellement, puis à l'échelle du génome.

Des expériences d'induction de l'activité de MYOD dans des fibroblastes de souris couplées à des analyses transcriptomiques ont ainsi permis de montrer que des centaines de gènes (plus de 300) sont régulés par MYOD, dont une portion significative l'est directement (Bergstrom et al., 2002). Des ChIP-seq (technique consistant à immunoprécipiter une protéine d'intérêt, puis à séquencer l'ADN qui y est fixé) de MYOD dans plusieurs types de cellules musculaires ont confirmé que MYOD fixe directement les éléments régulateurs de nombreux gènes exprimés lors de la différenciation musculaire (Cao et al., 2010). De plus, la fixation de MYOD à ces gènes augmente lors de la différenciation. Les gènes dont l'expression est contrôlée par MYOD appartiennent à des fonctions biologiques diverses impliquées dans la différenciation musculaire (Bergstrom et al., 2002). On y trouve les gènes liés à l'arrêt du cycle cellulaire comme *p21*, *RB*, *CCND1* et les gènes codant pour les facteurs de transcription importants pour la différenciation musculaire, dont *MYOD* lui-même, *MYOG* (myogénine), *MEF2*, *SIX*. MYOD contrôle aussi l'expression de gènes codant pour les protéines structurelles du muscle, comme les chaînes légères et lourdes de la myosine et les sous-unités de la troponine, importantes pour la contraction musculaire. Des gènes du métabolisme et de voies de signalisations importants pour le muscle, dont la voie IGF/AKT/MTOR (voir page 24) sont également induits par MYOD.

De plus, ces gènes ne sont pas induits au même moment. Par exemple, ceux codant pour les acteurs du cycle cellulaire, les protéines d'adhésion et les facteurs de transcription sont activés très tôt par MYOD, tandis que les gènes structuraux le sont plus tard. La différence de temporalité dans l'activation des cibles de MYOD n'est pas encore complètement comprise. Elle s'expliquerait en partie par le fait que MYOD n'est pas suffisant pour induire ces gènes tardifs. Ils auraient ainsi besoin de cofacteurs et de facteurs de transcription additionnels pour être induits, ces derniers étant des cibles « précoces » de MYOD (Penn et al., 2004). MYOD stimule ainsi l'expression de gènes pro-myogéniques, comme *MEF2* et *MYOG*, dont les produits MEF2 et myogénine vont coopérer plus tard avec lui pour activer les gènes « tardifs » (Cao et al., 2006; Penn et al., 2004). La myogénine ne peut ainsi se fixer sur ses promoteurs cibles que si la structure de la chromatine a été précédemment « ouverte » par MYOD, les deux facteurs coopérant ensuite pour induire leurs cibles tardives (Cao et al., 2006).

MYOD orchestre donc l'expression de plusieurs « sous-programmes » géniques à différents moments de la différenciation musculaire, activant rapidement des gènes importants

pour le processus de différenciation musculaire et plus tardivement ceux nécessaires à la structure et au fonctionnement des myotubes.

#### 4) **Regénération musculaire**

La régénération musculaire est permise grâce aux cellules satellites. Ces cellules expriment deux gènes clés régulateurs en amont de *MYOD* : *PAX3* et *PAX7* (Paired box), exprimés également dans les précurseurs myogéniques lors du développement embryonnaire, mais qui ne sont plus exprimés dans les cellules différenciées. Il est maintenant admis que les cellules satellites sont très proches de ces progéniteurs musculaires actifs lors de l'embryogénèse. Alors que toutes les cellules satellites expriment *PAX7*, essentiel pour leur survie (Seale et al., 2000), seulement certaines expriment son paralogue *PAX3* (Relaix et al., 2006). Les facteurs *PAX3* et *PAX7* sont nécessaires pour le maintien de cette population de cellules souches de réserve. Lors du processus d'activation, *MYOD* et *MYF5* sont surexprimés (Zammit et al., 2002). *MYF5* est déjà activé dans la majorité des cellules satellites adultes (Kuang et al., 2007) et la plupart des cellules satellites adultes quiescentes maintiennent également sa transcription (Beauchamp et al., 2000). Toutefois, dans les cellules quiescentes, l'ARNm de *MYF5* reste séquestré dans des complexes messenger-ribonucléoprotéine (mRNP) et associé avec son inhibiteur traductionnel miR-31 (Crist et al., 2012). Après activation, ces mRNP se dissocient et la traduction de l'ARNm de *MYF5* s'opère, entraînant accumulation de la protéine et activation de la myogénèse.

#### B) **Répresseurs de la différenciation musculaire**

*MYOD* et *MYF5* sont déjà exprimés dans les myoblastes en prolifération. Malgré cela, les gènes spécifiques à la différenciation musculaire ne seront exprimés qu'une fois que les myoblastes sortent du cycle cellulaire. Étant donné la forte puissance d'activation du programme musculaire par les bHLH myogéniques, de nombreux mécanismes d'inhibition existent afin de permettre qu'ils soient « actifs » au bon moment lors du développement ou de la régénération musculaire.

Lors de ma thèse, j'ai mis en évidence une régulation de répresseurs importants de la différenciation musculaire par la voie let-7 - E2F5. Les répresseurs *ID1* et *HMOX1* sont ainsi

directement réprimés par E2F5 lors de la myogénèse. E2F5 réprime indirectement *MSTN* et *TGF-β3* qui font partie d'une voie de signalisation externe fortement inhibitrice de la différenciation musculaire: la voie TGF-β. J'ai aussi trouvé que les répresseurs *SNAIL1* et *MYOR*, cibles prédites de E2F5, sont sous-régulés dans les myoblastes en absence de miR-98. La voie let-7 - E2F5 régule ainsi directement et indirectement de multiples répresseurs de la différenciation musculaire.

## 1) Facteurs de transcription inhibant la différenciation musculaire

### a) La famille ID, régulatrice de l'activité des MRF

Les protéines ID (inhibitor of DNA-binding protein) sont d'importants régulateurs négatifs de l'activité des MRF. La famille des protéines ID chez l'homme et la souris comprend quatre membres : ID1 à ID4 (Benezra et al., 1990; Biggs et al., 1992; Christy et al., 1991; Pagliuca et al., 1995; Riechmann et al., 1994). Elles font partie de la vaste famille des facteurs de transcription HLH (helix-loop-helix), leur domaine HLH leur permettant de former des hétérodimères avec d'autres protéines de la famille (Benezra et al., 1990). En revanche, contrairement aux bHLH, les facteurs ID n'ont pas de domaine basique nécessaire pour la liaison à l'ADN (Benezra et al., 1990).

Les protéines ID, exprimées fortement lors de la prolifération, diminuent lors de la différenciation dans de nombreuses lignées cellulaires (Benezra et al., 1990; Kreider et al., 1992). Cette diminution apparaît comme un événement nécessaire à la sortie du cycle et à la différenciation cellulaire. De plus, ID1 diminue fortement et très rapidement lors de la différenciation musculaire, cela souligne son rôle au début de la myogénèse et dans la sortie du cycle cellulaire (Clever et al., 2010; Tournay and Benezra, 1996). L'action inhibitrice des ID sur la différenciation musculaire s'explique par leur capacité à lier les protéines de la famille bHLH. Dans les myoblastes en prolifération, les protéines ID vont ainsi lier préférentiellement les protéines E (E12, E47...), mais aussi les MRF (MYOD, myogénine, MYF5...), l'affinité de ID pour les protéines E étant beaucoup plus forte (Langlands et al., 1997). ID empêche ainsi la formation du complexe MRF/protéine E requis pour l'activation de la transcription des gènes spécifiques au muscle, ce qui retarde la différenciation musculaire (Figure 4). Cela a été notamment montré par l'utilisation d'un dimère MYOD-E47, tous deux liés de façon covalente par un court polypeptide. Ce dernier est résistant à

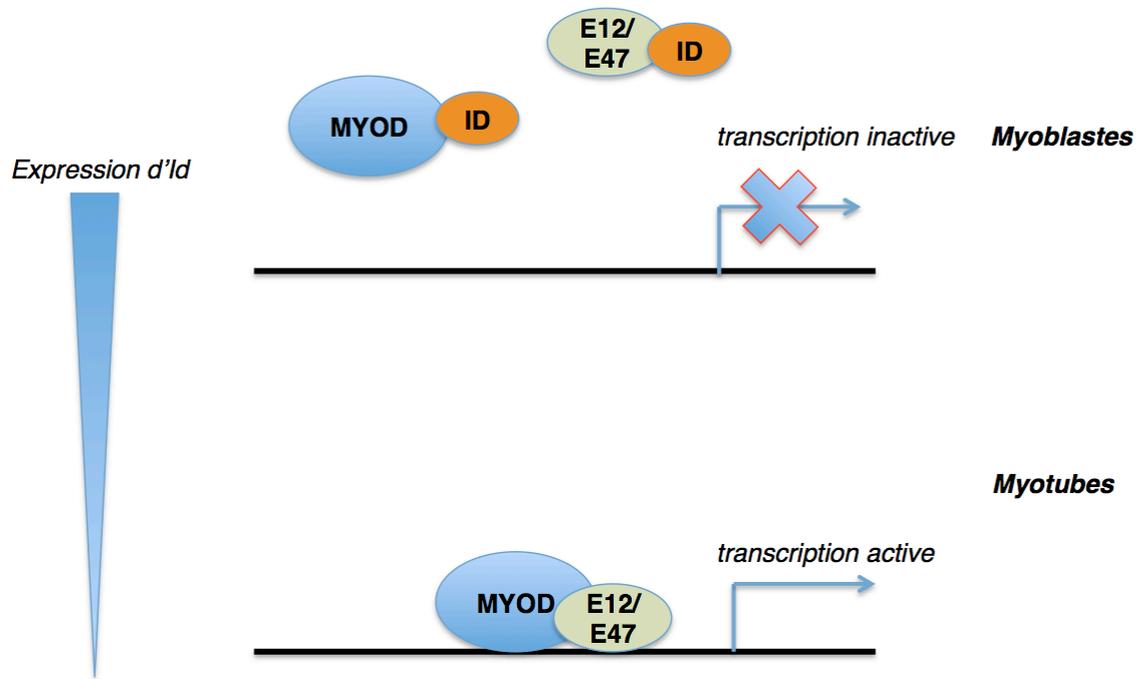
l'inhibition par ID (Neuhold and Wold, 1993). La diminution de ID au début de la différenciation musculaire permet aux complexes MRF/protéine E de se former et d'activer le programme myogénique (Jen et al., 1992) (Figure 4). En agissant comme un « piège » à protéines E et MRF, les protéines ID répriment ainsi un très large répertoire de gènes impliqués dans la différenciation musculaire (théoriquement, l'ensemble des gènes musculaires).

Dans le muscle, la capacité des ID à inhiber la différenciation, à l'exception de ID4, a été montrée par des expériences de surexpression dans plusieurs lignées de myoblastes murins (Atherton and Travers, 1996; Jen et al., 1992; Melnikova and Christy, 1996; Melnikova et al., 1999). La surexpression d'un seul ID suffit à provoquer un retard de différenciation.

Toutefois, malgré une très forte homologie de leur région HLH (Pagliuca et al., 1995), les différents membres de la famille ID n'ont pas la même activité sur leurs cibles (Langlands et al., 1997; Melnikova et al., 1999). Premièrement, l'affinité pour leurs cibles MRF varie: alors que ID1-4 interagissent tous fortement avec les protéines E, seuls ID1 et ID2 lient fortement MYOD et MYF5, mais ont une plus faible affinité pour la myogénine, signalant une possible différence de fonction. Parmi les différents ID, c'est ID1 qui fixe le plus fortement MYOD (Langlands et al., 1997).

L'expression de ID est régulée en réponse à des facteurs externes. ID sert ainsi de médiateur à des signaux d'inhibition de la différenciation musculaire, qui induisent son expression, comme les mitogènes du sérum (Tournay and Benezra, 1996) ou encore BMP-2 (Katagiri et al., 2002). La région génomique en amont de *ID1* contient en effet des éléments de réponse au sérum (Tournay and Benezra, 1996). TGF- $\beta$ , connu pour induire *ID1* dans d'autres tissus, n'a pas d'effet sur *ID1* dans le muscle squelettique (Brennan et al., 1991b).

Le mécanisme de forte répression de l'expression de ID au début de la différenciation musculaire, lui, n'est pas encore complètement compris, même s'il est clair que ID diminue en absence de sérum. De manière intéressante, la voie let-7 - E2F5 découverte dans mon projet de thèse, est un mécanisme supplémentaire qui pourrait expliquer cette forte répression de ID1 en début de différenciation musculaire (voir partie Discussion).



**Figure 4. Mécanisme d'inhibition de la différenciation musculaire par ID**

Lors de la prolifération des myoblastes, ID est fortement exprimé et séquestre les protéines E, et dans une moindre mesure les MRF, empêchant ainsi la formation du complexe MYOD/protéine E nécessaire pour la transcription du programme myogénique. L'expression de ID chute très rapidement lors de la différenciation musculaire, libérant les protéines E et MYOD, leur permettant d'interagir et d'activer ainsi le programme myogénique.

#### *b) Autres répresseurs transcriptionnels*

D'autres mécanismes sont à l'œuvre dans les myoblastes en prolifération, afin de réprimer l'activité de MYOD et plus largement des MRF. Certains facteurs de transcription agissent selon un mécanisme similaire à ID, séquestrant les protéines E et réprimant MYOD. C'est le cas des bHLH MYOR et TWIST qui sont, contrairement aux MRF, inhibiteurs de la différenciation musculaire.

MYOR (myogenic repressor, aussi appelé musculin) est un répresseur transcriptionnel spécifique du muscle, qui inhibe la différenciation musculaire selon plusieurs mécanismes (Lu et al., 1999). En se fixant les boîtes E des gènes musculaires, MYOR entrerait ainsi en compétition avec les bHLH activatrices de la différenciation du muscle strié squelettique. Il se pourrait aussi que MYOR réprime activement les gènes musculaires, voir inhibe les MRF en

séquestrant les protéines E, sur le même modèle que ID1. Comme ID1 également, MYOR est exprimé en prolifération et diminue fortement lors de la myogénèse.

TWIST est un autre facteur de transcription bHLH important pour la régulation négative de la myogénèse. Son rôle inhibiteur de la différenciation musculaire a été mis en évidence par des expériences de surexpression dans une lignée de myoblastes de souris, dont la plupart des clones n'étaient plus capable de différencier (Hebrok et al., 1994). Selon un mécanisme proche de l'action de ID et MYOR, il inhibe la différenciation du muscle strié en régulant notamment négativement MYOD et en séquestrant les protéines E (Spicer et al., 1996). Son expression diminue également lors de la différenciation musculaire. De manière intéressante, TWIST est un inhibiteur de MYOD plus puissant que ID (Spicer et al., 1996). Sa surexpression *in vitro* dans des myotubes C2C12 est même capable d'inverser le processus de différenciation musculaire, entraînant leur fragmentation en cellules mononucléées, une réentrée dans le cycle cellulaire et une réinitiation de la synthèse d'ADN (Hjiantoniou et al., 2008). Cette inversion s'expliquerait en partie par l'action négative de TWIST sur la myogénine (Mastroiannopoulos et al., 2013).

SNAIL1, un répresseur transcriptionnel qui recrute les histones désacétylases HDAC1 et 2, inhibe la différenciation musculaire en bloquant l'accès à MYOD aux boîtes E des gènes exprimés dans les myotubes (Soleimani et al., 2012). Au début de la différenciation, SNAIL1 doit disparaître afin que MYOD puisse activer le programme myogénique. L'action de SNAIL1 sur la différenciation du muscle strié squelettique fait partie d'un mécanisme intéressant, qui pourrait expliquer le fait que MYOD s'associe spécifiquement à certains gènes lors de la détermination myogénique et à d'autres lors de la différenciation terminale.

## 2) Répresseurs non transcriptionnels

Les facteurs de transcription jouent un rôle important dans la régulation négative de la différenciation musculaire. Cependant, il existe des répresseurs qui agissent selon un mode d'action différent.

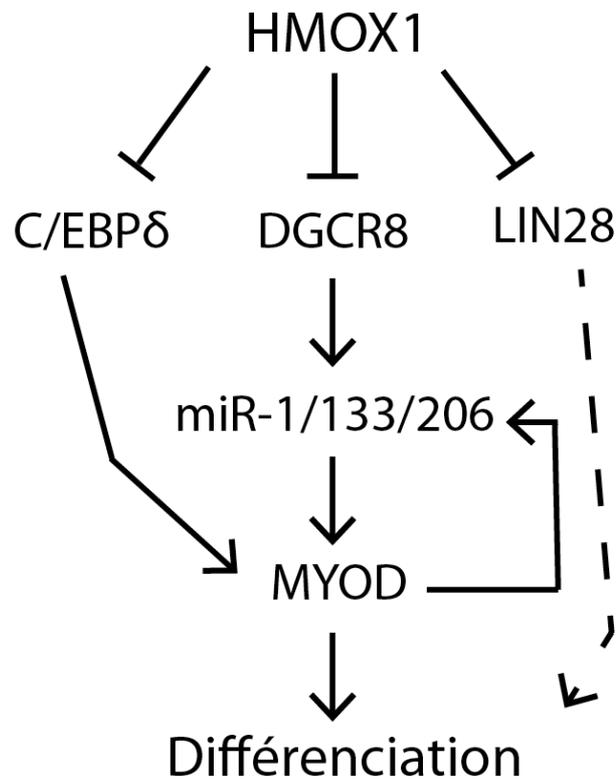
### a) *HMOX1*, répresseur de *myomiRs*

L'hème oxygenase 1 (HMOX1), est une enzyme cytoprotectrice qui catalyse la dégradation de l'hème libre, fortement oxydant, en biliverdine, fer et monoxyde de carbone

(CO). Exprimée en réponse à divers stress dont le stress oxydatif, elle protège la cellule contre ce dernier en entraînant la formation des antioxydants CO, bilirudine (à partir de la biliverdine) et ferritine (grâce au fer). HMOX1 protège ainsi la cellule contre l'apoptose et favorise la prolifération cellulaire (Gozzelino et al., 2010).

Des expériences de surexpression dans une lignée myoblastique de souris (C2C12) ont permis très récemment de mettre en évidence son rôle de répresseur de la myogénèse (Kozakowska et al., 2012). La surexpression de HMOX1 entraîne en effet une inhibition de la différenciation musculaire selon un mécanisme original, impliquant la régulation des miARN des myoblastes. De nombreux miARN, dont certains spécifiques du muscle, appelés myomiRs, régulent la différenciation musculaire (voir page 79). Parmi eux, quelques myomiRs activateurs de la myogénèse sont réprimés par HMOX1, ce qui entraîne in fine une inhibition de la différenciation musculaire. En effet, lorsque HMOX1 est surexprimé, l'expression de certains gènes impliqués dans la maturation des miARN est fortement réduite : c'est le cas de *DGCR8* (DiGeorge Critical syndrome Region 8, appelée Pasha chez *C.elegans* et chez la drosophile) (diminution en ARNm et protéine). Cette enzyme est impliquée dans une étape-clé de maturation des miARN (voir page 79). L'ARNm de LIN28, inhibiteur de la maturation des miARN let-7, voit son expression diminuée suite à la surexpression de HMOX1 (Figure 5). Le pool total des pré-miARN, précurseurs des miARN, et de miARN est ainsi réduit en présence de HMOX1. L'action de HMOX1 varie selon le miARN considéré. En effet, HMOX1 bloque spécifiquement l'expression des myomiRs miR-1, miR-133a/b, et miR-206. A l'inverse, miR-146a, myomiR répresseur de la différenciation musculaire, augmente lorsque HMOX1 est surexprimé. Les raisons de cette spécificité d'action restent à être déterminée. Au final, HMOX1 diminue l'expression des MRF MYOD et myogénine, et réprime donc la différenciation musculaire (Figure 5).

HMOX1 réprime aussi la différenciation du muscle strié squelettique selon un second mécanisme. HMOX1 inhibe via le CO l'action du facteur de transcription C/EBP $\delta$  (CCAAT/Enhancer-binding protein) sur le promoteur de *MYOD*, réprimant ainsi l'expression de *MYOD* et la différenciation musculaire (Kozakowska et al., 2012) (Figure 5).



**Figure 5. Mécanisme d'inhibition de la différenciation musculaire par HMOX1**

Illustration réalisée à partir des résultats de (Kozakowska et al. 2012).

→ : active ; —| : inhibe ; - -> : active potentiellement.

HMOX1 inhibe la différenciation musculaire en réprimant les myomiRs miR1/133/206, et C/EBPδ. LIN28 est lui aussi réprimé et pourrait participer à l'effet de HMOX1 sur la myogénèse.

### *b) La cycline D1*

La cycline D1 (CCND1), régulateur du cycle cellulaire, est aussi un répresseur important de la différenciation musculaire. L'activation du programme myogénique nécessite une sortie préalable du cycle cellulaire. CCND1 est au cœur d'un mécanisme qui permet de coupler la progression du cycle cellulaire à la régulation des gènes musculaires (Zhang et al., 1999a). Lors de la prolifération des myoblastes, CCND1 joue un rôle essentiel dans l'inhibition de l'activité de MYOD, réprimant ainsi la différenciation musculaire. Lorsque les cellules sont en état de division, CCND1 est exprimé en réponse à divers mitogènes. Cela permet à sa kinase partenaire CDK4 d'aller du cytoplasme vers le noyau, où le complexe CCND1/CDK4 inhibe l'activité de MYOD, évitant ainsi l'activation des gènes musculaires.

Lors de la sortie du cycle cellulaire et la différenciation, CCND1 diminue, CDK4 redevient cytoplasmique et MYOD peut activer le programme de différenciation musculaire.

### 3) Facteurs de croissance de la superfamille TGF- $\beta$

Les facteurs de croissance de la superfamille TGF- $\beta$  sont très conservés et exercent de multiples rôles : ils contrôlent la prolifération, la différenciation cellulaire ou encore l'apoptose dans de nombreux tissus.

#### a) TGF- $\beta$

TGF- $\beta$  est une petite protéine de 25 kDa, sécrétée, qui fait partie de la grande superfamille TGF- $\beta$  comprenant plus de 50 ligands. Elle peut agir de façon autocrine ou paracrine. TGF- $\beta$  existe sous trois isoformes : TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 et TGF- $\beta$ 3, dont les fonctions sont très proches. Il a été découvert pour la première fois comme un inducteur de la prolifération de fibroblastes de rat (Roberts et al., 1981). Il peut avoir un effet positif comme négatif sur la prolifération et la différenciation cellulaire. TGF- $\beta$  active ainsi la différenciation dans certains types cellulaires (globules rouges, neurones) et la réprime dans d'autres (cellules mésenchymateuses) (Flanders et al., 1991; He et al., 2006; Sparks and Scott, 1986). Les effets de TGF- $\beta$  sur la cellule sont complexes et dépendent largement du contexte cellulaire. La voie de signalisation TGF- $\beta$  débute par la fixation du ligand TGF- $\beta$  à un premier récepteur dit de "type II", qui va recruter et activer par phosphorylation un second récepteur, de "type I" (Massagué, 1998). Ce dernier va ensuite activer par phosphorylation les facteurs de transcription SMAD2 et SMAD3, leur permettant d'interagir avec SMAD4. Le complexe ainsi formé va se transloquer dans le noyau et réguler la transcription de nombreux gènes cibles, grâce à des co-facteurs.

Dans le muscle, TGF- $\beta$ 1 a été bien étudié et montré comme un répresseur puissant de la différenciation musculaire. Des expériences de culture *in vitro* de différentes lignées de myoblastes en présence de doses croissantes de TGF- $\beta$ 1 ont mis en évidence son rôle d'inhibiteur de la myogénèse terminale (Massagué et al., 1986). Ses isoformes TGF- $\beta$ 2 et TGF- $\beta$ 3, moins étudiés dans le muscle, retardent de la même manière la différenciation musculaire (Lafyatis and Lechleider, 1991; Schabert et al., 2009). Comme TGF- $\beta$ 1, leur expression et sécrétion augmente fortement durant la différenciation musculaire (Henningsen

et al., 2010). Toutefois, certaines études reportent un rôle opposé de TGF- $\beta$ 1 sur la différenciation musculaire sous certaines conditions. Ce dernier est ainsi capable d'induire la différenciation de myoblastes cultivés dans un milieu riche en mitogènes (Zentella and Massagué, 1992). TGF- $\beta$ 1 favorise également la différenciation de cellules souches en cellules musculaires (Slager et al., 1993). Cela montre l'importance du contexte intra et extracellulaire sur l'effet de TGF- $\beta$ 1.

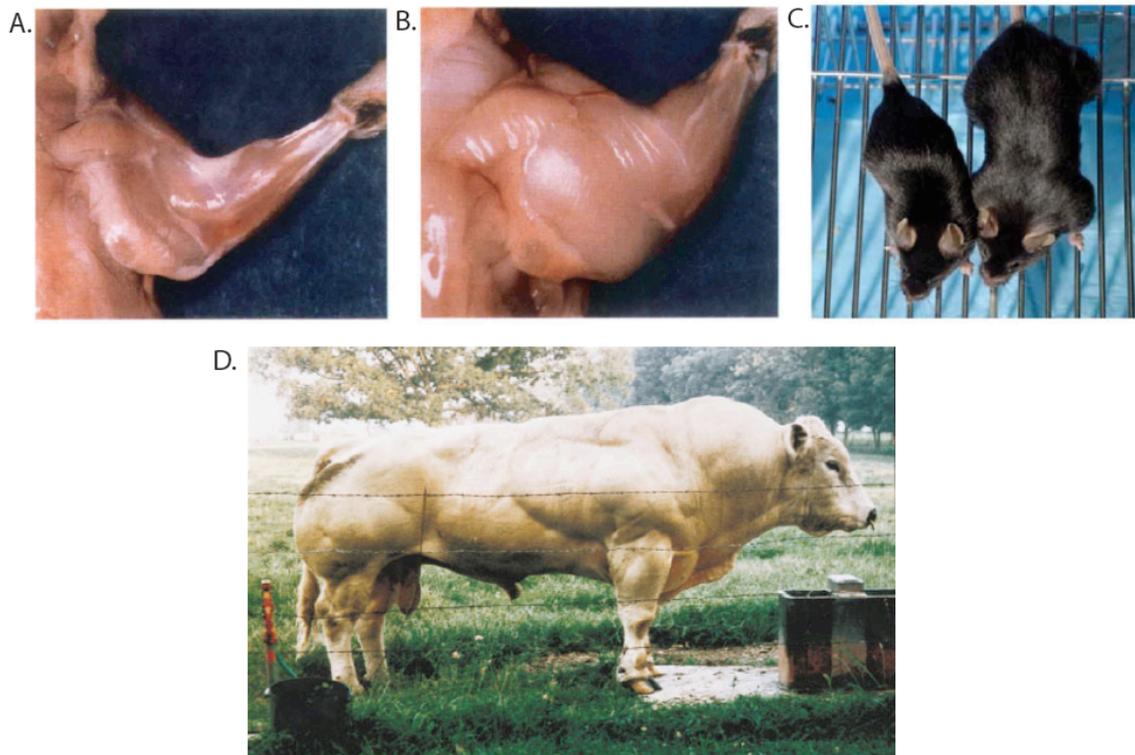
L'action de TGF- $\beta$ 1 sur la différenciation musculaire passe par plusieurs mécanismes. Premièrement, il entraîne l'inhibition de facteurs pro-myogéniques, dont les MRF et MEF2 (Brennan et al., 1991b; Liu et al., 2004). TGF- $\beta$ 1 réprime notamment l'expression de MYOD (Vaidya et al., 1989), qu'il inhibe également de façon post-traductionnelle via son médiateur SMAD3 (Liu et al., 2001). Une fois activé, SMAD3, comme ID1 ou MYOR, interagit directement avec MYOD et interfère avec la formation des complexes MYOD/protéine E, réprimant ainsi la différenciation du muscle strié squelettique. SMAD3 semblerait être l'effecteur principal de TGF- $\beta$ 1 pour l'inhibition de la myogénèse.

La compréhension de l'action de TGF- $\beta$  venant principalement d'expériences de culture de myoblastes *in vitro*, sa fonction *in vivo* a été moins explorée. Durant le développement, TGF- $\beta$ , sécrété par l'ectoderme, pourrait être important pour la formation correcte de la musculature des membres, empêchant la différenciation prématurée des myoblastes qui migrent dans les bourgeons de membres (Cusella-De Angelis et al., 1994). Il défavoriserait aussi la régénération musculaire, des souris mutantes pour une version tronquée de son récepteur TGFBR2 présentant un meilleur taux de régénération après blessure (Accornero et al., 2014). TGF- $\beta$  semble donc être un régulateur important du développement et de la régénération musculaire *in vivo*, même si son mécanisme d'action y reste plus flou. La fonction de son effecteur clé SMAD3, bien qu'interagissant avec MYOD *in vivo* (Liu et al., 2001), est en effet controversée. L'inhibition de SMAD3 a été reportée comme entraînant hypertrophie (Sartori et al., 2009) ou atrophie et défaut de régénération musculaire (Ge et al., 2011, 2012).

### *b) La myostatine*

La myostatine (MSTN), aussi appelée growth/differentiation factor-8 (GDF-8), est un membre de la superfamille TGF- $\beta$  et un inhibiteur très puissant de la différenciation musculaire. Elle a été découverte chez la souris par des expériences de PCR (polymerase chain reaction) dégénérée visant à trouver de nouveaux membres de la famille TGF- $\beta$

(McPherron et al., 1997). A la différence de TGF- $\beta$  qui est ubiquitaire, la myostatine est exprimée et sécrétée spécifiquement par le muscle squelettique. Dans la même étude, des souris mutantes délétées pour la myostatine (*MSTN*  $-/-$ ) ont permis de mettre en évidence son rôle de régulateur négatif de la croissance musculaire. Ces souris présentent un phénotype impressionnant d'hyper-musculature : elles ont une masse deux à trois fois plus élevée que les souris contrôles, en raison d'une hypertrophie et hyperplasie musculaires (Figure 6). La myostatine a une fonction très conservée chez les mammifères, des mutations naturelles chez l'homme, le bovin, ou encore le mouton étant associées à des phénotypes d'hypertrophie musculaire (Clop et al., 2006; McPherron and Lee, 1997; Schuelke and Wagner, 2004) (Figure 6). Cette hypertrophie musculaire peut s'expliquer par les effets négatifs de la myostatine sur la prolifération, la différenciation musculaire et la synthèse protéique montrés *in vitro* (Langley et al., 2002; Ríos et al., 2002; Taylor et al., 2001). Malgré sa capacité à stimuler l'arrêt du cycle cellulaire, la myostatine retarde la différenciation de myoblastes C2C12 en myotubes, comme l'ont montré des expériences de surexpression et de culture en présence de myostatine (Langley et al., 2002; Ríos et al., 2002).



**Figure 6. Phénotypes résultants de mutations dans le gène codant pour la myostatine.**

Des souris knockout pour la myostatine (*MSTN*  $-/-$ ) (B) présentent une forte hypertrophie musculaire (exemple ici du membre supérieur) comparées à des souris sauvages (A). Les photos sont extraites de (McPherron et al., 1997). En raison de cette hypertrophie musculaire, elles ont une masse deux à trois fois plus élevée (C), d'après (Lee, 2007). Des mutations naturelles pour la myostatine sont associées à un phénotype hyper-musclé, comme chez le boeuf (D). Les photos sont extraites de (McPherron and Lee, 1997) .

Les effets de la myostatine sur la différenciation musculaire sont proches de ceux exercés par TGF- $\beta$ . Mais contrairement à TGF- $\beta$ , la myostatine a d'abord été étudiée pour son rôle *in vivo*. Son mécanisme d'action a donc été moins exploré mais semble être très similaire à TGF- $\beta$ . De façon analogue, la myostatine entraîne une cascade de phosphorylations activant in fine SMAD2 et SMAD3. Ses récepteurs, quant à eux, varient, la myostatine liant principalement ACVR2B (activin type 2 receptor b) en tant que récepteur de type II (Rebbapragada et al., 2003).

Comme TGF- $\beta$ , la myostatine contrôle le programme myogénique en réprimant l'expression des MRF, comme MYOD, MYF5 ou la myogénine (Langley et al., 2002; Ríos et al., 2002), et l'activité de MYOD. Cette double répression de MYOD semble être également dépendante de SMAD3 (Langley et al., 2002). En plus de leurs effets sur les MRF, la myostatine, comme TGF- $\beta$ , interfèrent négativement avec la voie IGF/AKT/MTOR. Via SMAD2 et SMAD3, ils inhibent l'activation de AKT, diminuant la synthèse protéique nécessaire à la différenciation et l'hypertrophie musculaire (Trendelenburg and Meyer, 2009).

## II) Le facteur de transcription E2F5

### A) Introduction

La différenciation du muscle strié squelettique est un processus régulé séquentiellement au niveau transcriptionnel par de nombreux facteurs parmi lesquels les MRF jouent un rôle central. Pour rentrer en différenciation, les myoblastes sortent du cycle cellulaire, cette étape impliquant l'intervention d'autres régulateurs importants : les facteurs de transcription E2F.

Les facteurs E2F sont des régulateurs majeurs de processus primordiaux dans le cycle de vie d'une cellule : cycle cellulaire, apoptose, mais aussi de la différenciation cellulaire. J'ai montré durant ma thèse qu'un membre de la famille E2F, E2F5, favorise la différenciation musculaire en régulant plusieurs répresseurs de la myogénèse. E2F5 se comporte en général comme un répresseur transcriptionnel. Il est impliqué dans le cancer, où il est oncogène et le gène *E2F5* est amplifié dans plusieurs tumeurs, dont les cancers du sein et de l'ovaire. E2F5 favorise généralement le processus de différenciation cellulaire. Toutefois, malgré son importance dans la différenciation cellulaire, il n'avait encore jamais été étudié dans le cadre de la myogénèse.

### B) La famille E2F

#### 1) Les facteurs E2F, régulateurs importants du cycle cellulaire

E2F5 fait partie de la famille des facteurs de transcription E2F. Le premier facteur E2F, E2F1, a été à l'origine découvert comme un facteur capable de lier et d'activer le promoteur E2 d'un adénovirus responsable d'une prolifération cellulaire excessive (Kovesdi et al., 1986; La Thangue and Rigby, 1987; Yee et al., 1987). A la suite de cette découverte, il a été révélé que E2F1 lie et régule la transcription de promoteurs endogènes comme *MYC* (Thalmeier et al., 1989), *DHFR* (dihydrofolate reductase) (Blake and Azizkhan, 1989), ou encore *CCNE* (cycline E) (Ohtani et al., 1995), tous impliqués dans la régulation de la

prolifération. Une autre découverte clé a été que E2F1 induit la réentrée en phase S de cellules quiescentes, indiquant une fonction majeure dans la régulation du cycle cellulaire (Johnson et al., 1993). Depuis il a été confirmé que les facteurs E2F sont d'importants régulateurs du cycle cellulaire (Chen et al., 2009). Ils contrôlent l'expression de très nombreux gènes impliqués dans la prolifération et la réplication de l'ADN.

Les facteurs E2F ont été largement étudiés en raison de cela et de leur lien avec le cancer. Mais leur action ne se limite pas à la prolifération et au cycle cellulaire : ils régulent aussi la différenciation cellulaire, l'apoptose, et la réparation de l'ADN. Ils sont les effecteurs du suppresseur de tumeur RB, formant une voie RB-E2F ancienne et très conservée dans l'évolution (Dimova and Dyson, 2005; van den Heuvel and Dyson, 2008). Cette dernière est en effet présente chez les plantes, les vers, les insectes, montrant son importance. Cette conservation semble cohérente, vu que cette voie est primordiale pour des fonctions essentielles de la cellule, comme le contrôle du cycle cellulaire et la différenciation cellulaire.

## 2) Membres de la famille E2F

La famille E2F comprend 10 membres chez l'homme. On peut les classer en deux catégories principales, suivant que les facteurs E2F activent ou répriment la transcription de leurs gènes cibles (Chen et al., 2009):

-les activateurs : E2F1, E2F2 et E2F3a

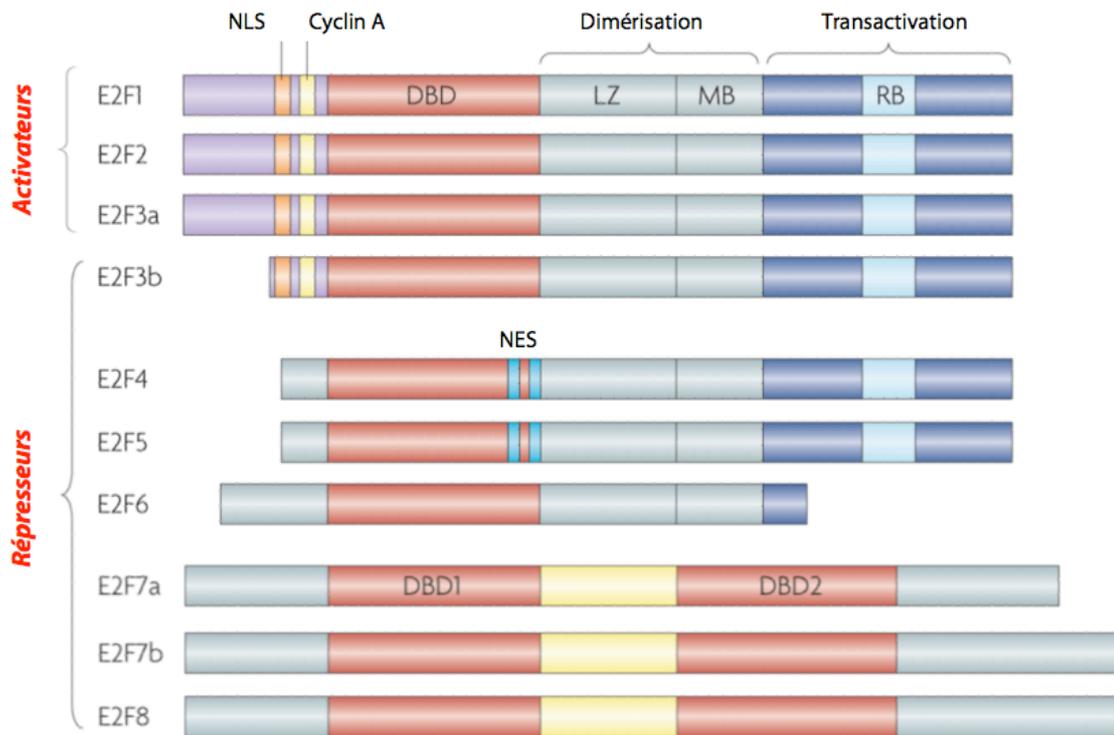
-les répresseurs : E2F3b, E2F4, E2F5, E2F6, E2F7a, E2F7b et E2F8

Les facteurs E2F activateurs sont essentiels pour la prolifération cellulaire (Wu et al., 2001), et contrôlent généralement la transition G1/S nécessaire à la poursuite du cycle cellulaire. Les répresseurs régulent plutôt la différenciation cellulaire. Toutefois, ce classement en deux groupes n'est pas figé et est un peu simpliste, les activateurs pouvant devenir dans certains cas répresseurs et inversement suivant le contexte cellulaire et le tissu considéré (Chong et al., 2009).

Leur domaine de liaison spécifique à l'ADN (DBD) est le dénominateur commun de cette famille E2F (Figure 7). Pour être fonctionnels, les facteurs E2F1-6 forment des dimères avec d'autres facteurs de transcription : les protéines DP (dimerization partner) DP1 à DP4 (Chen et al., 2009). Cela leur permet de lier l'ADN avec une haute affinité et augmente leur capacité de transactivation de la transcription (Helin et al., 1993; Krek et al., 1993). Cette interaction entre les facteurs E2F et leurs partenaires protéiques DP se réalise grâce aux

domaines protéiques MB (Marked Box) et LZ (Leucine Zipper) communs aux facteurs E2F1-6. E2F7 et E2F8, quant à eux, peuvent lier l'ADN sans interagir avec les protéines DP : ils agissent en tant qu'homodimères ou hétérodimères E2F7-E2F8. Seuls les facteurs E2F1-3 ont un domaine de liaison à la cycline A, qui permet au complexe cycline A/CDK2 de les inactiver (par phosphorylation de DP) en fin de phase S (Krek et al., 1995).

Les facteurs E2F ont d'autres partenaires qui régulent leur activité. La plupart des protéines E2F (E2F1-5) interagissent en effet grâce à leur domaine C-terminal (Ct) avec les protéines « pocket » RB, p107 et p130 lorsque ces dernières sont dans un état « hypophosphorylé » (Chen et al., 2009) (Figure 7). Les protéines « pocket » vont ensuite empêcher l'action des facteurs E2F ou recruter des remodeleurs de la chromatine qui vont réprimer la transcription. Les facteurs E2F activateurs ou répresseurs ont chacun leurs partenaires spécifiques. Alors que les facteurs E2F1-3 se lient à RB, E2F4 interagit préférentiellement avec p107, p130, mais aussi RB. E2F5 quant à lui a comme partenaire préférentiel p130, et dans une moindre mesure p107. E2F6 se distingue lui des facteurs E2F1-5. Il n'interagit pas avec des protéines « pocket » mais avec des membres du groupe Polycomb, impliqués dans le maintien d'un état de répression transcriptionnel de la chromatine (Attwooll et al., 2005; Ogawa et al., 2002; Trimarchi et al., 2001).



**Figure 7. Les différents membres de la famille E2F.**

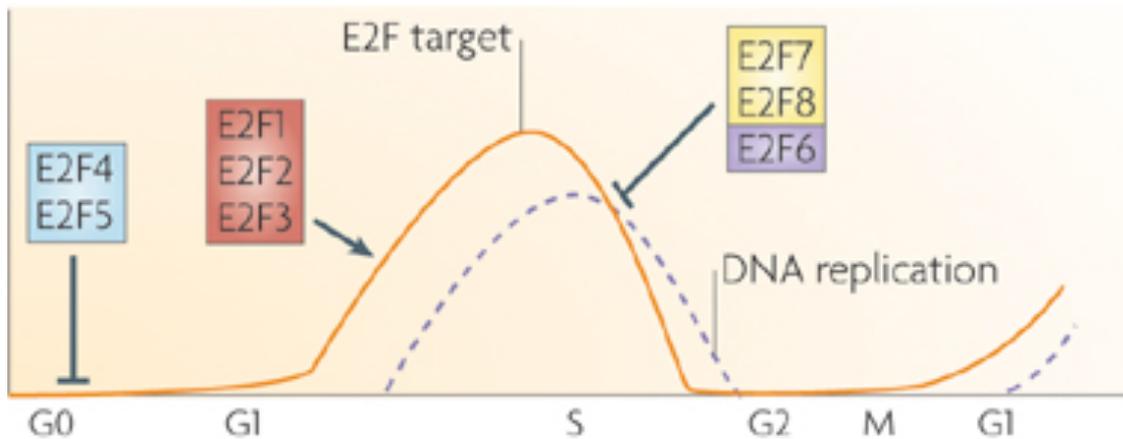
Adapté de (Chen et al., 2009). Tous les membres de la famille E2F ont en commun leur domaine de liaison à l'ADN (DBD, en rouge). Les facteurs E2F1-6 peuvent former des dimères avec les protéines DP grâce à leur domaine de dimérisation (en gris). Les facteurs E2F1-5 ont un domaine de transactivation en Ct (bleu-violet) qui contient un site de liaison aux protéines « pocket » (en bleu ciel). Ces dernières masquent ainsi ce domaine et la capacité de transactivation de la transcription des facteurs E2F lorsqu'elles interagissent avec eux. Les facteurs E2F1-3 ont un NLS (orange), leur assurant une localisation nucléaire, tandis que les facteurs E2F4-5 ont deux NES chacun (en bleu). Les facteurs E2F1-3 ont aussi un domaine de liaison à la cycline A (en jaune).

### 3) E2F5, un répresseur transcriptionnel associé à la différenciation cellulaire

Parmi les facteurs E2F, E2F5 n'est de loin pas le membre le plus étudié. Il a été découvert presque 10 ans après le premier facteur E2F (Hijmans et al., 1995; Sardet et al., 1995). Plusieurs études avaient suggéré l'existence de E2F4 et E2F5. Il avait été montré que les facteurs E2F s'associent avec un partenaire différent, p130, lors de la quiescence de fibroblastes de souris (Cobrinik et al., 1993). De plus, les facteurs E2F interagissant avec p107 semblaient être différents du complexe classique E2F1/RB (Dyson et al., 1993). Suite à cela, l'équipe du Dr Sardet a cherché à isoler les facteurs E2F associés à p130 en G0, et a ainsi découvert E2F4 et E2F5 (Sardet et al., 1995).

E2F5 est une protéine de 345 acides aminés, soit 37 kDa. Il se classe dans la catégorie des répresseurs de la famille E2F. Il est donc répresseur transcriptionnel, et réprime activement la transcription grâce à ses partenaires spécifiques p130 ou p107 (Gaubatz et al., 2000). Il est très similaire à E2F4, lui aussi répresseur, avec qui il partage 72% d'identité de séquence protéique (Vaishnav et al., 1998). Quant aux facteurs activateurs E2F1-3, ils sont très différents de E2F5 : seulement 32% d'identité de séquence protéique. Cela se ressent au niveau des domaines fonctionnels de E2F5, E2F4 et E2F5 formant une sous-classe des facteurs E2F. Ils n'ont notamment pas de domaine de liaison à la cycline A (Sardet et al., 1995).

Les facteurs E2F répresseurs n'ont qu'une faible capacité à activer la transcription. Leur capacité à forcer l'entrée de cellules quiescentes en phase S est très limitée, contrairement aux facteurs E2F activateurs (DeGregori et al., 1997; Lukas et al., 1996). Ils sont exprimés différemment, suivant la position dans le cycle cellulaire. E2F4 et E2F5 sont en général davantage exprimés en G0, soit dans des cellules quiescentes ou en différenciation cellulaire, et en début de G1 (Dimova and Dyson, 2005) (Figure 8). C'est là où les complexes E2F4-5/protéines « pocket » sont majoritaires. Ils répriment l'expression des gènes nécessaires à la phase S. Les facteurs E2F1-3 eux sont plutôt exprimés en fin de G1 et début de phase S. Induits par des signaux mitogènes, les complexes CDK4/CDK6-cycline D et CDK2-cycline E vont phosphoryler RB, qui va se séparer des facteurs E2F1-3 (Figure 9). Ces derniers peuvent ensuite activer la transcription des gènes nécessaires à la transition G1/S.



**Figure 8. Action des différents facteurs E2F durant le cycle cellulaire**

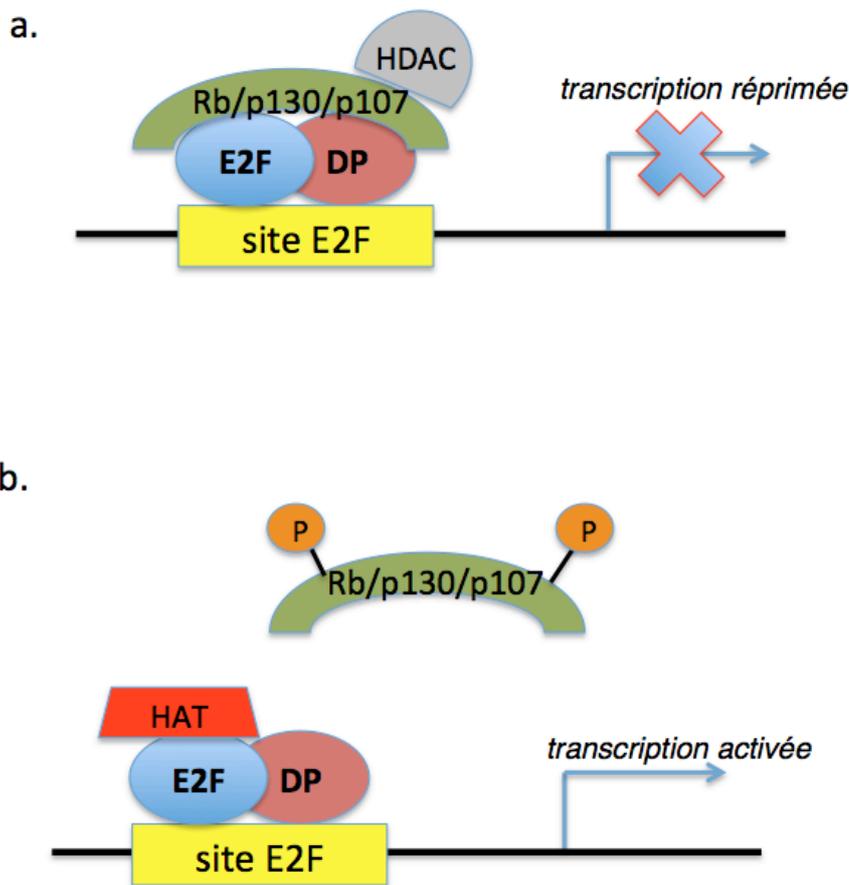
Extrait de (Chen et al., 2009). Le cycle cellulaire comprend deux phases où la cellule croît, G1 et G2. Elles sont entrecoupées par une phase de réplication de l'ADN (S), et une phase de mitose (M). G0 est une phase d'arrêt de croissance, caractéristique des cellules quiescentes ou en différenciation. E2F4 et E2F5 répriment leurs cibles en G0 et permettent de maintenir les cellules en G0. En G1/S, les facteurs E2F1-3 activent leurs cibles qui permettent la réplication de l'ADN et la progression du cycle cellulaire. A la fin de la phase S, ces gènes seraient notamment réprimés par les facteurs E2F6-8.

#### 4) Mécanisme d'action des facteurs E2F

Afin de réguler la transcription de ses gènes cibles, l'action des facteurs E2F passe par des modifications des histones. Ces dernières ne sont pas réalisées directement par les facteurs E2F, mais par des protéines partenaires qui vont être recrutées et entraînent activation ou répression de la transcription.

Les facteurs E2F activateurs, lorsque RB est phosphorylé et donc incapable d'interagir avec eux, recrutent divers histone acétyl-transférases (HAT), comme p300/CBP, PCAF, TIP60, pour activer la transcription (Blais and Dynlacht, 2007; Dimova and Dyson, 2005). p300/CBP notamment, et en particulier son activité HAT, est essentiel pour l'activité transcriptionnelle de E2F à la transition G1/S (Ait-Si-Ali et al., 2000).

RB, lorsqu'il lie les facteurs E2F activateurs en état hypophosphorylé, et p130/p107 liés aux facteurs E2F4-5, vont eux recruter plusieurs complexes, dont des HDAC et des méthyltransférases, qui vont réprimer la transcription (Blais and Dynlacht, 2007; Dimova and Dyson, 2005). La répression de la transcription par RB peut aussi être passive sans co-répresseur additionnel : RB bloque dans ce cas simplement le site de transactivation et donc l'activité des facteurs E2F activateurs.



**Figure 9. Mécanismes simplifiés de l'action des facteurs E2F.**

Les facteurs E2F peuvent activer ou réprimer la transcription selon différents mécanismes. Avant la transition G1/S, RB fixe et inhibe la capacité à activer la transcription des facteurs E2F1-3, ce qui réprime les gènes nécessaires à la progression du cycle cellulaire (a). Lors de la transition G1/S, le complexe cycline D/CDK4 phosphoryle RB qui se détache des facteurs E2F1-3. Les facteurs E2F1-3 peuvent ensuite activer la transcription des gènes nécessaires à la progression du cycle. Pour cela, ils peuvent recruter des HAT qui vont activer encore plus fortement la transcription (b). Les facteurs E2F4-5 répriment en général leurs cibles en G0 (quiescence, différenciation cellulaire) selon le

mécanisme en (a), en interagissant majoritairement avec p130 et p107, et en recrutant notamment des HDAC. Ce mécanisme de répression est actif mais ils inhibent également leurs gènes en remplaçant les facteurs E2F1-3 présents sur les promoteurs de leurs cibles en commun.

## 5) Régulation de l'activité des facteurs E2F

L'activité des facteurs E2F est régulée à différents niveaux en plus de leur régulation par les protéines « pocket ». Cette activité est bien sûr liée au cycle cellulaire via les cyclines et les protéines « pocket », et la plupart de ces mécanismes interviennent à un moment précis du cycle, coordonnant l'activité des facteurs E2F avec le cycle. L'expression des facteurs E2F est régulée au niveau transcriptionnel, notamment par le facteur de transcription MYC (Matsumura et al., 2003). Elle fluctue afin de correspondre avec leur timing d'activité dans le cycle. Les facteurs E2F1-3 sont ainsi exprimés en G1/S (Moberg et al., 1996). La protéine E2F peut être activée par phosphorylation (Morris et al., 2000), ou acétylation (Martínez-Balbás et al., 2000; Ozaki et al., 2009), et dégradée par ubiquitination (Campanero and Flemington, 1997; Marti et al., 1999). Les ARNm des facteurs E2F sont réprimés par divers miARN, dont miR-20a (Sylvestre et al., 2007). Des signaux externes interviennent aussi, et pas seulement les signaux mitogènes qui vont activer les cyclines/CDK puis les facteurs E2F. TGF- $\beta$  peut entraîner la formation d'un complexe E2F4-5/DP/p107 avec SMAD3, qui va transiter vers le noyau. Ce complexe va ensuite interagir avec SMAD4, autre effecteur de la voie TGF- $\beta$ , et reconnaître un site composite E2F-SMAD sur le promoteur de *MYC* et le réprimer (Chen et al., 2002).

Alors que de nombreux mécanismes régulent l'activité des facteurs E2F, pour E2F4 et E2F5 la régulation de leur localisation est particulièrement importante. Contrairement aux facteurs E2F1-3, les facteurs E2F4-5 n'ont pas de séquence d'import nucléaire (NLS), mais chacun a deux signaux de localisation extranucléaires (NES) (Figure 7) (Gaubatz et al., 2001). Alors que les facteurs E2F1-3 sont nucléaires, il est donc logique que E2F4 et E2F5 soient cytoplasmiques dans de nombreuses lignées. E2F4 et E2F5 ont donc besoin de changer de localisation, c'est à dire de transiter dans le noyau, afin de réprimer leurs cibles. En effet, lorsque E2F4 se situe dans le noyau, son activité augmente (Lindeman et al., 1997). De plus, la localisation de E2F4 et de E2F5 semble être dépendante de la position dans le cycle cellulaire. Cela permet à E2F4 et E2F5 de réguler leurs cibles à un instant t. Quel mécanisme est responsable de ce changement de localisation, alors que E2F4 et E2F5 n'ont pas de NLS ?

Il a été d'abord suggéré, par des expériences de surexpression de DP2 et de p130/p107, que ces derniers forcent E2F4 et E2F5 à transiter vers le noyau (Gaubatz et al., 2001; Lindeman et al., 1997; Magae et al., 1996). Toutefois, E2F5 aurait un domaine de localisation nucléaire intrinsèque, correspondant aux 56 premiers acides aminés en N-terminal, qui lui permettrait de transiter vers le noyau sans l'assistance d'aucun partenaire (Apostolova et al., 2002). L'export du noyau de E2F4 et E2F5 serait actif et s'opère grâce à l'Exportine-1 (ou CRM-1) qui reconnaît leur NES (Gaubatz et al., 2001).

E2F4 et E2F5 agissent dans certains cas comme activateurs de la transcription (Lee et al., 2011; Ma et al., 2014; Morris et al., 2000). L'activité de E2F5, par exemple, peut être modifiée par phosphorylation (en fin de G1) par le complexe cycline E/CDK2 (différent du complexe cycline D/CDK4 qui inactive RB). En effet, ce complexe, en phosphorylant E2F5, lui permet alors d'agir non plus comme un répresseur mais comme un activateur, en recrutant p300/CBP (Morris et al., 2000). Dans ce cas, E2F5 active ses cibles et stimule l'entrée en phase S et la progression du cycle cellulaire.

### C) Fonctions et cibles des facteurs E2F

Dès lors que les facteurs E2F ont été identifiés comme des acteurs majeurs de la prolifération cellulaire et impliqués dans le cancer, de nombreux laboratoires ont cherché à identifier leurs cibles.

Tous les facteurs E2F ont un domaine commun de liaison à l'ADN. Ils se fixent donc en général à une même séquence d'ADN consensus, appelée « site E2F », qui est généralement TTTSSCGC (S est un G ou un C) (Rabinovich et al., 2008; Schulze et al., 1995). Ces sites E2F sont souvent à l'intérieur d'un promoteur, relativement proche du site de début de la transcription (moins de 2 kb). Des algorithmes de prédiction permettent de prédire l'existence de ces sites E2F dans un promoteur.

Des approches à l'échelle du génome, incluant analyses transcriptomiques par micropuces, ChIP-seq et ChIP-on-chip (ChIP suivie de puces à ADN) ont permis de caractériser des centaines de cibles des facteurs E2F. Parmi elles on trouve majoritairement des gènes impliqués dans le cycle cellulaire, notamment dans la transition G1/S (Bracken et al., 2004) (Tableau 1). *CCNA*, *CCND*, *CCNE* (cyclines A, D, E), *CDK2*, ainsi que *E2F1-3* sont des cibles. L'induction de ces cibles permet la formation de boucles d'auto-activation avec les facteurs E2F.

<i>Activateurs du Cycle cellulaire</i>			<i>Synthèse de l'ADN/réplication</i>	<i>Régulateurs négatifs du cycle cellulaire</i>	<i>Apoptose</i>
<b>G1</b>	<b>G1/S</b>	<b>S/G2</b>			
<i>CCND1</i>	<i>CCNE1</i>	<i>CDC6</i>	<i>CDC6</i>	<i>p21</i>	<i>APAF1</i>
<i>CCND3</i>	<i>CDC25A</i>	<i>DHFR</i>	<i>DHFR</i>	<i>E2F7</i>	<i>CASP3</i>
<i>JUN</i>	<i>CDK2</i>		<i>PCNA</i>	<i>RB</i>	<i>CASP7</i>
<i>MYC</i>	<i>E2F1</i>		<i>POLA</i>	<i>p107</i>	<i>CASP8</i>
	<i>E2F2</i>		<i>POLA2</i>		
	<i>E2F3</i>		<i>POLD1</i>		

**Tableau 1. Gènes cibles des facteurs E2F**

Adaptée de (Bracken et al., 2004). Les facteurs E2F régulent des centaines de gènes impliqués dans le cycle cellulaire, la synthèse de l'ADN ou encore l'apoptose.

En plus de ce rôle dans le cycle cellulaire, les facteurs E2F régulent des gènes impliqués dans la synthèse et la réplication de l'ADN comme *POLA* et *POLD* (polymérase alpha et delta), la réparation de l'ADN, l'apoptose (certaines caspases comme *CASP3*, *CASP7*). Ils ciblent des régulateurs négatifs du cycle comme *p21*, *E2F7*, *RB* et *p107*, ce qui est plus étonnant. Toutefois, la plupart de ces études n'ont pas étudié spécifiquement les cibles de E2F5. Si les facteurs E2F sont supposés cibler largement des cibles identiques, ils ont aussi des cibles spécifiques. Ces spécificités ne sont pas encore bien comprises et seraient dues en partie à leurs spécificités de partenaires.

#### **D) Rôle de E2F5 dans la différenciation cellulaire**

Bien que les facteurs E2F aient été largement étudiés en tant que contrôleurs de la prolifération et du cycle cellulaire, bien moins de travaux ont exploré la régulation de la différenciation cellulaire par E2F5. Cette dernière n'est donc pas encore complètement comprise. Alors que les facteurs E2F activateurs E2F1-3 sont généralement impliqués dans la prolifération cellulaire, l'apoptose et la réparation de l'ADN, ce sont principalement les facteurs E2F répresseurs E2F4 et E2F5 qui régulent la différenciation cellulaire (Dimova and Dyson, 2005).

Quelques études ont ainsi permis de montrer que E2F4 et E2F5 sont capables de réguler la quiescence et la différenciation cellulaire dans certains tissus. Des souris mutantes pour *E2F4*, *E2F5* ou *p107/p130* montrent des défauts de différenciation dans de nombreux types cellulaires (Cobrinik et al., 1996; Humbert et al., 2000; Lindeman et al., 1998; Rempel et al., 2000). En particulier, des souris KO pour *E2F5* deviennent hydrocéphales et meurent autour de la naissance (Lindeman et al., 1998). La surexpression des facteurs E2F répresseurs, par exemple celle de E2F4 dans les neurones, favorise le processus de différenciation cellulaire (Persengiev et al., 1999).

Cette importance de E2F4 et E2F5 dans la différenciation cellulaire pourrait notamment s'expliquer par leur action sur le cycle cellulaire. En leur absence, les cyclines ne seraient plus réprimées, les cellules ne pouvant plus dès lors enclencher la sortie du cycle nécessaire à la différenciation. Toutefois, les rôles et le mécanisme d'action de E2F5 ne sont pas encore complètement compris.

C'est dans les kératinocytes que le mécanisme d'action de E2F5 sur la différenciation cellulaire a été le mieux étudié. Dans ces derniers, E2F5 semble jouer un rôle clé dans l'arrêt irréversible du cycle lié à la différenciation cellulaire (Apostolova et al., 2002). Lors de la différenciation, l'expression de E2F5 augmente et sa localisation change. Diffus à la fois dans le cytoplasme et le noyau en prolifération, il transite vers le noyau lors de la différenciation, soulignant un rôle dans la répression de gènes favorisant la progression du cycle cellulaire. Une autre étude a en effet montré que E2F5 se fixait sur les promoteurs de gènes impliqués dans le cycle cellulaire dans des keratinocytes en prolifération et différenciation (Chang et al., 2006).

## **E) E2F5 dans le muscle squelettique**

Dans le muscle, la fonction de E2F5 dans la différenciation cellulaire n'avait jusqu'alors pas été explorée. Cependant, quelques études apportent des données intéressantes sur le rôle et la régulation des facteurs E2F dans le muscle (voir Tableau 2). Comme nous l'avons vu précédemment, les facteurs E2F sont liés à RB et à la sortie irréversible du cycle cellulaire, nécessaire à la différenciation cellulaire.

Le partenaire protéique spécifique de E2F5, qu'est p130, semble être important pour la différenciation musculaire. En effet, un certain nombre de facteurs de la famille E2F forment un complexe avec p130 lors de la différenciation de myoblastes C2, et cet événement est

nécessaire pour la différenciation musculaire (Shin et al., 1995). De plus, l'expression de p130 augmente fortement durant la différenciation musculaire, soulignant son importance (Kiess et al., 1995; Puri et al., 1998). p107, quant à lui, diminue légèrement (Kiess et al., 1995; Novitch et al., 1996). Ces études suggèrent que p130 est la protéine « pocket » importante dans la régulation de la différenciation musculaire. Toutefois, des fibroblastes provenant de souris KO pour *p130* ou *p107* peuvent différencier normalement (en présence de MYOD), probablement grâce à une redondance de fonction (Novitch et al., 1996). E2F4, lui, est distribué à la fois dans le noyau et le cytoplasme de myoblastes C2C12, et s'accumule dans le noyau des myotubes (Puri et al., 1998). Cette accumulation de E2F4 induite par p130 corrèlerait avec l'arrêt du cycle cellulaire.

S'il n'a pas été étudié spécifiquement dans la différenciation musculaire, E2F5 jouerait cependant un rôle dans les cellules satellites. De manière intéressante, il a été en effet montré que la translocation de E2F5 dans leur noyau pourrait être une étape importante pour leur entrée en quiescence (Reed et al., 2007).

<b>E2F</b>	<b>Rôle dans le muscle</b>	<b>Expression durant la myogénèse</b>	<b>Localisation (myotubes)</b>	<b>Régulation par les MRF</b>	<b>Références</b>
E2F1	<b>Répresseur</b> de la myogénèse	Diminue	Cytoplasmique	-Induit par MYOD -Réprimé par la myogénine (via miR-20a)	(Gill and Hamel, 2000; Martelli and Livingston, 1999; Tedesco and Vesco, 2001; Wang and Helin, 1995; Yin et al., 2012)
E2F2	<b>Pro-myogénique</b> Ou <b>Non nécessaire</b> à la myogénèse	Augmente légèrement	Nucléaire	-	(Asp et al., 2009; Gill and Hamel, 2000; Wang et al., 2008a)
E2F3a	<b>Non nécessaire</b> à la myogénèse	Diminue	Cytoplasmique	-	(Asp et al., 2009; Gill and Hamel, 2000)
E2F3b	<b>Pro-myogénique</b> Nécessaire à la myogénèse	Augmente légèrement	-	-	(Asp et al., 2009)
E2F4	<b>Pro-myogénique</b> (léger)	Constante	Diffuse Ou Nucléaire	-	(Gill and Hamel, 2000; Puri et al., 1998)
E2F5	Rôle dans la <b>quiescence des cellules satellites</b>	-	Concentration dans le noyau (quiescence de cellules satellites)	-Réprimé par la myogénine (via miR-20a)	(Gill and Hamel, 2000; Reed et al., 2007; Yin et al., 2012)
E2F6	-	Forte expression dans le muscle, variations non connues	-	-	(Dahme et al., 2002)
E2F7	-	-	-	-Réprimé par la myogénine (via miR-20a)	(Yin et al., 2012)
E2F8	-	Non exprimé	-	-	(Maiti et al., 2005)

## **Tableau 2. Rôle et régulation des facteurs E2F dans la différenciation musculaire**

Les facteurs E2F ont des fonctions différentes sur la différenciation musculaire. E2F1 a été caractérisé dans plusieurs études comme un répresseur de la myogénèse, sa surexpression inhibe en effet la myogénèse (Martelli and Livingston, 1999; Tedesco and Vesco, 2001; Wang and Helin, 1995). E2F2 a été reporté comme étant pro-myogénique (Wang et al., 2008a) ou sans effet sur la différenciation musculaire (Asp et al., 2009), dans des myoblastes C2C12. Les facteurs E2F répresseurs de transcription que sont E2F3b et E2F4 favorisent la myogénèse, l'inhibition de E2F3b entraînant une répression beaucoup plus forte de la différenciation de myoblastes C2C12, comparé à l'inhibition de E2F4 (Asp et al., 2009). En dehors d'un rôle dans la quiescence des cellules satellites (Reed et al., 2007), le rôle de E2F5 dans la myogénèse n'avait pas encore été exploré. Les autres facteurs E2F, les répresseurs E2F6, E2F7 et E2F8 n'ont pas de rôle connu à ce jour dans la myogénèse. Alors que l'expression des facteurs E2F1 et E2F3a diminue durant la différenciation, musculaire, celle de E2F2 et de E2F3b augmente légèrement, tandis que celle de E2F4 reste constante (Asp et al., 2009). Les MRF, facteurs essentiels pour la différenciation musculaire, régulent aussi les facteurs E2F. MYOD induit ainsi E2F1, tandis que la myogénine réprime E2F1, E2F5 et E2F7, en induisant directement leur répresseur miR-20a (Yin et al., 2012). Les facteurs E2F ont aussi une localisation variable (cytoplasmique et/ou nucléaire) dans des myotubes provenant de myoblastes de rat L6 : E2F1, E2F3 et E2F5 sont cytoplasmiques, E2F2 est plutôt nucléaire et E2F4 est à la fois cytoplasmique et nucléaire (Gill and Hamel, 2000). Lors de la différenciation de myoblastes C2C12, E2F4 se concentre dans le noyau des myotubes (Puri et al., 1998).

### III) Les miARN let-7

#### A) Introduction

Alors que la régulation de la myogénèse au niveau transcriptionnel a commencé à être décryptée dès les années 1980, il est apparu plus récemment que les miARN sont aussi des régulateurs importants dans la différenciation musculaire. Les miARN sont de petits ARN non codants (20-24 nt) qui régulent l'expression génique au niveau post-transcriptionnel, entraînant inhibition de la traduction ou dégradation d'un ARNm cible. Le premier miARN, lin-4, a été découvert chez *C.elegans* (Lee et al., 1993). Depuis, plus de 24000 miARN ont été découverts chez plus de 200 espèces, on en dénombre près de 1900 chez l'homme (d'après la base de données miRbase [www.mirbase.org](http://www.mirbase.org), Release 21) (Kozomara and Griffiths-Jones, 2014). Ils sont présents chez plus de 140 espèces : chez de nombreux animaux, chez les plantes, et même chez certains virus (Kozomara and Griffiths-Jones, 2014; Lagos-Quintana et al., 2001; Pasquinelli et al., 2000). Ils régulent de nombreuses fonctions biologiques comme la prolifération, la différenciation cellulaire ou encore l'apoptose dans divers tissus (Stefani and Slack, 2008). Cela n'est pas étonnant, étant donné que chez l'homme environ 60% des gènes codants pour des protéines contiennent des sites de reconnaissance pour des miARN (Friedman et al., 2009).

Si la régulation transcriptionnelle de la différenciation musculaire a été bien étudiée, il reste encore beaucoup de zones d'ombre sur la régulation post-transcriptionnelle, et notamment sur l'action de nombreux miARN dans la différenciation musculaire. En effet, si certains ont été décrits (Braun and Gautel, 2011; Buckingham and Rigby, 2014; Ge and Chen, 2011; van Rooij et al., 2008), la plupart des miARN n'ont pas encore été étudiés dans le contexte de la différenciation musculaire. Ce manque de connaissance dans le domaine est dû d'une part à une manque de techniques performantes d'analyses phénotypiques à l'échelle du miRNome (l'ensemble des miARN du génome) de l'effet de chaque miARN sur la différenciation du muscle strié. D'autre part, pour comprendre l'action d'un miARN sur une fonction biologique donnée, il est nécessaire de connaître ses cibles ARNm. Or, des techniques pour caractériser l'ensemble des cibles fonctionnelles d'un miARN donné ne sont pas tout à fait au point, à l'heure actuelle. Les études dans le domaine se sont donc jusqu'alors

réalisées au « cas par cas », aboutissant sur la compréhension du rôle d'un nombre limité de miARN sur la différenciation musculaire, et la caractérisation de nombre de leurs cibles. Mais la grande taille du miRNome, combinée à celle du transcriptome, laisse présager qu'il reste de nombreux miARN et cibles associées à décrypter dans le cadre de la différenciation musculaire.

C'est pour cela que mon laboratoire a mis en place un criblage phénotypique à l'échelle du miRNome pour caractériser de nouveaux miARN impliqués dans la différenciation musculaire (Polesskaya et al., 2013) (voir Article n°1). Utilisant une banque d'antisens LNA (locked nucleic acids) qui permettent d'inhiber l'action d'un miARN donné (Naguibneva et al., 2006a), nous avons montré que 63 miARN sont importants pour la différenciation musculaire dans une lignée de myoblastes humains (LHCN). Parmi eux, les miARN de la famille let-7 ont montré un phénotype très intéressant. Leur inhibition entraîne, en effet, une forte accélération de la différenciation musculaire, accompagnée d'une importante hypertrophie des myotubes. A l'inverse, la surexpression de membres de la famille let-7, miR-98 et let-7g, retarde la différenciation musculaire.

La famille let-7 est sans aucun doute la famille de miARN la plus étudiée. Second miARN (avec lin-4) découvert chez *C. elegans* comme un régulateur temporel du développement (Reinhart et al., 2000), let-7 est hautement conservé chez l'homme. Let-7 n'est pas seul mais appartient à une famille de miARN: la famille let-7. Cette famille comprend 8 membres chez *C.elegans*, dont le 1er membre découvert est simplement nommé "let-7", et 13 membres chez l'homme (voir page 72). Nous nous limiterons ici essentiellement à l'étude des miARN let-7 chez l'homme (sauf lorsque d'autres espèces seront mentionnées). Les membres de la famille let-7 étant très similaires et ayant à priori des ARNm cibles et des fonctions également très similaires, nous parlerons généralement des "miARN let-7" ou de la "famille let-7", et non d'un membre de la famille en particulier (sauf dans le cas d'exemples précis où tel ou tel membre a été spécifiquement étudié). Suppresseurs de tumeur, dérégulés dans de nombreux cancers, les miARN let-7 jouent un rôle majeur de régulateurs de la différenciation cellulaire et de divers processus de développement (Boyerinas et al., 2010). Malgré leur importance dans la régulation de ces fonctions biologiques essentielles, leur rôle dans la différenciation musculaire n'avait jusqu'alors pas été exploré. De plus, les miARN let-7 étant des molécules « pro-différenciation cellulaire » dans de nombreuses autres types cellulaires, leur rôle dans le muscle est particulier et d'autant plus intéressant.

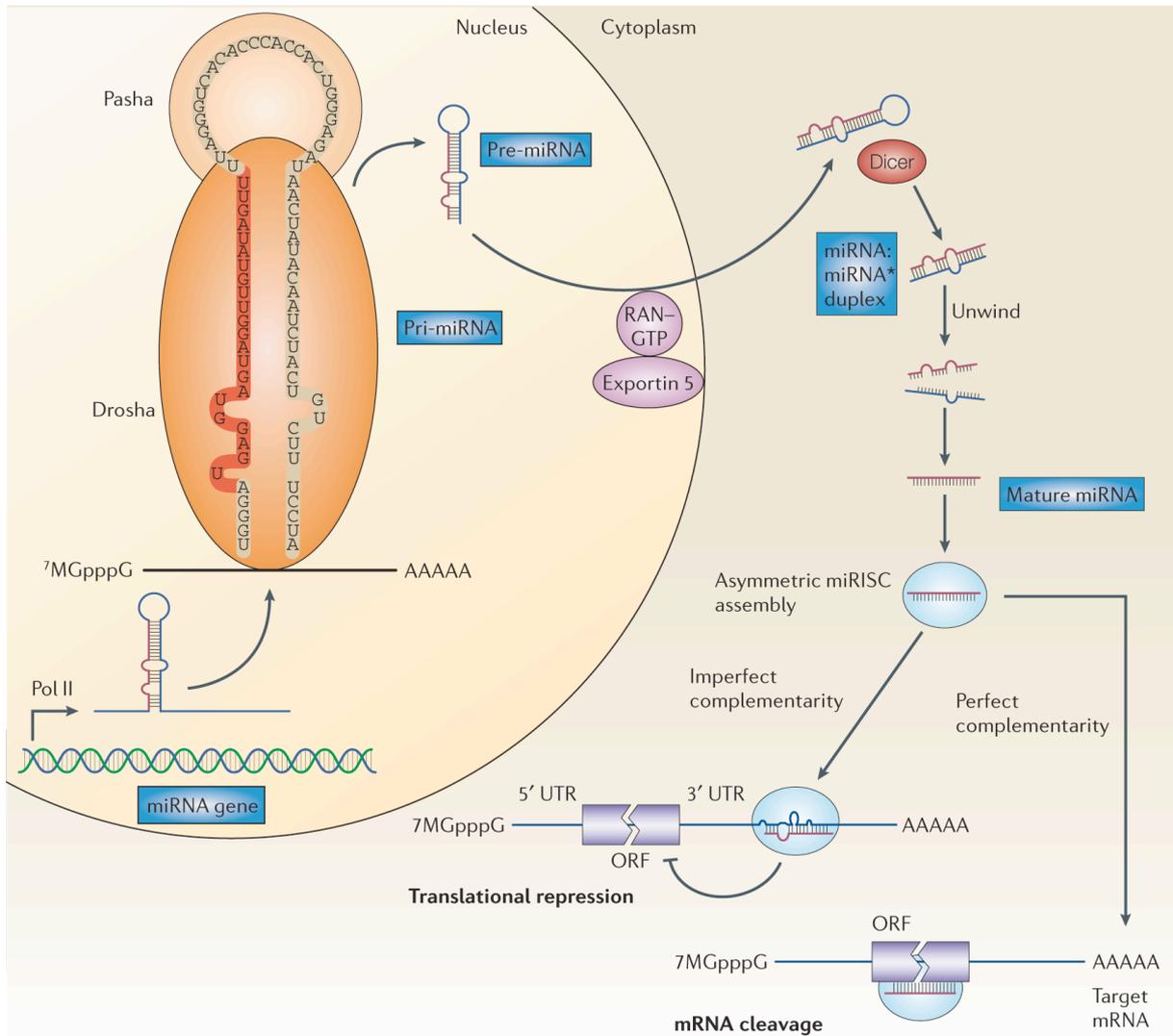
## **B) Biogénèse et mode d'action des miARN let-7**

### **1) Biogénèse des miARN let-7 et des miARN**

Les miARN let-7, comme la plupart des miARN, sont produits suite à plusieurs étapes de maturation de transcrits primaires qui vont donner les miARN matures : soit de simples brins de 20 à 24 nt (Figure 10) (Ha and Kim, 2014; Kim et al., 2009b; Krol et al., 2010). Les gènes de miARN se situent en majorité dans les introns de transcrits codants ou non codants. Les miARN sont généralement transcrits par l'ARN polymérase II (Lee et al., 2004) en tant que longs précurseurs ARN appelés miARN primaires (pri-miARN). Ces derniers arborent dans leur structure une boucle qui contient la séquence du miARN. De plus, les loci des miARN sont souvent proches les uns des autres, formant un « polycistron ». Cela permet à plusieurs miARN d'être co-transcrits ensemble sous forme d'un seul précurseur.

Une fois transcrit, le pri-miARN va subir une première étape de maturation dans le noyau grâce à un complexe appelé « microprocesseur » (Ha and Kim, 2014; Kim et al., 2009b; Krol et al., 2010). Ce dernier comprend deux enzymes : DROSHA et DGCR8 (ou PASHA). DROSHA est une RNase III, enzyme qui reconnaît et clive spécifiquement les ARN double-brin. Elle va ainsi cliver le pri-miARN en miARN précurseur de 70 nt (pré-miARN) grâce à son co-facteur essentiel DGCR8 (Lee et al., 2003; Yeom et al., 2006). Ce clivage laisse une extrémité sortante de 2 nt en 3', caractéristique des miARN. Le pré-miARN va ensuite être exporté en dehors du noyau par l'exportine-5 (Yi et al., 2003).

Dans le cytoplasme, le pré-miARN va être à nouveau clivé par une autre RNase III : DICER (Ha and Kim, 2014; Kim et al., 2009b; Krol et al., 2010). Ce clivage permet d'éliminer la boucle du pré-miRNA, libérant un petit duplex miARN/miARN\* de 20 à 24 nt. DICER détermine la longueur finale du miARN, et pourrait agir comme une sorte de « règle » moléculaire, clivant le pré-miARN à une distance fixe de ses extrémités 5' et 3'UTR. Ce clivage laisse une seconde extrémité sortante de 2 nt en 3'.



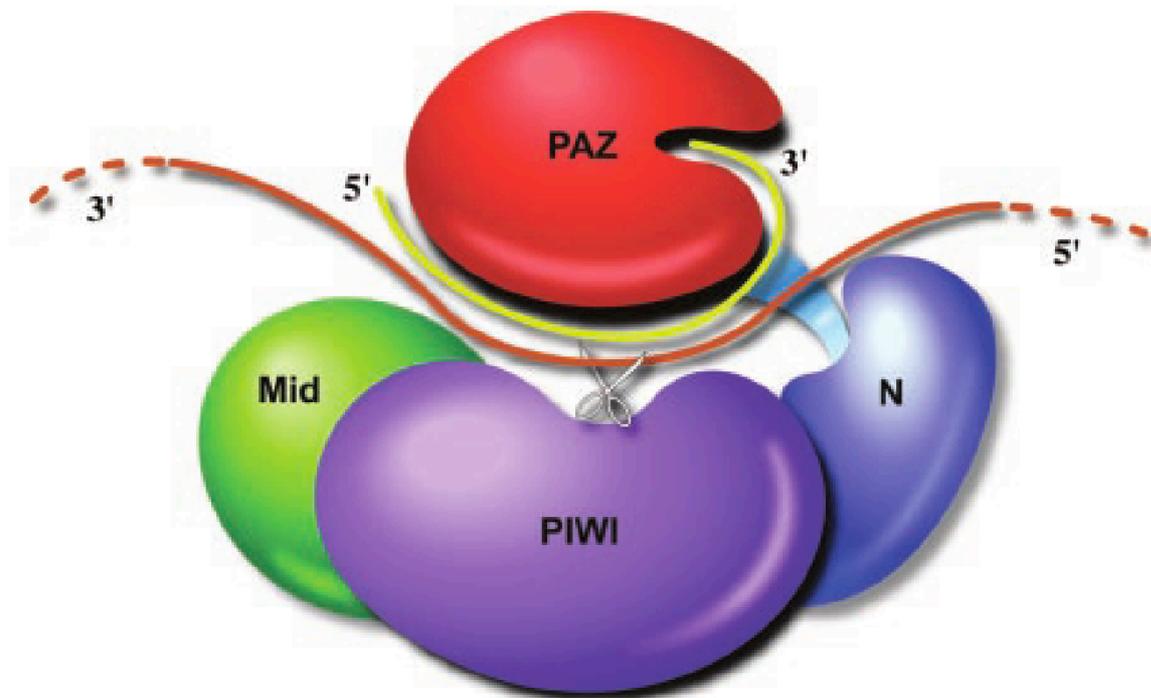
**Figure 10. La biogénèse des miARN.**

Extrait de (Esquela-Kerscher and Slack, 2006). Une fois transcrit par l'ARN polymérase II (POL II) sous forme d'un pri-miARN, ce dernier est clivé dans le noyau par le complexe Microprocesseur comprenant DROSHA et DGCR8 (PASHA). Le pré-miARN ainsi formé sort du noyau par l'exportine-5, et subit un second clivage par DICER dans le cytoplasme. Ensuite l'un des deux brins, le brin mature, est sélectionné au sein du complexe RISC comprenant une protéine AGO. Une fois dans le RISC, le miARN va entraîner généralement la répression de son ARNm cible, notamment par clivage ou répression traductionnelle (pour autres mécanismes voir **Figure 13**).

## 2) Le complexe miRISC

Ce duplex miARN va ensuite être pris en charge par une protéine Argonaute (AGO) afin de former le complexe miRISC (miRNA-induced silencing complex) (Kim et al., 2009b). Chez l'homme, il y a quatre protéines AGO (AGO1 à 4), toutes capables de former un complexe miRISC avec un miARN. Une fois le duplex chargé sur le miRISC, un seul des deux brins va être « sélectionné » : ce petit ARN simple brin (brin guide) correspond au miARN mature. Cette sélection se ferait selon des critères thermodynamiques, le brin dont l'extrémité 5' est la plus « instable », c'est à dire faiblement appariée, serait retenu dans le RISC (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003). L'autre brin (miARN\* ou brin passager) est dégradé. Le brin dont l'extrémité 5' interagit le plus faiblement avec AGO correspond au brin sélectionné. Toutefois, le brin dit « passager » peut dans certains cas être retenu et jouer un rôle dans la cellule (Okamura et al., 2008).

Une protéine AGO est constituée de quatre domaines (Figure 11) : N-terminal, PAZ (PIWI-AGO-ZWILLE), Mid et PIWI (Hutvagner and Simard, 2008; Kim et al., 2009b). Son domaine PAZ, qu'on retrouve aussi chez DICER, lie spécifiquement les 2 nt sortants en 3' du miARN mature (Lingel et al., 2004; Ma et al., 2004; Wang et al., 2008b, 2008c). Le domaine Mid quant à lui lie le 5' phosphate du miARN (Ma et al., 2005; Wang et al., 2008b, 2008c). Enfin, le domaine PIWI possède une structure proche de celui d'une RNase H bactérienne (Song et al., 2004; Wang et al., 2008b, 2008c), enzyme qui clive spécifiquement un simple brin ARN dans un duplexe ADN/ARN. Ce domaine confère une activité « slicer » (littéralement « trancheuse », c'est à dire de clivage) dans le cas de AGO2, seul membre de la famille qui peut cliver un ARNm ciblé dans le cas (rare) de complémentarité parfaite avec le miARN. Une fois le miARN « chargé » sur AGO, il va ensuite guider le complexe miRISC sur un site de complémentarité partielle de la cible ARNm. Cela va entraîner une répression de la traduction, ou une dégradation de l'ARNm (Filipowicz et al., 2008; Huntzinger and Izaurralde, 2011; Pasquinelli, 2012).



**Figure 11. Représentation schématique du clivage d'un ARNm guidé par le miRISC**

Extrait de (Song et al., 2004). Le complexe miRISC comprend le miARN et AGO, dont les 4 domaines PAZ, Mid, PIWI et N-terminal sont représentés ici. PAZ lie l'extrémité 3' du miARN, Mid le 5'. Le miRISC est guidé ensuite sur son site d'interaction avec l'ARNm, et PIWI permet un clivage (dans le cas d'AGO2 et d'une complémentarité parfaite).

Même si AGO est l'acteur principal du complexe miRISC, d'autres protéines partenaires interviennent aussi dans son fonctionnement. La seconde protéine essentielle du complexe est GW182 (glycine-tryptophane protéine de 182 kDa) chez la drosophile, TNRC6A, B et C (trinucleotide repeat containing 6) chez l'homme. Primordiale pour l'activité du miRISC, l'action de GW182 se situe en aval de AGO, avec lequel il interagit directement (Behm-Ansmant and Rehwinkel, 2006; Eulalio et al., 2008; Liu et al., 2005; Rehwinkel et al., 2005). En effet, si l'on « force » GW182 à se fixer à l'ARNm, cela suffit à l'inhibition de l'ARNm chez la drosophile, même en absence de AGO1 (Behm-Ansmant and Rehwinkel, 2006). Des résultats similaires ont été obtenus chez l'homme, notamment avec des formes tronquées de TNRC6 incapables de lier AGO (Baillat and Shiekhattar, 2009; Zipprich et al., 2009). GW182 serait ainsi l'effecteur de AGO à la fois pour la répression traductionnelle et la dégradation de l'ARNm chez la drosophile (Behm-Ansmant and

Rehwinkel, 2006; Eulalio et al., 2008) comme chez l'homme (Baillat and Shiekhhattar, 2009; Zipprich et al., 2009).

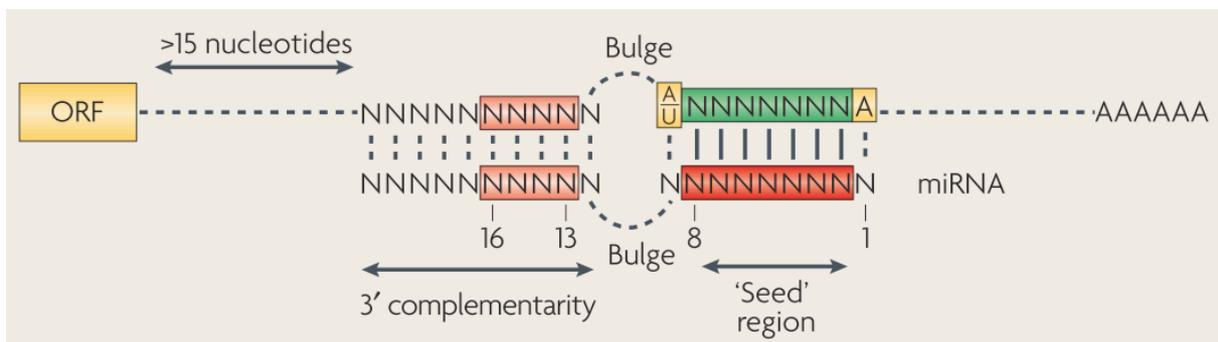
### 3) Reconnaissance de l'ARNm cible

Dès la découverte du premier miARN lin-4, un site de complémentarité trouvé dans le 3'UTR (région 3' non traduite) d'un ARNm, *LIN14*, a laissé imaginer que les miARN pourraient réguler des ARNm par un mécanisme de reconnaissance antisens (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993). Une fois dans le RISC, le miARN mature va en effet interagir directement avec sa cible ARNm, spécifique donc du miARN en question (Figure 12). Chez les animaux, cette interaction avec l'ARNm ne sera dans la majeure partie des cas que partielle (Bartel, 2009; Filipowicz et al., 2008). Ce n'est que sur une petite portion du duplex miARN/ARNm que la complémentarité sera parfaite. Cette zone correspondant aux nt 2 à 8 du miARN est appelée séquence « seed ». Second critère d'interaction important : des bases non appariées, ou « bosses » sont présentes dans la région centrale du duplex. Enfin les bases 13 à 16 du miARN peuvent aussi s'apparier de façon parfaite à l'ARNm. En outre, la localisation dans une zone riche en AU et la proximité avec la queue poly A de l'ARNm facilitent de part leur structure l'accès du complexe miRISC au site miARN. Généralement ce site d'interaction au miARN se situe dans le 3'UTR de l'ARNm, mais il peut également se retrouver dans le 5'UTR ou la séquence codante.

La séquence « seed » est très conservée et nécessaire à l'activité du miARN. Elle permet l'amorçage de l'interaction miARN/ARNm (Filipowicz et al., 2008). De plus, un miARN donné peut réguler de nombreux ARNm, et un ARNm peut contenir des sites pour de multiples miARN, ou plusieurs sites pour le même miARN. De ce fait, les miARN peuvent agir de façon synergique sur un seul ARNm, ce qui entraîne alors une répression plus effective (Bartel, 2009). Cela rend la régulation par les miARN très complexe. L'ARNm du facteur de transcription HMGA2 (High Mobility group AT-hook 2), par exemple, contient 7 sites pour les miARN let-7 (Mayr et al., 2007). L'ARNm de E2F5 n'en contient qu'un seul mais a des sites pour d'autres miARN, comme miR-20a, d'après Targetscan, outil de prédiction de cibles de miARN.

En effet, des outils bioinformatiques existent pour prédire les cibles d'un miARN : Targetscan, Pictar, miRDB (Min and Yoon, 2010)... L'existence et la conservation de cette séquence « seed » est le critère de recherche majeur qu'ils utilisent. Ils se basent également

sur d'autres paramètres comme la complémentarité de la partie 3' et la localisation dans une zone riche en AU. Malgré cela, ces outils donnent de nombreux faux positifs et faux négatifs. En raison de la petite taille du miARN et de sa complémentarité partielle, il est en effet difficile de prédire ses cibles. De plus, ces algorithmes se basent essentiellement sur des interactions connues entre les miARN et leurs ARNm cibles dans le 3'UTR. Les interactions non canoniques se basant moins sur le seed et se situant ailleurs que dans le 3'UTR d'un ARNm sont donc mal prédites. Toutefois, malgré ces défauts ces outils s'avèrent être des alliés précieux pour orienter une recherche de cibles de miARN.



**Figure 12. Interactions d'un miARN avec sa cible ARNm**

Extrait de (Filipowicz et al., 2008). Le miARN interagit avec une complémentarité parfaite sur les nt 2 à 8 : la séquence « seed » (représentée ici en rouge). Une bosse (bases non appariées) est généralement présente entre les nt 8 et 13. Une seconde zone d'interaction parfaite peut être présente au niveau des nt 13 à 16 (ici en rose). Le 1<sup>er</sup> nucléotide en regard du nt 1 du miARN est souvent un A. Le site d'interaction se situe souvent dans le 3'UTR de l'ARNm, à au moins 15 nucléotides du codon stop et dans une zone riche en AU.

Pour confirmer une cible candidate, il est donc nécessaire de la valider par des méthodes expérimentales (Kuhn et al., 2008; Thomson et al., 2011). La technique la plus utilisée est celle du « gène rapporteur luciférase »(Kuhn et al., 2008). Elle consiste à cloner le 3'UTR de l'ARNm en question dans un plasmide rapporteur, en aval du gène de la luciférase. Ce dernier exprimera donc un ARNm chimérique « Luciferase-3'UTR du gène à tester ». L'expression de la luciférase est ensuite mesurée en présence ou absence du miARN, une diminution de son expression validant une interaction directe ARNm/miARN.

#### 4) Mécanisme d'action des miARN let-7 et des miARN

Les miARN répriment majoritairement leurs cibles au niveau post-transcriptionnel. Dans la plupart des cas, les miARN n'entraînent qu'une inhibition modérée de leurs cibles (30-50%) (Baek et al., 2008; Selbach et al., 2008). Ils agissent comme des « accordeurs » l'expression des gènes.

Cependant, s'il est clair qu'ils entraînent une répression post-transcriptionnelle des gènes, le mécanisme d'action des miARN est un grand sujet de débat dans le domaine. Leur mode d'action exact reste en effet à être déterminé. Les miARN, dont les membres de la famille let-7, peuvent en effet entraîner dégradation de leur ARNm cible et/ou inhibition traductionnelle, voire même, moins fréquemment, une activation traductionnelle (Figure 13) (Huntzinger and Izaurralde, 2011; Pasquinelli, 2012). Les miARN let-7, ont servi de modèle à plusieurs travaux cruciaux sur le mode d'action des miARN (Bagga et al., 2005; Pillai et al., 2005; Selbach et al., 2008). Ces différents mécanismes sont décrits ci-dessous.

##### a) *Inhibition de la traduction*

Il a été initialement proposé que les miARN agissent par inhibition de la traduction. Ce mécanisme d'inhibition de la traduction n'est pas encore complètement compris. Il pourrait agir principalement à deux niveaux : inhibition de l'initiation ou de l'élongation (Huntzinger and Izaurralde, 2011; Pasquinelli, 2012).

Les premières études du mécanisme d'action d'un miARN ont été réalisées sur le miARN lin-4 chez *C.elegans* par Olsen et Ambros (Olsen and Ambros, 1999). Ces derniers ont suggéré que les miARN agissaient en inhibant la traduction au niveau de l'élongation, sans effet sur la quantité d'ARNm. D'autres études chez *C.elegans* (Seggerson et al., 2002) et dans des cellules humaines ont par la suite confirmé cette observation (Nottrott et al., 2006; Petersen et al., 2006). Cette inhibition de l'élongation est notamment appuyée par le fait que les miARN et leurs cibles ARNm se retrouvent dans les polysomes (complexe d'un ARNm et de plusieurs ribosomes caractéristique d'un ARNm en cours de traduction). L'absence de production de protéine pourrait être due à une destruction du polypeptide en cours de traduction, ou à un décrochage prématuré des ribosomes (Huntzinger and Izaurralde, 2011).

Parallèlement, une étude de Pillai a montré une inhibition par les miARN let-7 cette fois au niveau de l'initiation de la traduction (Pillai et al., 2005). Sans coiffe, nécessaire pour l'initiation, une cible ARNm n'est plus réprimée par les miARN let-7. De plus, dans cette étude, lorsqu'ils sont réprimés par les miARN let-7 les ARNm cibles se retrouvent dans les fractions polysomales légères, contrairement aux travaux cités ci-dessus.

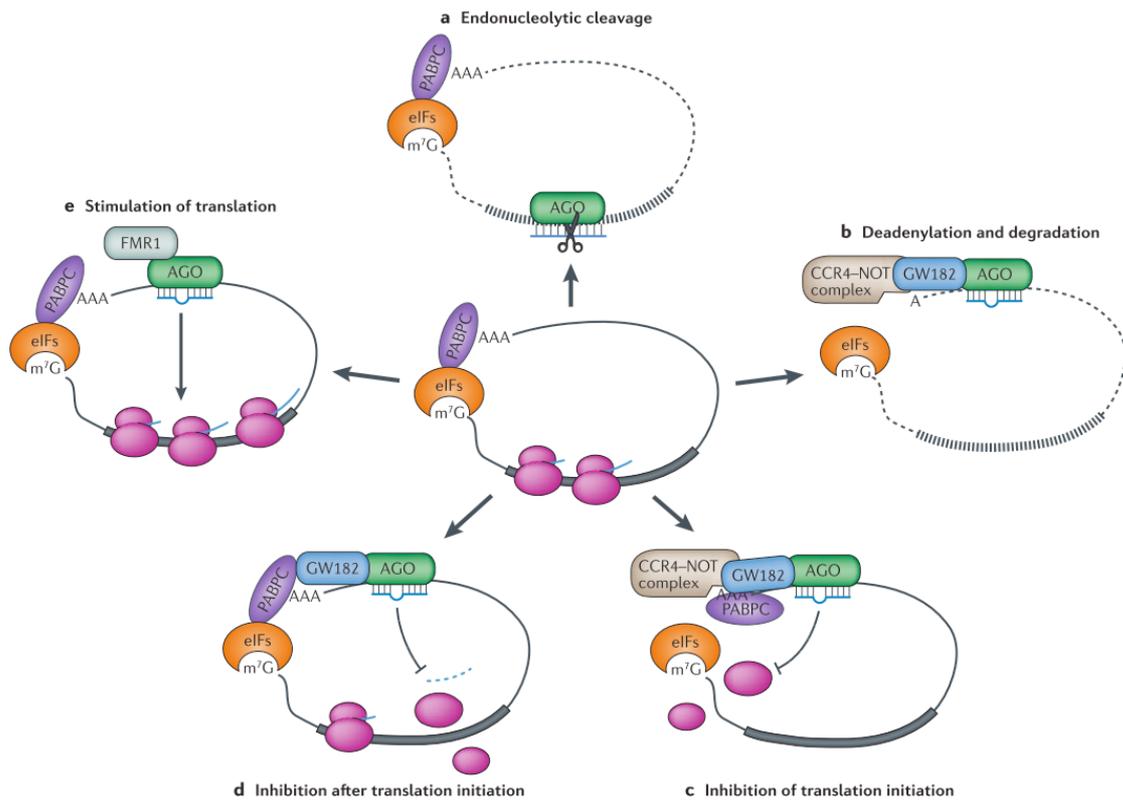
### *b) Clivage de l'ARNm*

Dans de rares cas les miARN agissent par clivage direct de l'ARNm. AGO2 (grâce à son activité « slicer ») permet ce clivage en cas de complémentarité parfaite. Ce mode d'action reste rare chez l'homme car la plupart des miARN n'interagissent que partiellement avec leur cible. On le retrouve plutôt chez les plantes (Huntzinger and Izaurralde, 2011).

### *c) Dégradation de l'ARNm*

Bien plus couramment qu'un clivage direct, les miARN entraînent leurs cibles dans la voie de dégradation des ARNm. Il a été initialement observé chez *C.elegans* que let-7 et lin-14, contrairement aux travaux d'Olsen, entraînent la dégradation de leurs ARNm cibles (Bagga et al., 2005). En parallèle, des études du transcriptome ont montré une corrélation entre présence/absence d'un miARN, et variations de ses cibles ARNm (validées ou prédites) (Baek et al., 2008; Lim et al., 2005; Selbach et al., 2008).

Cette dégradation est réalisée grâce à GW182 qui est recrutée par AGO (Filipowicz et al., 2008; Krol et al., 2010). GW182 recrute le complexe de déadénylase CCR4-NOT qui va raccourcir la queue polyA de l'ARNm, puis le complexe de décapping DCP1 :DCP2, ce qui va entraîner la dégradation de l'ARNm par l'exonucléase 5'→3' XRN1 (Behm-Ansmant and Rehwinkel, 2006; Rehwinkel et al., 2005). La dégradation se passerait en partie dans des structures cytoplasmiques appelées « P-bodies » ou « GW-bodies » (en référence à GW182 qui y est présent) (Filipowicz et al., 2008). Ces dernières contiennent les complexes nécessaires à cette dégradation, et stocke également les ARNm dont la traduction a été bloquée. La machinerie de traduction, en dehors du facteur d'initiation EIF4E, y est absente. CCR4-NOT est également impliqué dans la répression de la traduction, indépendamment de la déadénylation de l'ARNm (Chekulaeva et al., 2011)



**Figure 13. Mécanismes de régulation des ARNm par les miARN**

Extrait de (Pasquinelli, 2012). Les miARN peuvent agir sur leurs cibles ARNm selon différents mécanismes. Les facteurs d'initiation (EIFs, en orange) fixent la coiffe ( $m^7G$ ) et la PABPC (poly (A) binding protein), ce qui circularise les ARNm et active leur traduction par les ribosomes (en rose). a/clivage par AGO en cas de complémentarité parfaite du miARN (en bleu) et de l'ARNm ; b/déadénylation suivie de la dégradation de l'ARNm grâce au recrutement de GW182 et du complexe de déadénylation CCR4-NOT ; c-d/ inhibition de la traduction au niveau de : c/l'initiation, d/l'élongation, qui pourrait impliquer un décrochage du ribosome ou une dégradation du polypeptide en cours de traduction ; e/activation de la traduction, qui implique aussi la protéine FMR1 (fragile X mental retardation 1)

#### *d) Quel mécanisme final ?*

Le mode d'action des miARN est donc très complexe. En effet, ils semblent agir selon plusieurs mécanismes, impliquant dégradation de l'ARNm cible et/ou inhibition de la traduction, elle-même pouvant se dérouler à l'étape d'initiation ou d'élongation.

Des études plus récentes ont essayé de déterminer la part de répression traductionnelle et de dégradation de l'ARNm dans l'inhibition par le miARN. Quelques uns des travaux cités ci-dessus ont combiné micropuces à ARN et SILAC (spectrométrie de masse permettant de quantifier les variations de l'ensemble du protéome) pour mesurer conjointement les variations du transcriptome et du protéome suite à l'introduction ou la délétion d'un miARN. Elles ont ainsi montré que les variations d'expression protéiques entraînées par un miARN sont très souvent accompagnées d'une déstabilisation des ARNm correspondants (Baek et al., 2008; Lim et al., 2005; Selbach et al., 2008). C'est également le cas pour let-7b, qui, introduit ou inhibé dans des cellules HeLa (lignée de cellules cancéreuses), régule à lui seul (directement ou indirectement) des milliers de protéines (Selbach et al., 2008). Dans certains cas plus minoritaires, il peut y avoir inhibition de la traduction sans variation de la quantité d'ARNm (Baek et al., 2008).

Par la suite, le laboratoire de Bartel a confirmé cette tendance et montré que les miARN agissent très majoritairement (84%) sur le niveau d'expression protéique en déstabilisant et dégradant leurs cibles ARNm (Guo et al., 2010). Pour cela, ils ont utilisé dans des lignées de cellules HeLa et de neutrophiles de souris, une technique de « profilage ribosomique » (ribosome profiling). Cette dernière permet de connaître précisément la position des ribosomes sur l'ensemble des ARNm en cours de traduction.

La dégradation de l'ARNm pourrait donc être le mécanisme principal à l'œuvre sur la majorité des cibles des miARN dont la famille let-7, du moins dans le contexte limité des quelques miARN étudiés et des lignées cellulaires utilisées par les groupes cités ci-dessus. Il reste à confirmer que ce soit vraiment le cas, et à démontrer ce mécanisme dans un contexte plus général (autres miARN et autres tissus). Les résultats différents obtenus par ces équipes, ainsi que la proportion non négligeable de cibles régulées uniquement au niveau traductionnel, laissent penser que le mécanisme pourrait dépendre de la cible, voire du miARN et du type cellulaire.

### e) *Modes d'action non canoniques*

Les miARN n'entraînent pas toujours une répression post-transcriptionnelle des gènes. Dans certains cas ils sont capables au contraire d'activer la traduction d'un ARNm (Henke et al., 2008; Ørom et al., 2008; Vasudevan et al., 2007). Ils peuvent aussi agir au niveau de la transcription, qu'ils sont capables d'activer ou d'inhiber (Salmanidis et al., 2014).

Le mode d'action des miARN peut varier suivant la localisation cellulaire. En effet, une étude très récente a reporté de manière intéressante que le myomiR miR-1 était capable de transiter dans les mitochondries de myoblastes C2C12. Il y active directement la traduction d'ARNm mitochondriaux (Zhang et al., 2014). Ce mécanisme est indépendant de GW182, absent dans les mitochondries.

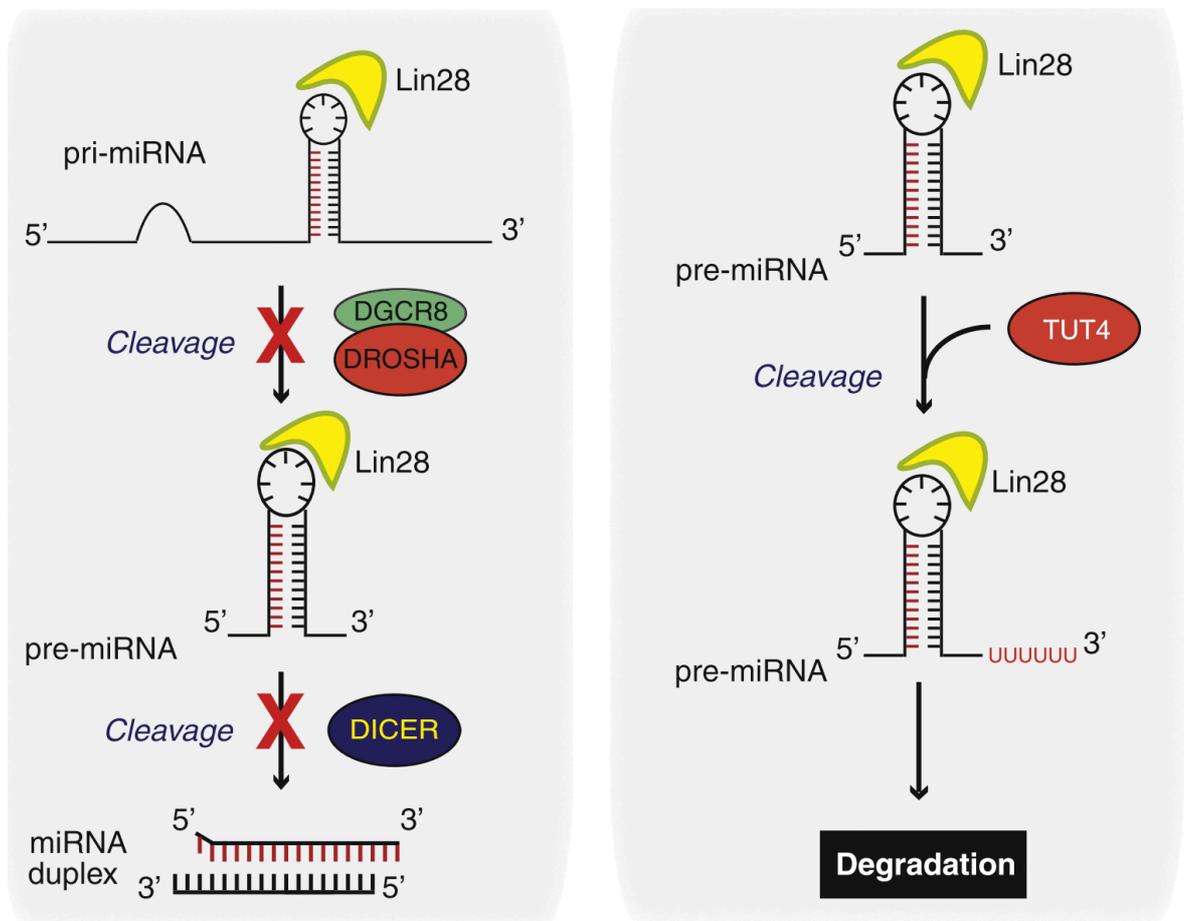
L'action des miARN let-7 peut aussi passer par ces mécanismes « non canoniques ». Par exemple les miARN let-7 activent la traduction de leur cible ARNm *HMGGA2* dans des cellules HeLa dont le cycle cellulaire est arrêté, alors qu'ils répriment *HMGGA2* en prolifération (Vasudevan et al., 2007). Les miARN let-7 pourraient donc activer ou réprimer une même cible suivant la position dans le cycle cellulaire, ce qui souligne l'importance du contexte cellulaire dans la régulation par les miARN. Il n'est pas exclu que la famille let-7 agisse sur d'autres cibles via activation traductionnelle ou en régulant directement leur transcription.

## 5) *Mécanismes de régulation de l'expression des miARN let-7*

L'expression des pri-miARN let-7 dans diverses lignées embryonnaires humaines alors que les miARN let-7 matures y sont absents, avait suggéré l'existence d'un régulateur négatif au niveau post-transcriptionnel (Suh et al., 2004).

Dans le cas des cellules souches embryonnaires, cette régulation est réalisée au niveau de sa maturation par la protéine LIN28, régulatrice spécifique des miARN let-7 la plus étudiée. LIN28A et son homologue LIN28B inhibent la maturation des miARN let-7 en se fixant sur la boucle des pri-miARN let-7 et/ou des pré-miARN let-7, réprimant ainsi l'action de DROSHA et de DICER (Figure 14) (Adams et al., 2014; Ha and Kim, 2014). LIN28A peut aussi recruter une enzyme, TUT4 (terminal uridylyl transferase), qui va ajouter un « signal de dégradation » sur les pré-miARN let-7. En les polyuridylylant (ajout d'une série d'uridines) en 3', TUT4 inhibe l'action de DICER sur les pré-miARN let-7 et entraînent leur dégradation

(Figure 14). LIN28, exprimé dans les cellules souches embryonnaires, fait partie d'un mécanisme de régulation très conservé permettant de maintenir leur pluripotence (qui serait affectée si les miARN let-7 matures étaient exprimés). Lors de la différenciation cellulaire, LIN28 voit généralement son niveau d'expression décroître, ce qui permet aux miARN let-7 de s'accumuler et de favoriser le processus de différenciation cellulaire.



**Figure 14. Mécanismes de régulation des miARN let-7 par LIN28.**

Extrait de (Adams et al., 2014). LIN28 régule négativement les miARN let-7 à différents niveaux. Il peut interférer avec sa biogénèse (partie gauche), en inhibant le clivage par DROSHA dans le noyau ou par DICER dans le cytoplasme. Il peut aussi entraîner sa dégradation en recrutant l'enzyme TUT4 qui va polyuridyler les pré-miARN let-7 (partie droite).

La maturation des miARN let-7 est également régulée positivement par KSRP (KH-type splicing regulatory protein), une protéine liant l'ARN qui se fixe aux pri-miARN let-7 et facilitent leur clivage par DROSHA (Trabucchi et al., 2009).

On note aussi que les miARN let-7 peuvent réguler leur propre biogénèse. En effet, les ARNm de LIN28 et DICER sont des cibles des miARN let-7, formant respectivement des boucles d'autorégulation positive et négative. Chez *C.elegans*, let-7 peut induire sa propre maturation en formant une boucle positive avec ALG-1, un homologue d'AGO (Zisoulis et al., 2012).

## C) La famille let-7 : rôles dans le développement et conservation

### 1) Découverte de let-7 comme un gène hétérochronique

*Let-7* a été à l'origine identifié comme un gène essentiel pour le développement de *C.elegans* suite à un criblage génétique (Meneely and Herman, 1979). Plus tard, let-7 fut l'un des premiers miARN découverts avec *lin-4* chez *C.elegans*, comme un gène « hétérochronique » et un petit ARN « régulateur temporel » (Reinhart et al., 2000).

Si let-7 est considéré comme un petit ARN « temporel », c'est parce qu'il a initialement été montré comme essentiel pour le bon timing de la détermination du destin cellulaire chez *C.elegans* (Pasquinelli et al., 2000; Reinhart et al., 2000). Ce dernier passe par quatre étapes larvaires (L1 à L4) avant d'atteindre l'âge adulte. Lors de cette étape de différenciation, certaines cellules de l'hypoderme, appelées cellules « seam » sortent du cycle cellulaire, fusionnent entre elles et vont sécréter une cuticule. Chez ce petit ver, le miARN let-7 mature doit s'accumuler avec le temps ces cellules « seam », pour que celles-ci puissent se différencier durant le passage de l'état larvaire L4 à l'état adulte (Johnson et al., 2003; Reinhart et al., 2000).

L'analyse de mutants *C.elegans* déficients en let-7 a permis de mettre en lumière ce rôle de let-7 dans le développement et la différenciation cellulaire. En absence de let-7, les cellules « seam » de ces mutants échouent à sortir du cycle cellulaire et donc à se différencier lors de la transition à l'état adulte. Au lieu de cela elles vont continuer à se diviser. *C.elegans* répète ainsi des états « larvaires » et n'arrive pas à passer à l'état adulte (Reinhart et al., 2000). Une majorité de ces mutants KO pour *let-7* meurent, d'où son nom : lethal-7 (let-7). A l'inverse lorsque let-7 est surexprimé précocément chez ce petit ver, les cellules « seam » vont se différencier prématurément (Hayes and Ruvkun, 2006). L'ensemble de ces résultats ont suggéré un rôle pro-différenciation cellulaire de let-7. De plus, let-7 (ainsi que *lin-4*) s'inscrit plus largement dans une voie dite « hétérochronique », qui contrôle le développement correct

dans le temps (entre les différents états larvaires) des tissus et des organes (Moss, 2007). Let-7 contrôle de nombreux gènes de cette voie, dont *LIN14*, *LIN28*, *LIN41*, et des gènes codant pour des facteurs de transcription importants pour le passage de L4 à l'âge adulte (Abbott et al., 2005; Grosshans et al., 2005; Reinhart et al., 2000; Slack et al., 2000). Let-7 agit en quelque sorte comme un « interrupteur » positif de la différenciation cellulaire, qui est lui-même régulé dans le temps.

Let-7 étant nécessaire pour réguler le timing de développement de *C.elegans*, et sa surexpression entraînant une différenciation précoce, son expression doit être restreinte dans les phases précoces du développement. L'interrupteur moléculaire que constitue let-7 doit être activé au bon moment du développement. Effectivement le miARN let-7 mature endogène n'apparaît que tardivement dans le développement de *C.elegans*. Il commence à s'accumuler à L3 et atteint son expression maximale à L4, corrélant l'apparition du miARN let-7 à celle d'un destin cellulaire orienté vers la différenciation (Esquela - Kerscher and Johnson, 2005; Reinhart et al., 2000).

## **2) La famille let-7, une famille de miARN conservée dans le règne animal**

Les miARN let-7 dans la majorité des organismes forment une « famille ». Une famille de miARN est définie par la séquence « seed » en commun, soit les nt 2 à 8 qui ont une complémentarité parfaite avec l'ARNm ciblé. *C.elegans* comprend ainsi 8 autres miARN de la famille let-7, dont certains contrôlent aussi son développement (Roush and Slack, 2008). Parmi eux, miR-48, miR-84 et miR-241, qui font aussi partie de la voie hétérochronique, sont exprimés plus tôt que let-7 et régulent donc une étape du développement plus précoce : la transition L2-L3 (Abbott et al., 2005). On voit donc que l'expression temporelle de différents membres de la famille let-7 permet de contrôler plusieurs étapes du développement.

Chez l'homme la famille let-7 comprend 13 membres: let-7a-1/3, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f-1/2, let-7g, let-7i, miR-98, et miR-202 (Figure 15) (Mondol and Pasquinelli, 2012). Ces derniers sont présents sur de nombreux loci dans le génome : 14 loci répartis sur 9 chromosomes, dont certains sont organisés en clusters. De plus, un même miARN let-7 mature peut être parfois produit par différents précurseurs: c'est le cas de let-7a (3 précurseurs let-7a-1/3) et let-7f (2 précurseurs let-7f-1/2).

La famille let-7 est largement présente à travers le règne animal, où elle est très conservée (Pasquinelli et al., 2000). La séquence de let-7a, par exemple, est identique chez de nombreux organismes. La séquence seed des miARN let-7, essentielle pour la reconnaissance de ses cibles ARNm, est encore plus conservée, puisqu'on la retrouve à l'identique de *C.elegans* à l'homme (Figure 15). La taille de la famille let-7 n'est cependant pas la même suivant l'espèce considérée. Le poisson-zèbre a 11 différents miARN let-7, *C.elegans* 9. L'organisation génomique de la famille let-7 est aussi conservée entre la plupart des vertébrés et chez la drosophile, mais pas chez *C.elegans* (Roush and Slack, 2008). En revanche, les miARN let-7 ne sont à priori pas présents chez les métazoaires « inférieurs » et chez les plantes.

<b><i>C. elegans</i></b>		<b><i>H. sapiens</i></b>	
let-7	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	let-7a (3)	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU
mir-48	UGAGGUAGGCUCAGUAGAUGCGA	let-7b	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
mir-84	UGAGGUAGUAUGUAAUUAUGUA	let-7c	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU
mir-241	UGAGGUAGGUGCGAGAAAUGA	let-7d	UGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU
mir-793	UGAGGUAUCUUAGUUAGACAGA	let-7e	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU
mir-794	UGAGGUAUUCAUCGUUGUCACU	let-7f (2)	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU
mir-795	UGAGGUAGAUUGAUCAGCGAGCUU	let-7g	UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU
	⏟	let-7i	UGAGGUAGUAGUUUGUCUGUU
	séquence seed	miR-98	UGAGGUAGUAAGUUGUAUUGUU
		miR-202	AGAGGUAUAGGGCAUGGGAAAA
			⏟
			séquence seed

**Figure 15. Membres de la famille let-7 chez *C.elegans* et chez l'homme.**

Adapté de (Mondol and Pasquinelli, 2012). La famille let-7 est très conservée dans le règne animal. On voit que le miARN mature let-7 de *C.elegans* est identique au miARN let-7a d'*Homo sapiens*. La séquence seed des miARN let-7 (en gris) est encore davantage conservée puisqu'on la retrouve à l'identique chez de nombreux organismes, elle est ici parfaitement identique entre l'homme et ce petit ver nématode.

Cette conservation des miARN let-7 est cohérente avec leur importance biologique. En effet, les miARN let-7 régulent le développement et la différenciation cellulaire dans nombre d'organismes (Roush and Slack, 2008). Chez la drosophile notamment, l'unique

membre de sa famille let-7 a été bien étudié et régule également les stades finaux du développement (Roush and Slack, 2008; Sokol, 2012).

Le timing d'apparition des miARN let-7 est aussi conservé durant l'évolution. En effet, chez la drosophile et chez des vertébrés comme la souris ou le poisson-zèbre, les miARN let-7 n'apparaissent que tardivement au cours du développement (Roush and Slack, 2008). Chez la drosophile, par exemple, l'apparition des miARN let-7 corrèle avec leur rôle dans une étape de son développement (passage du dernier état larvaire à la pupe). Chez la souris, les miARN let-7 augmentent durant l'embryogénèse et certains membres de la famille sont notamment induits lors du développement du cerveau.

Afin que les miARN let-7 matures soit présent au « bon moment » pour réguler la différenciation cellulaire, il est essentiel que des mécanismes de régulation contrôlent le « timing » de leur apparition. Différents mécanismes, au niveau transcriptionnel comme post-transcriptionnel, régulent la quantité des miARN let-7 matures au cours du développement. Chez *C.elegans* la transcription des miARN let-7 est sous contrôle d'un élément temporel de régulation (TRE), qui pourrait être activé par un facteur de transcription spécifique des cellules « seam » (Johnson et al., 2003). Chez la drosophile, l'ecdysone, hormone régulatrice du développement, pourrait réguler let-7, son pic d'expression étant corrélée à l'expression de let-7 (Sempere et al., 2002).

Certains mécanismes de régulation temporelle sont aussi conservés. C'est le cas de LIN28. Chez *C.elegans*, les précurseurs pri-miARN let-7 sont exprimés dès le début du développement (à L1) et suivent des oscillations d'expression ensuite (une à chaque stage) (Wynsberghe et al., 2011). LIN28 réprime la maturation des miARN let-7 dans les stades de développement précoces, où il est exprimé, puis diminue très fortement à la fin du développement. Son profil d'expression est inverse à celui des miARN let-7. Ces profils d'expression « opposés » des miARN let-7 et de LIN28 ont été reportés dans de nombreux types de cellules de mammifères. LIN28 régule ainsi les miARN let-7 aussi bien chez *C.elegans* que dans des cellules souches embryonnaires humaines caractérisées par l'absence des miARN let-7 (Wynsberghe et al., 2011).

De plus, certaines cibles des miARN let-7 sont également conservées entre différents organismes, même très éloignés. Cette conservation a permis par exemple d'identifier la première voie suppresseur de tumeur impliquant un miARN chez l'homme. En effet, l'oncogène *let-60/RAS* a d'abord été trouvé comme cible des miARN let-7 chez *C.elegans*, et s'est avérée être conservée chez l'homme (Johnson et al., 2005).

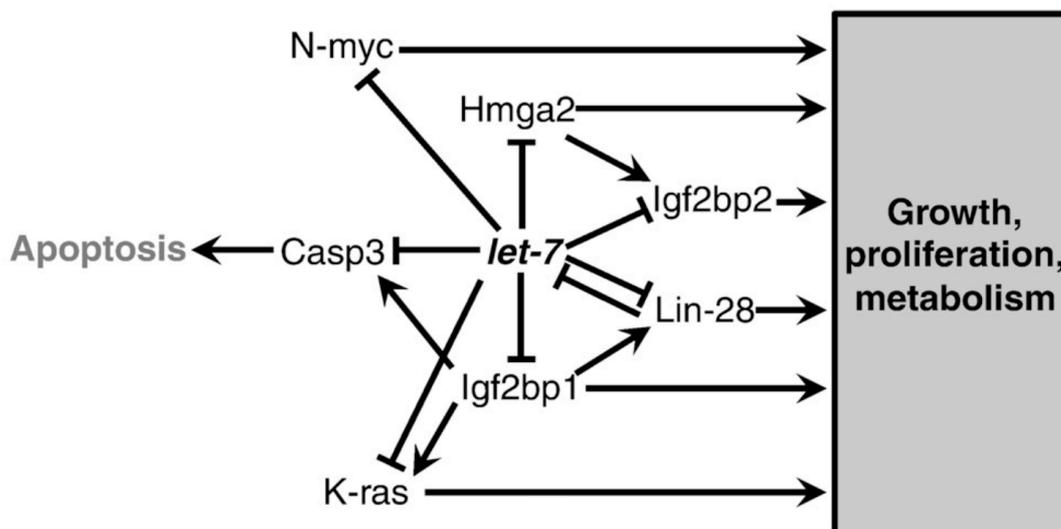
On voit que de nombreux paramètres autour de la famille let-7 sont conservés: séquence, organisation génomique, cibles, timing d'apparition associé à la régulation par LIN28... Cela montre l'importance des miARN let-7 en tant que régulateurs temporels du développement et de la différenciation cellulaire des métazoaires.

#### **D) Fonctions et cibles des miARN let-7 chez les mammifères**

Chez les mammifères, les miARN let-7 ont en été en grande partie étudiés en tant que miARN suppresseurs de tumeur (Boyerinas et al., 2010). Cette propriété est en partie liée à leur capacité à généralement inhiber la prolifération cellulaire, à l'inverse de leur action sur la différenciation cellulaire.

Des expériences de micropuces à ARN ont montré que let-7b régule globalement, de manière directe ou indirecte, les voies de prolifération, le cycle cellulaire, la division cellulaire et de nombreux oncogènes dans des cellules humaines (Johnson et al., 2007). Cela fait des miARN let-7 des régulateurs majeurs de ces procédés. Plusieurs groupes indépendants ont montré que les miARN let-7 répriment directement de nombreux ARNm impliqués dans ces fonctions biologiques. Parmi eux, on trouve des ARNm de régulateurs du cycle cellulaire, comme diverses cyclines (CCND1, CCND2), CDC25A, CDK6 (Johnson et al., 2007; Zhao et al., 2010). Les miARN let-7 régulent aussi les ARNm de facteurs de transcription comme MYC, HMGA2, et de régulateurs post-transcriptionnels comme LIN28 et les IGF2BP (IMPs) (Boyerinas et al., 2008; Lee and Dutta, 2007; Sampson et al., 2007). Toutes ces cibles citées, auxquelles on peut ajouter RAS, FAS, sont des oncogènes (Geng et al., 2011; Johnson et al., 2005). Les ARNm des facteurs E2F sont aussi régulés par la famille let-7 : c'est le cas des ARNm de E2F5 dans des chondrocytes, et de E2F2 (Dong et al., 2010; Papaioannou et al., 2013).

Nombre de ces cibles interagissent entre elles, certaines au sein de boucles d'autorégulation, formant un complexe réseau de régulation autour des miARN let-7 (Figure 16) (Gurtan and Sharp, 2013).



**Figure 16. Interconnexions entre les miARN let-7 et leurs cibles.**

Extrait de (Gurtan and Sharp, 2013). De nombreuses cibles des miARN let-7 sont impliquées dans la prolifération et la croissance cellulaire. Elles se régulent parfois entre elles, ou régulent les miARN let-7, ce qui forme un réseau de régulation complexe.

L'autorégulation des miARN let-7 passe notamment par leur action sur leur biogénèse via la régulation de l'ARNm de LIN28 et des ARNm des enzymes clés de la biogénèse des miARN comme DICER et AGO (Tokumaru et al., 2008). Les miARN let-7 régulent un autre procédé biologique important : l'apoptose (et interviennent donc dans la survie cellulaire). Pour cela ils ciblent notamment *CASP3* (Tsang and Kwok, 2008). S'il est vrai que les membres de la famille let-7 régulent en général les mêmes cibles, il n'est pas à exclure que certains miARN let-7 aient des rôles spécifiques.

### **E) Rôle des miARN let-7 dans la différenciation cellulaire**

Les miARN let-7 sont exprimés lors de la différenciation de multiples types cellulaires et chez de nombreux organismes, que ce soit *C.elegans*, la drosophile, la souris ou l'homme, où il y joue un rôle « pro-différenciation cellulaire ». Comme nous venons de le voir, let-7 a été initialement montré comme essentiel pour la différenciation chez *C.elegans*. Chez la drosophile son étude a été facilitée par la présence d'un seul gène *let-7*. Let-7 y régulerait notamment la formation du système nerveux adulte (Sokol, 2012). Chez les vertébrés, la

confirmation du rôle des miARN let-7 dans le développement est difficile en raison de l'existence de nombreux membres de la famille. Il est extrêmement compliqué de faire une délétion *in vivo* de tous les gènes codant pour les membres de la famille let-7. Mais les miARN let-7 sont très importants pour la différenciation cellulaire chez ces organismes. En cohérence avec ce rôle, les miARN let-7 augmentent généralement avec la différenciation cellulaire, et notamment dans la différenciation neuronale (Sempere and Freemantle, 2004).

Certains miARN peuvent être spécifiques d'un tissu, comme miR-1 dans le muscle (voir page 79), et ainsi avoir une activité restreinte à la différenciation de ces tissus en question. Chez l'homme et la souris les miARN let-7 sont, au contraire, exprimés de manière ubiquitaire dans la plupart des cellules somatiques. Les miARN let-7a et let-7b sont d'ailleurs parmi les miARN les plus abondants dans différents organes de l'homme et de la souris : cerveau (homme, souris), rein, poumon (souris) (Sempere and Freemantle, 2004)... Ces données sont en accord avec une action générale de la famille let-7 sur la différenciation cellulaire. Dans les cellules souches embryonnaires en revanche, les miARN let-7 y sont absents. Leur absence est nécessaire pour le maintien de l'état indifférencié de ces cellules ainsi que pour leur auto-renouvellement (Li and He, 2012). De plus, une étude utilisant une lignée de cellules souches embryonnaires déficiente en miARN (*DGCR8* *-/-*) présentant des défauts de différenciation a montré qu'un membre de la famille, let-7c, est important pour la différenciation de ces cellules souches (Melton et al., 2010). En effet, introduit dans ces dernières de manière ectopique, let-7c rétablit leur capacité à différencier. A l'inverse l'inhibition de plusieurs membres de la famille let-7, dont let-7a, let-7c, let-7f, par un antisens promeut la dédifférenciation de cellules somatiques (ici des fibroblastes de souris) en cellules souches induites (iPS). D'ailleurs on peut noter que LIN28 est un des facteurs classiquement utilisé pour la formation de cellules iPS, ce qui est cohérent avec ce résultat.

Des expériences de surexpression ou d'inhibition dans des cellules en culture ont permis de montrer généralement un rôle pro-différenciation cellulaire des miARN let-7 dans divers tissus (Tableau 3). Certaines cibles des miARN let-7 impliquées dans le processus de différenciation cellulaire ont aussi été caractérisées. Les miARN let-7a et let-7b ont notamment été montrés comme favorisant le processus de différenciation neuronale (Rybak et al., 2008; Zhao et al., 2010). Cette activation de la différenciation neuronale peut passer notamment par la répression de régulateurs positifs du cycle cellulaire, comme CCND1 (Zhao et al., 2010). Dans certains cas, des rôles « anti-différenciation cellulaire » des miARN let-7 ont été reportés. Let-7i inhiberait ainsi la différenciation neuronale en réprimant un facteur de transcription bHLH, MASH-1 (Tableau 3) (Cimadamore et al., 2013). Let-7f quant à lui

inhiberait la différenciation hépatocytaire (Davoodian et al., 2014). Quelques cibles des miARN let-7 dans ces tissus pourraient avoir un lien avec la différenciation musculaire (voir partie Discussion).

<i>miARN</i>	<i>Cellules/lignée</i>	<i>Espèce</i>	<i>Effet biologique</i>	<i>Cibles directes</i>	<i>Références</i>
Let-7a	Souches neuronales	Souris	+ différenciation neuronale	<i>LIN28A</i>	(Rybak et al., 2008)
Let-7b	Souches neuronales	Souris	+ différenciation neuronale	<i>CCND1</i> , <i>TLX</i>	(Zhao et al., 2010)
Let-7c	Leucémie myeloïde aigue	Homme	+ différenciation granulocytaire	<i>PBX2</i>	(Pelosi et al., 2012)
Let-7e	Souches adipocytaires	Souris	+ différenciation adipocytaire	<i>MMP-9</i>	(Ventayol et al., 2014)
Let-7f	Souches dérivées du tissu adipeux	Homme	- différenciation hépatocytaire	-	(Davoodian et al., 2014)
Let-7i	Souches neuronales	Homme	- différenciation neuronale	<i>MASH-1</i> , <i>NGN1</i>	(Cimadamore et al., 2013)

**Tableau 3. Membres de la famille let-7 impliqués dans la différenciation cellulaire et leurs cibles.**

Différents membres de la famille let-7 régulent généralement positivement la différenciation cellulaire, mais dans certains cas ont l'effet inverse. + : active ; - : inhibe

## **F) Rôle des miARN let-7 et des miARN dans la différenciation musculaire**

Les miARN let-7 sont des acteurs majeurs impliqués dans la régulation de la différenciation cellulaire. Mais leur rôle dans la différenciation du muscle n'avait jusqu'alors pas été exploré. Avant eux, d'autres miARN et plus généralement des ARN non codants ont été étudiés pour leur effet sur la différenciation musculaire.

### **1) miARN impliqués dans la différenciation musculaire et leurs cibles**

Le rôle primordial des miARN dans la myogénèse embryonnaire a été mis en évidence par des souris mutantes dont *DICER* a été inactivé spécifiquement dans le muscle. Ces souris meurent vers la naissance, sont caractérisées par une hypoplasie musculaire et un déficit en miR-1, miR-133 et miR-206 (O'Rourke et al., 2007). *DICER* et par conséquent les miARN apparaissent donc comme essentiels pour la myogénèse embryonnaire.

De précédents travaux ont aidé à décrypter le mode d'action de quelques miARN dans la différenciation musculaire. Certains, appelés « myomiRs », sont fortement enrichis, voire hautement spécifiques du muscle, ce qui souligne leur rôle spécifique dans la myogénèse. C'est le cas des miARN miR-1, miR-133 et miR-206, myomiRs les plus étudiés. miR-1 et miR-133 sont fortement exprimés dans le muscle squelettique et le cœur, tandis que miR-206 est spécifique du muscle squelettique (Kim et al., 2006; Lee and Ambros, 2001; Sempere and Freemantle, 2004). D'autres miARN importants pour le muscle, comme miR-181, ont au contraire une expression ubiquitaire.

La plupart de ces miARN voient leur expression augmenter durant la différenciation musculaire, miR-1, miR-133 et miR-206 étant parmi les plus fortement induits (Kim et al., 2006; Sempere and Freemantle, 2004). D'autres, plus rares, diminuent au cours de la myogénèse. L'expression de nombreux miARN lors de la myogénèse est induite par des facteurs de transcription importants pour la différenciation musculaire: MYOD, MEF2, SRF ... (Tableau 4)

<i>miARN</i>	<i>Tissu</i>	<i>Expression dans la différenciation musculaire</i>	<i>Rôle biologique</i>	<i>Cibles validées</i>	<i>Régulateurs</i>
<b>miR-1</b>	<b>muscle-spécifique</b>	<b>augmente</b>	<b>-prolifération +différenciation</b>	<b><i>DELTA, HAND2, HDAC4</i></b>	<b>MEF2, MYF5, MYOD, Myog, SRF</b>
miR-26a	ubiquitaire	augmente	+différenciation	<i>EZH2</i>	*
miR-30a	ubiquitaire	*	+différenciation	<i>SNAIL</i>	MYOD
<b>miR-133</b>	<b>muscle-spécifique</b>	<b>augmente</b>	<b>+prolifération +/- différenciation</b>	<b><i>IGF1R, NPTB, SRF, UCP2</i></b>	<b>MEF2, MYF5, MYOD, MYOG, SRF</b>
miR-125b	ubiquitaire	diminue	-différenciation	<i>IGF2</i>	*
miR-181	ubiquitaire	augmente	+différenciation	<i>HOXA11</i>	*
<b>miR-206</b>	<b>muscle squelettique -spécifique</b>	<b>Augmente</b>	<b>+différenciation</b>	<b><i>C-MET, CX43, FSTL1, MAML1, PAX3/7, POLA1, SNAI2, UTRN</i></b>	<b>MEF2, MYOD</b>
miR-214	ubiquitaire	augmente	+prolifération +différenciation	<i>EZH2, NRAS</i>	EZH2, MYOD, MYOG
miR-221/222	ubiquitaire	diminue	-différenciation	<i>p27</i>	*
miR-486	muscle-enrichi	augmente	+différenciation	<i>FOXO1, PAX7, PTEN</i>	MYOD, SRF

**Tableau 4. miARN ayant un rôle important dans la différenciation musculaire**

Liste non exhaustive, tableau réalisé d'après (Braun and Gautel, 2011; Buckingham and Rigby, 2014; Ge and Chen, 2011; van Rooij et al., 2008), + : stimule, - : inhibe, \* : non connus

Les miARN peuvent avoir un rôle d'activation ou d'inhibition de la différenciation musculaire et agissent parfois sur la prolifération des myoblastes (Tableau 4). Les miARN induits pendant la myogénèse semblent être en général plutôt activateurs.

Ils vont réguler de nombreux gènes importants pour le processus de différenciation musculaire (Tableau 4). miR-206 sous-régule la sous-unité alpha de la DNA polymérase, inhibant ainsi la synthèse d'ADN et stimulant la sortie du cycle cellulaire nécessaire à la différenciation du muscle strié squelettique (Kim et al., 2006). Les miARN régulent aussi,

directement ou indirectement, des facteurs de transcription nécessaires à l'établissement du programme myogénique. miR-181 promeut ainsi la différenciation musculaire en réprimant HOXA11, inhibiteur de MYOD (Naguibneva et al., 2006b).

Comme les miARN let-7, dans de nombreux cas les miARN agissent au sein de boucles de rétrocontrôle, étant sous régulation de leurs propres cibles. miR-1 par exemple, régule la désacétylase HDAC4, ce qui active l'expression du facteur de transcription MEF2, lui-même activateur de miR-1 (Chen et al., 2006; Liu et al., 2007). miR-1 régule ainsi positivement sa propre expression.

Les miARN apparaissent ainsi comme des régulateurs essentiels de la différenciation musculaire, et constituent une « couche » importante de régulation supplémentaire, en plus de la régulation transcriptionnelle par les MRF et autres facteurs de transcription. Cependant, le rôle de relativement peu de miARN a été exploré dans la myogénèse. Il reste probablement encore beaucoup de miARN impliqués dans la myogénèse à découvrir. De même, beaucoup de cibles de myomiRs déjà connus n'attendent que d'être révélées. Notre laboratoire a donc permis de combler en partie ce manque de connaissance en identifiant de nouveaux miARN impliqués dans la différenciation musculaire (voir Article 1), dont les miARN de la famille let-7 miR-98 et let-7g.

## **2) Les miARN let-7, nouveaux répresseurs de la différenciation musculaire**

Les miARN let-7 ont été très peu étudiés dans le contexte musculaire. Chez la drosophile, let-7 a été montré comme essentiel pour le remodelage neuro-musculaire (Sokol et al., 2008). Comparé à l'ensemble du miRNOME, let-7a, let-7b et miR-98 entre autres ont une bonne expression dans le muscle squelettique et le cœur humains (Sempere and Freemantle, 2004).

Chez la souris et chez l'homme, les miARN let-7 peuvent diminuer la tolérance au glucose en agissant notamment sur la voie IGF/PI3K/MTOR (Frost and Olson, 2011; Zhu et al., 2011). Plusieurs composants de cette voie, dont les récepteurs IGFR1 (insulin-like growth factor receptor), INSR (insulin-receptor), ainsi que AKT2 et PI3KIP1 (PI3K interacting protein 1) sont directement réprimés par les miARN let-7.

Nous avons ensuite montré dans mon laboratoire que miR-98 et let-7g retardent la différenciation musculaire, et que plusieurs de leurs cibles, HMGA2, IMP-1/2/3, LIN28, sont

inhibées durant ce processus (voir Article 1) (Polesskaya et al., 2013). LIN28, absent dans la plupart des tissus adultes, est présent dans le muscle squelettique et le cœur. Dans les myoblastes en différenciation, son expression augmente et il régule positivement la différenciation musculaire en augmentant la synthèse protéique, une de ses cibles importantes étant IGF2 (Polesskaya et al., 2007).

Dans un autre type de muscle, le muscle cardiaque, miR-98 inhiberait l'hypertrophie cardiaque en réprimant la cycline D2 (Khanjyan et al., 2013). miR-98 semblerait avoir un effet différent sur le cœur par rapport à ce que nous avons observé *in vitro* sur le muscle squelettique.

### **3) Interactions des miARN let-7 avec des longs ARN non codants lors de la différenciation musculaire**

Plus récemment, certains longs ARN non codants (lncARN), longs transcrits ne codant pas pour des protéines, ont été montrés comme importants pour la différenciation musculaire. Ces ARN jouent un rôle dans la régulation de la transcription ainsi que dans la régulation post-transcriptionnelle des ARNm (Rinn and Chang, 2012). Parmi eux, les lncARN H19 et linc-MD1 régulent la myogénèse. Ils agissent tous deux comme des « éponges moléculaires » ou « competing endogenous RNA » (ceRNA), en séquestrant des miARN, inhibant de ce fait leur action. Ces lncARN ajoutent ainsi encore un niveau de complexité supérieur aux réseaux de régulation post-transcriptionnels de la différenciation musculaire. Linc-MD1 accélère la différenciation du muscle strié en agissant comme une « éponge » pour miR-133 et miR-135, « dérèprimant » ainsi leurs cibles MEF2C et MAML1, facteurs de transcription activant la myogénèse terminale (Cesana et al., 2011).

H19, quant à lui, a été initialement appelé MYOH et identifié dans le même criblage génétique qui a permis d'identifier MYOD (Davis et al., 1987). Deux études contradictoires ont exploré le rôle d'H19 dans la différenciation musculaire (Dey et al., 2014; Kallen et al., 2013).

La première étude montre, dans une lignée de cellules humaines embryonnaires de rein (HEK 293), que H19, qui contient des sites pour les miARN let-7, agit comme une « éponge » des miARN let-7, les séquestrant et inhibant leur activité. Les auteurs suggèrent que H19 agirait selon le même mécanisme dans les myoblastes C2C12. H19 retarde ainsi la différenciation musculaire des C2C12, les miARN let-7 agissant eux comme accélérateur de

la différenciation musculaire (Kallen et al., 2013). Cela est en contradiction avec les résultats obtenus dans le cadre de ma thèse (voir partie Discussion). H19, en inhibant l'action des miARN let-7, dérégulerait des cibles des miARN let-7, dont DICER et HMGA2. La famille let-7 aurait ici un rôle pro-myogénique de par son action inhibitrice sur IMP-1, une protéine liant l'ARN qui réprime IGF2 (Insulin-like growth-factor 2).

Une seconde étude souligne à l'inverse un rôle pro-myogénique de H19, ce dernier contenant deux miARN favorisant la différenciation musculaire : miR-675-5p et miR-675-3p (Dey et al., 2014). Des expériences de perte de fonction de H19 *in vitro* dans des C2C12 et des cellules satellites (humaines, murines) provoquent un retardement de la différenciation musculaire. H19 est aussi important *in vivo* pour la régénération musculaire, des souris mutantes déficientes en H19 présentant une régénération anormale. Un retard de différenciation musculaire est aussi observé pour des myoblastes primaires issus de ces souris. Cette action pro-myogénique de H19 est en contradiction avec son rôle anti-différenciation musculaire montré dans la première étude (Kallen et al., 2013) (voir partie Discussion). De plus, alors que la première étude montre une induction très forte de l'expression des miARN let-7 (en l'occurrence let-7a) pendant la différenciation des C2C12, les auteurs de la seconde ne trouvent pas d'augmentation significative des miARN let-7 (let-7b dans cette étude) durant la différenciation musculaire des C2C12 comme des cellules satellites.

Ces résultats très différents concernant d'une part H19, d'autre part les miARN let-7, pourraient s'expliquer par des différences entre les lignées de C2C12 utilisées. Les différences d'expression des miARN let-7 pourraient aussi être dues au fait que les auteurs de la première étude mesurent l'expression du miARN let-7a, ceux de la seconde l'expression du miARN let-7b, l'expression pouvant être différente selon le membre de la famille let-7 considéré. Cependant, alors que le rôle pro-myogénique de H19 de la seconde étude est montré dans les C2C12, les cellules satellites et *in vivo*, dans la première étude la démonstration du rôle anti-différenciation musculaire de H19 ne se limite qu'aux C2C12.

On voit ainsi que les lncARN peuvent être des régulateurs importants de la myogénèse en « tamponnant » des miARN. Il est probable que ces derniers interagissent avec d'autres myomiRs. De nombreux lncARN ayant été découverts récemment, le rôle des lncARN dans la myogénèse est encore un continent mal connu qui ne demande qu'à être exploré pour mieux comprendre la régulation post-transcriptionnelle du muscle.

## IV) Pathologies associées aux let-7 et à E2F5

### A) Let-7 - E2F5 et cancer

#### 1) Les miARN Let-7, suppresseurs de tumeur

De nombreux miARN sont dérégulés dans le cancer. Parmi eux, les membres de la famille let-7 ont été largement étudiés pour leur lien avec le cancer. Les miARN let-7 agissent en effet généralement comme des suppresseurs de tumeur. De nombreuses tumeurs ont montré une absence ou une sous-expression de certains miARN let-7 (Boyerinas et al., 2010). Cette sous-régulation des miARN let-7 est souvent associée à un mauvais pronostic, par exemple dans le cas du cancer du poumon (Osada and Takahashi, 2011). De manière plus surprenante, certaines tumeurs présentent une surexpression de certains miARN let-7 tandis que d'autres y sont absents (Boyerinas et al., 2010).

Le lien entre les miARN let-7 et le cancer va de pair avec la fonction d'inhibition des voies de prolifération et du cycle cellulaire des miARN let-7 (Johnson et al., 2007). En effet, les cellules cancéreuses sont caractérisées par une prolifération excessive. La famille Let-7 réprime de nombreux gènes dits oncogènes et favorisant donc l'apparition du processus cancéreux : *MYC*, *RAS*, *FAS*, ...

Certains de ces gènes sont dits « oncofoetaux » : *HMG2*, *LIN28*, *IMP-1* notamment. Ils sont exprimés précocément dans l'embryon (et dans les cellules souches) (où les miARN let-7 sont encore absents) (Boyerinas et al., 2008). Une fois exprimé lors de la différenciation cellulaire des tissus, les miARN let-7 répriment ces gènes. La perte de membres de la famille let-7 dans certains cancers comme celui du poumon corrèle avec une réexpression de ces gènes, ce qui favorise le cancer.

Certaines voies de signalisation peuvent, via LIN28, contrôler l'expression des miARN let-7. Par exemple l'oncoprotéine SRC est capable d'entraîner une réponse inflammatoire via NF- $\kappa$ B, ce qui va activer LIN28 (Iliopoulos et al., 2009). Ce dernier va sous-réguler les miARN let-7, et augmenter l'expression de l'interleukine-6 (IL6), cible directe des miARN let-7. IL6 active ensuite à la fois STAT3, nécessaire pour la

transformation, et NF- $\kappa$ B, formant une boucle de régulation positive. Par ce mécanisme LIN28 favoriserait la transformation cancéreuse.

## 2) E2F5, une protéine oncogène

E2F5 est impliqué dans la régulation du cycle cellulaire (Gaubatz et al., 2000) et potentiellement dans le cancer où il semble plutôt oncogénique : sa surexpression/amplification est oncogénique dans des cellules primaires de rat et a été observée dans de nombreuses tumeurs solides humaines (sein, ovaire, foie, prostate etc.) (Jiang et al., 2011; Kothandaraman et al., 2010).

Les travaux de Johnson ont mis incidemment en évidence une altération significative de l'expression de E2F5 dans plusieurs lignées cancéreuses suite à la surexpression de let-7b, sans montrer son caractère de cible directe (Johnson et al., 2007). *E2F5* est amplifié notamment dans les cancers du sein et de l'ovaire, tandis que certains membres de la famille let-7 y sont sous-exprimés (Boyerinas et al., 2010; Jiang et al., 2011; Kothandaraman et al., 2010). L'effet suppresseur de tumeur des miARN let-7 pourrait passer en partie par sa répression de E2F5. De même, il est possible que la surexpression de E2F5 observée dans plusieurs lignées soit due en partie à une perte de certains miARN let-7, mais cela reste à prouver.

Le cancer est un problème de santé majeur et une des premières causes de mortalité dans le monde. Le cancer du sein est en France le plus fréquent et meurtrier chez la femme, avec une incidence de 90 pour 100 000 et 11 000 décès par an. Le cancer de l'ovaire entraîne 3000 décès par an. Son pronostic est souvent mauvais. Le cancer de la prostate est le plus fréquent chez l'homme. L'hépatocarcinome est très meurtrier notamment chez les enfants. De nouveaux traitements visant E2F5 et/ou ses cibles permettront d'améliorer le pronostic et la prise en charge de ces cancers.

## B) Les miARN let-7 dans les maladies cardiovasculaires

Une expression aberrante de certains miARN let-7 a été associée à diverses maladies cardiovasculaires comme: la fibrose cardiaque, l'hypertrophie cardiaque, l'arythmie,

l'infarctus du myocarde, l'hypertension, l'athérosclérose, la cardiomyopathie dilatée, l'angiogénèse ... (Bao et al., 2013).

L'étude de la famille let-7 dans le cœur promet des avancées thérapeutiques pour ces maladies, qui sont un des plus gros problèmes de santé publique et cause de décès (avec le cancer). Le miARN let-7b circulant par exemple pourrait être un marqueur de l'infarctus du myocarde. Le miARN let-7i serait un potentiel biomarqueur de la cardiomyopathie dilatée. miR-98, lui, inhibe l'hypertrophie cardiaque (voir page 81). Et les miARN let-7 pourraient aussi agir dans la différenciation de cellules souches embryonnaires cardiaques.

### **C) Let-7 - E2F5 et maladies musculaires**

Une des causes des changements structuraux et fonctionnels dans le muscle squelettique est l'âge, causant des dysfonctionnements et des fragilités. Les miARN let-7b et let-7e ont été montrés comme surexprimés dans les muscles de patients âgés, sans que le mode d'action des miARN let-7 dans le vieillissement ne soit exploré. Les auteurs suggèrent toutefois qu'une forte expression des miARN let-7 pourrait y réduire la prolifération et la régénération musculaire (Drummond et al., 2011). Les changements structuraux du muscle peuvent être causés par d'autres maladies. Les myopathies par exemple sont des maladies sévères caractérisées par une forte dérégulation de l'expression des gènes. Certains miARN (miR-21, miR-206, et d'autres), ont été montrés comme étant dérégulés dans diverses maladies musculaires dont les myopathies. Concernant les miARN let-7, trois membres de la famille, let-7c, let-7e et let-7i, ont été trouvés comme surexprimés dans cinq myopathies : FSHD (dystrophie facio-scapulo-humérale), LGMD21, LGMD2B (dystrophies musculaires des ceintures), MM (myopathies mitochondriales), NM (myopathie némaline) (Eisenberg et al., 2007). Une autre étude a montré que le miARN let-7c cible l'utrophine (Basu et al., 2011), une protéine qui peut compenser l'absence de dystrophine dans les modèles animaux. Ce papier suggère que l'inhibition des miARN let-7 pourrait être une stratégie thérapeutique contre la myopathie de Duchenne (DMD). Il est intéressant de remarquer que la dystrophine elle-même contient un site conservé pour les miARN let-7, laissant envisager une possible régulation directe par la famille let-7 (observation sur Targetscan).

Lors de ma thèse, j'ai exploré le rôle du miARN miR-98, du facteur de transcription E2F5, et de la voie let-7 - E2F5 dans la différenciation musculaire. En dépit de l'importance fonctionnelle de la voie let-7 - E2F5 dans la myogénèse terminale, aucune étude n'avait

montré son rôle dans le muscle jusqu'à présent. En conséquence, cette voie n'a jamais été étudiée dans aucune maladie musculaire ou dans des désordres musculaires liés à l'âge. Le rôle de E2F5 ou sa dérégulation dans les maladies musculaires n'a pas été étudié. Il serait très intéressant d'explorer la fonction de E2F5, des miARN let-7 et de la voie let-7 - E2F5 dans ces maladies musculaires. Bien que non lié directement aux maladies musculaires, mon projet aura apporté des connaissances nouvelles sur les mécanismes complexes de la différenciation du muscle. Même s'il est fondamental et ne constitue qu'une petite pierre apportée à l'édifice que représente la différenciation musculaire, le savoir apporté ici pourrait mener à de potentielles applications thérapeutiques dans le futur.

# RESULTATS

## Article 1

Avant mon arrivée dans le laboratoire, mon équipe d'accueil avait commencé le projet de criblage « perte-de-fonction » de miARN à l'échelle du miRNome, dans des myoblastes humains LHCN, afin de caractériser les miARN impliqués dans la différenciation musculaire. Dans ce but, une banque d'antisens LNA a été utilisée et a permis de montrer que parmi 870 miARN, l'inhibition de 63 d'entre eux a un effet sur la différenciation musculaire. Ces travaux ont permis d'initier mon projet de thèse, en démontrant que les miARN let-7g et miR-98, de la famille let-7, retardent la différenciation musculaire.

Au cours de ma thèse, j'ai adapté une technique de purification de cibles de miARN, le TAP-Tar (Tandem affinity purification of miRNA target mRNAs), mise en place dans le laboratoire dans des cellules HeLa (Nonne and Ameyar-Zazoua, 2009), à des myoblastes de souris C2C12. Pour cela nous avons créé une lignée de C2C12 surexprimant une version taguée d'AGO2. J'ai ensuite optimisé la technique pour purifier les cibles d'un miARN pro-myogénique de ce criblage: miR-365. J'ai ainsi pu montrer une interaction directe entre miR-365 et deux nouvelles cibles ARNm dans les myoblastes C2C12: *MAPK1* (mitogen activated kinase 1) et *XPO4* (exportine 4). *MAPK1* (aussi appelé *ERK2*) a été précédemment montré comme répresseur de la différenciation musculaire, et *XPO4* réprime *EIF5A2*, un facteur potentiellement important dans la myogénèse. Ces cibles sont fonctionnellement importantes pour la régulation de la différenciation par miR-365. Ma contribution aura permis de clarifier le mécanisme par lequel le miARN miR-365 accélère la différenciation musculaire.

Ces résultats font partie de travaux publiés dans un article de la revue PlosOne, et dont je suis co-auteur.

# Genome-Wide Exploration of miRNA Function in Mammalian Muscle Cell Differentiation

Anna Polesskaya<sup>1,2,3</sup>, Cindy Degerny<sup>1,2,3</sup>, Guillaume Pinna<sup>1,2</sup>, Yves Maury<sup>3</sup>, Georgui Kratassiouk<sup>1,2</sup>, Vincent Mouly<sup>4</sup>, Nadya Morozova<sup>1,2</sup>, Jeremie Kropp<sup>1,2</sup>, Niels Frandsen<sup>3</sup>, Annick Harel-Bellan<sup>1,2\*</sup>

**1** Department Epigenetics and Cancer FRE 3377, Centre National de la Recherche Scientifique, Commissariat à l'Energie Atomique Saclay, Gif-sur-Yvette, France, **2** Université Paris-Sud, Gif-sur-Yvette, France, **3** Institut des cellules Souches pour le Traitement et l'Etude des Maladies monogéniques, Association Française contre les Myopathies, Evry, France, **4** Thérapie des maladies du muscle strié/Institut de Myologie, UM76– Université Pierre et Marie Curie Paris 6–Paris, France, **5** Exiqon A/S, Vedbaek, Denmark

## Abstract

MiRNAs impact on the control of cell fate by regulating gene expression at the post-transcriptional level. Here, using mammalian muscle differentiation as a model and a phenotypic loss-of-function screen, we explored the function of miRNAs at the genome-wide level. We found that the depletion of a high number of miRNAs (63) impacted on differentiation of human muscle precursors, underscoring the importance of this post-transcriptional mechanism of gene regulation. Interestingly, a comparison with miRNA expression profiles revealed that most of the hit miRNAs did not show any significant variations of expression during differentiation. These constitutively expressed miRNAs might be required for basic and/or essential cell function, or else might be regulated at the post-transcriptional level. MiRNA inhibition yielded a variety of phenotypes, reflecting the widespread miRNA involvement in differentiation. Using a functional screen (the STarS - Suppressor Target Screen – approach, i. e. concomitant knockdown of miRNAs and of candidate target proteins), we discovered miRNA protein targets that are previously uncharacterized controllers of muscle-cell terminal differentiation. Our results provide a strategy for functional annotation of the human miRnome.

**Citation:** Polesskaya A, Degerny C, Pinna G, Maury Y, Kratassiouk G, et al. (2013) Genome-Wide Exploration of miRNA Function in Mammalian Muscle Cell Differentiation. PLoS ONE 8(8): e71927. doi:10.1371/journal.pone.0071927

**Editor:** Carol J. Wilusz, Colorado State University, United States of America

**Received:** November 21, 2012; **Accepted:** July 10, 2013; **Published:** August 21, 2013

**Copyright:** © 2013 Harel-Bellan et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by the European Commission Sixth Framework Programme (Integrated Project SIROCCO contract number LSHG-CT-2006-037900) and by grants from ANR, ARC and AFM. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** Niels Frandsen is an employee of Exiqon, but this does not alter our adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

\* E-mail: annick.harel-bellan@cea.fr

† These authors contributed equally to this work.

## Introduction

The microRNA (miRNA) machinery [1] has an essential function during development [2]. MicroRNAs (miRNAs) [1] are encoded in intergenic or intronic sequences as long precursors that are sequentially processed by the endonucleases Drosha and Dicer into short double-stranded sequences [3]. They regulate gene expression at the post-transcriptional level: in the cytoplasm, they guide the RISC complex, an Argonaute-containing complex of proteins, toward a target messenger RNA. The RISC complex cleaves the target messenger, or else inhibits its translation and/or accelerates its decay [4]. MiRNAs control the balance between cell proliferation, cell differentiation and cell death [3]. However, a limited number of miRNAs, have been studied at the functional level in specific differentiation programs, and genome-wide phenotypic analyses are scarce or absent in mammalian systems. Thus, a few miRNAs, miR-133, miR-1, miR-206, miR-181 and miR-27a, have previously been shown to be important in skeletal muscle cell terminal differentiation [5]. Here, we implemented a genome-wide miRNA loss-of-function screen using LNA-modified synthetic antisense oligonucleotides [6] in LHCN, a human skeletal muscle precursor cell line. The depletion of 63 miRNAs impacted on LHCN differentiation. Moreover, using a phenotypic

screen based on co-suppression of miRNAs and putative targets that we named the STarS assay, we identified important proteins whose role in controlling differentiation had not been previously identified.

## Results

### The Depletion of 63 miRNAs Impacts on Skeletal Muscle Cell Terminal Differentiation

A library of LNA antisense inhibitors targeting 870 miRNAs (listed in miRBase v12) was screened on a differentiating human muscle precursor cell line, LHCN [7], by transfecting individual inhibitors (in duplicate) prior to inducing differentiation. Muscle cell terminal differentiation involves the fusion of myoblastic precursor cells into large multinucleated post-mitotic cells (myotubes) that express muscle-specific markers such as muscle Myosin Heavy Chain (MHC) and Muscle Creatine Kinase (MCK). Differentiation was monitored on an Array Scan VTI automated microscope. Cells were reconstructed and nuclear and cytoplasmic Regions of Interest (ROI) were identified using the vHCS scan software (Figure S1a). The proportion of multinucleated MHC-positive myotubes (i. e., cells that are positive for MHC fluorescence and have at least 3 nuclei) was scored in each

individual sample and control well (raw data in File S1: SI1\_LNA Screen 1 raw data.xls). A plate-well series plot of the results is shown in Figure 1a. Candidate miRNAs with differences to the negative control  $\geq 2$  SDs (corresponding to a proportion of myotubes smaller or equal to 39% of the control) were selected using the Spotfire Decision Software and retested in a secondary screen (in triplicates): we monitored, in addition to the percent of multinucleated myotubes the total numbers of nuclei. Thresholds of 27% and 25.2%, corresponding to deviations of  $\geq 2$  SDs from the negative controls in the secondary screen, were set for inhibition of differentiation or decreased cell number phenotypes respectively. However, this threshold was not applied for increased differentiation or increased cell growth, as the conditions of the experiment were optimized to monitor a decrease but not an increase of these parameters (full confluence, low serum etc.). A proportion of candidates (63%) were confirmed in the secondary screen (Table I), i. e., a total of 63 hits. Among the hits were the miR-133 family members previously characterized as important muscle-specific miRNAs [8], which support the robustness of our screen. Moreover, as an additional quality control test, 18 hits were re-tested using new batches of LNAs: all hits were confirmed, further increasing the confidence in the screen results (Figure S1b). Note, however, that one out of eighteen hits, miR-18b, was not detected by RT-QPCR in our cells and might be a false positive. Finally, whenever monitored, miRNA knockdown was observed, at levels of inhibition ranging from 70 to 99% and with a high degree of specificity (Figure S1c and d).

LNA inhibitors induced various phenotypes (summarized in Table I). Inhibition of differentiation was observed in most instances. In the vast majority of the corresponding hits, inhibition was greater than 50% (Figure 1b). However, in some cases, and despite the fact that the assay was designed to detect inhibition, we instead observed activation of differentiation (Table I). LNAs affected various parameters: the proportion of differentiated cells (myotubes), the size of myotubes or both. Interestingly, some LNAs also impacted on the total cell number, in either a positive or a negative manner. In muscle, as well as in many other tissues, differentiation and proliferation are mutually exclusive, and the balance between the two processes is strictly regulated. Hit miRNAs affecting cell numbers might be expected to be involved in the control of this essential balance, and their function might not be restricted to muscle. Thus a subset of hit miRNAs could affect differentiation in an indirect manner, by impacting on cell proliferation and/or cell survival. In this category, miR-361-3p inhibition dramatically decreased the number of cells, suggesting that this miRNA controls pathways involved in cell survival. MiR-940 inhibition, on the other hand, consistently resulted in a 10% higher number of cells than in the control populations. Given that cells were seeded at full confluence for differentiation, a higher increase could not be expected. We thus believe that this 10% increase might be “biologically” significant, and implies that this miRNA might be required for proper growth control. Finally, we also identified miRNAs that are negative regulators of differentiation, since one or more of the differentiation parameters was enhanced when they were inhibited. Quite unexpectedly, miR-98, a member of the let-7 family previously characterized as pro-differentiation molecules [9], was detected as anti-differentiation in our cell model.

MiR-1 and miR-206 were not detected in our screen, in contrast to previously published results [8]. This might be due either to the high homology and possible redundancy between these two miRNAs or to the experimental model used here. Finally, miR-27a, a miRNA involved in embryonic muscle differentiation [10] was not detected in our screen either, most

likely because it is only involved in very early steps of differentiation, whereas our screen addressed later steps in the differentiation process. Note, in any case, that there is usually a certain rate of “false negative” in global screens.

### Phenotypic Importance does not Strictly Correlate with Differential Expression

MiRNA expression profiles were established for 97% of the miRNAs tested in the functional screen (see File S2: SI2\_Comparison of miRNAs tested in the two screens.xls), using arrayed RT-QPCR (see File S3: SI3\_Expression screen.xls, for the raw data; accession number: GSE45957). A comparison between the list of miRNAs showing differential expression during terminal differentiation and the list of miRNAs having a functional impact showed that the majority of the functionally important miRNAs hits were not scored as being differentially expressed (see Figure 2a). Indeed, even though the number of miRNAs that were up- or downregulated during differentiation was unexpectedly high, a minority of the hits (15 miRNAs, Figure S1e) was found to be both differentially expressed and functionally important for myoblast differentiation. Moreover, the majority of the differentially expressed hits were not dramatically induced or dramatically repressed. This observation was further confirmed for a selection of hits analyzed individually (Figure 2 b, c) that showed little or no modification of expression during differentiation. We have selected, for individual analysis, hit miRNAs linked to strong phenotypes in the original loss-of-function screen and that had various expression profiles during terminal differentiation. This selection of hits included two pro-differentiation miRNAs, miR-1249 and miR-365; one anti-differentiation miRNA, miR-98; and a miRNA required for myoblast survival, miR-361-3p – note that miR-98 and miR-365 have similar expression profiles but have opposite effects on differentiation. We also analyzed a miRNA strongly induced upon differentiation, miR-486-5p (Figure 2d), a pro-differentiation miRNA in our cell model and recently linked to cardiac cell differentiation [11].

### Validation of Selected Hits by Mimics

Gain-of-function assays using mimics were used to further explore the selected miRNAs functionally. A high proportion (5/6 = 80%) of mimics affected differentiation in the expected manner (Figure 3): ectopic expression of miR-486-5p, miR-1249 and miR-361-3p resulted in increased expression of the differentiation marker MCK, whereas inhibition of these miRNAs reduced MCK expression (Figure 3a, b); conversely, ectopic expression of let-7 miRNAs (miR-98 and another member of the family, let-7g) decreased MCK expression, whereas inhibition of these miRNAs increased MCK expression (Figure 3c). Most interestingly, miR-486-5p was able to induce differentiation under proliferation conditions (Figure 3b), implying that ectopic expression of this miRNA overrides the extremely stringent control of proliferation and differentiation operating in myoblast cells. The other mimics tested under proliferation conditions did not induce any phenotypic changes in myoblasts (data not shown). Under differentiation conditions, ectopic miR-1249, miR-361-3p and miR-486-5p all induced precocious differentiation, and inhibition of let-7 miRNAs had the same effect (Figure S2a). Although miR-1249, miR-361-3p and miR-486-5p mimics all impacted on differentiation in a similar manner, detailed analysis of the phenotypes of treated cells showed subtle differences in the morphology of differentiated myotubes (Figure 3d, e, g). Thus, miR-1249 and miR-361-3p mimics increased the fusion index (proportion of nuclei in myotubes) as compared to controls, whereas miR-486-5p mimic increased both the percentage of myotubes and the fusion index

**Table 1.** List of hits.

Hits of functional screen	Relative percentage of myotubes <sup>1</sup> , % of control	p value, Mann Whitney <sup>2</sup>	Relative cell count <sup>3</sup> , % of control	p value, Mann Whitney
<b>Inhibited differentiation</b>				
hsa-mir-100	56.13	***	97.25	*
hsa-mir-106a/hsa-mir-17	69.91	***	93.99	***
hsa-mir-1227	7.12	***	91.11	*
hsa-mir-1233	11.88	***	73.07	***
hsa-mir-125b	21.37	***	80.27	***
hsa-mir-1267	2.37	***	75.12	***
hsa-mir-130b*	27.31	***	86.11	***
hsa-mir-138-1*	57.01	***	80.1	***
hsa-mir-145	23.75	***	83.88	***
hsa-mir-1538	19	***	85.59	***
hsa-mir-18b*	15.44	***	75.64	***
hsa-mir-223	30.88	***	92.11	-
hsa-mir-296-5p	23.75	***	93.31	**
hsa-mir-326	14.25	***	94.34	***
hsa-mir-331-3p	4.75	***	90.22	***
hsa-mir-339-5p	66.39	***	92.79	**
hsa-mir-365	7.13	***	77.53	***
hsa-mir-429	54.63	***	85.25	***
hsa-mir-454	33.25	***	87.31	-
hsa-mir-455-3p	42.76	***	96.4	-
hsa-mir-484	4.83	***	78.73	-
hsa-mir-485-3p	4.75	***	71.49	***
hsa-mir-501-3p	69.25	***	91.25	***
hsa-mir-512-5p	21.37	***	72.89	***
hsa-mir-532-3p	9.5	***	85.93	***
hsa-mir-541	69.87	***	97.77	-
hsa-mir-600	35.63	***	93.48	-
hsa-mir-625*	28.5	***	72.89	***
Hits of functional screen	Relative percentage of myotubes <sup>1</sup> , % of control	p value, Mann Whitney test	Relative cell count <sup>2</sup> , % of control	p value, Mann Whitney test
hsa-mir-636	2.37	***	81.98	***
hsa-mir-663	21.38	***	84.73	***
hsa-mir-664	7.13	***	82.85	***
hsa-mir-766	45.13	***	73.24	***
hsa-mir-770-5p	19	***	75.47	***
hsa-mir-93*	9.5	***	92.1	-
<b>Inhibited differentiation &amp; low cell count</b>			***	
hsa-let-7b*	4.75	***	28.64	***
hsa-mir-1224-3p	2.38	***	51.46	***
hsa-mir-1228	2.38	**	9.43	***
hsa-mir-1249	1.66	***	53.17	***
hsa-mir-125a-5p	19	***	69.8	***
hsa-mir-1260	7.12	***	61.75	***
hsa-mir-1280	11.88	***	68.95	***
hsa-mir-129-3p	9.5	***	65.64	-
hsa-mir-1296	9.5	***	36.36	***
hsa-mir-133a/hsa-mir-133b	42.75	*	0.85	***

**Table 1. Cont.**

Hits of functional screen	Relative percentage of myotubes <sup>1</sup> , % of control	p value, Mann Whitney <sup>2</sup>	Relative cell count <sup>3</sup> , % of control	p value, Mann Whitney
hsa-mir-150	4.75	***	60.37	***
hsa-mir-197	4.75	***	27.79	***
hsa-mir-204	2.85	***	27.44	***
hsa-mir-328	0.1	**	30.87	***
hsa-mir-342-3p	33.25	***	58.83	***
hsa-mir-346	7.13	***	69.13	***
hsa-mir-361-3p	4.51	***	9.6	***
hsa-mir-483-3p	3.56	***	68.61	***
hsa-mir-486-5p	2.85	***	34.48	***
hsa-mir-574-3p	2.61	***	43.22	***
hsa-mir-629*	16.62	***	67.23	***
hsa-mir-885-5p	4.75	***	43.73	***
<b>Inhibited differentiation &amp; high cell count</b>				
hsa-mir-193b	38.04	***	102.74	*
Hits of functional screen	Relative percentage of myotubes <sup>1</sup> , % of control	p value, Mann Whitney test	Relative cell count <sup>2</sup> , % of control	p value, Mann Whitney test
hsa-mir-369-3p	61.75	***	103.6	*
hsa-mir-381	61.75	***	105.31	*
hsa-mir-886-5p	38.04	***	112.86	***
hsa-mir-940	21.37	***	112.35	***
<b>Enhanced differentiation</b>				
hsa-mir-98	104.51	*	87.82	***
<b>High cell count</b>				
hsa-mir-631	92.63	**	103.43	***

<sup>1</sup>see Material and Methods;

<sup>2</sup>\*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.005; – = not significant.

<sup>3</sup>total number of nuclei.

doi:10.1371/journal.pone.0071927.t001

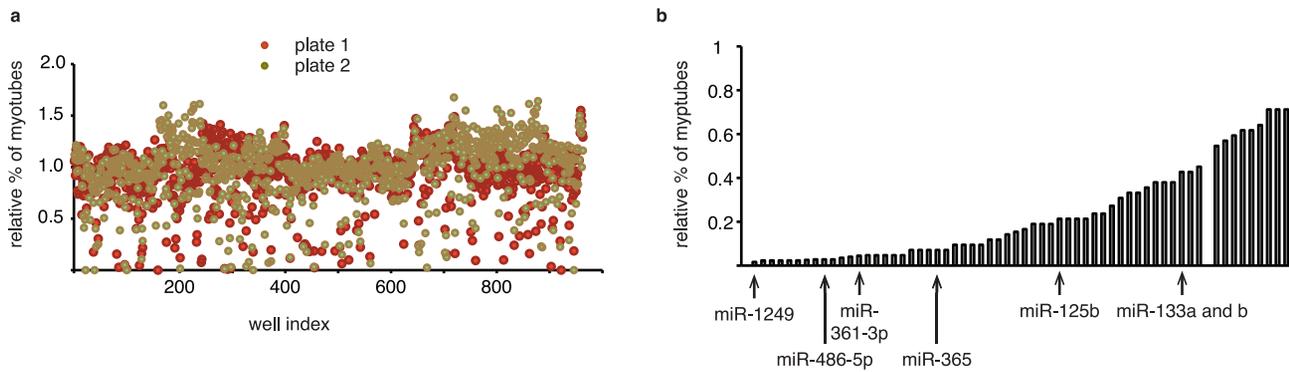
(Figure 3 e, g). Only one mimic out of six, miR-365, had no effect on differentiation (Figure S2b). The reason for this negative result is unclear. Mir-365 appears to be highly expressed in LHCN cells (as judged from RT-QPCR results, Figure S2c) and might thus be in excess in the cells.

### Identification of Essential miRNA Targets Using the STarS Assay

MiRNAs impact on cell biology by downregulating specific gene targets. In order to explore how our selection of hit miRNAs impact on skeletal muscle cell differentiation, we undertook the task of identifying functionally important gene targets. In mammals, unbiased target identification can be performed by Affymetrix mRNA profiling [12] or biochemical pull-downs [13,14]. However, these assays do not document the functional importance of identified targets. In order to directly address this question, we set up an assay similar to a standard genetic suppressor screen, based on the following rationale (Figure 4a): the phenotype observed upon miRNA downregulation by LNA inhibitors is, at least to a significant extent, due to overexpression of functionally important target proteins; consequently, concomitant down-regulation of a miRNA and of important target proteins should result in partial if not complete correction of the phenotype. We previously used this assay to characterize Hox-A11

as an important target of the pro-differentiation miRNA miR-181 in myoblasts [15]. As an additional proof of principle, in the present study, we used the same approach to demonstrate that Lin-28 is a functionally important target of the anti-differentiation miRNA let-7. Let-7 has previously been shown to control the expression of HMGA2 [16], Lin-28 [17] and IMP-1 [18] proteins, and, in keeping with these observations, these proteins were upregulated upon let-7 inhibition in our human myoblast cell line (Figure S3a). Whereas inhibiting let-7 increased differentiation, downregulating Lin-28 at the same time decreased differentiation back to normal levels, as monitored by the expression of the muscle specific marker MCK (Figure S3b) and as judged by the size of myotubes (Figure S3c). These results confirm that Lin-28, an activator of differentiation in muscle cells [17,19], is a functionally important target of let-7. As expected, other let-7 targets (HMGA2 and IMP proteins) were not affected by Lin-28 knockdown (Figure S3b) whereas IGF-2, a target of Lin-28 [19], was downregulated. These results validate this stringent assay, which is thus usable for unbiased screens of miRNA targets, designed to directly identify phenotypically important targets. We named this assay STarS (Suppressor Target Screen).

As a first proof-of-principle, we restricted our screen to targets predicted by 2 algorithms ([www.targetscan.org](http://www.targetscan.org) and [http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07\\_prediction.html](http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_prediction.html)) for four hit



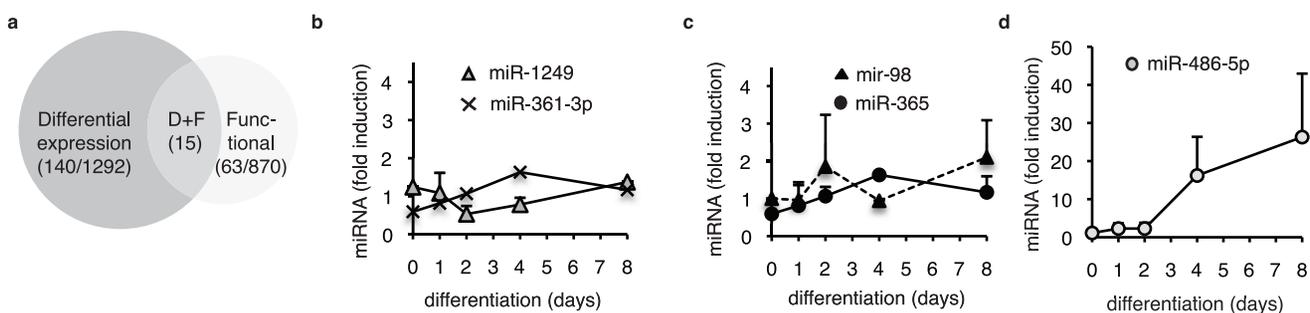
**Figure 1. Screening a genome-wide LNA antisense library.** (a) Plate-well series plot of the screen: library LNAs (100 nM) were transfected into LHCN and differentiation was monitored 7 days later (relative percentage of myotubes standardized on the mock-transfected control) (b) Proportion of myotubes for hits with inhibited differentiation (relative percentage of myotubes standardized on the control); notable hits are marked with an arrow (previously characterized miRNAs, or miRNAs selected for further analysis). doi:10.1371/journal.pone.0071927.g001

miRNAs: miR-486-5p, miR-361, miR-365 and miR-1249 (list of the targets tested in Figure S3d). The experimental setting was similar to that used in the miRNA inhibitor screen, except that cells received, instead of the LNA alone, a mixture of LNA miRNA inhibitors along with siRNAs downregulating miRNA putative targets prior to being placed under differentiation conditions. In a first screen, two siRNAs were tested for each potential target, and hits (for which at least one siRNA induced recovery of the phenotype as monitored by the proportion of myotubes) were screened again with 2 additional siRNAs per gene (see File S4: SI4\_Raw data STarS.xls). Potential targets were considered to be hits when at least 2 siRNAs caused significant levels of phenotypic rescue (Figure 4b for a summary of the results). For example, FOXO1 was identified as a phenotypically important target of miR-486-5p (Figure 4b), in keeping with previous observations in cardiac cells [11], showing the importance of this target in both skeletal and cardiac muscle as well as validating the present screen. The specificity of phenotypic rescue was first confirmed for miR-365, using siRNAs against putative targets of this and other miRNAs, by monitoring differentiation markers using immunofluorescence (Figure 4c) and western blot (Figure S3e). Subsequently, targets identified for any given miRNA were systematically tested upon downregulation of other miRNAs (Figure 4 d). In all cases, downregulating the targets of a given miRNA rescued differentiation upon inhibition of this miRNA, but did not do so when a different miRNA was inhibited: for

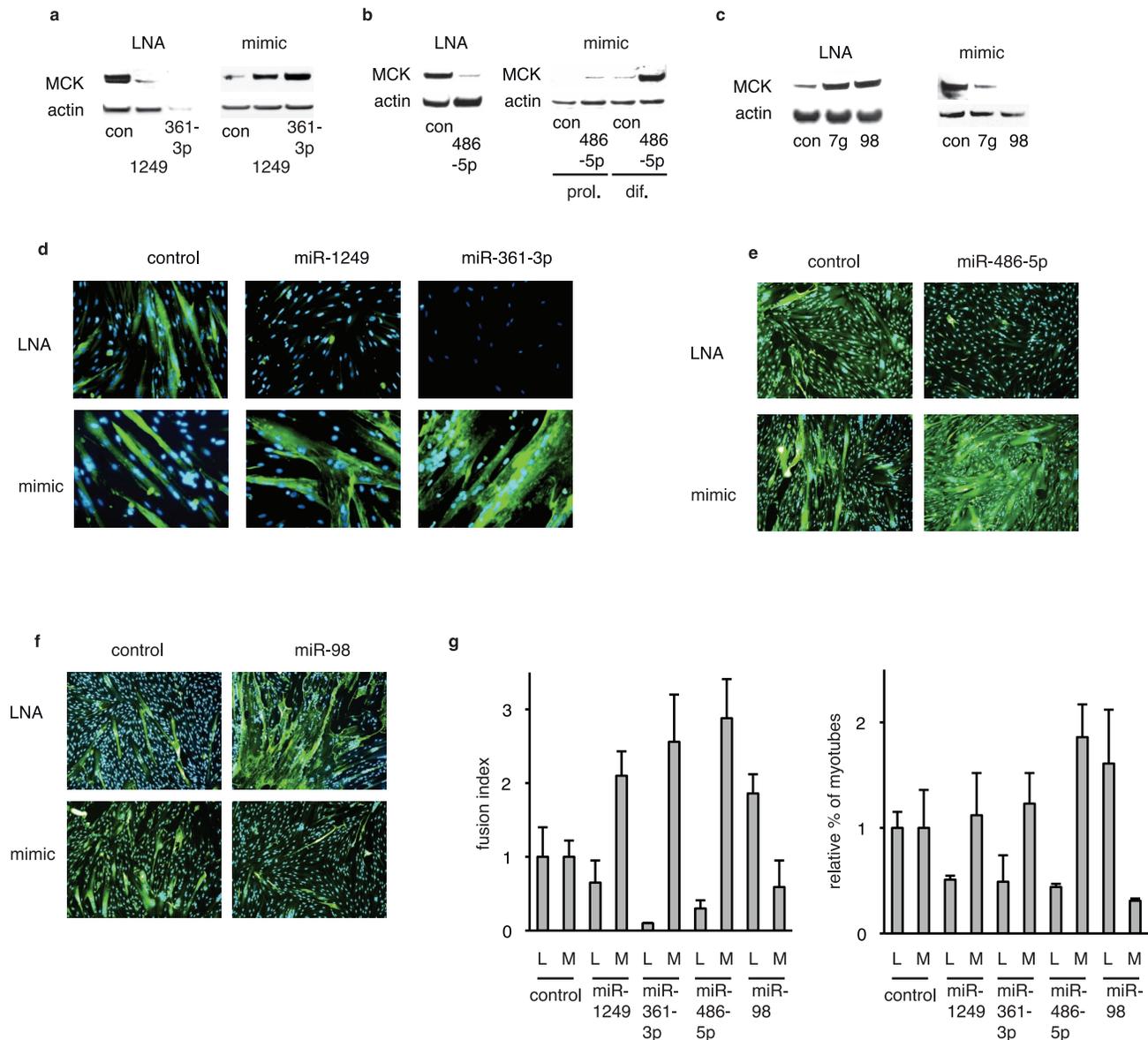
example, downregulating miR-365 targets (PIK3R3, MAPK1, XPO4 and CNOT6L) rescued inhibition by miR-365 LNA but not by miR-1249 or miR-486-5p LNAs. These data demonstrate the specificity of the STarS assay and indicate that the identified targets are indeed in the same pathway as the miRNA inhibited in the assay and under its control, albeit possibly as indirect targets. The STarS assay demonstrates the phenotypic importance of protein targets, but does not demonstrate that they are directly regulated by miRNAs. We addressed this issue for some target proteins, and MAPK. CNOT6L, XPO4 were regulated by miR-365 overexpression or downregulation (Figure 4e), and could be validated as direct targets, either by a TAP-Tar assay [14] in which mRNA targets are biochemically pulled down (Figure 4f) or, when this assay was not sensitive enough, by a standard reporter assay (Figure 4g).

## Discussion

MiRNAs contribute to gene regulation only at the post-transcriptional level, and they are often considered as “fine tuners”. Moreover, miRNAs can function redundantly; and, in many cases, several miRNAs co-regulate the same target gene. Consequently, individual miRNA molecules are often expected to be non-essential molecules. However, our genome-wide functional screen of miRNAs involved in mammalian muscle cell differentiation identified 63 miRNAs that are required for normal



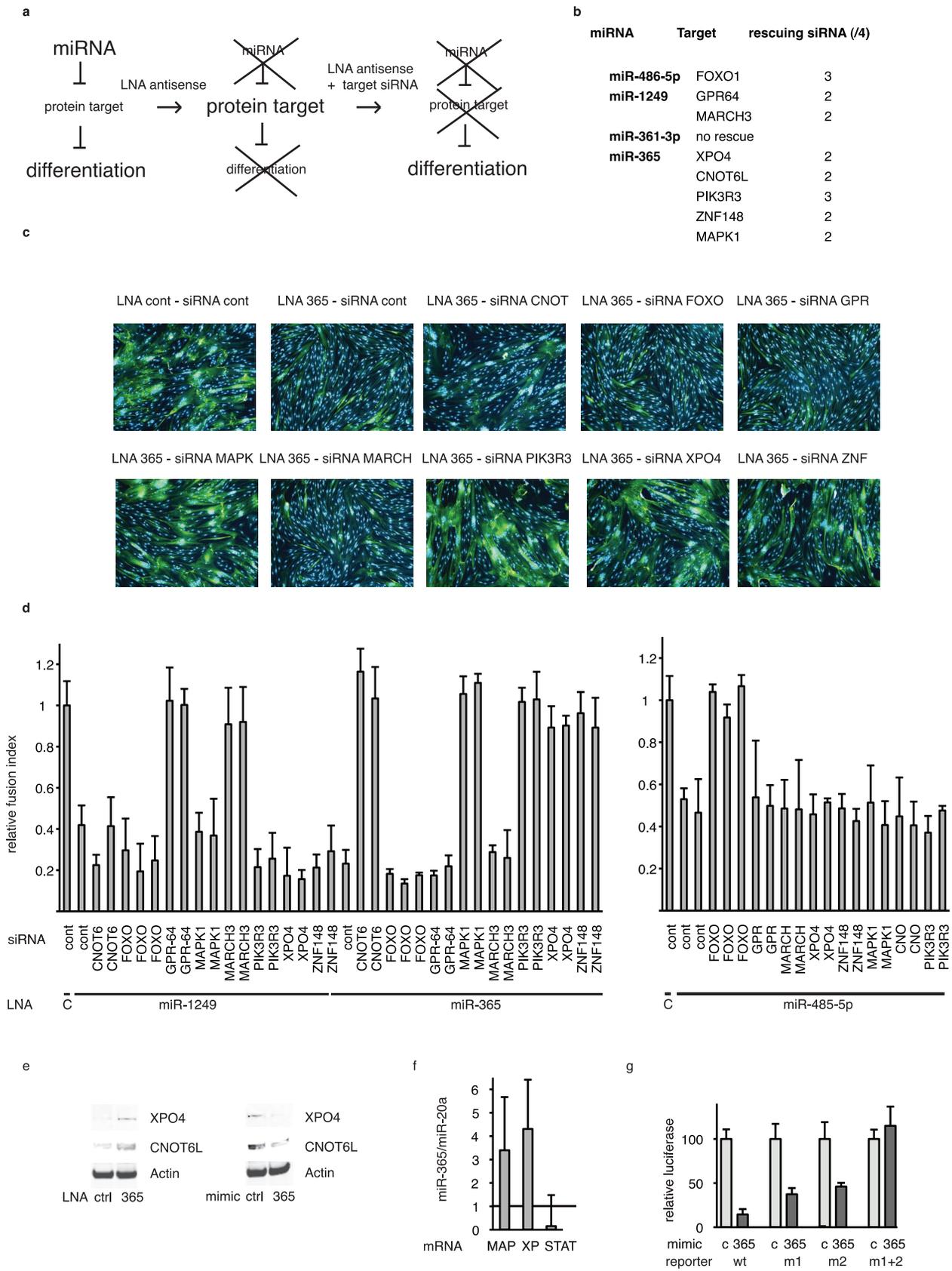
**Figure 2. Lack of correlation between differential expression and functional significance.** (a) Comparison between expression and functional results: distribution of miRNAs with differential expression (ratio between proliferation and differentiation  $\geq 2$ , dark grey), with functional impact (light grey) or with both. (b–d) Time course of expression for miR-361-3p, miR-1249, miR-365, miR-98 and miR-486-5p during terminal differentiation. LHCN cells were placed under differentiation conditions, and RNAs were extracted at indicated times and analyzed by RT-QPCR (mean of biological duplicates); results are shown as fold inductions as compared to proliferating cells. doi:10.1371/journal.pone.0071927.g002



**Figure 3. Validation of selected hits by gain-of-function assays.** LHCN cells were transfected with indicated LNAs (75 nM) or mimics (10 nM for miR-486-5p and 25 nM for all others; con: irrelevant control sequence) and placed under differentiation conditions, except when indicated (prol. = proliferation conditions); extracts were analyzed by western blots (**a–c**) - this experiment was reproduced 3 times - or by immunostaining (**d–f**), green: MHC, blue: Hoechst; (typical experiment that was run in triplicate and reproduced twice) at 7 days of differentiation; (**g**) statistical analysis of the results shown above: images were acquired and analyzed on an Operetta (Perkin Elmer); shown are the relative fusion index (see Material and Methods) and the relative percentage of MHC positive cells, with controls set to 1; L: LNA antisense, M: mimic. doi:10.1371/journal.pone.0071927.g003

differentiation. Note that it is possible that important miRNAs are ignored in our functional screen (miR-1 and miR-206, for example were not detected), in particular due to miRNA redundancy. Indeed, miRNA inhibitors were designed to inhibit individual members of miRNA families, and, for example, miR-181, a miRNA essential for differentiation [15] was below the threshold of detection in this screen, likely due to the high redundancy of the miR-181 family. The high number of hits was quite unexpected as compared to the few miRNAs that were found to be essential in a previously published screen implemented in *C. elegans* [20] (in which, however, only 10% of the genome miRNAs were analyzed). Our result underscores the importance of “fine-tuning” by miRNAs.

Quite unexpectedly, the 63 hits were not systematically differentially expressed during differentiation, and the proportion of miRNAs that were differentially expressed in the hit population was rather low (about 25%). Some of the constitutive miRNAs might be involved in biological essential functions and might impact on differentiation in an indirect manner. But, for some of these miRNAs that are directly involved in differentiation, this result suggests that miRNA activity is modified upon differentiation. MiRNA activity might be regulated through modulation of miRNA targets, for example via the modification of miRNA binding sites in the target 3'UTRs. MiRNA activity might also be regulated by RNA binding proteins that control mRNA translation, such as IGF2BPs or CPEB proteins. In any case, the activity



**Figure 4. StarS, a genetic suppressor assay to identify phenotypically important miRNA targets.** (a) Rationale of the assay. (b) Unbiased identification of phenotypically important targets of miR-486-5p, miR-1249 miR-361-3p and miR-365. MiRNAs were knocked down using LNA inhibitors (50 nM), and targets were knocked down using siRNAs (50 nM); differentiation was monitored by quantifying the fusion index on day 7;

identified targets and number of rescuing siRNAs are listed in (ERK: ERK1, XPO:XPO4, MAPK: MAPK1). (c) Fluorescence images of LHCN cells transfected with miR-365 LNA along with indicated siRNAs, and analyzed at day 7 by immunofluorescence after staining with anti-MHC antibodies (green) and counterstaining with DAPI (blue); cont: control; CNOT: CNOT6L; FOXO: FOXO1; GPR: GPR-64; MAPK: MAPK1; MARCH: MARCH-3; ZNF; ZNF-148. (d) Specificity of the STarS assay. LHCN cells were transfected as above with mixtures of LNAs and siRNAs (2–3 different siRNAs per gene), as indicated, and analyzed 7 days later by quantifying the fusion index; shown are relative values, using cells transfected with control siRNA and control LNA as a reference. (e) CNOT6L and XPO4 proteins are regulated by miR-365. LHCN cells were treated with miR-365 LNA or mimic as indicated, and CNOT6L and XPO4 proteins were detected by western blotting 48 h later. (f) XPO4 and MAPK1 are direct targets of miR-365: analysis by TAP-Tar. C2C12 mouse myoblast cells stably transduced with a vector expressing a tagged version of AGO2 were transfected with biotinylated miR-365, or miR-20a as a control, and extracts were submitted to tandem affinity purification followed by detection of associated mRNAs by RT-QPCR (MAP: MAPK1; XP: XPO4; STAT: STAT3). Values are means of 3 independent biological replicates, with duplicate measurements, of the ratios between values for miR-365 and values for miR-20a. (g) CNOT6L is a direct target of miR-365, analysis by a standard Renilla luciferase reporter assay, using 3.230 kb of CNOT6L 3'UTR, either wild type (wt) or with the predicted binding sites for miR-365 mutated individually (M1 or M2) or in combination (M1+2), transfected into C2C12 cells along with miRNA365 precursor (365) or a control precursor (C); shown are the ratio between the control precursor (set to 100%) and miR-365 precursor, after standardization on Firefly luciferase; results of a typical experiment with triplicate measurements that was reproduced 3 times.

doi:10.1371/journal.pone.0071927.g004

of individual miRNA molecules cannot be directly inferred from their expression profiles, underscoring the importance of functional screens, based on the direct estimation of the influence of miRNA depletion on cell phenotypes, to decipher miRNA function.

The phenotypes observed were diverse reflecting the involvement of miRNAs in multiple steps of the differentiation process. Using the STarS assay, we were able to identify functionally important targets of hit miRNAs. Some of these hit target proteins have been previously characterized as inhibitors of myotube differentiation: the miR-486-5p target FOXO1 [21] and the miR-365 target ERK2 [22]. Others, in contrast, have never been linked to skeletal muscle differentiation. The miR-365 target ZNF148 (ZBP-89) is a zinc finger protein that was shown to regulate multiple promoters in myoblast cells [23]. The miR-365 target PIK3R3 binds the IGF1R receptor and is involved in regulating cell proliferation by the IGF cytokines [24]. CNOT6L is a subunit of the CCR4 complex [25], which controls gene expression at multiple levels, including shortening of mRNA polyA tails in the cytoplasm, and a repressor of p27, a proliferation inhibitor required for differentiation [26]. Exportin-4 (XPO4) is a nuclear export protein that inhibits EIF5A2 [27], a translation regulator that seems to be important for skeletal muscle cell differentiation [28].

Downregulating miRNA targets did not systematically fully reconstitute differentiation. In particular, downregulating the miR-365 target CNOT6L restored cell fusion and MCK expression, but not MHC expression (Figure 4c et S3e). In contrast, downregulating XPO4 (or PIK3R3), which are also targets of miR-365, restored all measured parameters. These data indicate that distinct pathways, leading to MHC expression, cell fusion and/or MCK expression are all under the control of miR-365.

The miR-1249 target GPR64 (He6) is a G-protein-coupled orphan receptor preferentially expressed in epididymis [29], and its connection with skeletal muscle is quite unexpected. However, GPR64 is also a target of the pro-differentiation transcription factor RUNX2 in osteoblasts [30], a differentiation pathway mutually exclusive with myoblastic differentiation for mesodermic precursor cells. Finally, the miR-1249 target MARCH3 is an unexplored membrane RING protein belonging to the E3-Ubiquitin ligase family.

In summary, we describe here a genome-wide screen for miRNA function in skeletal muscle cells. We show that the depletion of an unexpectedly high number of miRNAs (63) impacts on normal progression of terminal differentiation. We undertook the analysis of some of the pathways controlled by 4 hit miRNAs, using an assay that we called the STarS assay, a genetic suppressor screen that directly identifies phenotypically important targets. Our data revealed the unsuspected importance of several

proteins, either not previously linked to muscle differentiation or else of completely unknown function, thus opening up new avenues of research. Thus, our study provides a convenient strategy that can facilitate the functional annotation of the human miRnome.

## Materials and Methods

### Cell Culture and Transfections

LHCN-M2 immortalized human myoblasts [7] were cultured under standard conditions. Briefly, cells were grown in 80% DMEM (Invitrogen 61965), 20%199 (Invitrogen 41150) supplemented with 20% FBS (PAA A 04306-0360, lot 731), penicillin/streptomycin (Invitrogen), plasmocin 2.5 µg/ml final (Invitrogen). For transfection and differentiation assays, cells were seeded on collagen-coated plates (50 mg of rat tail collagen - Sigma C 7661 - in 500 ml of 0.2% acetic acid in ddH<sub>2</sub>O) at  $2 \times 10^4$  cells/well of 96-well plates, or  $5 \times 10^5$  cells/well of 6-well plates. Differentiation was induced by switching to DMEM/antibiotics supplemented with 0.01 mg/ml insulin and 0.1 mg/ml transferrin (Invitrogen). The library of microRNA inhibitors with normalized T<sub>m</sub> (miRCURY LNA microRNA inhibitor library v. 12) was provided by Exiqon (Vedbaek, Denmark). The library contains 918 inhibitors targeting 870 human microRNAs listed in miRBase v. 17.0. The positive control was a miR-181 LNA inhibiting the whole miR-181 family (Exiqon) and the negative controls were a mutant of this oligonucleotide ([15] or mock transfected cells. In addition, an “All Stars Death” siRNA mix (Qiagen) was also run to monitor transfection efficiency. SiRNAs were obtained from Qiagen (Target accession numbers are listed in Figure S3 and sequences are available upon request). A control siRNA was used in all experiments (uagcaaugacgaugcgua). LNAs, mimics or siRNAs were transfected by reverse transfection using LipoRNAiMAX (Invitrogen) in 96-well plates using a pipetting robot (MicroLab Star, Hamilton).

### MicroRNA Profiling

Arrayed RT-QPCR profiling was performed by Exiqon. For individual RT-QPCR, total RNA was isolated with TRI Reagent Solution (Ambion), and assayed using the miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR system (Exiqon), or else with the TaqMan MicroRNA Assay Kit. MiR16, constitutively expressed, was used as an internal standard.

### Image Acquisition and Analysis

Terminal differentiation was monitored using an Array Scan VTI (Cellomics) or an Operetta (Perkin Elmer) High Content Screening system. These automated microscopes allow the systematic acquisition and analysis of epifluorescence images in

96-well plates. We used the colocalization bioapplication of the vHCS scan software (Cellomics), and the Harmony Image analysis software (Perkin Elmer) to analyze images acquired in two channels with a 5× (Cellomics) or a 10× (Perkin Elmer) objective in high-resolution camera mode. Nine (5×) or eleven (10×) pictures were scanned per well (covering approximately 50% of the well surface) in 96-well plates. On both systems, the first channel was used to automatically focus on the cell preparation based on the Hoechst signal (Hoechst Channel) and then to identify and quantify nuclei, while the second was used for myotube identification, based on the MHC labeling (FTIC channel). Applying intensity thresholds, nuclei and cell/myotubes were segmented to define 2 corresponding Regions Of Interest (ROI). Four parameters were analyzed: the percentage of myotubes (i.e. the percentage of cell ROI expressing MHC and with more than 3 nuclei), the fusion index (i. e. the number of nuclei in myotubes containing at least three nuclei above the total number of nuclei), the size of myotubes (i.e. the area of MHC-positive cell ROIs) and the cell count (total number of nuclei). In some cases, parameters were standardized on the Mock transfected control. The percentage of multinucleated myotubes was used to select hits in the primary screen and the residual viability (nuclei count per valid acquisition field) was added as an exclusion parameter in the secondary screen.

### Data Analysis

For the purpose of the primary screen, inhibitor miRNAs were selected as candidates when their activity values were found below 2 standard deviations (SD) from the negative control (corresponding to an approximate confidence interval of 95%). In the secondary screen, the Mann-Whitney test was used as a significance test. The significance threshold was set at 0.05 for the purpose of the selection of hit miRNAs.

### Antibodies

Western blotting and immunofluorescence were performed using standard procedures. Antibodies were: MHC (Sigma My-32), MCK (Santa Cruz sc-15161), Lin-28 (R&D AF3757), HMGA2 (R&D AF3184), IMP-2 (Abnova H00010644-A01), IMP-1 and 3 (kind gift of Pr. F. C. Nielsen), IGF-2 (R&D AF792), nucleolin (Sigma N2662), beta-actin (Sigma A5441), HRP-conjugated secondary antibodies (Sigma), Alexa Fluor-488-conjugated anti-mouse secondary antibody (Invitrogen A11029). Hoechst 33258 was used for staining of nuclei.

### TAP-Tar

C2C12 mouse myoblastic cells stably transduced with a vector expressing a tagged version of AGO2, or with the empty vehicle vector for the control, were transfected with biotinylated miR-365, or miR-20a as a control. Extracts were submitted to tandem affinity purification, first with anti-Flag antibodies (to immunoprecipitate AGO complexes) and then with streptavidin (to purify miR-365 complexes). Target mRNAs were analyzed by RT-QPCR.

### Reporter Assays and Mutagenesis

A pSiCheck reporter vector (Promega) containing 3.230 kb of either CNOT6L 3'UTR wild-type (nt 2710 to 5940) or mutant (the miR-365 seeds, gggcatt, were mutated into gtgcagt using the AccuPrime Pfx site-directed mutagenesis system - Life Technology) was transfected into C2C12 cells (a murine myoblast cell line), along with a control miRNA precursor or miR-365 precursor

(50 nM final concentration). Luciferase was measured 48 days later, in triplicates.

### Supporting Information

**Figure S1** a: Myotube reconstruction using mock transfected cells; mock transfected LHCN cells were differentiated for 7 days and stained with DAPI and anti-MHC antibodies; stained cells were analyzed on the Array Scan VTI microscope and reconstructed; green: MHC, blue: Hoechst. b: Confirmatory screen for 18 selected targets with new batches of LNA. LHCN cells were transfected with indicated LNAs and analyzed after 7 days of differentiation, following staining with DAPI and anti-MHC antibodies. Four parameters were measured as indicated. The background given by the “all death” siRNA was subtracted. c: MiRNA Knockdown. RNAs were extracted from cells treated with indicated LNAs for the indicated period of times, and the target miRNA was quantified by RT-qPCR. Values are relative to control samples, i. e. cells that received a control, scrambled LNA (set to 1), after standardization on miR-16 (a constitutive miRNA) content, and are means of 2–3 independent experiments with duplicate measurements (s.d.) d: MiRNA knockdown is specific. RNAs were extracted from cells treated with miR-98 or let-7g LNA for 2 days, and indicated miRNAs were quantified by RT-qPCR. Values are relative to control samples, i. e. samples that received a control, scrambled LNA (set to 1), after standardization on miR-16 content of the samples, and are means of 3 independent experiments with duplicate measurements (s. d.). Let-7 family LNAs are specific of the let-7 family (there is no significant inhibition of miR-365), and also more efficient on the targeted isoforms, even though each LNA also inhibits the other isoform. e: List of miRNAs that are hits in the phenotypic screen and differentially expressed. (EPS)

**Figure S2** a: early differentiation of cells treated with miR-1249, miR-361-3p, miR-486-5p mimics or let-7 LNA antisenses. LHCN cells were transfected with mimics or LNAs as indicated and analyzed after 4 days of differentiation by western blot (upper panel) or following staining with DAPI and anti-MHC antibodies (lower panels). At day 4, control cells do not show any sign of differentiation, whereas treated cells express MHC and form myotubes; con = control. b: MiR-365 mimic does not impact on differentiation. LHCN cells were transfected with mimics or LNAs as indicated and analyzed after 7 days of differentiation by western blot (upper panel) or following staining with DAPI and anti-MHC antibodies (lower panel). ctrl: control; 365: miR-365. c: RT-Q-PCR analysis of miRNA expression in LHCN at day 0 of differentiation; shown are the Cts; miR-16 was used as a reference. (EPS)

**Figure S3** a: Upregulation of Let-7 protein targets. LHCN cells were transfected with let-7g or miR-98 LNA antisenses as indicated, and expression of the indicated proteins was monitored by western blot at indicated times. Nucleolin is an example of unmodified protein. b: Lin-28 is a target of Let-7. LHCN cells were transfected with miR-98 or control LNA antisenses at indicated doses, along with control or Lin28 siRNAs at indicated doses. Differentiation was monitored by western blot analysis of the muscle marker MCK; downregulating Lin-28 restored normal levels of MCK, as well as of IGF-2, but did not affect other Let-7 targets (HMGA-2; IMP-2). c: Lin-28 siRNA restores normal differentiation increased by let-7 LNAs. LHCN cells were transfected with indicated LNAs and siRNAs, and analyzed at

day 7 by immunofluorescence after staining with anti-MHC antibodies and counterstaining with DAPI (upper panel); the fusion index was quantified (lower panel); ctrl: control. d: List of targets tested using the STarS assay in Figure 4d. e: Monitoring differentiation by MCK expression in the experiment described in Figure 4c. LHCN cells were transfected with miR-365 LNA along with indicated siRNAs (2 siRNAs per gene), and extracts were analyzed at day 7 by western blot with indicated antibodies; cont: control; CNO: CNOT6L; PI3: PIK3R3 MAP: MAPK1; XPO: XPO4. (EPS)

**File S1 LNA screen raw data.**  
(XLS)

**File S2 Lists of miRNAs tested in the LNA antisense screen and in the expression screen.**  
(XLS)

## References

- Ambros V (2001) microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell* 107: 823–826.
- Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, et al. (2003) Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet* 35: 215–217.
- Liu X, Fortin K, Mourelatos Z (2008) MicroRNAs: biogenesis and molecular functions. *Brain Pathol* 18: 113–121.
- Chen PY, Meister G (2005) microRNA-guided posttranscriptional gene regulation. *Biol Chem* 386: 1205–1218.
- Crist CG, Buckingham M (2009) microRNAs gain magnitude in muscle. *Cell Cycle* 8: 3627–3628.
- Naguibneva I, Ameyar-Zazoua M, Nonne N, Poleskaya A, Ait-Si-Ali S, et al. (2006) An LNA-based loss-of-function assay for micro-RNAs. *Biomed Pharmacother* 60: 633–638.
- Zhu CH, Mouly V, Cooper RN, Mamchaoui K, Bigot A, et al. (2007) Cellular senescence in human myoblasts is overcome by human telomerase reverse transcriptase and cyclin-dependent kinase 4: consequences in aging muscle and therapeutic strategies for muscular dystrophies. *Aging Cell* 6: 515–523.
- Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, et al. (2006) The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet* 38: 228–233.
- Roush S, Slack FJ (2008) The let-7 family of microRNAs. *Trends Cell Biol* 18: 505–516.
- Crist CG, Montarras D, Pallafacchina G, Rocancourt D, Cumano A, et al. (2009) Muscle stem cell behavior is modified by microRNA-27 regulation of Pax3 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 13383–13387.
- Small EM, O'Rourke JR, Moresi V, Sutherland LB, McAnally J, et al. (2010) Regulation of PI3-kinase/Akt signaling by muscle-enriched microRNA-486. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 4218–4223.
- Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP (2010) Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466: 835–840.
- Orom UA, Lund AH (2007) Isolation of microRNA targets using biotinylated synthetic microRNAs. *Methods* 43: 162–165.
- Nonne N, Ameyar-Zazoua M, Souidi M, Harel-Bellan A (2009) Tandem affinity purification of miRNA target mRNAs (TAP-Tar). *Nucleic Acids Res* 37: e20.
- Naguibneva I, Ameyar-Zazoua M, Poleskaya A, Ait-Si-Ali S, Groisman R, et al. (2006) The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation. *Nat Cell Biol* 8: 278–284.
- Yu F, Yao H, Zhu P, Zhang X, Pan Q, et al. (2007) let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell* 131: 1109–1123.
- Moss EG, Tang L (2003) Conservation of the heterochronic regulator Lin-28, its developmental expression and microRNA complementary sites. *Dev Biol* 258: 432–442.
- Boyerinas B, Park SM, Shomron N, Hedegaard MM, Vinther J, et al. (2008) Identification of let-7-regulated oncofetal genes. *Cancer Res* 68: 2587–2591.
- Poleskaya A, Cuvellier S, Naguibneva I, Duquet A, Moss EG, et al. (2007) Lin-28 binds IGF-2 mRNA and participates in skeletal myogenesis by increasing translation efficiency. *Genes Dev* 21: 1125–1138.
- Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Abbott AL, Lau NC, Hellman AB, et al. (2007) Most Caenorhabditis elegans microRNAs are individually not essential for development or viability. *PLoS Genet* 3: e215.
- Kitamura T, Kitamura YI, Funahashi Y, Shawber CJ, Castrillon DH, et al. (2007) A Foxo/Notch pathway controls myogenic differentiation and fiber type specification. *J Clin Invest* 117: 2477–2485.
- Bennett AM, Tonks NK (1997) Regulation of distinct stages of skeletal muscle differentiation by mitogen-activated protein kinases. *Science* 278: 1288–1291.
- Gallanti A, Prella A, Moggio M, Ciscato P, Checcarelli N, et al. (1992) Desmin and vimentin as markers of regeneration in muscle diseases. *Acta Neuropathol* 85: 88–92.
- Dey BR, Furlanetto RW, Nissley SP (1998) Cloning of human p55 gamma, a regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase, by a yeast two-hybrid library screen with the insulin-like growth factor-I receptor. *Gene* 209: 175–183.
- Denis CL, Chen J (2003) The CCR4-NOT complex plays diverse roles in mRNA metabolism. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 73: 221–250.
- Morita M, Suzuki T, Nakamura T, Yokoyama K, Miyasaka T, et al. (2007) Depletion of mammalian CCR4b deadenylase triggers elevation of the p27Kip1 mRNA level and impairs cell growth. *Mol Cell Biol* 27: 4980–4990.
- Zender L, Xue W, Zuber J, Semighini CP, Krasnitz A, et al. (2008) An oncogenomics-based in vivo RNAi screen identifies tumor suppressors in liver cancer. *Cell* 135: 852–864.
- Parreiras-e-Silva LT, Luchessi AD, Reis RI, Oliver C, Jamur MC, et al. (2010) Evidences of a role for eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) in mouse embryogenesis and cell differentiation. *J Cell Physiol* 225: 500–505.
- Davies B, Baumann C, Kirchhoff C, Ivell R, Nubbemeyer R, et al. (2004) Targeted deletion of the epididymal receptor HE6 results in fluid dysregulation and male infertility. *Mol Cell Biol* 24: 8642–8648.
- Tepluk NM, Galindo M, Tepluk VI, Pratap J, Young DW, et al. (2008) Runx2 regulates G protein-coupled signaling pathways to control growth of osteoblast progenitors. *J Biol Chem* 283: 27585–27597.

**File S3 Raw data of expression screen.**  
(XLS)

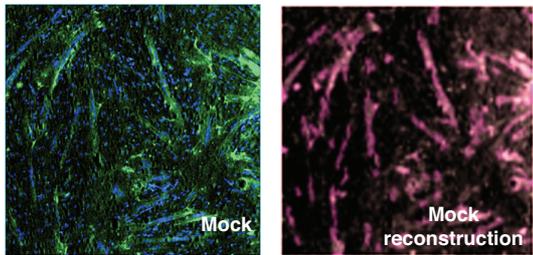
**File S4 Raw data of the STarS assay.**  
(XLS)

## Acknowledgments

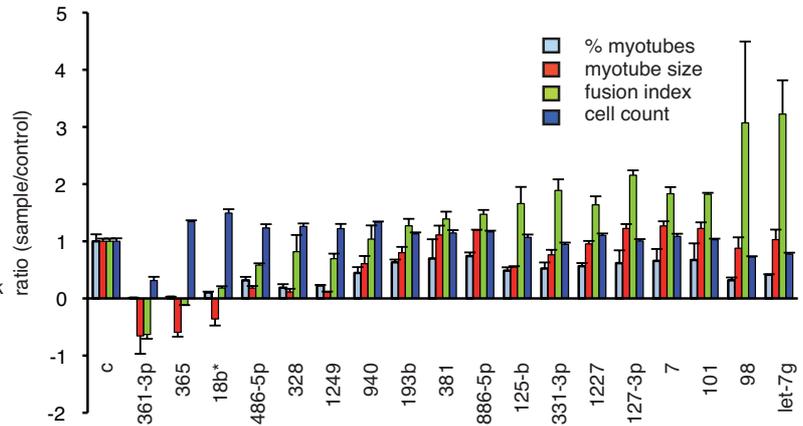
The authors thank Linda L. Pritchard for helpful comments and critical reading of the manuscript and Marc Peschanski (ISTEM, Evry, France) and Vladimir Lazar (Institut Gustave Roussy, Villejuif France) for help with imaging and arrayed RT-Q-PCR, respectively.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AHB AP. Performed the experiments: AP CD GP GK JK. Analyzed the data: YM NM. Contributed reagents/materials/analysis tools: NF VM. Wrote the paper: AHB AP CD GP.



Supplementary Figure S1 a :Myotube reconstruction using mock transfected cells; mock transfected LHCN cells were differentiated for 7 days and stained with DAPI and anti-MHC antibodies; stained cells were analyzed on the Array Scan VT1 microscope and reconstructed; green: MHC, blue: Hoechst.



Supplementary Figure S1 b: Confirmatory screen for 18 selected targets with new batches of LNA. LHCN cells were transfected with indicated LNAs and analyzed after 7 days of differentiation, following staining with DAPI and anti-MHC antibodies. Four parameters were measured as indicated. The background given by the "all death" siRNA was subtracted.

Treatment with LNA (days)		7
miR-486-5p		0.29 (0.17)
miR-365	0.01 (0.001)	
miR-1249	0.008	
Let-7g	0.05 (0.015)	
miR-98	0.064 (0.02)	

Supplementary Figure S1c: MiRNA Knockdown. RNAs were extracted from cells treated with indicated LNAs for the indicated period of times, and the target miRNA was quantified by RT-qPCR. Values are relative to control samples, i. e. cells that received a control, scrambled LNA (set to 1), after standardization on miR-16 (a constitutive miRNA) content, and are means of 2-3 independent experiments with duplicate measurements (s.d.)

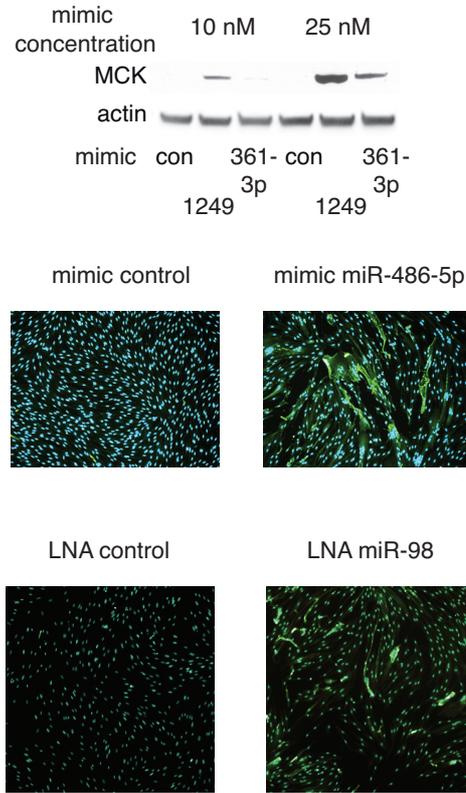
miRNA	let7-g	miR-98	miR-365
LNA miR-98	0.49 (0.17)	0.064 (0.02)	1.08 (0.23)
LNA let-7g	0.05 (0.015)	0.27 (0.05)	1.04 (0.2)

Supplementary Figure S1d: MiRNA knockdown is specific. RNAs were extracted from cells treated with miR-98 or let-7g LNA for 2 days, and indicated miRNAs were quantified by RT-qPCR. Values are relative to control samples, i. e. samples that received a control, scrambled LNA (set to 1), after standardization on miR-16 content of the samples, and are means of 3 independent experiments with duplicate measurements (s. d.). Each LNA is highly specific of the let-7 family (there is no significant inhibition of miR-365), and also more efficient on the targeted isoform, even though each also inhibits the other isoform.

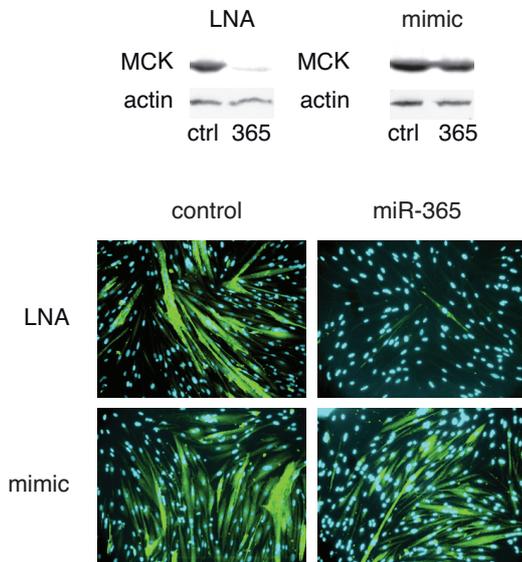
Hit miRNAs (in the functional screen) that are differentially expressed <sup>a</sup>
hsa-miR-125a-5p
hsa-miR-133a
hsa-miR-133b
hsa-miR-193b
hsa-miR-328
hsa-miR-331-3p
hsa-miR-342-3p
hsa-miR-361-3p
hsa-miR-365
hsa-miR-381
hsa-miR-485-3p
hsa-miR-486-5p
hsa-miR-501-3p
hsa-miR-532-3p
hsa-miR-664

<sup>a</sup>: see "expression raw data.xlsx" in supplementary information.

Supplementary Figure S1e: List of miRNAs that are hits in the phenotypic screen and differentially expressed.



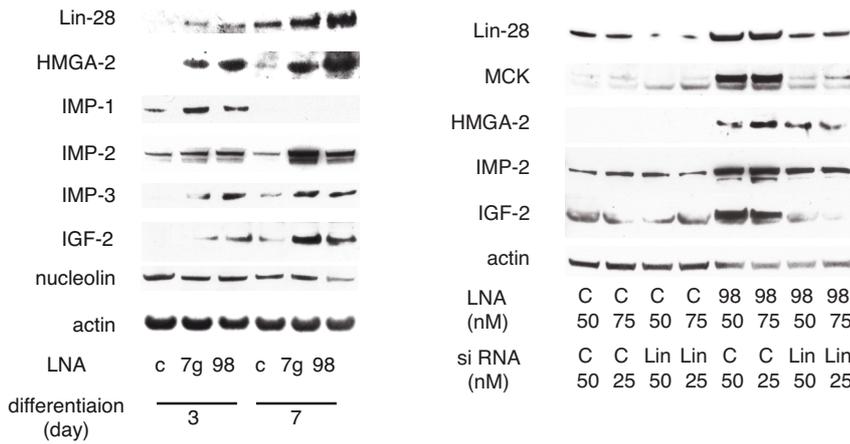
Supplementary Figure S2a: early differentiation of cells treated with miR-1249, miR-361-3p, miR-486-5p mimics or let-7 LNA antisenses. LHCN cells were transfected with mimics or LNAs as indicated and analyzed after 4 days of differentiation by western blot (upper panel) or following staining with DAPI and anti-MHC antibodies (lower panels). At day 4, control cells do not show any sign of differentiation, whereas treated cells express MHC and form myotubes; con= control.



Supplementary Figure S2b: MiR-365 mimic does not impact on differentiation LHCN cells were transfected with mimics or LNAs as indicated and analyzed after 7 days of differentiation by western blot (upper panel) or following staining with DAPI and anti-MHC antibodies (lower panel). ctrl: control; 365: miR-365

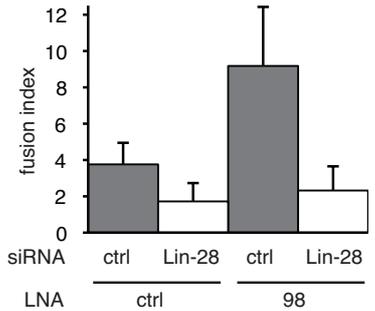
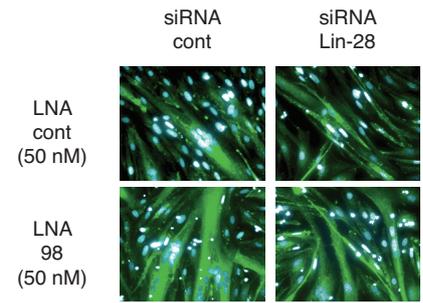
	Ct
miR365	23
miR486	31
let7g	24
miR1249	29
miR361	31
miR16	21

Supplementary Figure S2c: RT-Q-PCR analysis of miRNA expression in LHCN at day 0 of differentiation; shown are the Cts; miR-16 was used as a reference.



Supplementary Figure S3a: Upregulation of Let-7 protein targets. LHCN cells were transfected with let-7g or miR-98 LNA antisenses as indicated, and expression of the indicated proteins was monitored by western blot at indicated times. Nucleolin is an example of unmodified protein.

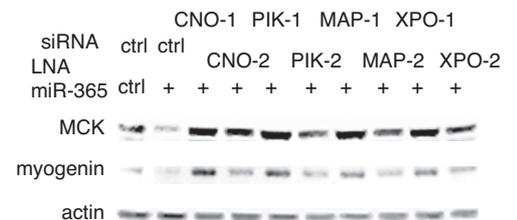
Supplementary Figure S3b: Lin-28 is a target of Let-7. LHCN cells were transfected with miR-98 or control LNA antisenses at indicated doses, along with control or Lin-28 siRNAs at indicated doses. Differentiation was monitored by western blot analysis of the muscle marker MCK. Downregulating Lin-28 restored normal levels of MCK expression, as well as of IGF-2, but did not affect other Let-7 targets (HMGA-2; IMP-2).



Supplementary Figure S3c: Lin-28 siRNA restores normal differentiation increased by let-7 LNAs. LHCN cells were transfected with indicated LNAs and siRNAs, and analyzed at day 7 by immunofluorescence after staining with anti-MHC antibodies and counterstaining with DAPI (upper panel); the fusion index was quantified (lower panel); ctrl: control.

Supplementary Figure S3d: List of targets tested using the STarS assay in Figure 4d.

miR-1249 Gene	REfSeq	miR-486-5p Gene	REfSeq	miR-365 Gene	REfSeq	miR-361-3p Gene	REfSeq
EPHB2	NM_004442 NM_017449	RBM12	NM_006047 NM_152838	HOXA9	NM_152739	PRDX6	NM_004905
GRB14	NM_004490	NR2C2	NM_003298	NR3C2	NM_000901	PTPLA	NM_014241
GPR64	NM_001079 858	SP5	NM_001003 845	RAB22A	NM_020673	CAPN1 0	NM_021251
MARCH3	NM_178450	COL6A6	NM_001102 608	XPO4	NM_022459	IGHMB P2	NM_002180
FZR1	NM_016263	ST6GALN AC6	NM_013443	EFNA3	NM_004952	EMP1	NM_001423
RGS6	NM_004296	H3F3B	NM_005324	SLC30A7	NM_133496	TNNI1	NM_003281
TOP1	NM_003286	RAB11FIP 4	NM_032932	NFIB	NM_005596	NFE2L3	NM_004289
MTMR3	NM_021090	SLC12A5	NM_020708	DCP2	NM_152624	IVD	NM_002225
MAFB	NM_005461	SMARCD2	NM_001098 426	ACVR1	NM_001105	TMBIM 1	NM_022152
MSI1	NM_002442	EPHA3	NM_005233	ZNF148	NM_021964	YAP1	NM_006106
HNRPK	NM_002140	STK4	NM_006282	NUFIP2	NM_020772	CEBPA	NM_004364
THRA	NM_199334	OLFM4	NM_006418	E2F2	NM_004091	NFAT5	NM_006599
FGFBP3	NM_152429	PLAGL2	NM_002657	RICTOR	NM_152756	SLC5A 3	NM_006933
ATG9A	NM_001077 198	MKL1	NM_020831	USP33	NM_015017	FBXL19	NM_001099 784
LOC401 498	NM_212558	SMAD2	NM_001003 652	ZNF644	NM_01662	PRRT2	NM_145239
VWA1	NM_022834	CIT	NM_007174	USP48	NM_032236	WDR5	NM_017588 NM_001079 675
LY6H	NM_002347	SHB	NM_003028	ARRDC3	NM_020801	ETV4	
TMEM10 5	NM_178520	ID4	NM_001546	RAPGEF4	NM_001100 397	NDST1	NM_001543
TMEM44	NM_001011 655	ZNF37A	NM_001007 094	CNOT6L	NM_144571	KIF13B	NM_015254
SUV39H 2	NM_024670	PIM1	NM_002648	VMD2L3	NM_032735	TBX3	NM_005996
ADAM12	NM_021641	CTDSPL2	NM_016396	ARHGAP1 2	NM_018287	SYNJ2	NM_003898
FGFR1	NM_015850	NFE2L1	NM_003204	EP400	NM_015409	MED1	NM_004774
PITX1	NM_002653	DCBLD2	NM_080927	DNAJB2	NM_006736		
PRRG2	NM_000951	NFAT5	NM_006599	MAPK1	NM_002745		
SGK2	NM_016276	MARK1	NM_018650	PIK3R3	NM_003629		
		PAX7	NM_013945				



Supplementary Figure S3e: Monitoring differentiation by MCK expression in the experiment described in Figure 4c. LHCN cells were transfected with miR-365 LNA along with indicated siRNAs (2 siRNAs per gene), and extracts were analyzed at day 7 by western blot with indicated antibodies; ctrl: control; CNO: CNOT6L; PI3: PIK3R3; MAP: MAPK1; XPO: XPO4.

## Article 2 (Article de recherche principal)

Mon équipe a précédemment montré que l'inhibition de miR-98 et let-7g, deux miARN de la famille let-7, entraîne une forte accélération de la différenciation musculaire avec hypertrophie des myotubes dans des myoblastes humains LHCN. Lors de ma thèse, j'ai cherché à comprendre comment les miARN let-7 retardent la différenciation musculaire. Dans ce but, j'ai d'abord entrepris de caractériser leurs cibles. Des analyses transcriptomiques sur puces d'expression (Affymetrix) de myoblastes humains dans lesquels miR-98 a été inhibé ont donc été réalisées, et ont montré qu'environ 240 gènes étaient significativement surexprimés lorsque l'expression de miR-98 est diminuée. Parmi ces cibles potentielles de miR-98, j'ai identifié le répresseur transcriptionnel E2F5, et montré qu'il est directement ciblé par miR-98. L'inhibition conjointe de E2F5 et de miR-98 était capable de restaurer presque complètement le phénotype de différenciation normale, indiquant que E2F5 est impliqué dans la régulation de la différenciation musculaire par miR-98. E2F5 est un facteur pro-différenciation dans les myoblastes, sa surexpression entraîne une accélération de la différenciation. J'ai ensuite montré que E2F5 peut fixer les promoteurs et réprimer l'expression de *HMOX1* et de *ID1*, des répresseurs connus de la différenciation musculaire. E2F5 réprime également des facteurs de la voie TGF- $\beta$ , de manière indirecte. Au final, miR-98 régule la différenciation musculaire en agissant sur l'expression de E2F5 et de ses multiples cibles.

Ces résultats ont fait l'objet d'un article publié dans la revue *Biochemical Journal*, dont je suis le premier auteur:

**Kropp, J., Degerny, C., Morozova, N., Pontis, J., Harel-Bellan, A., and Poleskaya, A. (2015). miR-98 delays skeletal muscle differentiation by down-regulating E2F5. *Biochem. J.* 466, 85–93. © Biochemical Society**

L'article sous sa forme finale est accessible sous ce lien :  
<http://www.biochemj.org.gate1.inist.fr/bj/466/0085/bj4660085.htm>

## MiR-98 delays skeletal muscle differentiation by downregulating E2F5

Jeremie Kropp<sup>\*, †, ‡</sup>, Cindy Degerny<sup>\*, †, ‡</sup>, Nadezda Morozova<sup>\*, †, ‡</sup>, Julien Pontis<sup>§</sup>, Annick Harel-Bellan<sup>\*, †, ‡, ¶</sup>, Anna Polesskaya<sup>\*, †, ‡, ¶ ||</sup>

\* CNRS FRE 3377, CEA Saclay, F-91191 Gif-sur-Yvette, France

† Univ Paris-Sud, FRE 3377, F-91191 Gif-sur-Yvette, France

‡ CEA Saclay, iBiTec-S/ SBIGeM, F-91191 Gif-sur-Yvette, France

§ Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Laboratoire Epigénétique et Destin Cellulaire, UMR7216, Centre National de la Recherche Scientifique CNRS, 35 rue Hélène Brion, 75013 Paris, France

|| Corresponding author, e-mail: [anna.polesskaya@cea.fr](mailto:anna.polesskaya@cea.fr)

¶ Equal contribution

**Word count:** 5 776

**Running title:** *MiR-98 downregulates skeletal myogenesis via E2F5*

**Keywords:** let-7, miR-98, skeletal muscle differentiation, E2F5.

**Abbreviations:** KD, knock down; IF, immunofluorescence; WB, western blot; LNA, locked nucleic acid; MRFs, myogenic regulatory factors; myomiRs, myogenic miRNAs; StarS assay, Suppressed Target Screen; MHC, myosin heavy chain; MCK, muscle creatin kinase; CycloA, cyclophilin A; HMOX1, heme oxygenase 1; MSTN, myostatin; ID1, inhibitor of DNA binding 1.

**Summary statement:** MiR-98, a miRNA of the let-7 family, downregulates skeletal muscle differentiation. MiR-98 directly suppresses the transcriptional repressor E2F5, impacting on the expression of novel E2F5 targets ID1 and HMOX1. This study identifies a novel network of regulatory factors in myogenesis.

### Abstract

A genome-wide screen had previously shown that knocking down miR-98 and let-7g, two miRNAs of the let-7 family, leads to a dramatic increase of terminal myogenic differentiation. Here we report that a transcriptomic analysis of human myoblasts, where miR-98 was knocked down, revealed approximately 240 genes which were sensitive to miR-98 depletion. Among these potential targets of miR-98, we identified the transcriptional repressor E2F5, and showed that it is a direct target of miR-98. Knocking down simultaneously E2F5 and miR-98 almost fully restored normal differentiation, indicating that E2F5 is involved in the regulation of skeletal muscle differentiation. We subsequently show that E2F5 can bind to the promoters of two inhibitors of terminal muscle differentiation, ID1 and HMOX1, which decreases their expression in skeletal myoblasts. We conclude that miR-98 regulates muscle differentiation by altering the expression of the transcription factor E2F5 and, in turn, of multiple E2F5 targets.

## Introduction

Skeletal muscle differentiation is a complex process regulated at multiple levels. While the transcriptional control of gene expression during determination and differentiation has been very well studied, the knowledge of the impact of post-transcriptional regulation in these processes is less advanced. However, multiple studies have identified microRNAs (miRNAs) as important factors in translational regulation of gene expression in skeletal muscle, characterizing a large number of myogenic miRNAs (myomiRs), as well as some of their mRNA targets (reviewed in [1]). In our previous work, we have shown that as many as 63 miRNAs have an impact on terminal differentiation of human skeletal myoblasts [2]. Whereas the majority of these miRNAs are positive regulators of differentiation, a small group was shown to suppress this process. The most striking example of such differentiation-suppressor miRNA was the let-7 family, and more specifically, miR-98 and let-7g.

The let-7 family is one of the most widely and abundantly expressed, the best-conserved and functionally important miRNA families known to date (reviewed in [3, 4]). In human, this family consists of 13 highly similar miRNAs (let-7a to i, miR-98 and miR-202) that share the same seed sequence, and in most cases were shown to target the same mRNAs and to have redundant functions (reviewed in [3]). In most instances, let-7 miRNAs had a positive effect on differentiation [5-7]. However, in skeletal muscle cells, miR-98 (and let-7g) appeared to downregulate the differentiation. In order to address how let-7 could have this unusual behavior, we used two different strategies to identify let-7 gene targets in these cells. First, transcriptomic analyses led to the identification of a number of putative target genes with modified expression in miR-98 loss-of-function or gain-of-function assays. Second, a co-suppression assay, in which both the miRNA and the putative target genes were concomitantly knocked down (KD), demonstrated that the transcriptional repressor E2F5 is largely responsible for the hypertrophic phenotype of human and mouse myoblasts following miR-98 KD. We show that E2F5 is a direct target of miR-98. Our further analyses identified several novel direct targets of E2F5 that are known down-regulators of muscle differentiation, such as ID1 (inhibitor of DNA binding 1). In conclusion, we have deciphered an anti-differentiation network controlled by miR-98 in skeletal muscle cells.

## Materials and methods

### *Cell Culture*

All cell lines were grown at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. C2C12 mouse myoblast and HeLa uterine cervical carcinoma cell lines were purchased from ATCC and cultured as indicated on the ATCC website. LHCN-M2 immortalized human myoblasts [8] were cultured under standard conditions. Differentiation was induced by switching to DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)/antibiotics supplemented with 0.01 mg/ml insulin and 0.1 mg/ml transferrin (Invitrogen).

### *RNA interference*

Transient transfection of siRNA was performed using Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. The efficiency of the siRNA-mediated knockdown of gene expression was evaluated by quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) and/or western blotting (WB). The siRNA referred as E2F5\_1 was purchased from Qiagen (Hs\_E2F5\_2 siRNA, catalog number SI00030443). The siRNA referred as control 1 was

designed in Guido Kroemer laboratory. The siRNAs referred as control 2, E2F5\_2 and E2F5\_3 were purchased from Dharmacon (ON-TARGETplus siRNAs D-001810-01, J-003263-10 and J-003263-12 respectively).

SiRNA target sequences were: control 1: AAGCCGGTATGCCGGTTAAGT, E2F5\_1: AUCAAUCUAAAGAGUCAUUCA, E2F5\_2: GGUGCUGGCUGUAAUACUA, E2F5\_3: GAGGUACCCAUCCAGAAA.

#### *Plasmid transfection*

Transient transfection of plasmids was performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. Efficiency of transfection was evaluated by immunofluorescence (IF) and/or WB. Expression vector for E2F5 (MGC Mouse E2F5 cDNA) was purchased from Thermo Fisher Scientific.

#### *Immunofluorescence*

IF was performed as previously described [9]. Image acquisitions were carried out on a Zeiss LSM510 Meta confocal microscope with a Plan Neofluar 100x, NA=1.3 oil immersion objective. Pinhole apertures were set to one Airy unit for each wavelength.

#### *Quantitative real-time RT-PCR*

For qRT-PCR, RNA was extracted using Trizol reagent (Life technologies) according to the manufacturer's instructions. RT was performed using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Quantitative real-time RT-PCR was then performed using Power SYBR-Green Master Mix (Applied Biosystems) on an Applied 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems). Primers used for RT-qPCR were as follows: human/mouse cyclophilin A, forward, GTCAACCCACCGTGTCTT, and reverse, CTGCTGTCTTTGGGACCTTGT; human E2F5, forward, CCAGAAATGGGTCAGAATGGA, and reverse, CCATGCTGGATTTCTGTGGA; mouse E2F5, forward, CACCAATGTCTTAGAGGGAATTGA, and reverse, TGCTTTGCTGTAGCCACAACCTT; human HMOX1, forward, TCAACATCCAGCTCTTTGAGGA, and reverse, GCTGAGTGTAAGGACCCATCG; human ID1, forward, GAGGCGGCATGCGTTC and reverse, CCCAGGCTGGATGCAGTTA; human MSTN, forward, GAAGATGGGCTGAATCCGTTT, and reverse, AATCCAATCCCATCCAAAAGC; human TGFB2, forward, CGAGAGGAGCGACGAAGAGT and reverse, CAACTGGGCAGACAGTTTCG; human TGFB3, forward, GAGCAGAATTCCGGGTCTTG and reverse, ATCTGGCCGAAGGATCTGG.

#### *Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)*

C2C12 cells, either in proliferation or differentiation, were washed 2X with PBS, treated with Formaldehyde (Sigma) diluted in PBS at a final concentration of 1% during 10 min at 37°C then stopped by adding Glycine at a final concentration of 0.125M. Fixed cells were washed 2X with cold PBS and harvested. Chromatin was prepared first by a step of cell lysis in Cell Lysis Buffer (5 mM PIPES pH8, 85 mM KCl, 0.5% NP-40) 5 min on ice. Lysed cells were then centrifuged 10 min at 600 g and resuspended in Nucleus Lysis Buffer (50 mM Tris pH8, 10 mM EDTA, 1% SDS). Chromatin was then sheared by sonication (10 cycles of 1 min ON, 1 min OFF) in a Bioruptor (Diagenode) to obtain DNA fragments around 500 bp. Cell debris were then cleared by centrifugation at 16000 g for 10 min.

For immunoprecipitation, Protein A/G ultralink beads (Thermo Fisher Scientific) were blocked overnight at 4°C in IP dilution Buffer (16.7 mM Tris pH8, 1.2 mM EDTA, 167 mM NaCl, 0.01% SDS, 1.1% Triton X-100) supplemented with 1 mg/ml BSA (New England Biolabs) and 1 mg/ml salmon sperm DNA (Life Technologies). Beads were then washed during 4h at 4°C in IP dilution buffer.

Chromatin was diluted in 1 ml of IP dilution buffer and pre-cleared for 4h at 4°C by addition of pre-blocked beads. Beads were removed and 10 µg of chromatin was immunoprecipitated with 5 µg of the specific antibody or Rabbit IgG as a negative control, overnight at 4°C.

Immunocomplexes were recovered by addition of pre-blocked beads, incubated 1h at 4°C. Beads were washed twice with IP dilution buffer, twice with TSE Buffer (20 mM Tris pH8, 2 mM EDTA, 500 mM NaCl, 1% Triton X-100), twice with LiCl buffer (100 mM Tris pH8, 500 mM LiCl, 1% desoxycholic acid, 1% NP-40), twice with TE buffer (10 mM Tris pH8, 1 mM EDTA). Immunocomplexes were then twice eluted from the beads with 250 µl of Elution Buffer (50 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1% SDS).

Eluates were supplemented with 200 mM NaCl and crosslink was reversed overnight at 65°C.

Eluates were then treated with RNase followed by Proteinase K, extracted with Phenol:Chloroform:Isoamyl, precipitated with 100% Ethanol supplemented with 90 mM NaAc and finally resuspended in DNase-free water. QPCRs were performed with Power SYBR-Green Master Mix (Applied Biosystems) in an Applied 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems). ChIP-qPCR results were represented as % of the negative control gene Neuronatin (NNAT).

The following primers were used for qPCR:

HMOX1, forward, CACGTGACCCGCGTACTTAA, and reverse, ACTCACTGGTTGTATGCGGAAA; ID1, forward, CAAAGCCACGCCTCTAGCA, and reverse, GACCAAGGGCGGGTTCA; NNAT, forward, CCCTACCCAACCCATCCTATC, and reverse, CCACCGCGGCACTTTG.

#### *Antibodies*

The following antibodies were used: for WB and IF, anti-E2F5 (sc-999 for WB, sc-374268 for IF), anti-MCK (sc-15161), anti-myogenin (sc-576) were obtained from Santa Cruz, monoclonal anti-myosin heavy chain (M4276, clone MY-32) and anti-actin (A5441, clone AC-15) were purchased from Sigma Aldrich; for ChIP, anti-E2F4 (sc-866x) and anti-E2F5 (sc-1083x) were obtained from Santa Cruz; goat IgG (I 9140) and mouse IgG (I 8765) were purchased from Sigma Aldrich; rabbit IgG (sc-2027) for ChIP were purchased from Santa Cruz.

#### *Luciferase reporter assays*

The 3'UTR of human E2F5 mRNA (harboring the miR-98 binding site) was cloned into a psiCHECK2-reporter vector (Promega) downstream of the reporter gene (Renilla luciferase). HeLa cells were seeded at 20 000 cells per well in a 96-well plate. 24h after, 10 ng of psiCHECK2-E2F5-3'UTR was co-transfected with 50 nM of either miRNA mimic or miRNA inhibitor. Co-transfection was performed with Lipofectamine 2000 (Life Technologies). 48h after transfection, the relative levels of Renilla versus Firefly luciferase activity (control of transfection efficiency) were measured with Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) according to the manufacturer's instructions. The luminescence signal was quantified on a Mithras LB 940 Multilabel Reader and analyzed with Mikrowin software (Berthold Technologies).

### *microRNAs inhibitors and mimics*

For miR-98 inhibition assays, the LNA (locked nucleic acid) to miR-98 and the control LNA (targeting an irrelevant sequence) were obtained from Exiqon. For let-7 overexpression, human let-7g miScript miRNA mimic was purchased from Qiagen. AllStars Negative control siRNA (Qiagen) was used as a negative control. Transient transfection of LNA and mimic were performed using Lipofectamin RNAiMAX (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

### *Image Acquisition and analysis of differentiation*

Terminal differentiation was monitored using an Operetta (Perkin Elmer) High Content Screening system as described in [2]. The fusion index (the number of nuclei in myotubes containing at least three nuclei above the total number of nuclei) was measured and used as a parameter to monitor terminal differentiation.

### *E2F site prediction*

Putative E2F binding-sites were identified with the software TRANSFAC from Biobase Gmbh (<http://www.biobase-international.com/>).

### *Transcriptomic analysis*

Variations of the transcriptome were analyzed on Affymetrix Human Gene 1.1 ST Arrays. Values of a fold change for all genes in each experimental set (proliferation, early and late differentiation) were ranked from the highest to the smallest ones, and next the inflection-point of the corresponding curve was considered as a threshold for significantly high fold change for a particular experimental set. According to this analysis, the threshold for Affymetrix data for the late differentiation set was set at 2.0 fold change, and for the proliferation and early differentiation sets at 1.5 fold change.

## **Results and Discussion**

### *MiR-98 KD increases differentiation in human and mouse myoblasts by massively altering gene expression.*

A genome-wide screen previously identified miR-98 and let-7g as negative regulators of human skeletal muscle cell differentiation: these miRNAs suppress hypertrophic and/or precocious differentiation of myotubes [2]. To further explore the mechanisms underlying this phenomenon, we performed miR-98 loss-of-function assays in human and mouse skeletal myoblasts. As we have previously shown, an LNA antisense miR-98 inhibitor is very efficient against the let-7 family in myoblasts, with a strong impact on let-7 targets [10]. LNA antisense inhibitors act by binding their target miRNAs with high affinity and efficiency [11]. Transfection of miR-98 LNA inhibitor leads to a strong and long-term (at least 5 days in human myoblasts) knock down (KD) of miR-98 levels ([2, 10] and Fig. 1A, B).

The effect of miR-98 and let-7g mimics on muscle differentiation was less pronounced than the effect of the miR-98 inhibitor. The let-7 mimics were notably less efficient in modifying the expression of well-known let-7 targets than let-7 inhibitors. These results are probably due to the high expression level of endogenous let-7 miRNAs in myoblasts ([2, 10] and our unpublished observations). Therefore, in this study we preferentially used miR-98 inhibitor, and only included the mimic in some experiments performed with high-sensitivity techniques.

Transfection of miR-98 inhibitor led to a four- to six-fold increase in the fusion index of human LHCN-M2 myoblast cells or of mouse C2C12 myoblast cells. (Fig. 1 C-F), confirming that miR-98 is a negative regulator of differentiation in both cell models.

*E2F5 is a novel direct target of miR-98 in differentiating myoblasts.*

In order to identify potential targets of miR-98 in muscle cells, we used two sequential assays. First, we analyzed the transcriptome of human myoblasts transfected with miR-98 inhibitor (KD) or mimic. The miR-98 loss-of-function (KD) assays were performed at different stages: proliferation, early differentiation, or late differentiation (Fig. 1G). Given the phenotype of miR-98 KD myoblasts, we were most interested in the early differentiation time point, whereas the other two were only analyzed to determine whether miR-98 targets changed during the differentiation process. Thus, the gain-of-function assays were performed only in early differentiating myoblasts. Statistical analysis of the data allowed us to identify 92 significantly upregulated genes in the early differentiation loss-of-function assay, 147 genes in the proliferation assay, and 48 genes in the late differentiation assay. Interestingly, only 13 genes were found to be significantly upregulated at all three time points in miR-98 loss-of-function assays, suggesting that the targets of let-7 in myoblasts can vary during differentiation (Fig. 1H and Table S1).

Second, we identified, among these potential targets, those that are involved in suppressing early myogenic differentiation by miR-98. To this end, we used the STarS assay [2] in which concomitant downregulation of phenotypically relevant gene targets together with the miRNA rescues a normal phenotype. In this assay, the transcriptional repressor E2F5 was found to be among the putative targets, whose inhibition significantly rescued a normal phenotype (Fig. 2A, B), indicating that E2F5 is, at least in part, responsible for the phenotype of miR-98 KD cells. Reporter assays using the 3'UTR of E2F5 cloned downstream of the Renilla luciferase gene showed that E2F5 is a direct target of let-7g and miR-98 (Fig. 2C). Moreover, both E2F5 mRNA and protein were shown to be strongly upregulated in myoblasts when miR-98 was inhibited (Fig. 2D, E). Taken together, these results demonstrate that E2F5 is a novel target of let-7 that is important in skeletal myoblasts, and suggest that E2F5 is a previously uncharacterized regulator of terminal myogenic differentiation. Consistently with this finding, suppression of let-7 was recently shown to directly upregulate E2F5 and thus decrease proliferation of chondrocytes [12].

*E2F5 is a pro-differentiation factor expressed in human and mouse skeletal myoblasts.*

In order to decipher the role of E2F5 in muscle differentiation, we first analyzed the expression of this factor in skeletal myoblasts. Whereas E2F5 mRNA levels did not strongly change during differentiation, the E2F5 protein levels appeared to decrease (Fig. 3A, B). Most importantly, at the same time, E2F5, which was diffuse in the cytoplasm and the nucleus of proliferating and early differentiating cells, concentrated in the nucleus in the majority of analyzed cells (typical images and numbers are presented in Fig. 3C). This observation is consistent with the previously reported localization of E2F5 to the nucleus in differentiating keratinocytes, where this transcription factor plays an important pro-differentiation role [13]. E2F5 loss-of-function assays in differentiating human myoblasts demonstrated that E2F5 is required for differentiation, as three distinct siRNAs all induced an almost complete inhibition of differentiation (Fig. 3D, E). Conversely, over-expressing E2F5 in mouse skeletal myoblasts C2C12 led to precocious expression of the differentiation marker MCK (Muscle Creatine Kinase), as well as of the pro-differentiation transcription factor myogenin (Fig. 3F). Therefore,

the miR-98 target E2F5 plays a pro-differentiation role and influences the temporality of differentiation in skeletal myoblasts.

*E2F5 directly downregulates the differentiation inhibitors HMOX1 and ID1, and impacts on the expression of myostatin and other factors of the TGF $\beta$  pathway.*

In order to explore how E2F5 impacts on skeletal muscle differentiation, we sought to characterize the targets of this transcriptional repressor. To this end, we identified the genes that were predicted to be targets of E2F5 in the Transfac  $\text{\textcircled{R}}$  database (<http://www.biobase-international.com/product/transcription-factor-binding-sites>) among the genes that were downregulated in miR-98 loss-of-function assays. Some of these genes (Table 1) were known regulators of skeletal muscle differentiation, including heme oxygenase 1 (HMOX1), a myomiR inhibitor [14], ID1, a member of a family of inhibitors of key myogenic factors [15], as well as five genes belonging to the transforming factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) signalling pathway among which myostatin, a cytokine of the TGF $\beta$  superfamily and an extremely potent inhibitor of myogenesis [16]. Not all of these potential E2F5 targets were regulated in the same manner in proliferation, early differentiation, or late differentiation in miR-98 KD human myoblasts. For in-depth analysis, we focused on five genes: HMOX1, ID1, myostatin, TGF $\beta$ 2 and TGF $\beta$ 3. In order to demonstrate that these genes are indeed regulated by E2F5, we used E2F5 loss-of-function assays. HMOX1, ID1, myostatin and TGF $\beta$ 3, but not TGF $\beta$ 2, were significantly upregulated upon E2F5 knock down by two different siRNAs (Fig. 4A).

To find out whether this regulation was directly dependent on E2F5 transcriptional repression, we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) using E2F5 antibody. As a positive control in these experiments, we used E2F4, a transcriptional repressor belonging to the same family, with known binding sites in the genome of C2C12 myoblasts (<http://genome.ucsc.edu/ENCODE/dataMatrix/encodeDataMatrixMouse.html>, GEO sample accession GSM915187). The promoters of both HMOX1 and ID1 were strongly enriched in E2F5 ChIP samples both in proliferation and in differentiation, confirming that these inhibitors of myogenesis are indeed novel direct targets of the transcriptional repressor E2F5, and indirect targets of miR-98 in muscle (Fig. 4B).

The promoters of myostatin and TGF $\beta$ 3 were not found to be direct targets of E2F5 or E2F4 in our ChIP assays (data not shown). However, we found it extremely intriguing that these potent inhibitors of myogenesis are differentially regulated by a KD of miR-98, as well as by a KD of the miR-98 target E2F5. Moreover, a group of genes belonging to the TGF $\beta$  pathway was downregulated in miR-98-depleted human myoblasts (Table 1). The search for the most enriched pathways in the sets of genes with significantly high fold-change in miR-98 KD experiments was performed using Gene Ontology and KEGG pathway databases. TGF $\beta$  signaling pathway was found to be the most enriched one in the list of genes significantly increased during early differentiation (14.3 % of associated genes with p-value corrected by Benjamini-Hochberg algorithm= 6.64E-09), and the third most enriched one in the list of genes in the late differentiation set (37% and 1.57E-20). Further studies are needed to find a link between miR-98, E2F5, and the TGF $\beta$  regulation of myogenesis.

Let-7 miRNAs, which influence the temporality of *C.elegans* development, have been implicated in regulating cell proliferation and differentiation of numerous cell and tissue types, such as neuronal, cardiac, adipogenic and others ([17-21], reviewed in [3]) in mammals. In a few cases, a let-7 miRNA acted as a negative regulator of differentiation, via an unknown mechanism [22]. The impact and mechanisms of let-7-dependent regulation of these processes remain

contradictory, even in the context of highly similar experimental systems, such as mouse skeletal myoblasts C2C12 [23, 24]. The contradictions can be partially resolved by our observation that let-7 targets can change depending on the stage of terminal myogenic differentiation, highlighting the complexity of let-7 functions.

In our previous studies, we showed that the let-7 family strongly delays skeletal muscle terminal differentiation. Here, we show that this effect is mediated through the inhibition of previously unidentified targets of let-7 in skeletal muscle, including the transcriptional repressor E2F5, which, in turn, acts on known inhibitors of differentiation such as ID1 and HMOX1. ID1 is known to impair the activity of myogenic regulatory factors (MRFs), including the key transcription factor MyoD, by sequestering their E-protein partners [25]. HMOX1 is also capable to repress the expression of MyoD, as well as of myomiRs miR-1, miR-133 and miR-206, important activators of myogenesis [1, 14]. Myostatin and TGF $\beta$  were shown in multiple studies to repress the expression and activity of various MRFs and their partners in skeletal muscle (reviewed in [26]). Let-7 miRNAs thus appear to regulate a large set of key myogenic genes through their action on E2F5, which acts directly or indirectly on several regulatory pathways of differentiation. It is likely that E2F5 activates myogenesis by increasing the expression of myomiRs miR-1/133/206, and by acting at multiple levels on the MRFs expression and activity. Consequently, let-7 could regulate a very large set of genes via its action on the mRNA of a single gene, E2F5, which seems to act here as an “amplifier” of let-7 anti-differentiation effect.

To summarize, let-7 has a specific panel of direct and indirect targets in skeletal muscle, which accounts for its anti-differentiation effect in this tissue. These data underscore the importance of the cellular environment in miRNA function: unlike transcription factors, for which target sites are constitutively present in all cells and tissues (even though not always accessible), miRNA activity strongly depends on the expression of gene target mRNAs. Thus, it is particularly important to study let-7 and other miRNA targets in the right cellular context, in order to reconstitute the regulatory networks controlled by the members of this family of miRNAs.

### **Acknowledgements**

The authors thank Drs. G. Pinna et S. Ait-Si-Ali for help with statistical analysis and ChIP assays, Dr. V. Mouly for the LHCN cells, and Drs. R. Gorelik and C. Mann for the critical reading of the manuscript. The authors declare that there is no conflict of interest.

### **Author contribution**

This study is part of the PhD thesis work of Jeremie Kropp, with the help of Dr. C. Degerny, under the direction of A. Harel-Bellan and A. Polesskaya. Jeremie Kropp designed, performed, analyzed and interpreted most of the experiments. N. Morozova performed the bioinformatic analysis. J. Pontis helped for design and analysis of ChIP assays. Anna Polesskaya, Annick Harel-Bellan and Jeremie Kropp wrote the manuscript.

### **Funding**

This work was supported by the French National Research Agency (ANR) grant [ANR-09-GENO-107-01]. Jeremie Kropp was supported by PhD Fellowships from the French Ministry

of Higher Education and Research, and from AFM (Association Française contre les Myopathies).

## Figures:

Figure 1. MiR-98 KD increases differentiation in LHCN (human) and C2C12 (mouse) myoblasts by massively altering gene expression. A, B. Inhibition of miR-98 following transfection of LNA inhibitor in LHCN human (A) or C2C12 mouse (B) myoblasts. C. Immunofluorescence (IF) staining of LHCN human myoblasts transfected with control or miR-98 inhibitor, 5d differentiation. MHC: myosin heavy chain. Shown are typical fields out of at least ten independent experiments performed in triplicate. D. Quantification of miR-98 KD experiments shown in C. E. IF staining of C2C12 mouse myoblasts transfected with control or miR-98 inhibitor, 2d differentiation. F. Quantification of miR-98 KD experiments shown in E. G. Time course of miR-98 loss-of-function assays in LHCN myoblasts. (A): proliferation, (B): early differentiation, (C): late differentiation. H. Number of significantly up-regulated genes in loss-of-function miR-98 assays performed at indicated time points. 3 independent experiments, \*\*\*,  $p < 0,001$  (t-test). d, days; ctrl, control.

Figure 2. E2F5 is a novel direct target of miR-98 in differentiating myoblasts.

A. IF staining of LHCN myoblasts transfected with 2 different control siRNAs or 3 different E2F5 siRNAs, 5d differentiation. Shown are typical fields out of at least three independent experiments performed in triplicate. B. Quantification of E2F5/miR-98 double KD experiments shown in A. C. Luciferase assays using the 3'UTR of E2F5 cloned into pSiCheck.2 reporter vector, transfected together with miR-98 inhibitor or let-7g mimic in HeLa cells. The data are shown as the mean of 3 independent experiments, each performed in 9 replicates. D-E. Expression of endogenous E2F5 in proliferating or differentiating LHCN (D) or C2C12 (E) myoblasts transfected for 24h with indicated miRNA inhibitors. D: mRNA, the mean of 3 independent experiments; E: protein, a representative experiment out of 3. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  (t-test). ctrl, control; conf, confluent.

Figure 3. E2F5 is a pro-differentiation factor largely responsible for the phenotype of miR-98 KD myoblasts. A-C. Expression of endogenous E2F5 in proliferating or differentiating C2C12 myoblasts. A: mRNA, the mean of 3 independent experiments; B: protein, a representative experiment out of 3; C: IF (shown are typical cells out of 50 analyzed, representing 47/50 for 0 d, 48/50 for 1 d, 38/50 for 2 d, 42/50 for 3 d time points). D. IF staining of LHCN myoblasts transfected with 2 different control siRNA or 3 different E2F5 siRNAs, 7d differentiation. MHC: myosin heavy chain. Shown are typical fields out of 3 independent experiments performed in triplicate. E. Quantification of E2F5 KD experiments shown in D. F. Western blot analysis of differentiating C2C12 myoblasts transfected with an E2F5 expression vector or with a control vector. conf, confluent.

Figure 4. E2F5 directly downregulates the differentiation inhibitors HMOX1 and ID1, and impacts on the expression of myostatin and other factors of the TGF $\beta$  pathway. A. RT-qPCR analysis of altered expression of putative E2F5 targets in E2F5 KD cells. The data are shown as the mean of 6 independent experiments. B. ChIP assays using anti E2F5 or E2F4 antibodies in C2C12 myoblasts (the mean of 5 independent experiments). \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  (t-test). C. Model for miR-98 dependent regulation of muscle differentiation. d, days.

## References

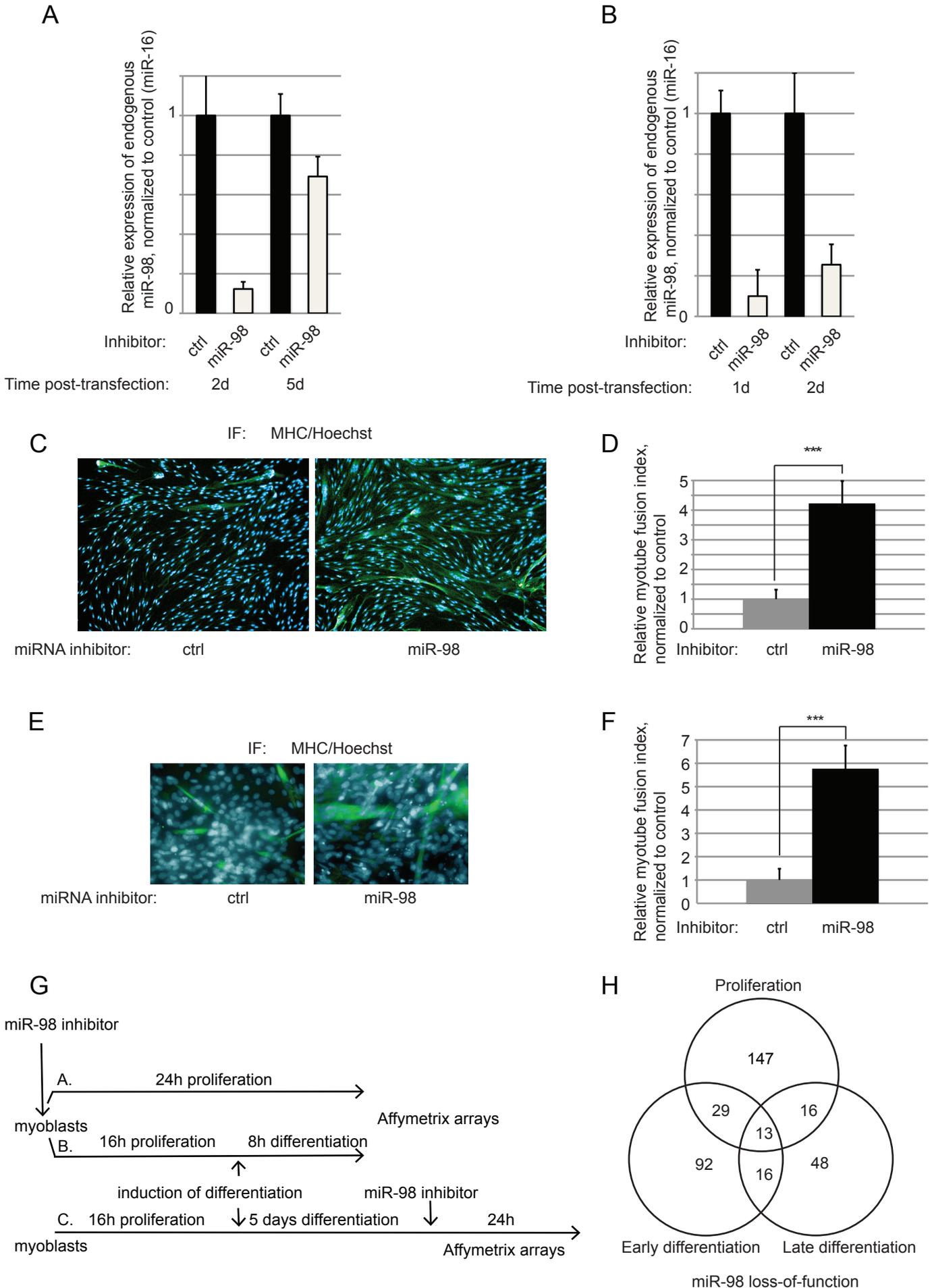
- 1 McCarthy, J. J. (2011) The MyomiR network in skeletal muscle plasticity. *Exerc. Sport Sci. Rev.* **39**, 150-154
- 2 Polesskaya, A., Degerny, C., Pinna, G., Maury, Y., Kratassiouk, G., Mouly, V., Morozova, N., Kropp, J., Frandsen, N. and Harel-Bellan, A. (2013) Genome-wide exploration of miRNA function in mammalian muscle cell differentiation. *PLoS One.* **8**, e71927
- 3 Mondol, V. and Pasquinelli, A. E. (2012) Let's make it happen: the role of let-7 microRNA in development. *Curr. Top. Dev. Biol.* **99**, 1-30
- 4 Wang, X., Cao, L., Wang, Y., Liu, N. and You, Y. (2012) Regulation of let-7 and its target oncogenes (Review). *Oncol. Lett.* **3**, 955-960
- 5 Bao, M. H., Feng, X., Zhang, Y. W., Lou, X. Y., Cheng, Y. and Zhou, H. H. (2013) Let-7 in cardiovascular diseases, heart development and cardiovascular differentiation from stem cells. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 23086-23102
- 6 Toledano, H. (2013) The role of the heterochronic microRNA let-7 in the progression of aging. *Exp. Gerontol.* **48**, 667-670
- 7 Boyerinas, B., Park, S. M., Hau, A., Murmann, A. E. and Peter, M. E. (2010) The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endocr. Relat. Cancer.* **17**, F19-36
- 8 Zhu, C. H., Mouly, V., Cooper, R. N., Mamchaoui, K., Bigot, A., Shay, J. W., Di Santo, J. P., Butler-Browne, G. S. and Wright, W. E. (2007) Cellular senescence in human myoblasts is overcome by human telomerase reverse transcriptase and cyclin-dependent kinase 4: consequences in aging muscle and therapeutic strategies for muscular dystrophies. *Aging Cell.* **6**, 515-523
- 9 Boudoukha, S., Cuvellier, S. and Polesskaya, A. (2010) Role of the RNA-binding protein IMP-2 in muscle cell motility. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 5710-5725
- 10 Boudoukha, S., Rivera Vargas, T., Dang, I., Kropp, J., Cuvellier, S., Gautreau, A. and Polesskaya, A. (2014) MiRNA let-7g regulates skeletal myoblast motility via Pinch-2. *FEBS Lett.* **588**, 1623-1629
- 11 Petersen, M. and Wengel, J. (2003) LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics. *Trends in biotechnology.* **21**, 74-81
- 12 Papaioannou, G., Inloes, J. B., Nakamura, Y., Paltrinieri, E. and Kobayashi, T. (2013) let-7 and miR-140 microRNAs coordinately regulate skeletal development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, E3291-3300
- 13 Apostolova, M. D., Ivanova, I. A., Dagnino, C., D'Souza, S. J. and Dagnino, L. (2002) Active nuclear import and export pathways regulate E2F-5 subcellular localization. *J. Biol. Chem.* **277**, 34471-34479
- 14 Kozakowska, M., Ciesla, M., Stefanska, A., Skrzypek, K., Was, H., Jazwa, A., Grochot-Przeczek, A., Kotlinowski, J., Szymula, A., Bartelik, A., Mazan, M., Yagensky, O., Florczyk, U., Lemke, K., Zebzda, A., Dyduch, G., Nowak, W., Szade, K., Stepniewski, J., Majka, M., Derlacz, R., Loboda, A., Dulak, J. and Jozkowicz, A. (2012) Heme oxygenase-1 inhibits myoblast differentiation by targeting myomirs. *Antioxid. Redox. Signal.* **16**, 113-127
- 15 Benezra, R., Davis, R. L., Lockshon, D., Turner, D. L. and Weintraub, H. (1990) The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell.* **61**, 49-59
- 16 McPherron, A. C., Lawler, A. M. and Lee, S. J. (1997) Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature.* **387**, 83-90

- 17 Meza-Sosa, K. F., Pedraza-Alva, G. and Perez-Martinez, L. (2014) microRNAs: key triggers of neuronal cell fate. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, 175
- 18 Yang, Y., Ago, T., Zhai, P., Abdellatif, M. and Sadoshima, J. (2011) Thioredoxin 1 negatively regulates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy through upregulation of miR-98/let-7. *Circ. Res.* **108**, 305-313
- 19 Ventayol, M., Vinas, J. L., Sola, A., Jung, M., Brune, B., Pi, F., Mastora, C. and Hotter, G. (2014) miRNA let-7e targeting MMP9 is involved in adipose-derived stem cell differentiation toward epithelia. *Cell Death Dis.* **5**, e1048
- 20 Polesskaya, A., Cuvellier, S., Naguibneva, I., Duquet, A., Moss, E. G. and Harel-Bellan, A. (2007) Lin-28 binds IGF-2 mRNA and participates in skeletal myogenesis by increasing translation efficiency. *Genes Dev.* **21**, 1125-1138
- 21 Pelosi, A., Careccia, S., Lulli, V., Romania, P., Marziali, G., Testa, U., Lavorgna, S., Lo-Coco, F., Petti, M. C., Calabretta, B., Levrero, M., Piaggio, G. and Rizzo, M. G. (2013) miRNA let-7c promotes granulocytic differentiation in acute myeloid leukemia. *Oncogene.* **32**, 3648-3654
- 22 Davoodian, N., Lotfi, A. S., Soleimani, M., Mola, S. J. and Arjmand, S. (2014) Let-7f microRNA negatively regulates hepatic differentiation of human adipose tissue-derived stem cells. *J. Physiol. Biochem.* **70(3)**, 781-789
- 23 Kallen, A. N., Zhou, X. B., Xu, J., Qiao, C., Ma, J., Yan, L., Lu, L., Liu, C., Yi, J. S., Zhang, H., Min, W., Bennett, A. M., Gregory, R. I., Ding, Y. and Huang, Y. (2013) The imprinted H19 lncRNA antagonizes let-7 microRNAs. *Mol. Cell.* **52**, 101-112
- 24 Dey, B. K., Pfeifer, K. and Dutta, A. (2014) The H19 long noncoding RNA gives rise to microRNAs miR-675-3p and miR-675-5p to promote skeletal muscle differentiation and regeneration. *Genes Dev.* **28**, 491-501
- 25 Jen, Y., Weintraub, H. and Benezra, R. (1992) Overexpression of Id protein inhibits the muscle differentiation program: in vivo association of Id with E2A proteins. *Genes Dev.* **6**, 1466-1479
- 26 Kollias, H. D. and McDermott, J. C. (2008) Transforming growth factor-beta and myostatin signaling in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* (1985). **104**, 579-587
- 27 Stachurska, A., Ciesla, M., Kozakowska, M., Wolfram, S., Boesch-Saadatmandi, C., Rimbach, G., Jozkowicz, A., Dulak, J. and Loboda, A. (2013) Cross-talk between microRNAs, nuclear factor E2-related factor 2, and heme oxygenase-1 in ochratoxin A-induced toxic effects in renal proximal tubular epithelial cells. *Mol. Nutr. Food. Res.* **57**, 504-515
- 28 Han, X. H., Jin, Y. R., Seto, M. and Yoon, J. K. (2011) A WNT/beta-catenin signaling activator, R-spondin, plays positive regulatory roles during skeletal myogenesis. *J. Biol. Chem.* **286**, 10649-10659
- 29 Sun, L., Trausch-Azar, J. S., Ciechanover, A. and Schwartz, A. L. (2005) Ubiquitin-proteasome-mediated degradation, intracellular localization, and protein synthesis of MyoD and Id1 during muscle differentiation. *J. Biol. Chem.* **280**, 26448-26456
- 30 Melnikova, I. N., Bounpheng, M., Schattman, G. C., Gilliam, D. and Christy, B. A. (1999) Differential biological activities of mammalian Id proteins in muscle cells. *Exp. Cell Res.* **247**, 94-104
- 31 McLennan, I. S. and Koishi, K. (2002) The transforming growth factor-betas: multifaceted regulators of the development and maintenance of skeletal muscles, motoneurons and Schwann cells. *Int. J. Dev. Biol.* **46**, 559-567
- 32 Schabort, E. J., van der Merwe, M. and Niesler, C. U. (2011) TGF-beta isoforms inhibit IGF-1-induced migration and regulate terminal differentiation in a cell-specific manner. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* **31**, 359-367

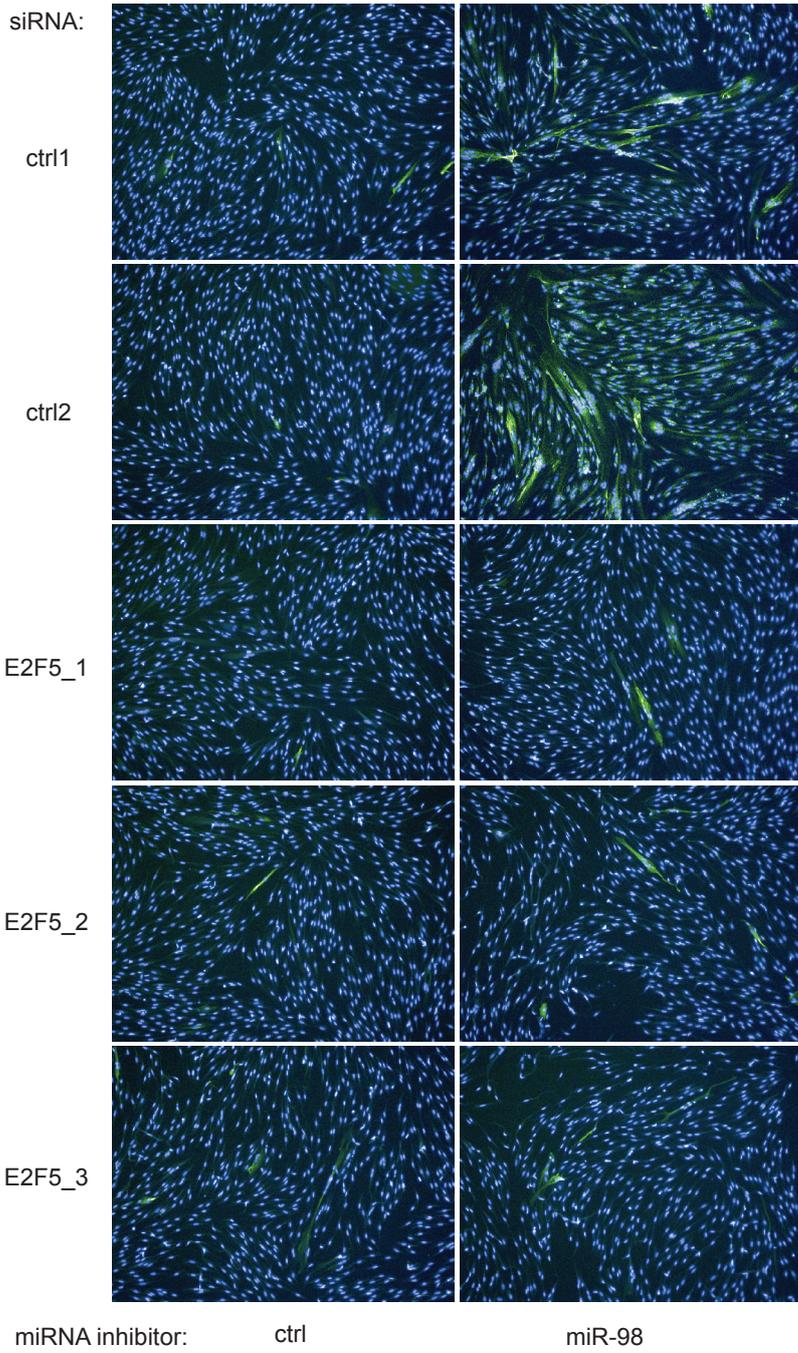
- 33 Dschietzig, T. B. (2014) Myostatin - From the Mighty Mouse to cardiovascular disease and cachexia. *Clin. Chim. Acta.* **433**, 216-224
- 34 Vial, C., Zuniga, L. M., Cabello-Verrugio, C., Canon, P., Fadic, R. and Brandan, E. (2008) Skeletal muscle cells express the profibrotic cytokine connective tissue growth factor (CTGF/CCN2), which induces their dedifferentiation. *J. Cell. Physiol.* **215**, 410-421
- 35 Zhou, Q., Yang, M., Lan, H. and Yu, X. (2013) miR-30a negatively regulates TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition and peritoneal fibrosis by targeting Snail. *Am. J. Pathol.* **183**, 808-819
- 36 Soleimani, V. D., Yin, H., Jahani-Asl, A., Ming, H., Kockx, C. E., van Ijcken, W. F., Grosveld, F. and Rudnicki, M. A. (2012) Snail regulates MyoD binding-site occupancy to direct enhancer switching and differentiation-specific transcription in myogenesis. *Mol. Cell.* **47**, 457-468
- 37 Burge, J. A. and Hanna, M. G. (2012) Novel insights into the pathomechanisms of skeletal muscle channelopathies. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **12**, 62-69
- 38 Lu, J., Webb, R., Richardson, J. A. and Olson, E. N. (1999) MyoR: a muscle-restricted basic helix-loop-helix transcription factor that antagonizes the actions of MyoD. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 552-557

Gene symbol	Name	References	fold change, miR-98 loss-of function		
			proliferation	early diff	late diff
HMOX1	heme oxygenase 1	[14, 27]	-1,96	-1,63	-1,32
DKK1	dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1	[28]	-1,32	-1,45	-1,85
ID1	inhibitor of DNA-binding 1	[29, 30]	-1,38	-1,23	-1,13
TGFB2	transforming growth factor, beta 2	[31]	1,02	-1,16	-1,56
TGFB3	transforming growth factor, beta 3	[32]	1,09	1,14	-1,96
MSTN	myostatin	[33]	-1,53	-1,09	1,03
CTGF	connective tissue growth factor, TGFβ induced	[34]	-1,03	1,10	-1,70
SNAI1	snail homolog 1, TGFβ induced	[35, 36]	1,02	-1,05	-1,96
SCN4A	sodium channel, voltage-gated, type IV, alpha subunit	[37]	-1,09	1,04	-2,25
MSC	musculin (MyoR)	[38]	1,02	1,09	-1,78

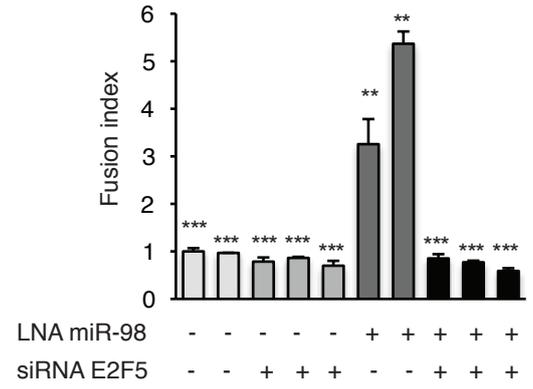
Table 1. Muscle differentiation inhibitors that are both predicted E2F5 targets and downregulated in miR-98 KD myoblasts. MiR-98 loss-of-function (KD) assays were performed in LHCN cells in proliferation, in early or in late differentiation, shown is a mean of 3 independent experiments (see Fig. 1G for the time-course of the assay). Diff, differentiation.



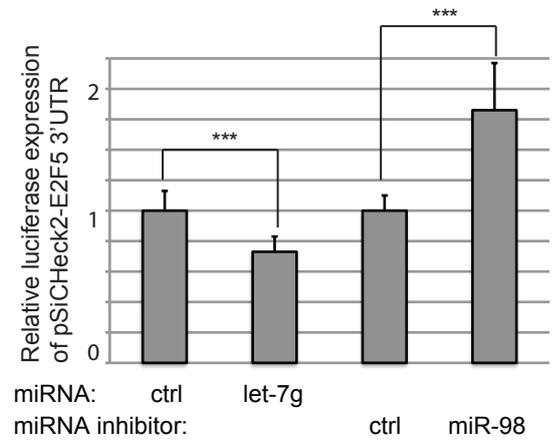
A



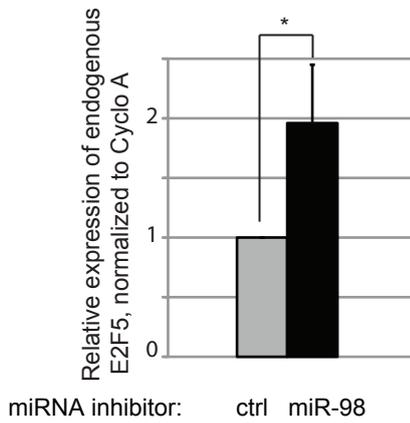
B



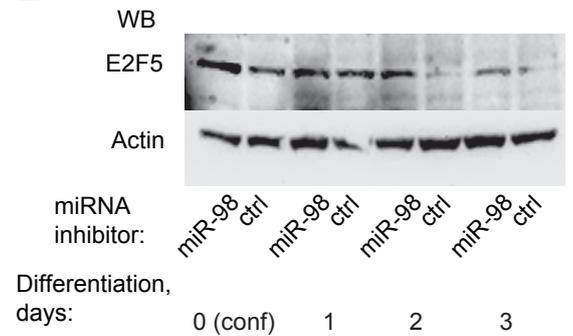
C

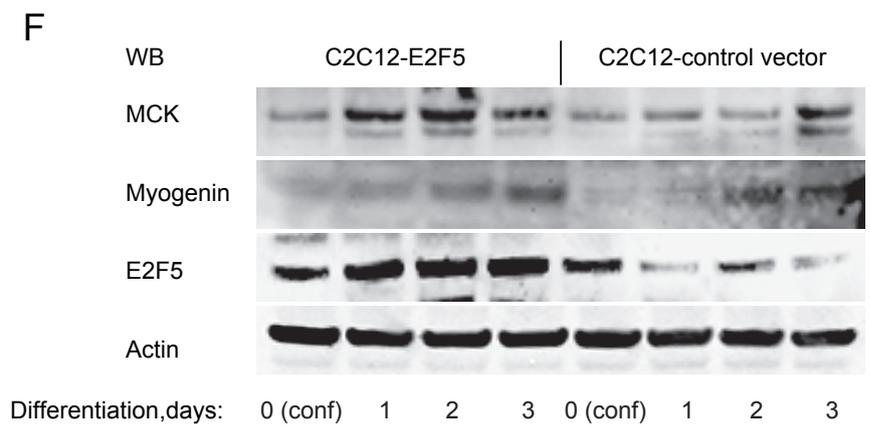
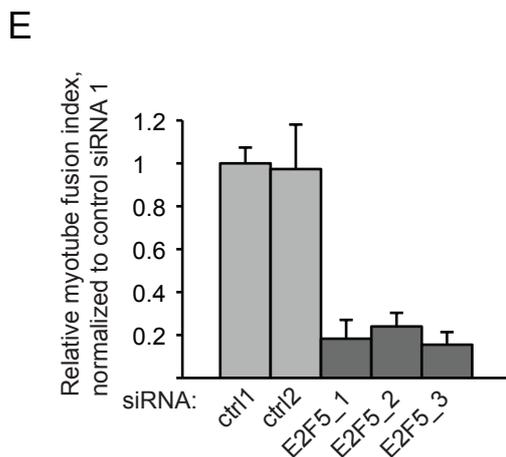
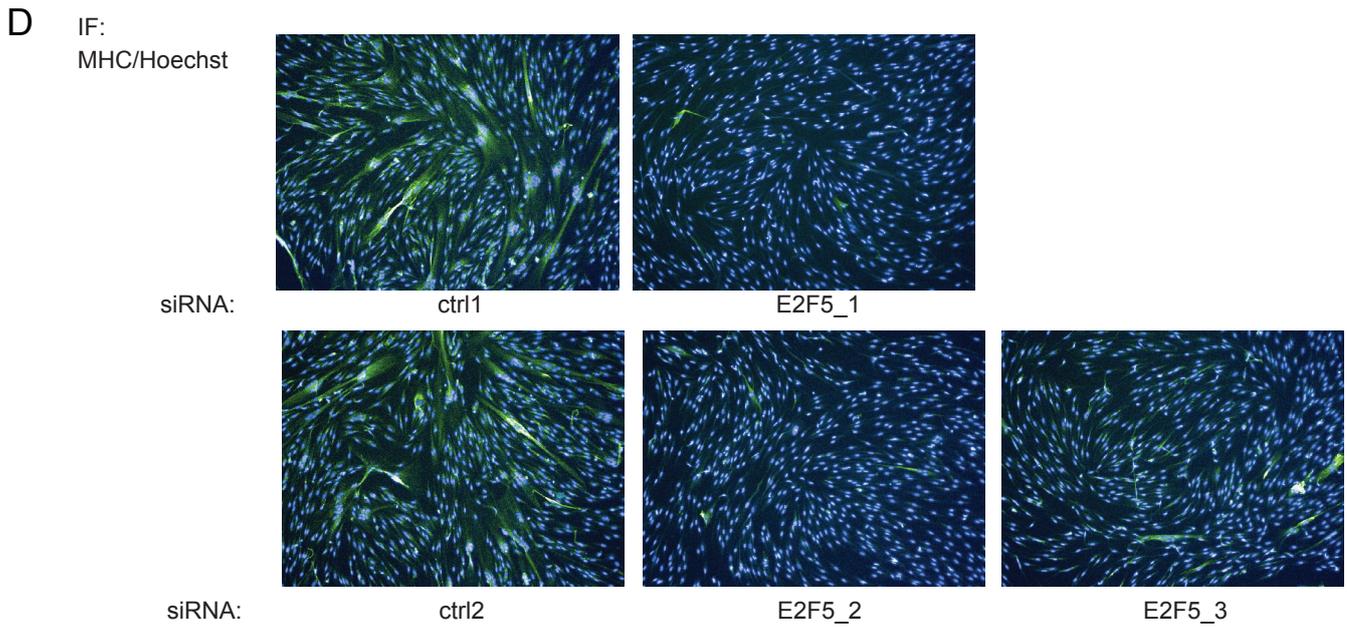
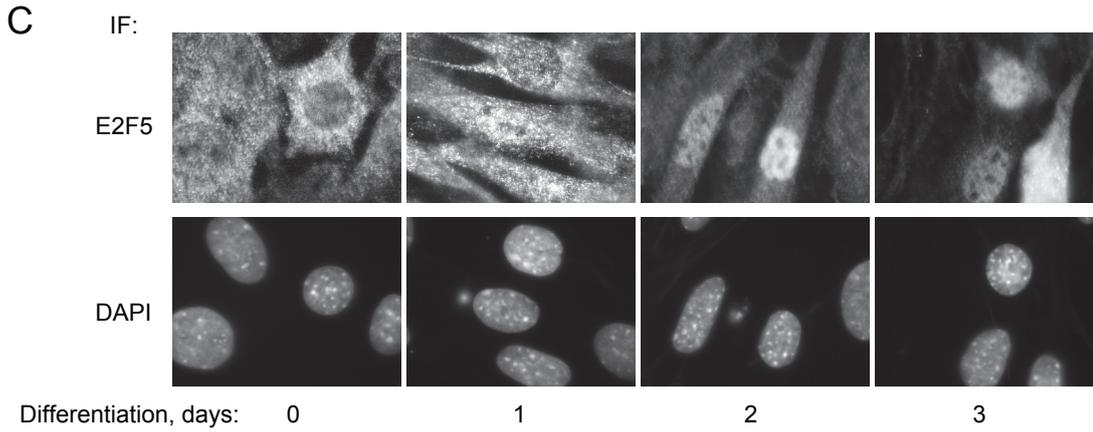
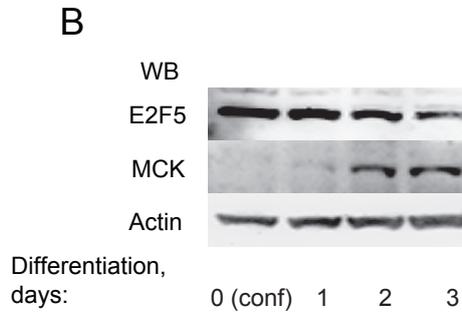
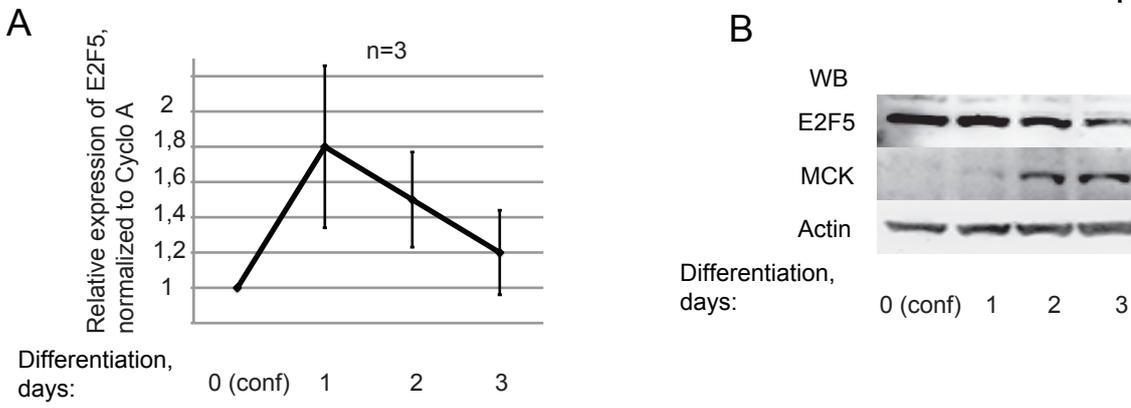


D

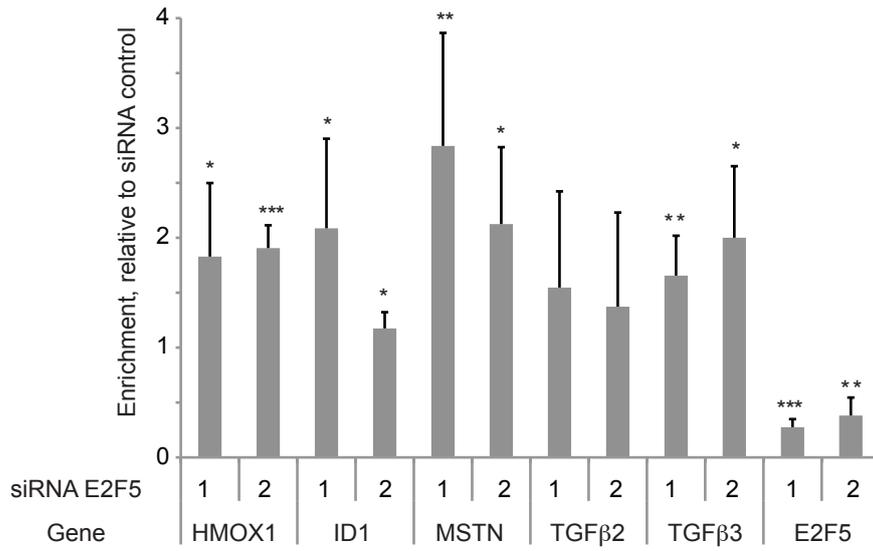


E

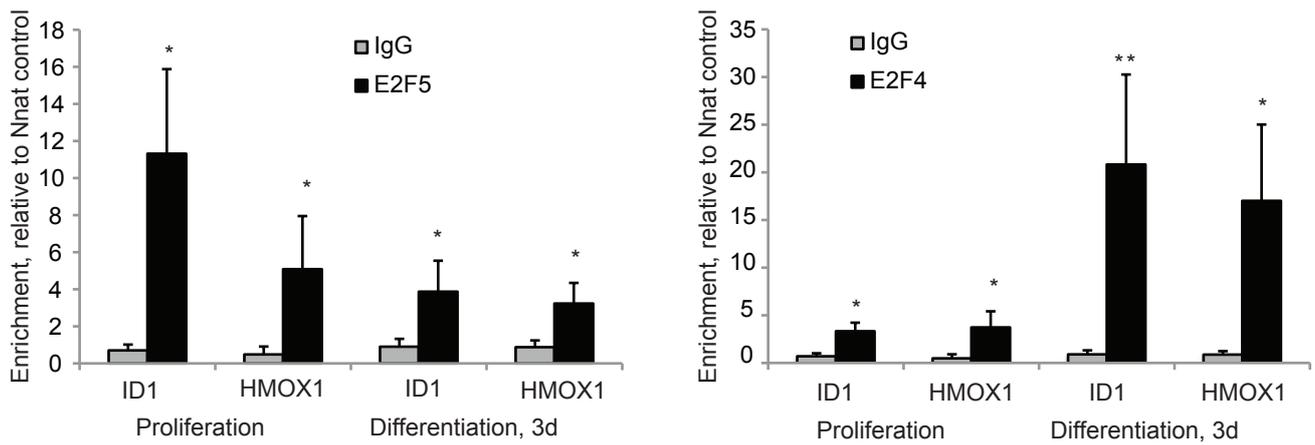




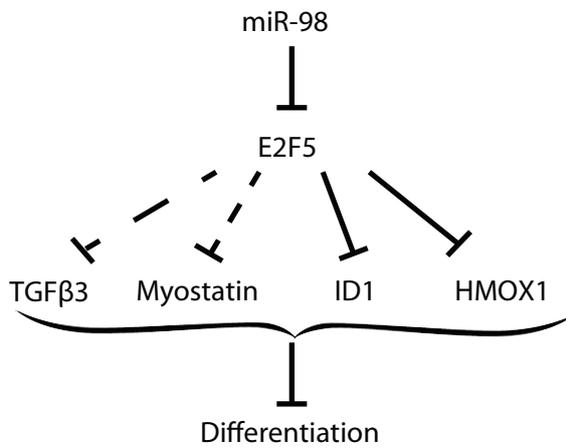
A



B



C



### Supplementary Table 1. Significantly upregulated genes in miR-98 loss-of-function assays.

Loss-of-function assays (KD with LNA miR-98) were performed in LHCN human skeletal myoblasts in proliferation, in early or in late differentiation stages (see Fig. 1G for the time-course of the assay). Gain-of-function assays (overexpression with mimic miR-98) were performed in LHCN human skeletal myoblasts only in early differentiation stage. A gene is significantly upregulated in loss-of-function assays if its fold change is > 1,50 (proliferation and early differentiation stages) or > 2 (late differentiation stage). A gene is significantly downregulated in gain-of-function assays if its fold change is <-1,5. Prol= proliferation; diff=differentiation. Fold changes of significantly regulated genes are marked in red. (3 independent experiments)

List of 13 genes significantly upregulated in all 3 groups of miR-98 KD myoblasts.

Gene Symbol	Fold change, miR-98 loss-of-function			Fold change, miR-98 gain-of-function
	PROL	EARLY DIF	LATE DIF	MIMIC MIR-98 (EARLY DIF)
HMG2A	4,20	3,87	2,02	-1,29
IGF2BP1	2,03	2,16	2,71	-1,36
IFI44L	1,93	1,95	2,37	-1,01
IFI27	1,61	1,91	4,33	1,18
OAS2	1,56	1,88	2,30	1,03
DICER1	1,84	1,78	2,57	-1,66
IFITM1	1,71	1,72	2,76	1,18
HERC6	1,89	1,70	2,12	1,07
HDHD1	1,62	1,70	2,09	-1,40
CCL5	1,79	1,70	3,41	1,03
ZC3HAV1L	1,79	1,60	2,07	-1,25
IFIT1	1,96	1,53	2,37	1,05
XAF1	1,65	1,50	2,27	-1,05

List of 239 genes significantly upregulated in miR-98 KD myoblasts

Gene symbol	Fold change, miR-98 loss-of-function			Significantly upregulated in the group	Fold change, miR-98 gain-of-function
	PROL	EARLY DIF	LATE DIF		MIMIC MIR-98 (EARLY DIF)
ARPP19	2,82	1,48	-1,09	PROL	1,97
LOC388022	2,09	-1,41	-1,57	PROL	1,39
PDS51	2,07	1,10	1,45	PROL	-1,01
ATRX	2,02	-1,54	-1,19	PROL	1,06
MIR199A2	2,01	-1,05	1,29	PROL	-1,16
SNORD50B	1,98	-1,15	1,42	PROL	-1,04
GP1BB	1,97	-1,21	1,12	PROL	1,75
PAIP1	1,96	-1,28	1,36	PROL	-1,02
DDX58	1,95	1,41	1,85	PROL	1,23
FIGN	1,92	1,39	1,93	PROL	-1,68
SEPT14	1,88	-1,16	-1,36	PROL	1,83
SERPINB2	1,87	1,29	1,14	PROL	1,37
HIST1H2AJ	1,85	1,23	1,72	PROL	-1,70
CCDC115	1,85	-1,10	-1,34	PROL	-1,01
GOLGA8IP	1,82	-1,40	-1,12	PROL	-1,42
LILRP2	1,82	-1,11	1,02	PROL	1,27
C15orf51	1,80	-1,03	-1,46	PROL	-1,71
AKR1B10	1,80	-1,27	1,53	PROL	1,23
ANKRD32	1,79	-1,28	1,09	PROL	1,04
LOC100129033	1,77	1,18	1,20	PROL	-1,20
RPL26L1	1,75	-1,02	-1,08	PROL	-1,31
C20orf177	1,74	1,22	1,36	PROL	1,16
SNORD38B	1,74	1,25	1,98	PROL	1,16
ZNF805	1,73	-1,14	1,06	PROL	-1,02
RASA4	1,73	-1,14	1,86	PROL	-1,01
TMEM188	1,72	1,01	1,06	PROL	-1,02
PLA2G15	1,72	1,13	1,35	PROL	-1,21
BTN2A1	1,71	1,41	1,51	PROL	-1,35
CDH8	1,71	1,08	-1,40	PROL	-1,05
FAM103A1	1,70	1,36	1,72	PROL	-1,31
INTS4	1,69	1,04	1,14	PROL	1,26
ZNF799	1,67	-1,05	1,41	PROL	1,44
CENPM	1,66	1,07	1,15	PROL	1,20
SH2D4A	1,66	1,07	1,05	PROL	1,00
ZNF594	1,66	-1,12	1,21	PROL	1,50
NMI	1,66	1,07	1,29	PROL	1,39
IFT80	1,65	1,04	1,36	PROL	1,01
PAPPA	1,64	1,14	1,35	PROL	1,14
C5orf25	1,64	-1,02	1,38	PROL	-1,00
ARSI	1,64	1,12	1,11	PROL	-1,26
PIBF1	1,62	-1,07	1,38	PROL	1,05
SNAP23	1,62	1,01	1,24	PROL	-1,26
ZNF552	1,62	-1,38	1,11	PROL	-1,38
IGF2BP3	1,61	1,19	1,51	PROL	-1,21
PCDH9	1,61	1,05	-1,24	PROL	1,06
CCDC58	1,61	-1,05	1,03	PROL	1,20
PLSCR1	1,61	1,35	1,84	PROL	1,05
EEF1A1	1,61	1,13	1,01	PROL	1,36
SLC39A11	1,60	1,24	1,02	PROL	1,20
SNORD26	1,60	1,15	1,77	PROL	1,00
ARL5B	1,60	1,26	1,41	PROL	-1,20
C9orf85	1,60	-1,09	-1,19	PROL	-1,11
RRP7A	1,60	1,11	1,08	PROL	-1,09
SLC25A26	1,59	-1,03	-1,24	PROL	1,67
PPIH	1,59	-1,14	-1,44	PROL	1,28
F2RL2	1,59	1,45	1,14	PROL	-1,22
CYP2D6	1,59	-1,12	1,47	PROL	1,22
SNORD47	1,58	-1,34	1,82	PROL	-1,02
PARP9	1,58	1,32	1,60	PROL	-1,00
IFIT5	1,58	1,21	1,43	PROL	1,05
RP56KB2	1,57	1,46	1,67	PROL	-1,38
KBTBD10	1,57	-1,13	-1,01	PROL	1,07

BRIX1	1,57	1,07	1,10	PROL	-1,10
MCRS1	1,57	-1,00	1,01	PROL	1,41
EEF1E1	1,57	1,08	1,37	PROL	-1,02
TMC7	1,57	-1,01	1,27	PROL	-1,28
GYPC	1,56	1,25	-1,07	PROL	1,14
E2F6	1,56	1,10	1,28	PROL	1,03
ANKRD46	1,56	1,07	1,63	PROL	-1,03
IKBKE	1,56	1,19	1,25	PROL	-1,44
C7orf44	1,56	1,12	1,21	PROL	-1,11
GPR89B	1,56	-1,10	1,25	PROL	1,11
IL8	1,55	1,42	1,65	PROL	-1,24
DDX60	1,55	1,40	1,95	PROL	1,02
AREG	1,55	1,48	1,22	PROL	-1,07
C10orf12	1,55	1,16	1,12	PROL	1,03
LRI3	1,55	1,27	1,11	PROL	1,01
ZNRD1	1,54	-1,05	1,19	PROL	1,09
CXorf26	1,54	-1,08	-1,08	PROL	1,35
SNORA21	1,54	-1,00	1,07	PROL	1,12
ZNF146	1,54	-1,05	-1,15	PROL	1,15
LOC284861	1,54	1,12	1,03	PROL	-1,66
PMM2	1,54	-1,15	-1,18	PROL	-1,22
CCL2	1,53	1,01	1,50	PROL	-1,09
DDX19A	1,53	1,27	1,29	PROL	-1,11
SNX24	1,53	1,11	1,09	PROL	-1,04
ZNF608	1,53	-1,36	-1,44	PROL	-1,12
CDC25A	1,53	-1,04	1,17	PROL	-1,12
WDR35	1,53	-1,04	-1,19	PROL	-1,10
NCAM2	1,53	1,22	1,02	PROL	-1,22
CDC34	1,53	1,43	1,67	PROL	-1,06
P2RX5	1,53	1,01	1,39	PROL	-1,21
C1D	1,52	-1,02	1,17	PROL	1,12
RSRC1	1,52	-1,25	1,14	PROL	1,02
TMSB15A	1,52	-1,11	-1,19	PROL	-1,04
SNORD96A	1,52	1,20	1,57	PROL	-1,10
LCOR	1,52	1,32	1,39	PROL	-1,35
ITGB3	1,52	1,35	-1,15	PROL	-1,19
STX18	1,52	1,05	-1,05	PROL	1,32
DLEU2	1,52	-1,24	1,65	PROL	1,07
C17orf63	1,52	1,34	1,59	PROL	-1,34
MTF2	1,52	1,11	1,57	PROL	-1,21
ADPGK	1,51	-1,09	1,18	PROL	-1,06
GALC	1,51	1,33	1,48	PROL	-1,34
GPR89A	1,51	-1,13	1,18	PROL	1,06
FLJ42875	1,51	-1,12	-1,66	PROL	-1,36
C15orf39	1,51	1,29	1,17	PROL	-1,10
SCG5	1,51	1,07	1,05	PROL	1,26
IFI44	1,51	1,28	1,80	PROL	1,03
SLC26A6	1,51	-1,09	-1,13	PROL	1,34
C12orf24	1,50	-1,06	1,03	PROL	-1,16
SRFBP1	1,50	1,01	1,09	PROL	-1,03
DPP3	1,50	-1,27	-1,04	PROL	-1,21
SLFN11	1,50	-1,11	1,02	PROL	-1,29
SRP19	1,50	1,41	-1,10	PROL	1,14
IFIT2	1,48	2,33	1,45	EARLY DIF	1,02
INHBE	1,24	2,32	1,00	EARLY DIF	-1,07
TRIB3	1,13	2,27	-1,22	EARLY DIF	1,06
PMAIP1	1,32	1,92	1,83	EARLY DIF	1,03
SNORD46	1,17	1,82	-1,06	EARLY DIF	-1,32
IL1A	1,08	1,82	1,05	EARLY DIF	1,06
CLDN1	1,39	1,79	-1,33	EARLY DIF	-1,11
ZDHC3	1,39	1,78	1,31	EARLY DIF	-1,49
SNORA73A	1,11	1,78	-1,06	EARLY DIF	-1,17
SNORD3A	1,47	1,74	-1,94	EARLY DIF	1,23
IGF2BP2	1,30	1,72	1,78	EARLY DIF	-1,30
STK40	1,11	1,70	1,27	EARLY DIF	-1,41
MXD1	1,38	1,70	1,17	EARLY DIF	-1,08
RNU1-1	-1,20	1,70	-1,10	EARLY DIF	-1,31
EXPH5	1,07	1,68	1,28	EARLY DIF	1,11
GPCPD1	-1,03	1,67	1,12	EARLY DIF	1,09
FBXL12	1,37	1,67	-1,16	EARLY DIF	1,04
BATF2	1,04	1,66	-1,07	EARLY DIF	-1,19
KRT18	1,27	1,65	-1,31	EARLY DIF	1,03
MKX	-1,00	1,64	1,05	EARLY DIF	1,02
ERRF1	1,37	1,64	-1,07	EARLY DIF	-1,32
METRNL	-1,12	1,64	1,15	EARLY DIF	-1,07
FAM129A	-1,16	1,63	-1,01	EARLY DIF	1,07
YOD1	1,20	1,63	1,15	EARLY DIF	1,01
C1orf38	1,28	1,62	-1,06	EARLY DIF	1,07
F2RL1	1,15	1,62	-1,20	EARLY DIF	-1,09
USP10	1,09	1,62	1,06	EARLY DIF	-1,03
DND1	1,14	1,61	-2,10	EARLY DIF	-1,12
C6orf99	-1,20	1,61	-1,05	EARLY DIF	1,28
PQLC2	1,16	1,61	1,43	EARLY DIF	-1,07
ELF4	1,11	1,61	1,32	EARLY DIF	-1,37
LOC645332	1,01	1,59	-1,05	EARLY DIF	-1,58
DUSP8	-1,30	1,58	1,10	EARLY DIF	-1,38
APOL1	-1,04	1,58	1,19	EARLY DIF	1,35
CD274	1,24	1,58	1,53	EARLY DIF	-1,19
RFT1	-1,16	1,58	-1,09	EARLY DIF	1,19
HIRA	-1,10	1,57	-1,16	EARLY DIF	-1,15
NGF	1,06	1,56	-1,25	EARLY DIF	-1,19
GINS2	1,24	1,55	1,89	EARLY DIF	-1,39
PLAGL1	1,15	1,55	1,45	EARLY DIF	-1,31
TOM1L1	-1,14	1,55	1,10	EARLY DIF	-1,06
KATNAL1	1,49	1,55	1,46	EARLY DIF	-1,04
SNX8	1,25	1,55	-1,11	EARLY DIF	1,22
DUSP6	1,01	1,55	1,36	EARLY DIF	-1,05
PLAGL2	1,48	1,54	1,58	EARLY DIF	-1,37
MAPK6	1,49	1,54	1,21	EARLY DIF	-1,18
NME6	1,26	1,54	1,51	EARLY DIF	1,09
FAM167A	-1,02	1,54	-1,11	EARLY DIF	-1,08
SNORD33	-1,02	1,53	1,26	EARLY DIF	-1,03

FAM27D1	-1,76	<b>1,53</b>	1,00	EARLY DIF	1,22
CTH	1,18	<b>1,52</b>	1,01	EARLY DIF	-1,07
UHRF1BP1	-1,01	<b>1,52</b>	1,12	EARLY DIF	-1,20
TES	1,37	<b>1,52</b>	1,03	EARLY DIF	-1,01
SNORA14A	-1,23	<b>1,52</b>	-1,67	EARLY DIF	1,10
NDUFAF2	1,15	<b>1,52</b>	1,11	EARLY DIF	-1,03
FAM100B	1,28	<b>1,51</b>	1,15	EARLY DIF	1,02
GDF6	1,30	<b>1,51</b>	-1,25	EARLY DIF	-1,10
POU5F1B	-1,01	<b>1,51</b>	1,11	EARLY DIF	1,46
CXCL1	1,24	<b>1,51</b>	1,61	EARLY DIF	-1,19
OR1F2P // OR1F:	-1,19	<b>1,50</b>	1,05	EARLY DIF	1,39
SPAG5	-1,08	-1,08	<b>2,00</b>	LATE DIF	-1,07
NCAPH	1,14	1,05	<b>2,01</b>	LATE DIF	-1,03
KIFC1	1,13	-1,14	<b>2,01</b>	LATE DIF	1,03
CDC20	1,04	1,12	<b>2,03</b>	LATE DIF	1,21
GMNN	1,37	1,23	<b>2,05</b>	LATE DIF	-1,20
SNORD80	1,42	1,07	<b>2,05</b>	LATE DIF	-1,04
DEPDC1	1,49	1,10	<b>2,05</b>	LATE DIF	-1,11
DTL	-1,07	1,13	<b>2,06</b>	LATE DIF	<b>-1,51</b>
DDX60L	1,36	1,42	<b>2,09</b>	LATE DIF	-1,07
PARP14	1,36	1,23	<b>2,09</b>	LATE DIF	1,06
BIRC5	-1,02	1,19	<b>2,10</b>	LATE DIF	1,13
SNORD113-3	1,30	-1,39	<b>2,13</b>	LATE DIF	1,27
HRC	-1,03	-1,11	<b>2,14</b>	LATE DIF	1,05
AURKA	-1,04	1,06	<b>2,14</b>	LATE DIF	-1,29
KIAA0101	1,12	-1,02	<b>2,14</b>	LATE DIF	1,06
XIRP1	-1,09	1,09	<b>2,19</b>	LATE DIF	1,06
GATM	-1,02	1,08	<b>2,19</b>	LATE DIF	1,05
RTP4	1,14	1,17	<b>2,22</b>	LATE DIF	1,03
SNORD4A	1,20	1,04	<b>2,25</b>	LATE DIF	1,27
NDC80	-1,18	-1,01	<b>2,34</b>	LATE DIF	1,19
SNORD13P1	1,17	-1,68	<b>2,37</b>	LATE DIF	1,30
RGS16	1,17	1,12	<b>2,42</b>	LATE DIF	-1,06
LRRFIP1	1,18	-1,12	<b>2,45</b>	LATE DIF	1,16
SNORD6	1,21	-1,00	<b>2,59</b>	LATE DIF	1,24
PBK	1,22	1,04	<b>2,59</b>	LATE DIF	1,09
WEE1	1,41	-1,24	<b>2,61</b>	LATE DIF	-1,06
BDKRB1	-1,00	-1,03	<b>2,66</b>	LATE DIF	1,09
CUZD1	-1,16	1,11	<b>2,66</b>	LATE DIF	1,13
NGFR	-1,33	1,15	<b>3,32</b>	LATE DIF	-1,02
MX1	<b>1,86</b>	<b>2,28</b>	1,95	PROL & EARLY DIF	-1,10
IL6	<b>1,71</b>	<b>2,09</b>	-1,13	PROL & EARLY DIF	-1,09
CXCL2	<b>2,40</b>	<b>1,97</b>	1,27	PROL & EARLY DIF	1,43
IFIT3	<b>1,78</b>	<b>1,77</b>	1,81	PROL & EARLY DIF	1,04
RPL32	<b>1,70</b>	<b>1,77</b>	1,42	PROL & EARLY DIF	1,36
EPST11	<b>2,23</b>	<b>1,74</b>	1,91	PROL & EARLY DIF	1,06
E2F5	<b>1,58</b>	<b>1,70</b>	1,55	PROL & EARLY DIF	-1,04
STX3	<b>1,55</b>	<b>1,67</b>	1,00	PROL & EARLY DIF	1,09
USP18	<b>1,79</b>	<b>1,66</b>	1,90	PROL & EARLY DIF	1,18
UBE2MP1 // UBE	<b>1,64</b>	<b>1,60</b>	1,14	PROL & EARLY DIF	1,06
TRIM14	<b>2,13</b>	<b>1,60</b>	1,15	PROL & EARLY DIF	-1,02
HERC5	<b>1,89</b>	<b>1,59</b>	1,50	PROL & EARLY DIF	1,23
PIGH	<b>1,52</b>	<b>1,59</b>	-1,01	PROL & EARLY DIF	-1,21
HS3ST3B1	<b>1,60</b>	<b>1,57</b>	1,21	PROL & EARLY DIF	1,12
DPH3	<b>1,67</b>	<b>1,52</b>	1,47	PROL & EARLY DIF	-1,15
VPS33A	<b>1,79</b>	<b>1,51</b>	1,75	PROL & EARLY DIF	-1,28
OAS1	<b>1,72</b>	1,49	<b>2,25</b>	PROL & LATE	-1,31
SNORA33	<b>1,65</b>	1,12	<b>2,11</b>	PROL & LATE	1,06
IFIH1	<b>2,04</b>	1,47	<b>2,08</b>	PROL & LATE	1,25
MX2	1,46	<b>2,12</b>	<b>2,64</b>	EARLY&LATE DIF	-1,22
BST2	1,15	<b>1,66</b>	<b>3,55</b>	EARLY&LATE DIF	-1,03
OAS3	1,23	<b>1,59</b>	<b>2,17</b>	EARLY&LATE DIF	1,05
HMG2A2	<b>4,20</b>	<b>3,87</b>	<b>2,02</b>	ALL	-1,29
IGF2BP1	<b>2,03</b>	<b>2,16</b>	<b>2,71</b>	ALL	-1,36
IFI44L	<b>1,93</b>	<b>1,95</b>	<b>2,37</b>	ALL	-1,01
IFI27	<b>1,61</b>	<b>1,91</b>	<b>4,33</b>	ALL	1,18
OAS2	<b>1,56</b>	<b>1,88</b>	<b>2,30</b>	ALL	1,03
DICER1	<b>1,84</b>	<b>1,78</b>	<b>2,57</b>	ALL	<b>-1,66</b>
IFITM1	<b>1,71</b>	<b>1,72</b>	<b>2,76</b>	ALL	1,18
HERC6	<b>1,89</b>	<b>1,70</b>	<b>2,12</b>	ALL	1,07
HDHD1	<b>1,62</b>	<b>1,70</b>	<b>2,09</b>	ALL	-1,40
CCL5	<b>1,79</b>	<b>1,70</b>	<b>3,41</b>	ALL	1,03
ZC3HAV1L	<b>1,79</b>	<b>1,60</b>	<b>2,07</b>	ALL	-1,25
IFIT1	<b>1,96</b>	<b>1,53</b>	<b>2,37</b>	ALL	1,05
XAF1	<b>1,65</b>	<b>1,50</b>	<b>2,27</b>	ALL	-1,05

## Résultats supplémentaires

Lors de ma thèse, je me suis concentré sur l'exploration de la voie de régulation de l'expression des gènes let-7 – E2F5. Cependant, mes résultats ont permis de montrer que les miARN let-7 impactent significativement l'expression de nombreux autres gènes jouant potentiellement un rôle dans la différenciation musculaire.

### miR-98 régule de nombreux gènes de la voie interféron

Les essais perte de fonction de miR-98 réalisés dans des myoblastes, suivis d'analyses transcriptomiques sur puces d'expression (Affymetrix) ont montré que l'inhibition de miR-98 fait varier massivement l'expression des gènes (Article 2) (ces myoblastes seront appelés myoblastes miR-98 KD dans la suite du texte). J'ai cherché ensuite à déterminer si certaines voies régulatrices cellulaires étaient impactées par l'inhibition de miR-98. Parmi les 92 gènes significativement surexprimés dans les myoblastes miR-98 KD (différenciation précoce) (Article 2-Figure 1H), se trouvent 24 gènes de la voie interféron, soit 26% du total (Tableau 5). Un gène est considéré comme significativement surexprimé lorsque sa variation d'expression par rapport au contrôle est supérieure au seuil de 1,5.

Gène	Nom	Variation d'expression (fold change), miR-98 KD		
		prolif	early diff	late diff
<i>APOL1</i>	apolipoprotein L1	-1,04	1,58	1,19
<i>BST2</i>	bone marrow stromal cell antigen 2	1,15	1,66	3,55
<i>CCL5</i>	chemokine (C-C motif) ligand 5	1,79	1,70	3,41
<i>CXCL1</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	1,24	1,51	1,61
<i>CXCL2</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	2,40	1,97	1,27
<i>ELF 4</i>	ETS-related transcription factor	1,11	1,61	1,32
<i>EPST11</i>	epithelial stromal interaction 1	2,23	1,74	1,91
<i>HERC5</i>	hect domain and RLD 5	1,89	1,59	1,50
<i>HERC6</i>	hect domain and RLD 6	1,89	1,70	2,12
<i>IFI27</i>	interferon, alpha-inducible protein 27	1,61	1,91	4,33
<i>IFI44L</i>	interferon-induced protein 44-like	1,93	1,95	2,37
<i>IFIT1</i>	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	1,96	1,53	2,37
<i>IFIT2</i>	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	1,48	2,33	1,45
<i>IFIT3</i>	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	1,78	1,77	1,81
<i>IFITM1</i>	interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	1,71	1,72	2,76
<i>IL6</i>	interleukin 6	1,71	2,09	-1,13
<i>MX1</i>	myxovirus resistance 1, interferon-inducible protein p78	1,86	2,28	1,95
<i>MX2</i>	myxovirus resistance 2	1,46	2,12	2,64
<i>OAS2</i>	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2	1,56	1,88	2,30
<i>OAS3</i>	2'-5'-oligoadenylate synthetase 3	1,23	1,59	2,17
<i>PMAIP1</i>	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	1,32	1,92	1,83
<i>TRIM14</i>	tripartite motif-containing 14	2,13	1,60	1,15
<i>USP18</i>	ubiquitin specific peptidase 18	1,79	1,66	1,90
<i>XAF1</i>	XIAP associated factor 1	1,65	1,50	2,27

**Tableau 5. Variations d'expression des gènes de la voie interféron significativement surexprimés dans les myoblastes miR-98 KD.**

Les essais perte de fonction de miR-98 ont été réalisés dans des myoblastes LHCN en prolifération (prolif), différenciation précoce (early diff) ou tardive (late) (voir Article 2-Figure 1G pour la

cinétique de l'expérience). En violet sont indiqués les gènes qui contiennent des sites prédits pour les miARN let-7 (selon Targetscan), en rouge les cibles validées des miARN let-7.

N=3 expériences indépendantes

L'expression des facteurs clés pro-myogéniques n'est pas augmentée dans les myoblastes miR-98 KD

Dans les myoblastes miR-98 KD, les MRF (*MYOD*, *MRF4*, *MYOG*, *MYF5*), les *MEF2* et *SRF* ne sont pas surexprimés en absence de miR-98. En différenciation précoce, *MYOD*, *MRF4* et *SRF* ne varient pas significativement. *MYF5*, *MYOG* et les *MEF2* diminuent (Tableau 6). Un changement d'expression de ces facteurs importants pour la différenciation musculaire ne semble donc pas être impliqué dans le phénotype d'hypertrophie observé dans les myoblastes miR-98 KD.

Gène	Variation d'expression (fold change), miR-98 KD		
	prolif	early diff	late diff
<i>MEF2A</i>	-1,96	-1,63	-1,32
<i>MEF2B</i>	-1,32	-1,45	-1,85
<i>MEF2C</i>	-1,38	-1,23	-1,13
<i>MEF2D</i>	1,02	-1,16	-1,56
<i>MRF4</i>	1,09	1,14	-1,96
<i>MYF5</i>	-1,53	-1,09	1,03
<i>MYOD</i>	-1,03	1,10	-1,70
<i>MYOG</i>	1,02	-1,05	-1,96
<i>SRF</i>	-1,09	1,04	-2,25

**Tableau 6. Variations d'expression des facteurs de transcription pro-différenciation musculaire dans les myoblastes miR-98 KD.**

Les données présentées ici sont extraites des analyses transcriptomiques présentées dans le Tableau 5. Prol=prolifération, early diff=différenciation précoce, late diff= différenciation tardive.

N=3 expériences indépendantes

Gènes les plus significativement surexprimés dans les myoblastes miR-98 KD (différenciation précoce)

Parmi les 28 gènes les plus significativement surexprimés dans les myoblastes miR-98 KD (différenciation précoce), on retrouve des cibles validées des miARN let-7 (*HMGA2*, *DICER1*, *IL6*...) et des cibles inconnues des miARN let-7 (Figure 17). Parmi ces dernières, certaines contiennent des sites prédits pour les miARN let-7 dans leur 3'UTR (selon Targetscan), et ont donc une forte probabilité d'être des cibles directes des miARN let-7 dans les myoblastes (*PMAIP1*, *MXD1*, *HDHD1*...). *E2F5* est également parmi les gènes les plus fortement surexprimés dans ces myoblastes miR-98 KD.

Variations d'expression, miR-98 KD (fold change)

Gène	early diff	late diff	prolif
HMGA2	3,87	2,02	4,2
IFIT2	2,33	1,45	1,48
INHBE	2,32	1	1,24
MX1	2,28	1,95	1,86
TRIB3	2,27	-1,22	1,13
IGF2BP1	2,16	2,71	2,03
MX2	2,12	2,64	1,46
IL6	2,09	-1,13	1,71
CXCL2	1,97	1,27	2,4
IFI44L	1,95	2,37	1,93
PMAIP1	1,92	1,83	1,32
IFI27	1,91	4,33	1,61
OAS2	1,88	2,3	1,56
IL1A	1,82	1,05	1,08
CLDN1	1,79	-1,33	1,39
ZDHHC3	1,78	1,31	1,39
DICER1	1,78	2,57	1,84
IFIT3	1,77	1,81	1,78
RPL32	1,77	1,42	1,7
EPST11	1,74	1,91	2,23
IGF2BP2	1,72	1,78	1,3
IFITM1	1,72	2,76	1,71
STK40	1,7	1,27	1,11
MXD1	1,7	1,17	1,38
E2F5	1,7	1,55	1,58
HERC6	1,7	2,12	1,89
HDHD1	1,7	2,09	1,62
CCL5	1,7	3,41	1,79

**Figure 17. Variations d'expression des gènes les plus significativement surexprimés dans les myoblastes miR-98 KD (différenciation précoce)**

Les données présentées ici sont extraites des mêmes analyses transcriptomiques présentées dans le Tableau 5. early diff= différenciation précoce, late diff= différenciation tardive prol=prolifération

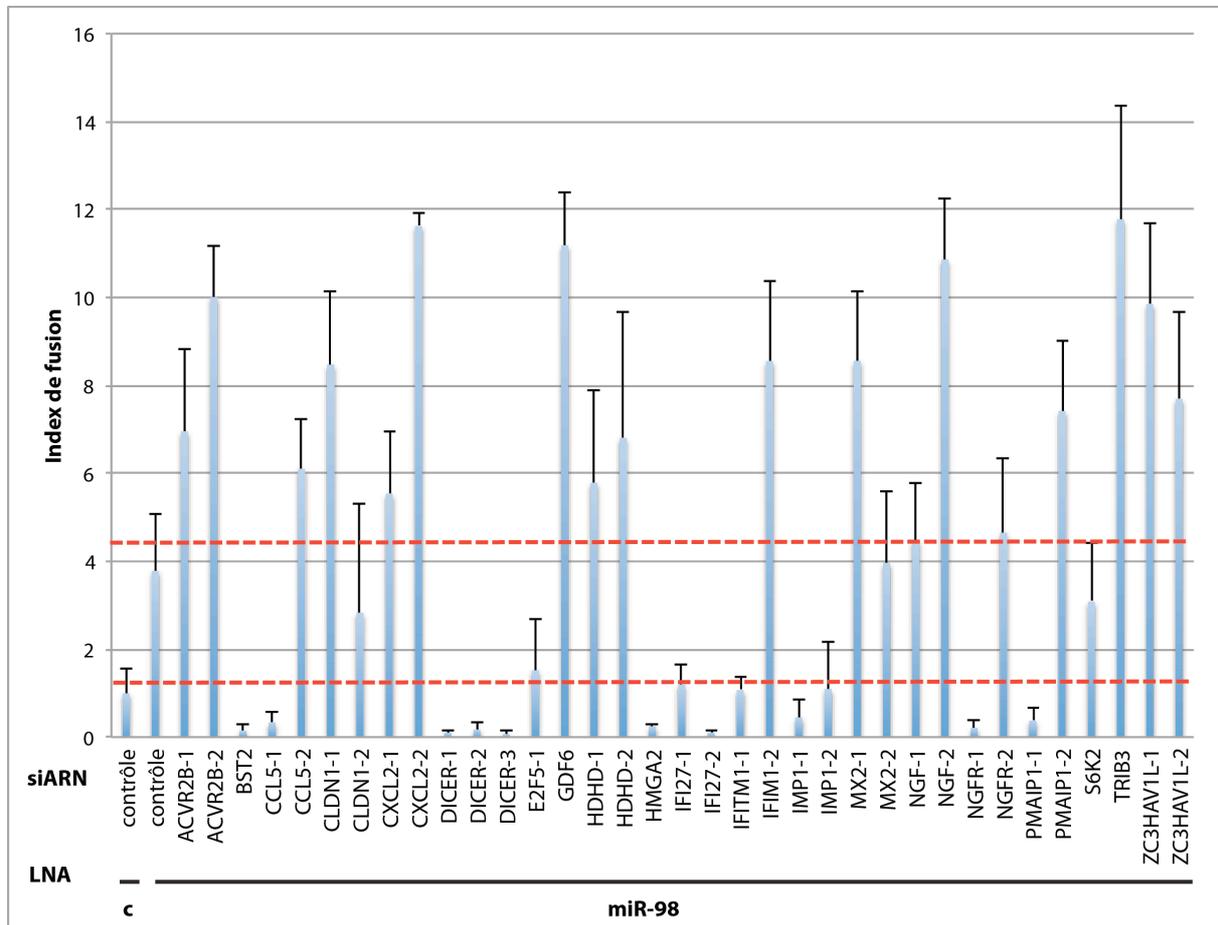
En rouge : cibles validées des miARN let-7, en violet : cibles potentielles des miARN let-7 (contenant des sites prédits pour les miARN let-7).

N=3 expériences indépendantes

## Recherche de cibles fonctionnellement importantes de miR-98

Nous avons utilisé le STarS assay (voir Article 1-Figure 4) afin d'évaluer si certains gènes significativement surexprimés dans les myoblastes miR-98 KD étaient des cibles fonctionnelles importantes de miR-98 (Figure 18). Nous avons ainsi réalisé des essais double perte de fonction : miR-98 par un antisens LNA (Locked Nucleic Acid) / gène d'intérêt par un siARN. Si une cible est fonctionnellement importante, son inhibition dans les myoblastes miR-98 KD sera capable de restaurer un phénotype de différenciation normal (diminution de la différenciation jusqu'au niveau du double contrôle LNA contrôle/siARN contrôle). Parmi une vingtaine de siARN, le siARN contre *E2F5* donnait la meilleure restauration du phénotype (nous avons ensuite validé ce résultat par deux autres siARN *E2F5* - voir Article 2). Le siARN contre *S6K2* restaurait en partie le phénotype. Un siARN contre *IFI27* était capable de restaurer un niveau de différenciation presque normal, mais un second siARN contre *IFI27* inhibait complètement la différenciation musculaire. L'inhibition de certains gènes réprimait complètement la différenciation musculaire (*BST2*, *DICER*), tandis que d'autres renforçaient l'effet d'hypertrophie musculaire du LNA miR-98 (*ACVR2B*, *GDF6*, *TRIB3*). Enfin, l'inhibition de certains gènes par deux siARN différents entraînait des phénotypes opposés, ne nous permettant pas de conclure quant à leur effet sur la différenciation musculaire (*NGFR*, *PMAIP1*). *HDHD1*, cible prédite des miARN let-7, ou *ZC3HAV1L*, dont les rôles dans le muscle sont inconnus, semblaient réprimer la différenciation musculaire.

Ces données mettent en avant de potentiels nouveaux régulateurs de la différenciation myogénique dépendants de l'expression des miARN let-7. Les rôles de ces gènes dans la différenciation musculaire, ainsi que la possibilité de leur régulation directe par les miRNAs let-7, reste à étudier.



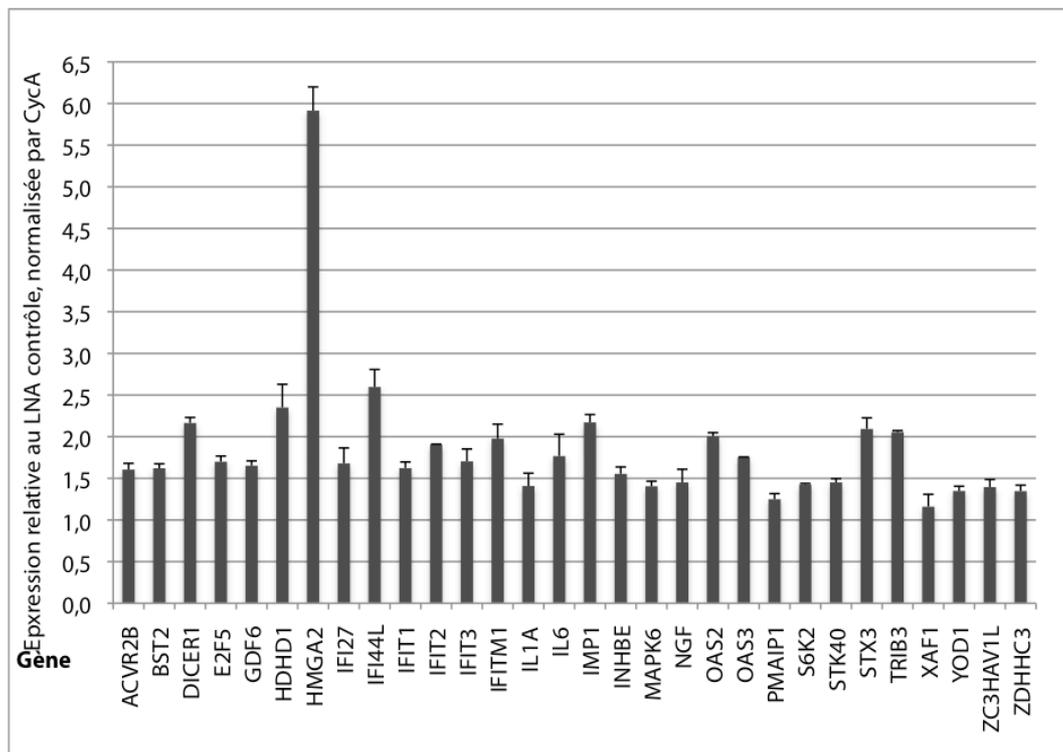
**Figure 18. Quantification des expériences de double perte de fonction miR-98/siARN contre des gènes significativement surexprimés dans les myoblastes miR-98 KD.**

Les myoblastes LHCN ont été transfectés avec les mélanges de LNA/siARN indiqués, à une concentration de 50 nM/50 nM, 1-2 siARN par gène, dont les efficacités ont été précédemment validées par RT-qPCR. Les cellules ont été ensuite mises en conditions de différenciation et analysées 7 jours plus tard par la mesure de l'index de fusion. Ce dernier correspond à la quantification du nombre de noyaux dans des myotubes de trois noyaux ou plus, normalisé par le contrôle (LNA contrôle/siARN contrôle). Les index de fusion du LNA contrôle/siARN contrôle (différenciation normale) et LNA miR-98/siARN contrôle (phénotype d'hypertrophie) sont délimités par les connecteurs rouges, c=contrôle. Ces résultats correspondent à une expérience représentative, réalisée en triplicats.

## Validation des variations d'expression observées dans les myoblastes miR-98 KD

(résultats préliminaires)

Après *E2F5* (Article 2-Fig 2D), nous avons voulu confirmer les variations d'expression d'autres gènes détectées dans les analyses transcriptomiques des myoblastes miR-98 KD. Pour cela nous avons à nouveau réalisé des essais perte de fonction de miR-98 dans des myoblastes LHCN suivis d'analyses par RT-qPCR (Figure 19). Parmi une trentaine de gènes, de nombreuses variations semblent être confirmées. *HMGGA2*, cible validée des miARN let-7, est le gène dont l'expression varie le plus (6 fois). De nombreux gènes de la voie interféron ont leur expression augmentée entre 1,5 et 2 fois (*BST2*, *IFI27*, *IFIT1-3*, *IFITM1*, *OAS2-3*), confirmant les variations observées dans nos analyses transcriptomiques.

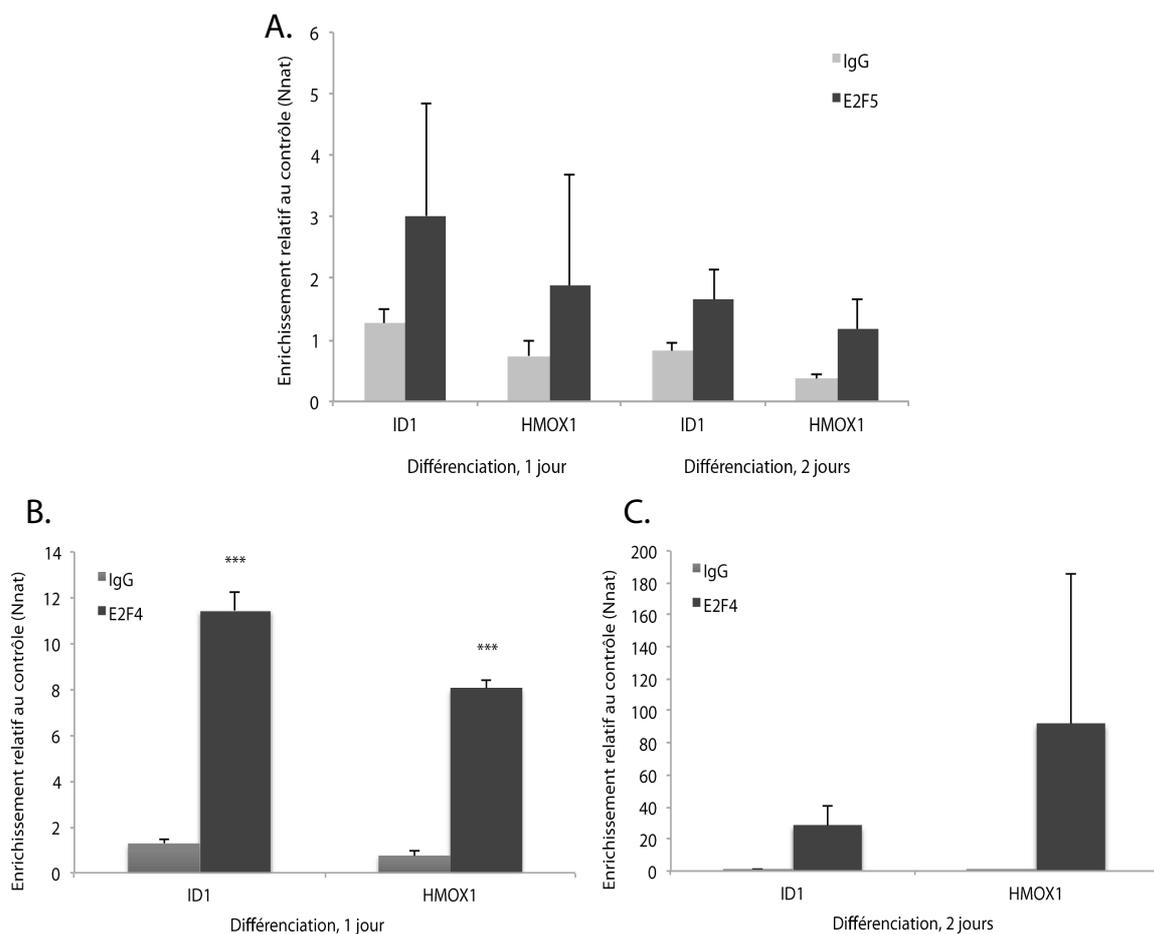


**Figure 19. Validation par RT-qPCR des variations de l'expression des gènes observées sur puces Affymetrix dans des myoblastes miR-98 KD (différenciation précoce).**

Les myoblastes LHCN ont été transfectés avec le LNA miR-98 (100 nM). Après 16h de prolifération, ils ont été placés en conditions de différenciation pour 8h, les ARN ont été ensuite extraits et les variations d'expression analysées par RT-qPCR. Les variations d'expression de chaque gène ont été normalisés par un gène de ménage (*CycA* : cyclophiline A). N=2

## E2F5 ne fixe pas les promoteurs de *HMOX1* et *ID1* à 1 et 2 jours de différenciation musculaire

Nous avons montré que E2F5 et E2F4 fixent les promoteurs de *HMOX1* et de *ID1* dans des myoblastes C2C12 en prolifération et à 3 jours de différenciation (Article 2-Figure 4B). Nous avons également étudié la fixation de E2F4 et E2F5 sur les promoteurs de leurs cibles *HMOX1* et *ID1* à 1 et 2 jours de différenciation musculaire (myoblastes C2C12), par ChIP suivie de qPCR (Figure 20). Les promoteurs de *HMOX1* et de *ID1* ne sont pas significativement enrichis ( $p$ -value > 0,05 d'après un t-test) à 1 et 2 jours de différenciation dans les éluats de ChIP E2F5, indiquant que E2F5 ne les fixe pas. E2F4 en revanche, fixe les promoteurs de *ID1* et de *HMOX1* à 1 jour de différenciation, mais ne les fixe plus à 2 jours (résultats non significatifs,  $p$ -value > 0,05).



## **Figure 20. Expériences de ChIP de E2F4 et E2F5 dans des myoblastes à 1 et 2 jours de différenciation**

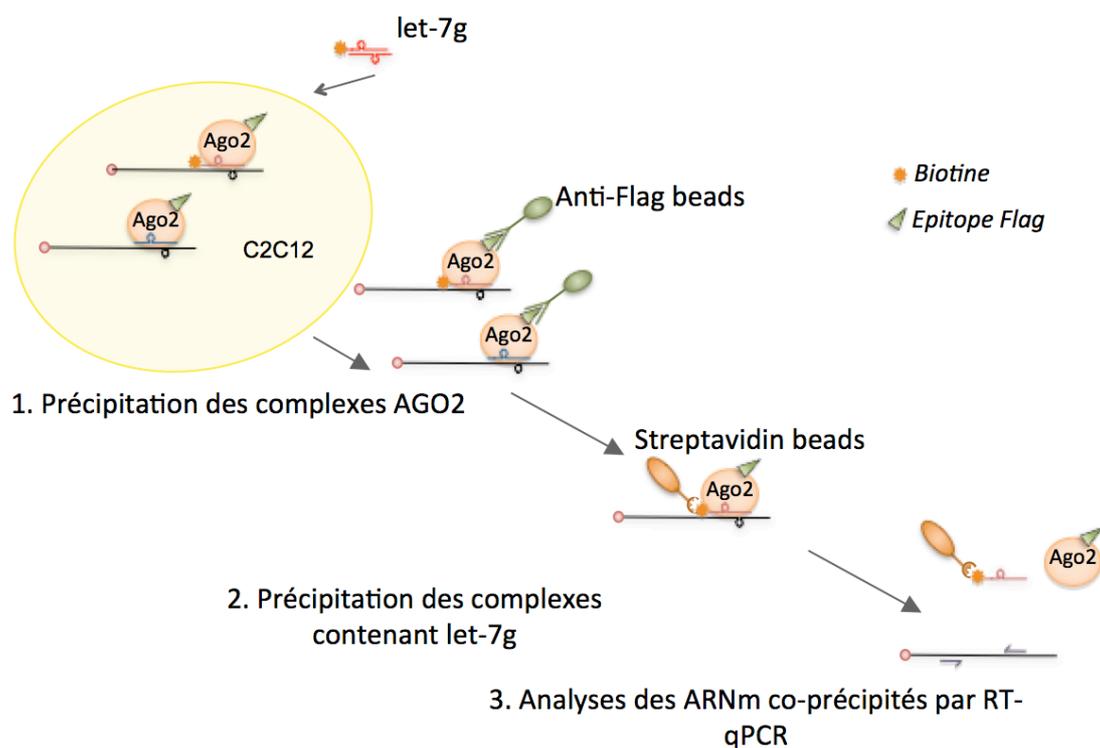
- A. ChIP de E2F5 à 1 et 2 jours de différenciation. B. ChIP de E2F4 à 1 jour de différenciation.
- C. ChIP de E2F4 à 2 jours de différenciation.

Les données présentées ici proviennent des expériences de ChIP réalisées pour l'Article 2 dans des myoblastes C2C12. Les résultats sont présentés ici en % d'enrichissement par rapport à un contrôle négatif non fixé par E2F4-E2F5 (Nnat=neuronatin)

\*\*\* :  $p < 0,001$  (t-test). N=4 (1 jour de différenciation) ; N=3 (2 jours de différenciation).

### Le TAP-Tar, une méthode biochimique pour valider des cibles des miARN let-7

En parallèle des tests perte de fonction de miR-98 suivi de puces Affymetrix (Article 2-Figure 1G-H), nous avons développé une autre méthode afin de caractériser les cibles de miR-98 (et d'autres miARN, comme miR-365-voir Article 1) dans des myoblastes. Afin de purifier de nouvelles cibles directes des miARN let-7 dans des myoblastes, j'ai adapté et amélioré le TAP-Tar, technique de purification de cibles de miARN (Nonne and Ameyar-Zazoua, 2009), à des myoblastes C2C12 (Figure 21).

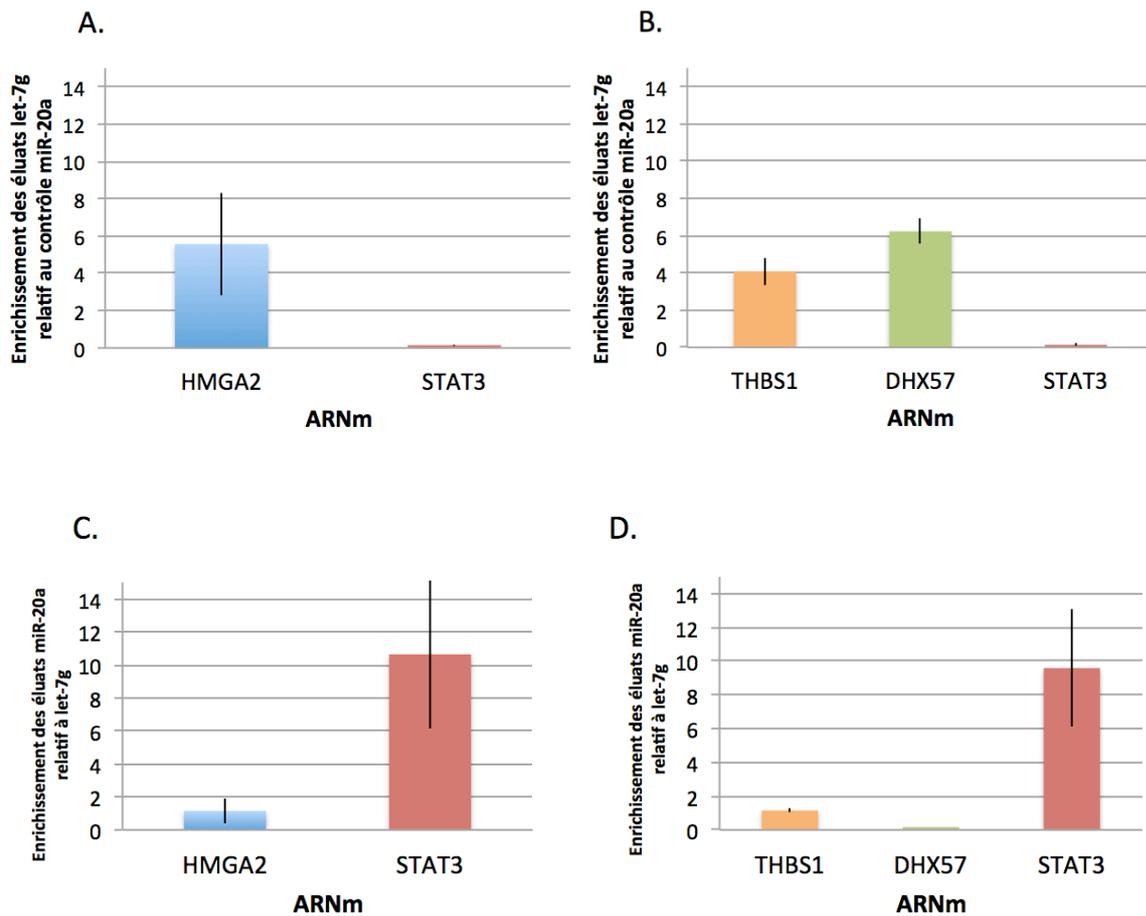


**Figure 21. Principe de la technique de TAP-Tar**

Illustration réalisée à partir des résultats de (Nonne and Ameyar-Zazoua, 2009). Le miARN d'intérêt (ici let-7g) est biotinylé et est transfecté dans une lignée de myoblastes surexprimant une version taguée d'AGO2 (Flag/HA). Les complexes AGO2 tagués (contenant l'ensemble des miARN de la cellule associés à leurs cibles ARNm) sont ensuite précipités par des billes anti-Flag (1). Une seconde étape de purification est réalisée grâce à des billes de streptavidine, qui ont une très forte affinité pour la biotine, et permettent ainsi de purifier les complexes RISC contenant spécifiquement let-7g et ses cibles ARNm. Les ARNm précipités sont ensuite quantifiés par RT-qPCR.

Le TAP-Tar suivi de RT-qPCR m'a permis de montrer plusieurs nouvelles interactions entre miARN et leurs cibles dans des myoblastes C2C12. J'ai ainsi purifié de nouvelles cibles ARNm de miR-365 (Article 1). J'ai ensuite utilisé le TAP-Tar afin de valider de nouvelles cibles des miARN let-7. *HMG2*, cible validée des miARN let-7, est fortement enrichie après TAP-Tar dans les éluats let-7g (comparé aux éluats contrôle miR-20a) (Figure 22-A). Cela montre que la technique fonctionne pour let-7g. De nouvelles cibles ARNm de let-7g ont ensuite été purifiées par TAP-Tar : *THBS1* (thrombospondine 1) et *DHX57* (DEAH (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 57) (Figure 22-B). A l'inverse dans les éluats miR-20a, la cible

ARNm validée de miR-20a *STAT3* est très enrichie (miR-20a est utilisé ici comme un miARN contrôle) (Figure 22-CD).



**Figure 22. Résultats d'expériences de TAP-Tar de let-7g et de miR-20a**

Le TAP-Tar a été réalisé pour let-7g versus miR-20a, suivis de RT-qPCR pour les ARNm indiqués. Les résultats sont présentés en ratio entre les valeurs pour le miARN d'intérêt comparé à son miARN contrôle. Le miARN contrôle n'a pas de site d'interaction prédit pour les ARNm cibles de notre miARN d'intérêt. A. TAP-Tar let-7g montrant l'enrichissement de l'ARNm *HMG2* dans les éluats let-7g. B. TAP-Tar let-7g montrant l'enrichissement en nouvelles cibles ARNm *THBS1* et *DHX57* dans les éluats let-7g. C-D. TAP-Tar miR-20a montrant un fort enrichissement en ARNm *STAT3* dans les éluats miR-20a.

N=5 expériences indépendantes

Nous avons ensuite voulu essayer de déterminer par cette approche de nouvelles cibles de let-7g à plus large échelle dans des myoblastes C2C12 (en état de prolifération). Dans ce but, il est nécessaire d'analyser les éluats let-7g obtenus par TAP-Tar par des

approches à l'échelle du transcriptome (puces d'expression ou RNA-seq). De précédents essais dans le laboratoire avaient échoué, probablement en raison des faibles quantités d'ARN récupérées dans les éluats après TAP-Tar (quelques ng). Dans ce but, nous avons effectué un TAP-Tar let-7g vs miR-20a suivie d'une pré-amplification d'ARN sur les éluats. Cette dernière a permis d'obtenir 1-2 µg d'ADN complémentaire (quantité suffisante pour des puces d'expression) à partir des quelques ng des éluats finaux (Ovation PicoSL v2, Nugen). Cette pré-amplification a été suivie de puces d'expression (Affymetrix Human Gene 1.1 ST), ce qui nous a permis d'analyser les variations du transcriptome entre les éluats let-7g et miR-20a (Tableau 7). Nous avons d'abord évalué l'enrichissement de cibles connues des miARN let-7 dans les éluats let-7, afin d'avoir une estimation de la fiabilité de cette méthode. Nous avons ainsi observé que certaines cibles ARNm de let-7g sont fortement enrichies dans les éluats let-7 analysés sur puces d'expression : *DICER1*, *E2F2*, *IGF2BP1* (IMP1), *TGFBR1*... Cependant, de nombreuses cibles connues des miARN let-7 ne sont pas enrichies dans ces éluats : *CCND1*, *LIN28A*, *HMGGA2*...

Gène	Variation d'expression let-7g/miR-20a	Signal miR-	
		Signal let-7g	20a
<i>ITGB3</i>	10,76	9,45	6,02
<i>BCL7A</i>	9,07	9,75	6,56
<i>TGFBR1</i>	6,13	9,01	6,40
<i>KLK10</i>	4,95	7,22	4,91
<i>DICER1</i>	4,53	12,34	10,16
<i>E2F2</i>	4,25	8,27	6,18
<i>PBX2</i>	3,18	9,47	7,80
<i>IGF2BP1</i>	2,21	6,45	5,31
<i>HRAS1</i>	2,1	6,56	5,49
<i>NF2</i>	2,1	5,94	4,86
<i>NRAS</i>	1,92	11,82	10,88
<i>HMGA2</i>	1,76	5,25	4,43
<i>KRAS</i>	1,51	9,24	8,64
<i>CASP3</i>	1,44	7,99	7,47
<i>DAD1</i>	1,25	11,47	11,15
<i>SMOX</i>	1,12	5,27	5,10
<i>KRT19</i>	1,1	5,03	4,90
<i>PRDM1</i>	1,04	3,77	3,72
<i>LIN28A</i>	-1	4,92	4,92
<i>WNT1A</i>	-1,15	4,12	4,31
<i>FANCD2</i>	-1,17	4,42	4,64
<i>EIF2C4</i>	-1,23	2,99	3,29
<i>TRIM71</i>	-1,25	4,61	4,93
<i>DRD3</i>	-1,29	4,15	4,52
<i>SMC1A</i>	-1,35	7,05	7,48
<i>CDK6</i>	-1,37	7,19	7,65
<i>RAVER2</i>	-1,44	3,8	4,33
<i>EIF4G2</i>	-1,46	11,86	12,41
<i>CDC25A</i>	-1,47	10,24	10,8
<i>E2F5</i>	-1,48	9,35	9,91

<i>CCND1</i>	-1,8	12,28	13,13
<i>TUSC2</i>	<b>-2,23</b>	8,45	9,61
<i>TLR4</i>	<b>-3,52</b>	6,27	8,09

**Tableau 7. Variations d'expression de cibles validées de let-7g dans les éluats let-7g et miR-20a.**

Après TAP-Tar de let-7g vs miR-20a, les éluats ont subi une pré-amplification d'ARN avant d'être analysés sur puces d'expression (Affymetrix).

### Article 3

Durant ma thèse, j'ai également contribué au projet de recherche de Selim Boudoukha, alors doctorant dans mon laboratoire. Ses travaux ont montré un nouveau rôle du miARN let-7g dans les myoblastes. Let-7g régule la motilité de myoblastes C2C12 en réprimant directement l'ARNm de PINCH-2, une protéine impliquée dans le remodelage des adhésions focales.

Dans le cadre de ce projet j'ai étudié notamment les variations d'expression du miARN let-7g endogène durant la différenciation musculaire. Ce dernier est exprimé de façon stable dans les myoblastes en prolifération et en différenciation, il ne varie pas de façon significative au cours de la myogénèse. J'ai également cherché à montrer une interaction directe entre le miARN let-7g et l'ARNm de PINCH-2 par la technique de TAP-Tar, ce qui s'est révélé difficile (probablement en raison de l'expression relativement faible de l'ARNm PINCH-2 endogène). Cette interaction a pu ensuite être démontrée par la technique du test luciférase.

Ces résultats ont fait l'objet d'un article publié dans la revue FEBS Letters, et dont je suis co-auteur:

**Boudoukha, S., Vargas, T.R., Dang, I., Kropp, J., Cuvellier, S., Gautreau, A., and Polesskaya, A. (2014). MiRNA let-7g regulates skeletal myoblast motility via Pinch-2. FEBS Lett. 588, 1623–1629.**

L'article est accessible sous ce lien :

<http://www.febsletters.org/article/S0014-5793%2814%2900186-0/abstract>

# DISCUSSION

Les miARN de la famille let-7 ont été montrés comme importants dans la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire de nombreux tissus chez plusieurs organismes, de *C. elegans* jusqu'à l'homme (Boyerinas et al., 2010). De façon surprenante, aucune étude n'avait jamais reporté un quelconque rôle des miARN let-7 dans la myogénèse. De plus, les miARN let-7 se comportent différemment dans le muscle. Alors qu'ils ont majoritairement été décrits comme des miARN favorisant le processus de différenciation cellulaire, nous avons montré que dans le muscle ils répriment ce procédé. Il était donc particulièrement intéressant de comprendre comment les miARN let-7 retardent la différenciation musculaire. Lors de ma thèse, j'ai pu montrer que l'effet des miARN let-7 sur la différenciation était dû à leur action sur de nouvelles cibles, dont le facteur de transcription E2F5. Ce dernier, également important pour des processus de différenciation cellulaire dans divers tissus, n'avait jamais été étudié dans le cadre de la différenciation musculaire.

### **Phénotype d'hypertrophie dû à l'inhibition des miARN let-7**

Nous avons observé une forte accélération de la différenciation musculaire lorsque le membre de la famille let-7 miR-98 est inhibé dans des myoblastes (myoblastes miR-98 KD) (Article 2 Figure 1C-F). Mais l'inhibiteur de miARN utilisé, un antisens LNA (Locked Nucleic Acid) contre miR-98, inhibe également la plupart des membres de la famille let-7 (Article 1 Figure S1). Il est en effet difficile de concevoir un inhibiteur contre un seul miARN let-7, ces derniers étant très similaires. L'effet que nous observons n'est donc pas dû uniquement à l'inhibition de miR-98 mais de plusieurs membres de la famille let-7.

Les membres de la famille let-7 ont des fonctions redondantes et sont très similaires (Boyerinas et al., 2010; Roush and Slack, 2008). On pourrait considérer que c'est la quantité totale des miARN let-7 (ou pool) qui est importante, plutôt que celle d'un membre en particulier. Lorsque nous avons surexprimé let-7g ou miR-98, nous avons obtenu l'effet inverse (retard de différenciation musculaire). Mais ce phénotype était beaucoup moins prononcé. Cela est probablement dû au fait que les miARN let-7 sont déjà suffisamment exprimés et que la surexpression de l'un d'entre eux ne fait qu'augmenter légèrement leur quantité totale et leur action. L'inhibiteur LNA contre miR-98, lui, fait drastiquement diminuer la quantité totale des miARN let-7 et a donc un effet plus prononcé sur le phénotype.

Toutefois, il n'est pas exclu que des membres de la famille let-7 aient des rôles spécifiques. Une étude a ainsi reporté des niveaux d'activités différents de deux membres, let-7b et let-7i dans le même système : les neurones (Cimadamore et al., 2013). La surexpression de ces derniers réprime la prolifération et la différenciation neuronale à des intensités très différentes. De même, nous avons observé, de manière plus modérée, une légère différence d'efficacité entre miR-98 et let-7g sur l'inhibition de la différenciation musculaire (voir Article 1 Figure 3c). Les miARN let-7 ont tous la même séquence « seed » chez l'homme mais montrent quelques différences mineures dans leur séquence du brin mature (Figure 15) (Mondol and Pasquinelli, 2012). On peut imaginer que ces légères différences puissent entraîner des spécificités vis à vis de certaines cibles, voire une inhibition plus efficace sur d'autres cibles. Cela pourrait passer via des interactions secondaires (notamment les nucléotides 13 à 16, qui peuvent varier entre les différents miARN let-7, et peuvent être zone de complémentarité parfaite avec l'ARNm) (Figure 12) (Filipowicz et al., 2008).

Nous noterons également que les phénotypes observés sont uniquement dus à un effet des miARN let-7 sur la différenciation et non sur la prolifération cellulaire (Résultats non montrés).

Le phénotype d'hypertrophie musculaire observé est donc dû à la diminution de la quantité générale des miARN let-7. Il n'aura toutefois pas permis de discriminer entre de possibles différences d'activités entre les membres de la famille let-7.

### **Cibles des miARN let-7 dans les myoblastes et myotubes**

La majorité des miARN agissant sur la dégradation des ARNm (Guo et al., 2010) (voir page 68), nous avons choisi une approche transcriptomique à large échelle : l'analyse des variations du transcriptome par micropuces (Affymetrix), afin de caractériser les cibles des miARN let-7 et de comprendre leur effet sur la différenciation musculaire. Des approches transcriptomiques pour les miARN let-7 ont été utilisés précédemment par d'autres groupes. Une étude a ainsi reporté les variations du transcriptome entraînées par une surexpression de let-7b, et ainsi caractérisé d'éventuelles cibles des miARN let-7 dans des cellules cancéreuses humaines (Johnson et al., 2007). Notre approche utilisant un LNA est différente et nous permet d'étudier globalement l'action des miARN let-7 sur la différenciation musculaire.

Nos analyses transcriptomiques nous ont permis d'identifier pas loin de 240 gènes qui sont significativement surexprimés dans les myoblastes miR-98 KD (Article 2 Table S1). Les

miARN let-7 régulent donc la différenciation musculaire en agissant sur l'expression de très nombreux gènes. Ces derniers peuvent être des cibles directes comme indirectes des miARN let-7. Parmi eux, nous avons retrouvé certaines cibles connues des miARN let-7 (*HMG2*, *DICER1*, *IL6*, *IGF2BP1*...), mais aussi de nombreuses cibles inconnues (avec des sites prédits pour les let-7 ou non prédits) (Résultats supplémentaires-Figure 17) (Article 2-Table S1). La présence de cibles connues des miARN let-7 confirme la pertinence de cette approche pour identifier de nouvelles cibles des miARN let-7 dans ces myoblastes et myotubes.

Nous avons poursuivi notre étude avec un crible fonctionnel, utilisant les siARN contre des cibles potentielles dans les myoblastes miR-98 KD, afin de restaurer le phénotype de différenciation normale. Parmi ces siARN (27 cibles ont été au sélectionnées au préalable), celui qui donnait la meilleure restauration du phénotype était le siARN contre *E2F5* (effet confirmé par deux autres siARN *E2F5*). Ce dernier était aussi la seule à être une cible prédite des miARN let-7, d'où notre choix d'explorer cette voie.

L'inhibition de deux autres ARNm, *IFI27* (interferon-alpha inducible protein 27, aussi appelé ISG12A) et *S6K2*, était capable de rétablir partiellement (*S6K2*), ou totalement (*IFI27*) une différenciation « normale » une fois co-transfectés avec le LNA contre miR-98 (Résultats supplémentaires-Figure 18). Ces deux ARNm n'ont pas de sites pour la famille let-7, et sont donc possiblement des cibles indirectes des miARN let-7.

*S6K2*, homologue de *S6K1* est un effecteur de la voie IGF/AKT/MTOR, voie activatrice de la myogénèse (voir page 24). Il est important pour l'augmentation de la synthèse protéique lors de la myogénèse. Les miARN let-7 ont été montrés comme régulant la tolérance au glucose en réprimant de multiples gènes de la voie IGF (voir page 79). Toutefois, nous n'avons pas retrouvé les gènes en question (*IGF1R*, *INSR*, *AKT2*, *PI3K*), ni d'autres gènes de la voie (*IGF2R*, *AKT1*) comme significativement surexprimés dans les myoblastes miR-98 KD. L'implication de la voie IGF/AKT/MTOR dans le phénotype observé dans les myoblastes miR-98 KD a donc été jugée peu probable.

*IFI27* code, lui, pour une petite protéine mitochondriale de la voie interféron (Rosebeck and Leaman, 2008). L'interféron (alpha, beta ou gamma) est une cytokine qui a de multiples effets sur les cellules. Il régule la réponse immunitaire, la croissance cellulaire ou encore l'apoptose (Kalliolias and Ivashkiv, 2010; Schroder et al., 2004). Il est capable d'induire l'expression d'une centaine de gènes (Sen and Sarkar, 2007). Nombre d'entre eux ont été peu étudiés. C'est le cas de *IFI27*, dont le rôle dans le muscle est inconnu. *IFI27* est l'un des gènes les plus induits en réponse à l'interféron et serait l'un de ses effecteurs dans l'induction de l'apoptose (Cheriyath et al., 2011; Rosebeck and Leaman, 2008). Il est possible

que la protéine IFI27 stimule la différenciation musculaire via l'induction des caspases 3 et 9, activatrices de la myogénèse (Fernando et al., 2002; Murray et al., 2008; Rosebeck and Leaman, 2008). Néanmoins, un second siARN contre *IFI27* ne restaurait pas une différenciation normale, mais inhibait fortement la différenciation des myoblastes miR-98 KD (Résultats supplémentaires-Figure 18). Cette observation ne nous a pas permis d'inclure IFI27 parmi les cibles fonctionnellement importantes des miARN let-7 dans les myoblastes en différenciation.

En choisissant l'approche par puces Affymetrix nous avons certainement manqué quelques cibles qui seraient uniquement inhibées au niveau traductionnel. En effet, dans certains cas plus minoritaires, les miARN inhibent la traduction sans effet sur l'ARNm (Baek et al., 2008). L'approche de spectrométrie de masse à large échelle (SILAC) utilisée par le laboratoire du Dr Rajewsky pour les miARN let-7, permet de mesurer les variations du protéome induites par un miARN et donc de détecter ses cibles uniquement inhibées au niveau traductionnel (Selbach et al., 2008) (voir page 68). Mais cette approche étant très coûteuse, le bénéfice à en tirer par rapport à son prix n'aurait été que limité pour le projet.

Nous avons ainsi montré que les miARN let-7 agissent sur de nombreuses cibles dans la différenciation musculaire, et que certaines d'entre elles semblent importantes pour l'effet de répression de la différenciation musculaire des miARN let-7.

## **Le TAP-Tar, une technique biochimique pour purifier les cibles des miARN let-7**

Le TAP-Tar, technique que j'ai adaptée et améliorée dans les C2C12, constitue une bonne technique alternative au test luciférase pour déterminer les cibles d'un miARN. Le TAP-Tar permet de valider qu'un miARN interagit bien avec sa cible ARNm au sein du complexe RISC dans la cellule. De plus, le protocole est bien plus simple et rapide qu'un clonage suivi de test luciférase (Nonne and Ameyar-Zazoua, 2009). Le TAP-Tar permet en outre de déterminer plusieurs cibles d'un miARN à la fois. Un éluat de miARN récupéré pour une expérience permet en théorie de quantifier au maximum entre 30 et 40 cibles de ce miARN. J'ai pu valider plusieurs cibles de miARN avec un bon enrichissement (Article 1) (Figure 22). Cependant, l'efficacité de la technique est dépendante de chaque cible. Pour certaines cibles j'ai dû utiliser jusqu'à 5 fois plus de matériel pour une RT-qPCR, limitant ainsi le nombre de cibles que l'on peut valider par expérience. D'autres cibles se sont révélées impossibles à purifier, par exemple l'ARNm de PINCH-2 pour let-7g. Ces différences

d'efficacité pourraient être dues au niveau d'expression de la cible ainsi qu'à sa force d'interaction avec le miARN. L'approche TAP-Tar suivie de puces d'expression Affymetrix est une technique originale qui pourrait permettre de combler un gros manque dans le domaine des miARN (Tableau 7). En effet, il n'existe pas à ce jour de technique à l'échelle du transcriptome permettant de déterminer l'ensemble des cibles d'un miARN. Mes résultats montrent de manière intéressante que plusieurs cibles des miARN let-7 sont enrichies dans les éluats let-7g (Tableau 7). Toutefois, de nombreuses cibles validées des miARN let-7 ne sont pas enrichies dans ces éluats. De plus, nous avons observé un fort « bruit de fond » dans ces expériences, la grande majorité des cibles présentes dans les éluats let-7g n'ayant aucun site prédit pour les miARN let-7. Ces résultats suggèrent que la technique n'est pas suffisamment sélective pour permettre une détermination de cibles d'un miARN à large échelle.

### **Action anti-différenciation des miARN let-7**

Les miARN let-7 sont généralement connus pour favoriser le processus de différenciation dans de nombreux types cellulaires (neurones, adipocytes...) chez l'homme et la souris (Ventayol et al., 2014; Zhao et al., 2010) (voir page 76). Mes résultats montrent, de manière surprenante, que dans le muscle les miARN let-7 ont un effet différent, puisqu'ils répriment la différenciation musculaire. Les miARN let-7 sembleraient avoir plusieurs cibles lors de la différenciation musculaire, ce qui pourrait expliquer en partie leur action anti-différenciation. La régulation de la différenciation cellulaire par les miARN let-7 est ainsi très complexe et semblerait dépendre du contexte cellulaire. Cela est confirmé par le fait que l'action des miARN let-7 peut aussi varier au cours de la différenciation musculaire. En effet, mes analyses transcriptomiques ont montré que les cibles régulées par miR-98 entre des cellules en prolifération, en différenciation précoce ou tardive ne sont pas les mêmes (Article 2-Figure 1H et Table S1). Seul 13 gènes, soit 5% du total, sont significativement surexprimés à la fois en prolifération, en différenciation précoce et tardive (Article 2 Table S1).

Certaines cibles des miARN let-7 ont été montrées comme importantes dans la différenciation cellulaire (voir page 76). Il semble cependant difficile de dégager un « consensus » de cibles des miARN let-7 fonctionnellement importantes dans la différenciation de tous ces types cellulaires. Chaque type cellulaire a des spécificités pour déclencher le processus de différenciation, entre autres des facteurs de transcription (les MRF dans le cas de la myogénèse). Toutefois, certains gènes et voies cellulaires semblent être des

cibles fonctionnelles des miARN let-7 partagées par plusieurs types cellulaires en différenciation. C'est le cas de la biogénèse des miARN let-7 avec DICER et LIN28A. Ce dernier a été montré comme jouant un rôle dans les différenciation neuronale et musculaire (Cimadamore et al., 2013; Polesskaya et al., 2007). De nombreux activateurs du cycle cellulaire, comme CCND1, sont des cibles des miARN let-7 (voir page 75). Leur diminution est importante pour la sortie du cycle cellulaire liée à la différenciation. Ce consensus hypothétique de cibles des miARN let-7 dans la différenciation cellulaire sera donc probablement composé d'un noyau de cibles communes pour plusieurs types de cellules et de tissus, et complété par des cibles tissu-spécifiques, individuelles dans chaque cas. Nous ne nous sommes pas intéressés à ces cibles déjà connues et avons étudié le mécanisme d'action d'une nouvelle cible des miARN let-7 dans les myoblastes : E2F5.

### Voies régulées par les miARN let-7 lors de la différenciation musculaire

Parmi les ARNm significativement régulés (surexprimés ou sous-exprimés) dans les myoblastes miR-98 KD, nous avons observé la présence de nombreux gènes de la voie TGF- $\beta$  (Article 2). Elle a été montrée comme étant la voie la plus enrichie parmi les gènes régulés en différenciation précoce, et la troisième plus enrichie en différenciation tardive.

La régulation de la voie TGF- $\beta$  par les miARN let-7, semblerait, du moins pour certains de ses gènes, passer par la répression de E2F5. Nous avons en effet observé que sans E2F5, deux membres de la famille, la myostatine et TGF- $\beta$ 3 sont surexprimés (Article 2- Figure 4A). Dans les myoblastes miR-98 KD, ils sont à l'inverse sous-exprimés (en prolifération et différenciation précoce pour TGF- $\beta$ 3, en différenciation tardive pour la myostatine) (Article 2-Table 1).

Nous n'avons pas confirmé ces gènes comme cibles directes de E2F5 par ChIP, mais il est très intéressant que E2F5 puisse réguler cette voie qui est fortement inhibitrice de la différenciation musculaire. Des études supplémentaires seraient nécessaires pour déterminer les liens exacts entre miR-98, E2F5, TGF- $\beta$  et la différenciation musculaire. Nous avons ici observé des variations de l'expression de gènes de la voie, sans étudier si cela impacte réellement sur la cascade de signalisation de la voie TGF- $\beta$ . Il serait intéressant de déterminer si miR-98 via la répression de E2F5 entraîne une activation de la voie TGF- $\beta$ .

Parmi les gènes significativement surexprimés dans les myoblastes miR-98 KD, se trouvent également de nombreux gènes impliqués dans la voie interféron, en plus d'*IFI27* :

*IFITM1*, *OAS2-3*, *IFIT1-3*, *IFI44L*, *MXI-2*, *CCL5* (Article 2 Table S1, Résultats supplémentaires- Tableau 5) ...

Ces gènes ont-ils un rôle dans la myogénèse ? De précédentes études ont examiné le rôle de l'interféron dans la myogénèse. Plusieurs gènes « interféron-inductibles » augmentent durant la différenciation musculaire. L'interféron- $\gamma$ , ainsi que certains gènes de cette voie, dont les oligoadénylate synthétases (*OAS1-3*), ont été montrés comme répresseurs de la différenciation musculaire (Bisbal et al., 2000; Londhe and Davie, 2011; Luan et al., 2008). L'interféron-  $\gamma$ , produit par les cellules musculaires, a des effets complexes sur les myoblastes et a aussi été reporté comme favorisant la régénération et la différenciation musculaire (Cheng et al., 2008). Nos résultats ont montré soit une activation, soit une inhibition très forte de la différenciation musculaire à la suite de transfection de siARN contre plusieurs de ces gènes « interféron » (Résultats supplémentaires-Figure 18). Les miARN let-7 semblent impacter cette voie dans la myogénèse. Aucun de ces siARN n'était capable de rétablir une différenciation musculaire normale dans des myoblastes miR-98 KD, laissant suggérer qu'ils ne sont pas des cibles fonctionnellement importantes des miARN let-7.

De manière intéressante, les miARN let-7 semblent réguler de nombreux gènes de la voie TGF- $\beta$ , ainsi que de la voie de réponse à l'interféron, lors de la différenciation musculaire. La sous-expression de nombreux gènes de la voie TGF- $\beta$  dans les myoblastes miR-98 KD pourrait favoriser l'inhibition de la différenciation musculaire.

### Répression d'inhibiteurs de la différenciation musculaire par les miARN let-7

Plusieurs gènes trouvés comme significativement surexprimés dans les myoblastes miR-98 KD sont des répresseurs de la différenciation musculaire. C'est le cas des gènes codant pour les membres de la superfamille TGF- $\beta$  comme *GDF6* (*BMP13*) et *ACVR2B* (récepteur à la myostatine), ou de l'inhibiteur d'AKT *TRIB3* (Inada et al., 1996; Kato and Du, 2007; Lee and McPherron, 2001). Nos résultats montrent que leur inhibition par un siARN dans des myoblastes miR-98 KD augmente très fortement la myogénèse terminale (Résultats supplémentaires-Figure 18).

Malgré l'induction de ces répresseurs, l'inhibition de miR-98 provoque une forte augmentation de la différenciation musculaire. Il me semblerait important de considérer d'une part :

-l'effet des miARN let-7 sur l'ensemble de leurs cibles : les miARN let-7 régulent de nombreuses cibles, à la fois des activateurs et des répresseurs de la différenciation musculaire ;

-l'intensité de la répression: certaines cibles vont être plus diminuées que d'autres ;

-l'interaction avec des voies et des cibles spécifiques de la cellule.

Mes résultats montrent que les miARN let-7 régulent à la fois des activateurs et des inhibiteurs de la différenciation musculaire. Mais au final, c'est l'action des miARN let-7 sur les cibles « activatrices » de la différenciation musculaire qui l'emporte, et entraîne une répression de la différenciation musculaire.

### **Expression des miARN let-7 au cours de la différenciation musculaire**

Plusieurs myomiRs montrent des variations importantes lors de la différenciation musculaire (voir page 79). C'est le cas de miR-1 et miR-206, dont la très forte induction corrèle avec la myogénèse. Nos résultats ne montrent pas de variation importante de l'expression de miR-98 et let-7g dans des myoblastes LHCN (Article 1-Figure 2C) ou C2C12 (Article 3-Figure 2D).

Certains myomiRs, comme miR-1, ont une expression spécifique au muscle (Ge and Chen, 2011; van Rooij et al., 2008). Les miARN let-7 sont quant à eux ubiquitaires. On pourrait penser que certains miR spécifiques du muscle ont, de par leur cibles et leur expression, une action spécifique sur la différenciation musculaire. Les miARN let-7, eux, régulent la différenciation cellulaire de nombreux systèmes.

Alors qu'une étude a confirmé ces résultats d'expression, ne trouvant pas de variation significative des miARN let-7 lors de la myogénèse (Dey et al., 2014), une autre équipe a reporté une augmentation énorme d'un miARN let-7 (let-7a) lors de la différenciation musculaire (Kallen et al., 2013) (voir page 82). Cela est surprenant et souligne des différences possibles entre les lignées utilisées.

L'expression des miARN let-7 n'est pas modifiée au cours de la myogénèse, pourtant les miARN let-7 régulent la différenciation musculaire et leurs cibles changent au cours de ce processus. Cela suggère que l'activité des miARN let-7 pourrait être modifiée durant la différenciation musculaire. Certaines protéines de liaison à l'ARN peuvent coopérer avec les miARN pour la répression d'un ARNm, ou masquer des sites de miARN. C'est le cas notamment d'HuR, qui augmente lors de la myogénèse, et qui a été montré comme aidant au

recrutement des miARN let-7 sur l'ARNm de sa cible MYC et entraînant ainsi sa répression (Kim et al., 2009a). Le raccourcissement du 3'UTR de certaines cibles (et donc la perte des sites let-7) selon le stade de différenciation est une autre hypothèse pour expliquer ces changements de cibles. Ce phénomène est bien décrit pour plusieurs cibles des miARN let-7 dans les cellules cancéreuses humaines (Mayr and Bartel, 2009). La stoechiométrie entre les miARN let-7 et leurs cibles ARNm pourrait aussi intervenir dans la régulation de l'activité des miARN let-7. Les miARN let-7 ciblant des centaines d'ARNm, et l'expression de ces ARNm variant au cours de la différenciation musculaire, certaines cibles ARNm seront plus ou moins inhibées au cours de la myogénèse. Des ARN "éponges" (comme H19) pourraient également réguler l'activité des miARN let-7 en les séquestrant (Kallen et al., 2013). L'expression des miARN let-7 ne variant pas de manière importante lors de la différenciation musculaire, il est donc possible que son activité soit diminuée lors de la myogénèse, afin de favoriser cette dernière.

### **Les miARN let-7 retardent la différenciation musculaire en ciblant E2F5 et ses multiples cibles**

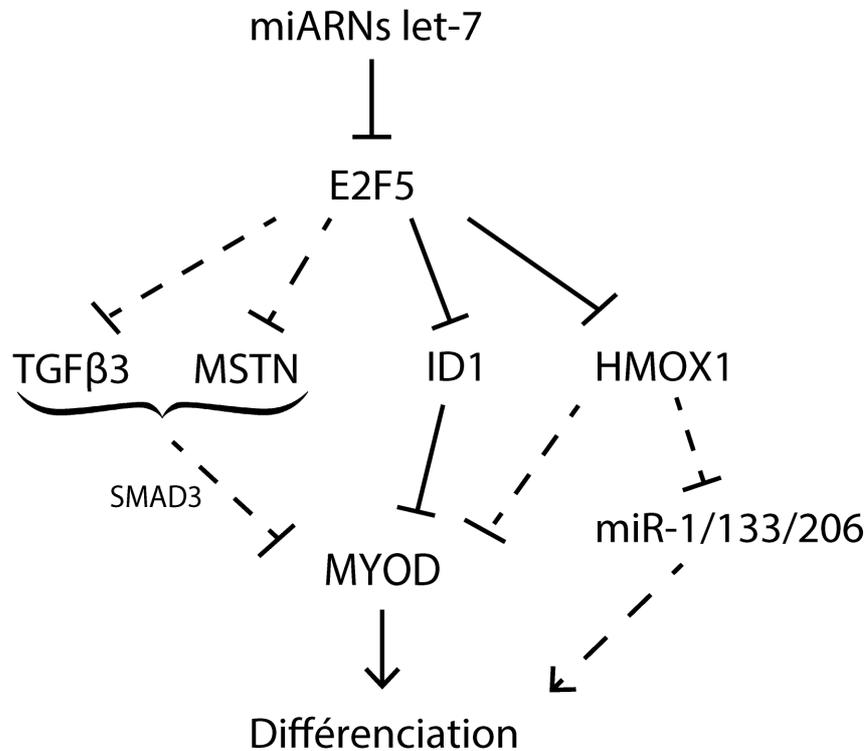
Les miARN let-7 régulent donc de très nombreux gènes lors de la myogénèse. Nous avons pu expliquer l'effet des miARN let-7 sur la différenciation du muscle strié via leur action directe sur le facteur de transcription E2F5, mettant en évidence une nouvelle voie de régulation de la différenciation musculaire: la voie let-7 – E2F5.

Pour comprendre l'action de E2F5 sur la différenciation musculaire, nous avons cherché à déterminer ses gènes cibles. E2F5 est généralement un répresseur transcriptionnel et nos résultats montrent que son expression est augmentée en absence de miR-98. En conséquence, nous avons voulu déterminer de potentielles cibles de E2F5, parmi les gènes significativement réprimés dans les myoblastes miR-98 KD. Les facteurs E2F fixent généralement un site consensus, appelé site E2F, dans les promoteurs de leurs gènes cibles (Rabinovich et al., 2008) (voir page 51). Des algorithmes de prédictions permettent de prédire ces sites E2F, et nous avons donc utilisé l'un d'entre eux (Transfac) pour trouver de potentielles cibles. Toutefois, ces algorithmes peuvent donner des faux positifs. L'utilisation de données de ChIP-sequencing de E2F4 dans des myoblastes C2C12 (ENCODE project, GEO sample accession GSM915187), en parallèle des algorithmes de prédiction, nous a permis d'améliorer notre recherche de cibles, E2F4 et E2F5 fixant généralement les mêmes promoteurs. Ces données (non publiées) montrent notamment de forts pics de E2F4 sur les

promoteurs de *ID1* et *HMOX1*, répresseurs de la myogénèse. Nous avons ensuite pu montrer que E2F5 réprime directement ces nouveaux gènes cibles *ID1* et *HMOX1*.

La protéine ID1 est connue pour réprimer l'activité des MRF en séquestrant les protéines E (voir page 32). L'enzyme HMOX1 est un répresseur des myomiRs miR-1/133/206, et de MYOD dans des myoblastes C2C12 (voir page 35). Comme nous venons de le voir, E2F5 réprime aussi des membres de la voie TGF- $\beta$  : TGF- $\beta$ 3 et la myostatine. Ces derniers ont également été montrés comme répresseurs de MYOD (voir page 38) et semblent être réprimés de manière indirecte par E2F5. Ceci est cohérent avec les données de ChIP-sequencing de E2F4 qui ne montrent pas de fort signal de E2F4 sur les promoteurs de *TGF- $\beta$ 3* et de *MSTN*.

Les miARN let-7 réguleraient donc un large panel de gènes via E2F5. Ce dernier activerait donc la différenciation musculaire en agissant directement ou indirectement sur plusieurs voies de répression de la myogénèse (Figure 23). Il semble fort possible que E2F5 active la différenciation musculaire en augmentant l'expression de miR-1/133/206 et en agissant à de multiples niveaux sur MYOD (Figure 23), mais ces régulations restent à être confirmées. Les miARN let-7 réguleraient ainsi de très nombreux gènes du programme myogénique via E2F5 – ID1 et E2F5 – HMOX1. E2F5 agirait ici comme une sorte d'« amplificateur » du signal de répression de la différenciation musculaire des miARN let-7.



**Figure 23. Mécanisme possible de régulation de la différenciation musculaire par la voie let-7 - E2F5.**

→ : active directement; —| : inhibe directement; - -> : active indirectement; - -| : inhibe indirectement

E2F5 agit comme un amplificateur de l'action des miARN let-7. Il réprime de multiples répresseurs de la différenciation musculaire : ID1, HMOX1, TGF-β3 et MSTN. Ces derniers sont connus pour réprimer la myogénèse en inhibant notamment MYOD. TGF-β3 et MSTN répriment l'expression de MYOD et activent SMAD3, qui interfère avec la formation des complexes MYOD/protéines E. ID1 agit selon un mécanisme similaire à SMAD3, en séquestrant les protéines E (et MYOD) et réprimant l'activité de MYOD et des MRF. HMOX1 réprime indirectement l'expression de MYOD, et inhibe également la biogénèse des myomiRs miR-1/miR-133/miR-206, activateurs de la myogénèse. La voie let-7 – E2F5 pourrait ainsi agir sur la différenciation et sur MYOD à de multiples niveaux.

Les ARNm des MRF ne sont pas significativement surexprimés dans les myoblastes miR-98 KD (Résultats supplémentaires-Tableau 6). L'expression de *MYOD* notamment ne varie pas significativement. Si l'action de la voie let-7 – E2F5 sur MYOD se confirmait, ce serait donc plutôt une régulation post-traductionnelle, ce qui est en accord avec l'action de ID1 et de TGF-β sur MYOD. Il est également possible qu'un éventuel effet de let-7 – E2F5

sur la transcription des MRF se manifeste plus tardivement, nos analyses transcriptomiques ayant été réalisées 24h après transcription du LNA miR-98.

Amplificateur de l'action des miARN let-7, E2F5 cible des répresseurs de la myogénèse comme *HMOX1*, *ID1*, et des membres de la superfamille TGF- $\beta$ . La dérégulation des multiples cibles de E2F5, suite à son inhibition par les miARN let-7, renforcerait ainsi l'effet des miARN let-7 et favoriserait l'inhibition de la myogénèse.

### **Partenaires de E2F5 dans la myogénèse**

Pour explorer plus en détail le mécanisme d'activation de la différenciation musculaire par E2F5, il serait intéressant de déterminer ses protéines partenaires. Il a été montré que E2F5 interagit généralement avec la protéine p130 (ou p107). De plus, p130, qui augmente dans la myogénèse, est la protéine « pocket » majoritaire trouvée dans les complexes E2F lors de la différenciation musculaire (voir page 53). Il resterait à montrer que E2F5 s'associe bien à p130 au cours de la différenciation musculaire.

### **Régulation de l'activité de E2F5 au cours de la différenciation musculaire**

Les variations d'expression de E2F5 induites dans les myoblastes miR-98 KD suffisent-elles à expliquer le phénotype d'hypertrophie ? Sans miARN let-7, l'ARNm et la protéine E2F5 augmentent environ de deux fois. Ces variations de E2F5 suffisent à activer la différenciation musculaire. On note que cet effet de E2F5 est noyé parmi les variations d'expression de centaines de gènes suite à l'inhibition de miR-98. Mais la surexpression de E2F5 seule suffit à accélérer la différenciation musculaire, de même que l'inhibition de E2F5 retarde cette différenciation.

Toutefois, ces systèmes sont artificiels, et ne reflètent pas les variations d'expression de E2F5 au niveau endogène dues aux miARN let-7 durant la différenciation du muscle strié. On note d'ailleurs que les miARN let-7 répriment E2F5 en agissant sur sa quantité d'ARNm. Néanmoins, il est possible que les miARN let-7 inhibent également la traduction de E2F5.

La répression de E2F5 par les miARN let-7 n'est pas le seul mécanisme régulant son activité. Il a été précédemment montré que la localisation de E2F5 était importante pour la régulation de son activité (voir page 50). Dans les kératinocytes par exemple, le changement de localisation de E2F5, cytoplasmique en prolifération, vers le noyau est un événement

important pour la différenciation cellulaire (Apostolova et al., 2002). E2F5 avait jusqu'alors été très peu étudié dans le muscle. Sa translocation dans le noyau serait importante pour la sortie du cycle cellulaire nécessaire à la quiescence de cellules satellites de souris (Reed et al., 2007). Nous avons pour notre part observé que la localisation de E2F5, diffus dans le noyau et le cytoplasme en prolifération, change durant la myogénèse, E2F5 se concentrant dans le noyau des myotubes. Cela laisse suggérer que ce changement de localisation est important pour la différenciation musculaire.

Le mécanisme exact de localisation nucléaire dans la myogénèse reste flou. E2F4 et E2F5, qui ont un NES, ont été montrés comme étant exportés activement du cytoplasme par l'Exportine 1 (XPO1 ou CRM1) (voir page 50) (Gaubatz et al., 2001). On pourrait imaginer une diminution de l'expression de CRM1 au cours de la myogénèse qui participerait à la concentration nucléaire de E2F5. Des modifications post-traductionnelles de E2F5, comme des phosphorylations, pourraient également accompagner ce changement de localisation. Cela a été montré pour E2F4 (Paquin et al., 2013).

Malgré une localisation diffuse dans des myoblastes en prolifération, E2F5 se fixe tout de même aux promoteurs de ses cibles *HMOX1* et *IDI* (Article 2-Figure 4B). Cette fixation serait due à la fraction de E2F5 présente dans le noyau. E2F5 ne semble pas en revanche fixer ses cibles dans les premières phases de la différenciation musculaire (fixation non significative à 1 et 2 jours de différenciation) (Résultats supplémentaires-Figure 20), mais est bien présent en différenciation plus tardive (à 3 jours de différenciation). L'absence de significativité à 1 jour et 2 jours de différenciation pourrait s'expliquer par une trop faible quantité de E2F5 présente dans le noyau. Alternativement, il pourrait y avoir une modification des complexes initiaux formés par E2F5 sur ses promoteurs cibles, ce qui entraînerait une plus forte présence et/ou affinité de E2F5 sur ses promoteurs au début et à la fin de la différenciation. Nos résultats montrent que la fixation de E2F4 aux promoteurs de *HMOX1* et de *IDI* augmente fortement à 3 jours de différenciation par rapport aux myoblastes en prolifération, à l'inverse de E2F5 dont la fixation semble légèrement diminuer. Ces résultats pourraient être dus à une compétition de E2F4 et E2F5 sur leurs promoteurs cibles. Une forte fixation de E2F4 pourrait ainsi expliquer une plus faible fixation de E2F5 à 1 et 2 jours de différenciation.

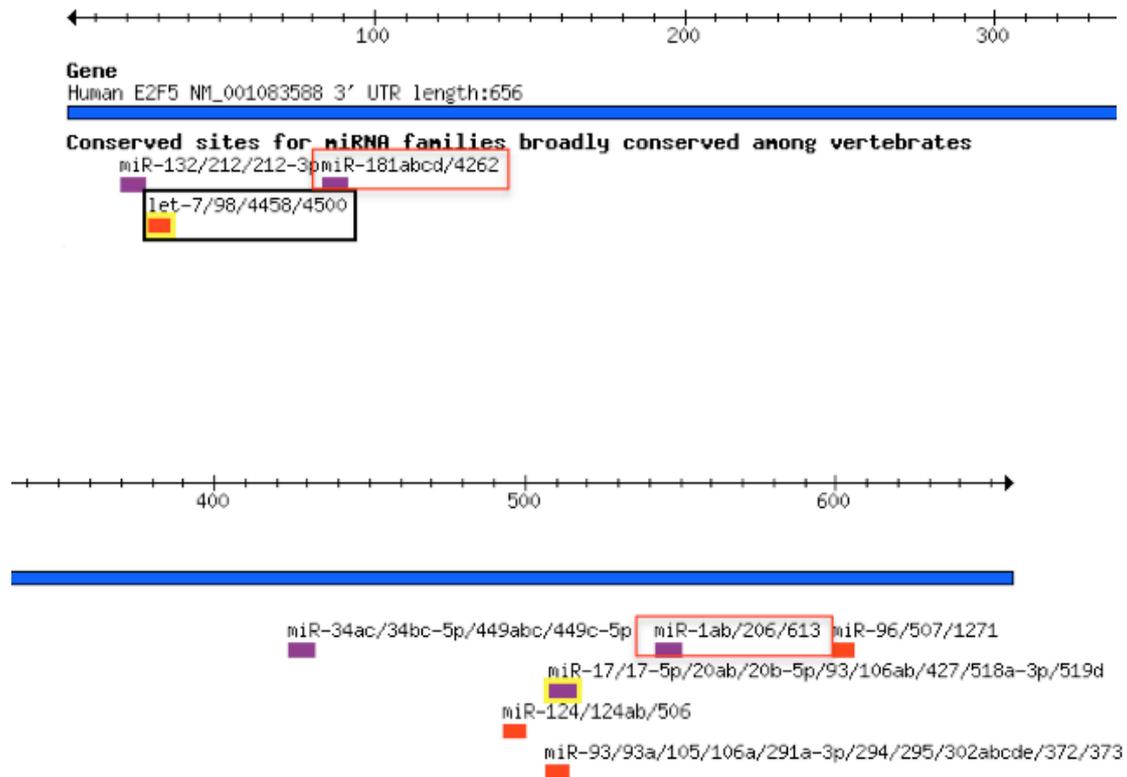
Nous avons supposé que cette localisation nucléaire est due à un changement de localisation de E2F5. Il est possible que des mécanismes de dégradation de E2F5 (par ubiquitination par exemple) soient également responsables de cette concentration dans le noyau. Il a été montré que E2F1 pouvait être dégradé par ubiquitination et que son interaction

avec son partenaire RB le stabilise et le protège de cette dégradation (Campanero and Flemington, 1997). De même, on peut imaginer que la fraction cytoplasmique de E2F5 soit dégradée lors de la myogénèse. La fraction nucléaire de E2F5 pourrait être stabilisée et protégée via interaction avec ses protéines partenaires (p130 par exemple).

Des modifications post-traductionnelles sur E2F5 sont une autre possibilité et pourraient jouer sur sa capacité de fixation. L'acétylation de E2F1 par exemple, a été montrée comme améliorant à la fois sa stabilité, sa fixation à l'ADN ainsi que son activité transcriptionnelle (Martínez-Balbás et al., 2000). Toutefois, si les facteurs E2F1-3 peuvent être acétylés, cela ne semble pas être le cas des facteurs E2F4-5, qui n'ont pas les lysines acétylées conservées sur les facteurs E2F1-3 (Marzio, 2000). Cela reste à être vérifié dans le contexte de la myogénèse.

De plus, alors que la protéine E2F5 diminue au cours de la différenciation musculaire, son ARNm ne varie pas de façon significative (Article 2 Figure 3A-B). Cela pourrait s'expliquer par une régulation post-traductionnelle. Il est possible que ce soit la cause de mécanismes de dégradation comme nous venons le voir. L'autre possibilité serait une inhibition traductionnelle par des miARN. L'ARNm de E2F5 contient dans son 3'UTR de multiples sites pour des miARN. L'expression des miARN let-7 n'augmentant pas durant la myogénèse, et réprime E2F5 au niveau de son ARNm, ce qui ne suffit pas donc à expliquer cette diminution uniquement protéique. Mais on note également la présence de sites fortement conservés pour miR-1, miR-206 et miR-181 dans le 3'UTR de E2F5 (Figure 24). Ces myomiRs augmentent drastiquement pendant le processus de différenciation musculaire (voir page 79). Il est possible qu'ils inhibent la traduction de E2F5 au cours de la myogénèse.

## Human E2F5 3' UTR



### Figure 24. Sites conservés pour des familles de miARN dans le 3'UTR de E2F5 (humain)

D'après Targetscan. Le site pour les miARN let-7 est encadré en noir (au début du 3'UTR). Il est suivi par un site pour miR-181 (encadré en rouge). A la fin du 3'UTR se trouve le site pour miR-1/miR-206 (également encadré en rouge).

Il se pourrait que E2F5, malgré une localisation diffuse en prolifération, ait un effet précoce sur la différenciation musculaire et la sortie du cycle cellulaire notamment via ID1. L'expression de la protéine E2F5 est d'ailleurs forte dans les myoblastes en prolifération (Article 2-Figure 3B). Il pourrait ensuite avoir une seconde action, plus tardive (à 3 jours), sur la myogénèse. Il serait intéressant de déterminer si E2F5 agit différemment sur grand nombre de ses cibles en début et fin de différenciation musculaire. Cette action pourrait passer par le recrutement de complexes différents de modification de la chromatine.

De plus, ID1 est une protéine très exprimée en prolifération et qui diminue brutalement en début de différenciation musculaire (Clever et al., 2010; Tournay and Benezra, 1996) (voir page 32). Ce mécanisme est encore mal compris et une répression par E2F5 dans les premières étapes de la myogénèse pourrait en partie l'expliquer.

Mes résultats montrent que l'expression de E2F5 est un paramètre important pour l'activation de la différenciation musculaire. La localisation nucléaire de E2F5 corrèle quant à elle avec la myogénèse et pourrait y jouer un rôle primordial, confirmant les observations de précédentes études. D'autres mécanismes de régulation de l'activité de E2F5 sont également envisageables et il serait intéressant de les étudier.

# CONCLUSION

Au cours de ma thèse, j'ai pu mettre en évidence une nouvelle voie de régulation de la différenciation musculaire : la voie let-7 – E2F5.

Nous avons d'abord montré dans notre laboratoire que les miARN let-7, généralement activateurs de la différenciation dans de nombreux tissus, répriment, de façon surprenante, la différenciation musculaire dans des lignées de myoblastes humains et murins. L'inhibition d'un miARN de la famille let-7, miR-98, entraîne une forte accélération de la différenciation musculaire accompagnée d'une hypertrophie des myotubes, tandis que la surexpression de miARN let-7 ectopiques retardent la myogénèse.

Afin de comprendre l'effet des miARN let-7 sur la différenciation musculaire, j'ai caractérisé leurs cibles. Environ 240 gènes, dont de nombreuses cibles précédemment non identifiées des miARN let-7, sont significativement surexprimés lorsque miR-98 est inhibé dans des myoblastes en prolifération ou différenciation. De manière intéressante, les gènes significativement régulés en prolifération, différenciation précoce et tardive sont en majeure partie différents, soulignant la complexité de l'action des miARN let-7. J'ai ensuite montré que l'un de ces gènes, le répresseur transcriptionnel E2F5, est important pour la répression de la différenciation musculaire par les miARN let-7. Son inhibition dans des myoblastes miR-98 KD est capable de restaurer presque complètement une différenciation musculaire normale, soulignant l'importance fonctionnelle d'une voie let-7 - E2F5 dans la myogénèse. Par la suite, j'ai montré que miR-98 cible directement l'ARNm de E2F5, qui n'avait jusqu'alors pas été identifié comme une cible directe des miARN let-7. Mes résultats montrent pour la première fois que E2F5 est un facteur « pro-différenciation musculaire » dans des myoblastes humains et murins. L'inhibition de E2F5 seul réprime la myogénèse, tandis que sa surexpression est capable de l'accélérer. De plus, j'ai observé que E2F5, diffus à la fois dans le noyau et le cytoplasme des myoblastes en prolifération, change de localisation et se concentre dans le noyau au cours de la différenciation musculaire. Cela laisse penser que ce changement de localisation joue un rôle important dans la myogénèse.

Par la suite, afin de comprendre comment E2F5 agit sur la différenciation musculaire, j'ai cherché à caractériser ses cibles. J'ai d'abord identifié des cibles potentielles de E2F5 parmi les gènes significativement réprimés dans les myoblastes miR-98 KD, où E2F5 est surexprimé. Parmi ces gènes, j'ai montré que l'inhibition de E2F5 dans des myoblastes entraîne une augmentation significative de répresseurs connus de la différenciation musculaire : HMOX1, ID1, et les membres de la famille TGF- $\beta$  myostatine et TGF- $\beta$ 3. J'ai

ensuite prouvé que *ID1* et *HMOX1* sont de nouvelles cibles directes de E2F5. E2F5 fixe en effet leurs promoteurs dans des myoblastes en prolifération et différenciation.

Je propose donc le modèle suivant pour la régulation de la différenciation musculaire par les miARN let-7. Les miARN let-7 retardent la différenciation musculaire en réprimant de nombreuses cibles, dont un facteur de transcription : E2F5. E2F5 réprime lui directement les gènes codant pour des inhibiteurs de la différenciation musculaire, dont ID1, répresseur clé des MRF, et HMOX1, répresseur de myomiRs. E2F5 inhibe aussi indirectement des gènes codant pour des protéines de la voie TGF- $\beta$ , TGF- $\beta$ 3 et la myostatine, fort répresseurs de la myogénèse. Au final, les miARN let-7 retardent la différenciation du muscle strié squelettique en régulant l'expression de E2F5 et donc ses multiples cibles, dont *ID1* et *HMOX1*.

E2F5 agit comme un véritable « amplificateur » de l'action des miARN let-7, leur permettant de réguler un réseau de gènes encore plus vaste. Ainsi un événement unique, la surexpression d'un seul petit ARN, miR-98, permet de déclencher l'expression de nombreux répresseurs de la myogénèse via l'inhibition de E2F5. De plus, mes travaux suggèrent que de nombreux régulateurs de la différenciation musculaire : miARN let-7, E2F5, protéines TGF- $\beta$ , myomiRs, HMOX1, ID1, MYOD sont interconnectés. Cela montre la complexité des réseaux de régulation de la différenciation musculaire, faisant interagir à de multiples niveaux miARN, facteurs de transcription, et voies de signalisation.

L'étude de la voie let-7 – E2F5, quoique très fondamentale, pourrait servir à de potentielles applications thérapeutiques dans le futur. Une expression aberrante des miARN let-7 est associée à diverses maladies cardio-vasculaires. Certains miARN let-7 sont surexprimés lors du vieillissement musculaire ainsi que dans différentes myopathies. Il serait particulièrement intéressant d'étudier le réseau de régulation let-7 – E2F5 dans ces maladies, et de déterminer si l'expression de E2F5 et de ses cibles y sont également perturbées. E2F5 étant un amplificateur de l'action des miARN let-7, il est possible que les variations d'expression des miARN let-7 observées dans ces maladies entraînent de larges remaniements du transcriptome via E2F5, et participent à l'altération de l'expression des gènes observée dans ces myopathies.

# PERSPECTIVES

Mon travail de thèse a montré que les miARN let-7 retardent la différenciation musculaire en agissant massivement sur le transcriptome des myoblastes. J'ai montré pour la première fois que E2F5 est une cible directe des miARN let-7 importante pour la régulation de la myogénèse. Toutefois, l'action des miARN let-7 sur la différenciation musculaire passerait aussi par la répression d'autres cibles. Mes analyses transcriptomiques dans les myoblastes miR-98 KD ont en effet mis en évidence de nombreuses cibles des miARN let-7 qui pourraient potentiellement jouer un rôle dans la myogénèse. Parmi elles, se trouvent des gènes qui n'avaient jamais été identifiés comme cibles de ces miARN. Il serait donc intéressant d'explorer la fonction de ces potentielles cibles dans la différenciation musculaire, ainsi que de déterminer leur caractère de cible directe ou indirecte des miARN let-7. Ces études permettront d'établir un réseau d'interactions entre les cibles des miARN let-7 dans la différenciation musculaire. Pour étudier ces réseaux, nous pourrions inhiber plusieurs de ces cibles en même temps dans les myoblastes miR-98 KD, et déterminer leur capacité à restaurer une différenciation musculaire normale.

J'ai aussi montré que les les miARN let-7 régulent de nombreux gènes impliqués dans une même voie cellulaire : voies de signalisation TGF- $\beta$ , interféron, et potentiellement biogénèse des miARN via HMOX1. Il serait intéressant de déterminer si ces voies sont fonctionnellement importantes pour l'inhibition de la myogénèse par les miARN let-7. Dans ce but, nous pourrions réaliser une inhibition de certains effecteurs clés de ces voies dans les myoblastes miR-98 KD (récepteurs au TGF- $\beta$  et à l'interféron, effecteurs SMADs pour la voie TGF- $\beta$ ...) et mesurer leur capacité à restaurer une différenciation musculaire normale. Il serait également intéressant de voir si les cascades de signalisation du TGF- $\beta$  et interféron sont réprimées ou activées dans les myoblastes miR-98 KD (pour cela on pourrait mesurer la phosphorylation de certains effecteurs de ces voies, par exemple les SMADs).

Mes résultats ont montré de manière très intéressante que les cibles régulées par les miARN let-7 variaient considérablement selon l'état de différenciation des myoblastes. Après avoir déterminé plus en détail les réseaux de cibles et les voies importantes fonctionnellement pour les miARN let-7 dans les myoblastes miR-98 KD, il serait important d'étudier la régulation de ces cibles et voies à différents stages de différenciation des myoblastes. Cela permettrait ainsi de voir comment ces réseaux changent entre l'étape précoce de « déclenchement » de la myogénèse, et des états plus tardifs de la différenciation musculaire, qui correspondent davantage à la « maintenance » d'un état post-mitotique différencié.

Mon travail de thèse a également permis pour la première fois d'identifier une fonction « pro-myogénique » du facteur E2F5. Il serait intéressant de faire un ChIP-

sequencing de E2F5 dans des myoblastes en prolifération et à différents stades de la différenciation, afin d'avoir une vision générale des cibles que E2F5 régule. Cette technique pourrait être couplée par des expériences gain/perte de fonction de E2F5 suivies d'analyses transcriptomiques. Ces approches permettraient de déterminer si E2F5 régule d'autres répresseurs de la myogénèse, et s'il agit de manière plus globale sur la voie TGF- $\beta$ . Nous avons également observé que la fixation de E2F5 sur les promoteurs de *IDI* et *HMOX1* change au cours de la différenciation musculaire. Les deux approches que je viens de citer permettront de déterminer si la fixation et la régulation des cibles de E2F5 changent au cours de la différenciation musculaire. Il est envisageable que les cibles de E2F5 varient entre des états plus précoces et tardifs de la myogénèse.

L'ensemble de ces travaux permettront de caractériser les réseaux de cibles et les voies régulées par les miARN let-7 et E2F5 au cours de la myogénèse. Ils permettront ainsi de comprendre de façon globale comment les miARN let-7 et E2F5 régulent la différenciation musculaire, et d'apporter une meilleure compréhension de ce processus complexe qu'est la myogénèse.

# REFERENCES

- Abbott, A.L., Alvarez-Saavedra, E., Miska, E. a, Lau, N.C., Bartel, D.P., Horvitz, H.R., and Ambros, V. (2005). The let-7 MicroRNA family members mir-48, mir-84, and mir-241 function together to regulate developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Cell* 9, 403–414.
- Accornero, F., Kanisicak, O., Tjondrokoesoemo, A., Attia, A.C., McNally, E.M., and Molkentin, J.D. (2014). Myofiber-specific inhibition of TGF $\beta$  signaling protects skeletal muscle from injury and dystrophic disease in mice. *Hum. Mol. Genet.* 1–26.
- Adams, B.D., Kasinski, A.L., and Slack, F.J. (2014). Aberrant Regulation and Function of MicroRNAs in Cancer. *Curr. Biol.* 24, R762–R776.
- Ait-Si-Ali, S., Polesskaya, a, Filleur, S., Ferreira, R., Duquet, a, Robin, P., Vervish, a, Trouche, D., Cabon, F., and Harel-Bellan, a (2000). CBP/p300 histone acetyl-transferase activity is important for the G1/S transition. *Oncogene* 19, 2430–2437.
- Apostolova, M.D., Ivanova, I. a, Dagnino, C., D'Souza, S.J. a, and Dagnino, L. (2002). Active nuclear import and export pathways regulate E2F-5 subcellular localization. *J. Biol. Chem.* 277, 34471–34479.
- Armand, O. (1983). Origin of satellite cells in avian skeletal muscles. *Arch Anat Microsc Morphol Exp.* 72, 163–181.
- Asp, P., Acosta-alvear, D., Tsikitis, M., Oevelen, C. Van, and Dynlacht, B.D. (2009). E2f3b plays an essential role in myogenic differentiation through isoform-specific gene regulation. *Genes Dev.* 23, 37–53.
- Atherton, G., and Travers, H. (1996). Regulation of cell differentiation in C2C12 myoblasts by the Id3 helix-loop-helix protein. *Cell Growth Differ.* 7, 1059–1066.
- Attwooll, C., Oddi, S., Cartwright, P., Prosperini, E., Agger, K., Steensgaard, P., Wagener, C., Sardet, C., Moroni, M.C., and Helin, K. (2005). A novel repressive E2F6 complex containing the polycomb group protein, EPC1, that interacts with EZH2 in a proliferation-specific manner. *J. Biol. Chem.* 280, 1199–1208.
- Baek, D., Villén, J., Shin, C., Camargo, F.D., Gygi, S.P., and Bartel, D.P. (2008). The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 455, 64–71.
- Bagga, S., Bracht, J., Hunter, S., Massirer, K., Holtz, J., Eachus, R., and Pasquinelli, A.E. (2005). Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell* 122, 553–563.
- Baillat, D., and Shiekhatar, R. (2009). Functional dissection of the human TNRC6 (GW182-related) family of proteins. *Mol. Cell. Biol.* 29, 4144–4155.
- Bao, M.-H., Feng, X., Zhang, Y.-W., Lou, X.-Y., Cheng, Y., and Zhou, H.-H. (2013). Let-7 in cardiovascular diseases, heart development and cardiovascular differentiation from stem cells. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 23086–23102.

- Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* *136*, 215–233.
- Basu, U., Lozynska, O., Moorwood, C., Patel, G., Wilton, S.D., and Khurana, T.S. (2011). Translational regulation of utrophin by miRNAs. *PLoS One* *6*, e29376.
- Beauchamp, J.R., Heslop, L., Yu, D.S.W., Tajbakhsh, S., Kelly, R.G., Wernig, A., Buckingham, M.E., Partridge, T.A., and Zammit, P.S. (2000). Expression of CD34 and Myf5 Defines the Majority of Quiescent Adult Skeletal Muscle Satellite Cells. *J. Cell Biol.* *151*, 1221–1233.
- Behm-Ansmant, I., and Rehwinkel, J. (2006). mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4: NOT deadenylase and DCP1: DCP2 decapping complexes. *Genes Dev.* *20*, 1885–1898.
- Benezra, R., Davis, R.L., Lockshon, D., Turner, D.L., and Weintraub, H. (1990). The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* *61*, 49–59.
- Bergstrom, D. a., Penn, B.H., Strand, A., Perry, R.L.S., Rudnicki, M. a., and Tapscott, S.J. (2002). Promoter-Specific Regulation of MyoD Binding and Signal Transduction Cooperate to Pattern Gene Expression. *Mol. Cell* *9*, 587–600.
- Berkes, C. a., and Tapscott, S.J. (2005). MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* *16*, 585–595.
- Biggs, J., Murphy, E. V, and Israel, M.A. (1992). A human Id-like helix-loop-helix protein expressed during early development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 1512–1516.
- Bisbal, C., Silhol, M., Laubenthal, H., Kaluza, T., Carnac, G., Milligan, L., Le Roy, F., and Salehzada, T. (2000). The 2'-5' oligoadenylate/RNase L/RNase L inhibitor pathway regulates both MyoD mRNA stability and muscle cell differentiation. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 4959–4969.
- Black, B.L., and Olson, E.N. (1998). Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *14*, 167–196.
- Black, B., Molkentin, J., and Olson, E. (1998). Multiple roles for the MyoD basic region in transmission of transcriptional activation signals and interaction with MEF2. *Mol. Cell. Biol.* *18*.
- Blackwell, T., and Weintraub, H. (1990). Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection. *Science* (80-. ). *250*, 1104–1110.
- Blais, A., and Dynlacht, B.D. (2007). E2F-associated chromatin modifiers and cell cycle control. *Curr. Opin. Cell Biol.* *19*, 658–662.
- Blake, M.C., and Azizkhan, J.C. (1989). Transcription factor E2F is required for efficient expression of the hamster dihydrofolate reductase gene in vitro and in vivo. *Mol. Cell. Biol.* *9*, 4994–5002.

- Bodine, S.C., Stitt, T.N., Gonzalez, M., Kline, W.O., Stover, G.L., Bauerlein, R., Zlotchenko, E., Scrimgeour, a, Lawrence, J.C., Glass, D.J., et al. (2001). Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat. Cell Biol.* 3, 1014–1019.
- Boyerinas, B., Park, S.-M., Shomron, N., Hedegaard, M.M., Vinther, J., Andersen, J.S., Feig, C., Xu, J., Burge, C.B., and Peter, M.E. (2008). Identification of let-7-regulated oncofetal genes. *Cancer Res.* 68, 2587–2591.
- Boyerinas, B., Park, S.-M., Hau, A., Murmann, A.E., and Peter, M.E. (2010). The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 17, F19–36.
- Bracken, A.P., Ciro, M., Cocito, A., and Helin, K. (2004). E2F target genes: unraveling the biology. *Trends Biochem. Sci.* 29, 409–417.
- Braun, T., and Gautel, M. (2011). Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 349–361.
- Braun, T., Buschhausen-Denker, G., Bober, E., Tannich, E., and Arnold, H.H. (1989). A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts. *EMBO J.* 8, 701–709.
- Brennan, T.J., Chakraborty, T., and Olson, E.N. (1991a). Mutagenesis of the myogenin basic region identifies an ancient protein motif critical for activation of myogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 5675–5679.
- Brennan, T.J., Edmondson, D.G., Li, L., and Olson, E.N. (1991b). Transforming growth factor beta represses the actions of myogenin through a mechanism independent of DNA binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 3822–3826.
- Buckingham, M., and Rigby, P.W.J. (2014). Gene regulatory networks and transcriptional mechanisms that control myogenesis. *Dev. Cell* 28, 225–238.
- Busanello, A., Battistelli, C., Carbone, M., Mostocotto, C., and Maione, R. (2012). MyoD regulates p57kip2 expression by interacting with a distant cis-element and modifying a higher order chromatin structure. *Nucleic Acids Res.* 40, 8266–8275.
- Campanero, M.R., and Flemington, E.K. (1997). Regulation of E2F through ubiquitin-proteasome-dependent degradation: stabilization by the pRB tumor suppressor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 2221–2226.
- Cao, Y., Kumar, R.M., Penn, B.H., Berkes, C. a, Kooperberg, C., Boyer, L. a, Young, R. a, and Tapscott, S.J. (2006). Global and gene-specific analyses show distinct roles for MyoD and Myog at a common set of promoters. *EMBO J.* 25, 502–511.
- Cao, Y., Yao, Z., Sarkar, D., Lawrence, M., Sanchez, G.J., Parker, M.H., MacQuarrie, K.L., Davison, J., Morgan, M.T., Ruzzo, W.L., et al. (2010). Genome-wide MyoD binding in skeletal muscle cells: a potential for broad cellular reprogramming. *Dev. Cell* 18, 662–674.

- Cesana, M., Cacchiarelli, D., Legnini, I., Santini, T., Sthandier, O., Chinappi, M., Tramontano, A., and Bozzoni, I. (2011). A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA. *Cell* *147*, 358–369.
- Chang, W., Andrews, J., Carter, D., and Dagnino, L. (2006). Differentiation and Injury-Repair Signals Modulate the Interaction of E2F and pRB Proteins with Novel Target Genes in Keratinocytes Report. *Cell Cycle* 1872–1879.
- Chekulaeva, M., Mathys, H., Zipprich, J.T., Attig, J., Colic, M., Parker, R., and Filipowicz, W. (2011). miRNA repression involves GW182-mediated recruitment of CCR4-NOT through conserved W-containing motifs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 1218–1226.
- Chen, C.-R., Kang, Y., Siegel, P.M., and Massagué, J. (2002). E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the TGFbeta receptor to c-myc repression. *Cell* *110*, 19–32.
- Chen, H., Tsai, S., and Leone, G. (2009). Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 785–797.
- Chen, J.-F., Mandel, E.M., Thomson, J.M., Wu, Q., Callis, T.E., Hammond, S.M., Conlon, F.L., and Wang, D.-Z. (2006). The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat. Genet.* *38*, 228–233.
- Cheng, M., Nguyen, M.-H., Fantuzzi, G., and Koh, T.J. (2008). Endogenous interferon-gamma is required for efficient skeletal muscle regeneration. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *294*, C1183–91.
- Cheriyath, V., Leaman, D.W., and Borden, E.C. (2011). Emerging roles of FAM14 family members (G1P3/ISG 6-16 and ISG12/IFI27) in innate immunity and cancer. *J. Interferon Cytokine Res.* *31*, 173–181.
- Choi, J., Costa, M.L., Mermelstein, C.S., Chagas, C., Holtzer, S., and Holtzer, H. (1990). MyoD converts primary dermal fibroblasts, chondroblasts, smooth muscle, and retinal pigmented epithelial cells into striated mononucleated myoblasts and multinucleated myotubes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 7988–7992.
- Chong, J., Wenzel, P., and Sáenz-Robles, M. (2009). E2F1-3 switch from activators in progenitor cells to repressors in differentiating cells. *Nature* *462*, 930–934.
- Christy, B.A., Sanders, L.K., Lau, L.F., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Nathans, D. (1991). An Id-related helix-loop-helix protein encoded by a growth factor-inducible gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 1815–1819.
- Cimadamore, F., Amador-Arjona, A., Chen, C., Huang, C.-T., and Terskikh, A. V (2013). SOX2-LIN28/let-7 pathway regulates proliferation and neurogenesis in neural precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, E3017–26.
- Clever, J.L., Sakai, Y., Wang, R. a, and Schneider, D.B. (2010). Inefficient skeletal muscle repair in inhibitor of differentiation knockout mice suggests a crucial role for BMP signaling during adult muscle regeneration. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *298*, C1087–99.

Clop, A., Marcq, F., Takeda, H., Pirottin, D., Tordoir, X., Bibé, B., Bouix, J., Caiment, F., Elsen, J.-M., Eycheenne, F., et al. (2006). A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nat. Genet.* *38*, 813–818.

Cobrinik, D., Whyte, P., Peeper, D.S., Jacks, T., and Weinberg, R. a (1993). Cell cycle-specific association of E2F with the p130 E1A-binding protein. *Genes Dev.* *7*, 2392–2404.

Cobrinik, D., Lee, M.H., Hannon, G., Mulligan, G., Bronson, R.T., Dyson, N., Harlow, E., Beach, D., Weinberg, R. a, and Jacks, T. (1996). Shared role of the pRB-related p130 and p107 proteins in limb development. *Genes Dev.* *10*, 1633–1644.

Crescenzi, M., Fleming, T.P., Lassar, a B., Weintraub, H., and Aaronson, S. a (1990). MyoD induces growth arrest independent of differentiation in normal and transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 8442–8446.

Crist, C.G., Montarras, D., and Buckingham, M. (2012). Muscle satellite cells are primed for myogenesis but maintain quiescence with sequestration of Myf5 mRNA targeted by microRNA-31 in mRNP granules. *Cell Stem Cell* *11*, 118–126.

Cusella-De Angelis, M.G., Molinari, S., Le Donne, a, Coletta, M., Vivarelli, E., Bouche, M., Molinaro, M., Ferrari, S., and Cossu, G. (1994). Differential response of embryonic and fetal myoblasts to TGF beta: a possible regulatory mechanism of skeletal muscle histogenesis. *Development* *120*, 925–933.

Dahme, T., Wood, J., Livingston, D.M., and Gaubatz, S. (2002). Two different E2F6 proteins generated by alternative splicing and internal translation initiation. *Eur. J. Biochem.* *269*, 5030–5036.

Davis, R.L., Weintraub, H., and Lassar, a B. (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* *51*, 987–1000.

Davis, R.L., Cheng, P.F., Lassar, a B., and Weintraub, H. (1990). The MyoD DNA binding domain contains a recognition code for muscle-specific gene activation. *Cell* *60*, 733–746.

Davoodian, N., Lotfi, A.S., Soleimani, M., Mola, S.J., and Arjmand, S. (2014). Let-7f microRNA negatively regulates hepatic differentiation of human adipose tissue-derived stem cells. *J. Physiol. Biochem.* *70*, 781–789.

DeGregori, J., Leone, G., Miron, a, Jakoi, L., and Nevins, J.R. (1997). Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 7245–7250.

Deng, C., Zhang, P., Harper, J.W., Elledge, S.J., and Leder, P. (1995). Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* *82*, 675–684.

Dey, B.K., Pfeifer, K., and Dutta, A. (2014). The H19 long noncoding RNA gives rise to microRNAs miR-675-3p and miR-675-5p to promote skeletal muscle differentiation and regeneration. *Genes Dev.* *28*, 491–501.

- Dimova, D.K., and Dyson, N.J. (2005). The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene* *24*, 2810–2826.
- Dong, Q., Meng, P., Wang, T., Qin, W., Qin, W., Wang, F., Yuan, J., Chen, Z., Yang, A., and Wang, H. (2010). MicroRNA let-7a inhibits proliferation of human prostate cancer cells in vitro and in vivo by targeting E2F2 and CCND2. *PLoS One* *5*, e10147.
- Drummond, M.J., McCarthy, J.J., Sinha, M., Spratt, H.M., Volpi, E., Esser, K. a, and Rasmussen, B.B. (2011). Aging and microRNA expression in human skeletal muscle: a microarray and bioinformatics analysis. *Physiol. Genomics* *43*, 595–603.
- Dyson, N., Dembski, M., Fattaey, a, Ngwu, C., Ewen, M., and Helin, K. (1993). Analysis of p107-associated proteins: p107 associates with a form of E2F that differs from pRB-associated E2F-1. *J. Virol.* *67*, 7641–7647.
- Edmondson, D.G., and Olson, E.N. (1989). 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 Dev.* *3*, 628–640.
- Eisenberg, I., Eran, A., Nishino, I., Moggio, M., Lamperti, C., Amato, A. a, Lidov, H.G., Kang, P.B., North, K.N., Mitrani-Rosenbaum, S., et al. (2007). Distinctive patterns of microRNA expression in primary muscular disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 17016–17021.
- Erbay, E., and Chen, J. (2001). The mammalian target of rapamycin regulates C2C12 myogenesis via a kinase-independent mechanism. *J. Biol. Chem.* *276*, 36079–36082.
- Esquela-Kerscher, A., and Slack, F.J. (2006). Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat. Rev. Cancer* *6*, 259–269.
- Esquela-Kerscher, A., and Johnson, S. (2005). Post-embryonic expression of *C. elegans* microRNAs belonging to the lin-4 and let-7 families in the hypodermis and the reproductive system. *Dev. Dyn.* *234*, 868–877.
- Eulalio, A., Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2008). GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *15*, 346–353.
- Fernando, P., Kelly, J.F., Balazsi, K., Slack, R.S., and Megeney, L.A. (2002). Caspase 3 activity is required for skeletal muscle differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 11025–11030.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., and Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.* *9*, 102–114.
- Flanders, K.C., Lüdecke, G., Engels, S., Cissel, D.S., Roberts, A.B., Kondaiah, P., Lafyatis, R., Sporn, M.B., and Unsicker, K. (1991). Localization and actions of transforming growth factor-beta s in the embryonic nervous system. *Development* *113*, 183–191.

- Foulstone, E.J., Meadows, K.A., Holly, J.M., and Stewart, C.E. (2001). Insulin-like growth factors (IGF-I and IGF-II) inhibit C2 skeletal myoblast differentiation and enhance TNF alpha-induced apoptosis. *J. Cell. Physiol.* *189*, 207–215.
- Friedman, R.C., Farh, K.K.-H., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* *19*, 92–105.
- Frost, R.J. a, and Olson, E.N. (2011). Control of glucose homeostasis and insulin sensitivity by the Let-7 family of microRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 21075–21080.
- Gaubatz, S., Lindeman, G.J., Ishida, S., Jakoi, L., Nevins, J.R., Livingston, D.M., and Rempel, R.E. (2000). E2F4 and E2F5 play an essential role in pocket protein-mediated G1 control. *Mol. Cell* *6*, 729–735.
- Gaubatz, S., Lees, J.A., Lindeman, G.J., and Livingston, D.M. (2001). E2F4 Is Exported from the Nucleus in a CRM1-Dependent Manner E2F4 Is Exported from the Nucleus in a CRM1-Dependent Manner. *Mol. Cell. Biol.* *21*. 1384-1392
- Ge, Y., and Chen, J. (2011). MicroRNAs in skeletal myogenesis. *Cell Cycle* *10*, 441–448.
- Ge, X., McFarlane, C., Vajjala, A., Lokireddy, S., Ng, Z.H., Tan, C.K., Tan, N.S., Wahli, W., Sharma, M., and Kambadur, R. (2011). Smad3 signaling is required for satellite cell function and myogenic differentiation of myoblasts. *Cell Res.* *21*, 1591–1604.
- Ge, X., Vajjala, A., McFarlane, C., Wahli, W., Sharma, M., and Kambadur, R. (2012). Lack of Smad3 signaling leads to impaired skeletal muscle regeneration. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *303*, E90–102.
- Geng, L., Zhu, B., Dai, B.-H., Sui, C.-J., Xu, F., Kan, T., Shen, W.-F., and Yang, J.-M. (2011). A let-7/Fas double-negative feedback loop regulates human colon carcinoma cells sensitivity to Fas-related apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *408*, 494–499.
- Gill, R.M., and Hamel, P. a (2000). Subcellular compartmentalization of E2F family members is required for maintenance of the postmitotic state in terminally differentiated muscle. *J. Cell Biol.* *148*, 1187–1201.
- Golub, T., Mandlboim, O., Lieberman, N., Kojekaro, G., Davis, M., and Oren, M. (2004). Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5 : Myod double-mutant mice. *Nature.* *431*. 466-471
- Gossett, L.A., Kelvin, D.J., Sternberg, E.A., and Olson, E.N. (1989). A New Myocyte-Specific Enhancer-Binding Factor That Recognizes a Conserved Element Associated with Multiple Muscle-Specific Genes. *Mol. Cell. Biol.* *9*, 5022–5033.
- Gozzelino, R., Jeney, V., and Soares, M.P. (2010). Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *50*, 323–354.
- Grosshans, H., Johnson, T., Reinert, K.L., Gerstein, M., and Slack, F.J. (2005). The temporal patterning microRNA let-7 regulates several transcription factors at the larval to adult transition in *C. elegans*. *Dev. Cell* *8*, 321–330.

- Gu, W., Schneider, J., and Condorelli, G. (1993). Interaction of myogenic factors and the retinoblastoma protein mediates muscle cell commitment and differentiation. *Cell* 72.
- Guo, H., Ingolia, N.T., Weissman, J.S., and Bartel, D.P. (2010). Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466, 835–840.
- Guo, K., Wang, J., Andrés, V., Smith, R.C., and Walsh, K. (1995). MyoD-induced expression of p21 inhibits cyclin-dependent kinase activity upon myocyte terminal differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 15, 3823–3829.
- Gurtan, A.M., and Sharp, P. a (2013). The role of miRNAs in regulating gene expression networks. *J. Mol. Biol.* 425, 3582–3600.
- Ha, M., and Kim, V.N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 509–524.
- Halevy, O., Novitch, B.G., Spicer, D.B., Skapek, S.X., Rhee, J., Hannon, G.J., Beach, D., and Lassar, A.B. (1995). Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD. *Science* 267, 1018–1021.
- Hasty, P., Bradley, A., and Morris, J. (1993). Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature* 364, 501–506.
- Hayes, G.D., and Ruvkun, G. (2006). Misexpression of the *Caenorhabditis elegans* miRNA let-7 is sufficient to drive developmental programs. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 71, 21–27.
- He, W., Dorn, D.C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Moore, M.A.S., and Massagué, J. (2006). Hematopoiesis controlled by distinct TIF1gamma and Smad4 branches of the TGFbeta pathway. *Cell* 125, 929–941.
- Hebrok, M., Wertz, K., and Füchtbauer, E. (1994). M-twist is an inhibitor of muscle differentiation. *Dev. Biol.* 165, 537–544.
- Helin, K., Wu, C.L., Fattaey, a R., Lees, J. a, Dynlacht, B.D., Ngwu, C., and Harlow, E. (1993). Heterodimerization of the transcription factors E2F-1 and DP-1 leads to cooperative trans-activation. *Genes Dev.* 7, 1850–1861.
- Henke, J.I., Goergen, D., Zheng, J., Song, Y., Schüttler, C.G., Fehr, C., Jünemann, C., and Niepmann, M. (2008). microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J.* 27, 3300–3310.
- Henningsen, J., Rigbolt, K.T.G., Blagoev, B., Pedersen, B.K., and Kratchmarova, I. (2010). Dynamics of the skeletal muscle secretome during myoblast differentiation. *Mol. Cell. Proteomics* 9, 2482–2496.
- Héron-Milhavet, L., Franckhauser, C., Rana, V., Berthenet, C., Fisher, D., Hemmings, B.A., Fernandez, A., and Lamb, N.J.C. (2006). Only Akt1 is required for proliferation, while Akt2 promotes cell cycle exit through p21 binding. *Mol. Cell. Biol.* 26, 8267–8280.

- Van den Heuvel, S., and Dyson, N.J. (2008). Conserved functions of the pRB and E2F families. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 713–724.
- Hijmans, E.M., Voorhoeve, P.M., Beijersbergen, R.L., van 't Veer, L.J., and Bernards, R. (1995). E2F-5, a new E2F family member that interacts with p130 in vivo. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 3082–3089.
- Hjiantoniou, E., Anayasa, M., Nicolaou, P., Bantounas, I., Saito, M., Iseki, S., Uney, J.B., and Phylactou, L. a (2008). Twist induces reversal of myotube formation. *Differentiation.* *76*, 182–192.
- Humbert, P.O., Rogers, C., Ganiatsas, S., Landsberg, R.L., Trimarchi, J.M., Dandapani, S., Brugnara, C., Erdman, S., Schrenzel, M., Bronson, R.T., et al. (2000). E2F4 is essential for normal erythrocyte maturation and neonatal viability. *Mol. Cell* *6*, 281–291.
- Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat. Rev. Genet.* *12*, 99–110.
- Hutvagner, G., and Simard, M.J. (2008). Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 22–32.
- Iliopoulos, D., Hirsch, H. a, and Struhl, K. (2009). An epigenetic switch involving NF-kappaB, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. *Cell* *139*, 693–706.
- Inada, M., Katagiri, T., Akiyama, S., Namiki, M., and Komaki, M. (1996). Bone Morphogenetic Protein-12 and -13 Inhibit Terminal Differentiation of Myoblasts , but Do Not Induce Their Differentiation into Osteoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun* *322*, 317–322.
- Jen, Y., Weintraub, H., and Benezra, R. (1992). Overexpression of Id protein inhibits the muscle differentiation program : in vivo association of Id with E2A proteins. *Genes Dev.* *6*, 1466–1479.
- Jiang, Y., Yim, S.-H., Xu, H.-D., Jung, S.-H., Yang, S.Y., Hu, H.-J., Jung, C.-K., and Chung, Y.-J. (2011). A potential oncogenic role of the commonly observed E2F5 overexpression in hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* *17*, 470–477.
- Johnson, C.D., Esquela-Kerscher, A., Stefani, G., Byrom, M., Kelnar, K., Ovcharenko, D., Wilson, M., Wang, X., Shelton, J., Shingara, J., et al. (2007). The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. *Cancer Res.* *67*, 7713–7722.
- Johnson, D., Schwarz, J., Cress, W., and Nevins, J. (1993). Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter the S phase. *Nature* *365*, 349–352.
- Johnson, S.M., Lin, S.-Y., and Slack, F.J. (2003). The time of appearance of the *C. elegans* let-7 microRNA is transcriptionally controlled utilizing a temporal regulatory element in its promoter. *Dev. Biol.* *259*, 364–379.

- Johnson, S.M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., Labourier, E., Reinert, K.L., Brown, D., and Slack, F.J. (2005). RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 120, 635–647.
- Kallen, A.N., Zhou, X.-B., Xu, J., Qiao, C., Ma, J., Yan, L., Lu, L., Liu, C., Yi, J.-S., Zhang, H., et al. (2013). The imprinted H19 lncRNA antagonizes let-7 microRNAs. *Mol. Cell* 52, 101–112.
- Kallioli, G.D., and Ivashkiv, L.B. (2010). Overview of the biology of type I interferons. *Arthritis research & therapy* 12, 1–9.
- Kaneko, S., Feldman, R.I., Yu, L., Wu, Z., Gritsko, T., Shelley, S.A., Nicosia, S. V, Nobori, T., and Cheng, J.Q. (2002). Positive feedback regulation between Akt2 and MyoD during muscle differentiation. Cloning of Akt2 promoter. *J. Biol. Chem.* 277, 23230–23235.
- Katagiri, T., Imada, M., Yanai, T., Suda, T., Takahashi, N., and Kamijo, R. (2002). Identification of a BMP-responsive element in Id1, the gene for inhibition of myogenesis. *Genes Cells* 7, 949–960.
- Kato, S., and Du, K. (2007). TRB3 modulates C2C12 differentiation by interfering with Akt activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353, 933–938.
- Kaushal, S., Schneider, J., Nadal-Ginard, B., and Mahdavi, V. (1994). Activation of the myogenic lineage by MEF2A, a factor that induces and cooperates with MyoD. *Science* (80-). 266, 1236–1240.
- Khanjyan, M. V, Yang, J., Kayali, R., Caldwell, T., and Bertoni, C. (2013). A high-content, high-throughput siRNA screen identifies cyclin D2 as a potent regulator of muscle progenitor cell fusion and a target to enhance muscle regeneration. *Hum. Mol. Genet.* 22, 3283–3295.
- Khvorova, A., Reynolds, A., and Jayasena, S.D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115, 209–216.
- Kiess, M., Gill, R., and Hamel, P. (1995). Expression and activity of the retinoblastoma protein (pRB)-family proteins, p107 and p130, during L6 myoblast differentiation. *Cell Growth Differ.* 6, 1287–1298.
- Kim, H.H., Kuwano, Y., Srikantan, S., Lee, E.K., Martindale, J.L., and Gorospe, M. (2009a). HuR recruits let-7/RISC to repress c-Myc expression. *Genes Dev.* 23, 1743–1748.
- Kim, H.K., Lee, Y.S., Sivaprasad, U., Malhotra, A., and Dutta, A. (2006). Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation. *J. Cell Biol.* 174, 677–687.
- Kim, V.N., Han, J., and Siomi, M.C. (2009b). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 126–139.
- Kothandaraman, N., Bajic, V.B., Brendan, P.N.K., Huak, C.Y., Keow, P.B., Razvi, K., Salto-Tellez, M., and Choolani, M. (2010). E2F5 status significantly improves malignancy diagnosis of epithelial ovarian cancer. *BMC Cancer* 10, 64.

- Kovesdi, I., Reichel, R., and Nevins, J.R. (1986). Identification of a cellular transcription factor involved in E1A trans-activation. *Cell* 45, 219–228.
- Kozakowska, M., Ciesla, M., Stefanska, A., Skrzypek, K., Was, H., Jazwa, A., Grochot-Przeczek, A., Kotlinowski, J., Szymula, A., Bartelik, A., et al. (2012). Heme oxygenase-1 inhibits myoblast differentiation by targeting myomirs. *Antioxid. Redox Signal.* 16, 113–127.
- Kozomara, A., and Griffiths-Jones, S. (2014). miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 42, D68–73.
- Kreider, B.L., Benezra, R., Rovera, G., and Kadesch, T. (1992). Inhibition of myeloid differentiation by the helix-loop-helix protein Id. *Science* 255, 1700–1702.
- Krek, W., Livingston, D.M., and Shirodkar, S. (1993). Binding to DNA and the retinoblastoma gene product promoted by complex formation of different E2F family members. *Science* 262, 1557–1560.
- Krek, W., Xu, G., and Livingston, D.M. (1995). Cyclin A-kinase regulation of E2F-1 DNA binding function underlies suppression of an S phase checkpoint. *Cell* 83, 1149–1158.
- Krol, J., Loedige, I., and Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat. Rev. Genet.* 11, 597–610.
- Kuang, S., Kuroda, K., Grand, F. Le, and Rudnicki, M.A. (2007). Asymmetric Self-Renewal and Commitment of Satellite Stem Cells in Muscle. *Cell* 999–1010.
- Kuhn, D.E., Martin, M.M., Feldman, D.S., Terry, A. V, Nuovo, G.J., and Elton, T.S. (2008). Experimental validation of miRNA targets. *Methods* 44, 47–54.
- De la Serna, I.L., Carlson, K. a, and Imbalzano, a N. (2001). Mammalian SWI/SNF complexes promote MyoD-mediated muscle differentiation. *Nat. Genet.* 27, 187–190.
- Lafyatis, R., Lechleider, R., Roberts, A. B. and Sporn, M. B. (1991) Secretion and transcriptional regulation of transforming growth factor-beta 3 during myogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 11, 3795–3803.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294, 853–858.
- Langlands, K., Yin, X., Anand, G., and Prochownik, E. V. (1997). Differential Interactions of Id Proteins with Basic-Helix-Loop-Helix Transcription Factors. *J. Biol. Chem.* 272, 19785–19793.
- Langley, B., Thomas, M., Bishop, A., Sharma, M., Gilmour, S., and Kambadur, R. (2002). Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *J. Biol. Chem.* 277, 49831–49840.
- Lassar, a B., Paterson, B.M., and Weintraub, H. (1986). Transfection of a DNA locus that mediates the conversion of 10T1/2 fibroblasts to myoblasts. *Cell* 47, 649–656.

Lassar, a B., Buskin, J.N., Lockshon, D., Davis, R.L., Apone, S., Hauschka, S.D., and Weintraub, H. (1989). MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer. *Cell* 58, 823–831.

Lassar, a B., Davis, R.L., Wright, W.E., Kadesch, T., Murre, C., Voronova, A., Baltimore, D., and Weintraub, H. (1991). Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo. *Cell* 66, 305–315.

Lee, S.-J. (2007). Quadrupling muscle mass in mice by targeting TGF-beta signaling pathways. *PLoS One* 2, e789.

Lee, R.C., and Ambros, V. (2001). An Extensive Class of Small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 862-864

Lee, S., and McPherron, A. (2001). Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 2–7.

Lee, Y.S., and Dutta, A. (2007). The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes Dev.* 21, 1025–1030.

Lee, B.-K., Bhinge, A. a, and Iyer, V.R. (2011). Wide-ranging functions of E2F4 in transcriptional activation and repression revealed by genome-wide analysis. *Nucleic Acids Res.* 39, 3558–3573.

Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843–854.

Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., et al. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415–419.

Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S.H., and Kim, V.N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 23, 4051–4060.

Li, M., and He, L. (2012). microRNAs as novel regulators of stem cell pluripotency and somatic cell reprogramming. *Bioessays* 34, 670–680.

Lim, L.P., Lau, N.C., Garrett-Engle, P., Grimson, A., Schelter, J.M., Castle, J., Bartel, D.P., Linsley, P.S., and Johnson, J.M. (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433, 769–773.

Lindeman, G.J., Gaubatz, S., Livingston, D.M., and Ginsberg (1997). The subcellular localization of E2F-4 is cell-cycle dependent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 5095–5100.

Lindeman, G.J., Dagnino, L., Gaubatz, S., Xu, Y., Bronson, R.T., Warren, H.B., and Livingston, D.M. (1998). A specific, nonproliferative role for E2F-5 in choroid plexus function revealed by gene targeting. *Genes Dev.* 12, 1092–1098.

Lingel, A., Simon, B., Izaurralde, E., and Sattler, M. (2004). Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 576–577.

- Liu, D., Black, B.L., and Derynck, R. (2001). TGF-beta inhibits muscle differentiation through functional repression of myogenic transcription factors by Smad3. *Genes Dev.* *15*, 2950–2966.
- Liu, D., Kang, J.S., and Derynck, R. (2004). TGF-beta-activated Smad3 represses MEF2-dependent transcription in myogenic differentiation. *EMBO J.* *23*, 1557–1566.
- Liu, J., Rivas, F., Wohlschlegel, J., and Yates, J. (2005). A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat. Cell Biol.* *7*, 1261–1266.
- Liu, N., Williams, A.H., Kim, Y., McAnally, J., Bezprozvannaya, S., Sutherland, L.B., Richardson, J. a, Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2007). An intragenic MEF2-dependent enhancer directs muscle-specific expression of microRNAs 1 and 133. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 20844–20849.
- Londhe, P., and Davie, J.K. (2011). Gamma interferon modulates myogenesis through the major histocompatibility complex class II transactivator, CIITA. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 2854–2866.
- Lu, J., Webb, R., Richardson, J. a, and Olson, E.N. (1999). MyoR: a muscle-restricted basic helix-loop-helix transcription factor that antagonizes the actions of MyoD. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 552–557.
- Luan, Y., Lengyel, P., and Liu, C.-J. (2008). P204, a P200 Family Protein, As a Multifunctional Regulator of Cell Proliferation and Differentiation. *Cytokine Growth Factor Rev.* *19*, 357–369.
- Lukas, J., Petersen, B.O., Holm, K., Bartek, J., Helin, K., Lukas, J., Petersen, B.O., Holm, K., Bartek, J., and Helin, K. (1996). Deregulated Expression of E2F Family Members Induces S-Phase Entry and Overcomes p16 INK4A -Mediated Growth Suppression. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 1047-1057
- Ma, J.-B., Ye, K., and Patel, D.J. (2004). Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature* *429*, 318–322.
- Ma, J.-B., Yuan, Y.-R., Meister, G., Pei, Y., Tuschl, T., and Patel, D.J. (2005). Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature* *434*, 666–670.
- Ma, L., Quigley, I., Omran, H., and Kintner, C. (2014). Multicilin drives centriole biogenesis via E2f proteins. *Genes Dev.* *28*, 1461–1471.
- Magae, J., Wu, C.L., Illenye, S., Harlow, E., and Heintz, N.H. (1996). Nuclear localization of DP and E2F transcription factors by heterodimeric partners and retinoblastoma protein family members. *J. Cell Sci.* *109*, 1717–1726.
- Maiti, B., Li, J., de Bruin, A., Gordon, F., Timmers, C., Opavsky, R., Patil, K., Tuttle, J., Cleghorn, W., and Leone, G. (2005). Cloning and characterization of mouse E2F8, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation. *J. Biol. Chem.* *280*, 18211–18220.

- Martelli, F., and Livingston, D. (1999). Regulation of endogenous E2F1 stability by the retinoblastoma family proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *96*, 2858–2863.
- Martelli, F., Cenciarelli, C., Santarelli, G., Polikar, B., Felsani, A., and Caruso, M. (1994). MyoD induces retinoblastoma gene expression during myogenic differentiation. *Oncogene* *9*, 3579–3590.
- Marti, a, Wirbelauer, C., Scheffner, M., and Krek, W. (1999). Interaction between ubiquitin-protein ligase SCFSKP2 and E2F-1 underlies the regulation of E2F-1 degradation. *Nat. Cell Biol.* *1*, 14–19.
- Martínez-Balbás, M. a, Bauer, U.M., Nielsen, S.J., Brehm, a, and Kouzarides, T. (2000). Regulation of E2F1 activity by acetylation. *EMBO J.* *19*, 662–671.
- Marzio, G. (2000). E2F Family Members Are Differentially Regulated by Reversible Acetylation. *J. Biol. Chem.* *275*, 10887–10892.
- Massagué, J. (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* *67*, 753–791.
- Massagué, J., Cheifetz, S., Endo, T., and Nadal-Ginard, B. (1986). Type beta transforming growth factor is an inhibitor of myogenic differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *83*, 8206–8210.
- Mastroiannopoulos, N.P., Antoniou, A. a, Koutsoulidou, A., Uney, J.B., and Phylactou, L. a (2013). Twist reverses muscle cell differentiation through transcriptional down-regulation of myogenin. *Biosci. Rep.* *33*, 903–911.
- Matsumura, I., Tanaka, H., and Kanakura, Y. (2003). E2F1 and c-Myc in cell growth and death. *Cell Cycle* *333–338*.
- Mauro, a (1961). Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* *9*, 493–495.
- Mayr, C., and Bartel, D.P. (2009). Widespread shortening of 3'UTRs by alternative cleavage and polyadenylation activates oncogenes in cancer cells. *Cell* *138*, 673–684.
- Mayr, C., Hemann, M.T., and Bartel, D.P. (2007). Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science* *315*, 1576–1579.
- McPherron, a C., and Lee, S.J. (1997). Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 12457–12461.
- McPherron, A., Lawler, A., and Lee, S. (1997). Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* *387*, 83–90.
- Melnikova, I., and Christy, B. (1996). Muscle Cell Differentiation Is Inhibited by the Helix-Loop-Helix Protein Id3. *Cell Growth Differ.* *7*, 1067–1079.

- Melnikova, I.N., Bounpheng, M., Schatteman, G.C., Gilliam, D., and Christy, B. a (1999). Differential biological activities of mammalian Id proteins in muscle cells. *Exp. Cell Res.* *247*, 94–104.
- Melton, C., Judson, R.L., and Belloch, R. (2010). Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Nature* *463*, 621–626.
- Meneely, P., and Herman, R. (1979). Lethals, steriles and deficiencies in a region of the X chromosome of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 99–115.
- Min, H., and Yoon, S. (2010). Got target?: computational methods for microRNA target prediction and their extension. *Exp. Mol. Med.* *42*, 233.
- Moberg, K., Starz, M. a, and Lees, J. a (1996). E2F-4 switches from p130 to p107 and pRB in response to cell cycle reentry. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 1436–1449.
- Molkentin, J.D., Black, B.L., Martin, J.F., and Olson, E.N. (1995). Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins. *Cell* *83*, 1125–1136.
- Mondol, V., and Pasquinelli, A. (2012). Let's make it happen: the role of let-7 microRNA in development. *Curr. Top. Dev. Biol.* *99*, 1–30.
- Morris, L., Allen, K.E., and La Thangue, N.B. (2000). Regulation of E2F transcription by cyclin E-Cdk2 kinase mediated through p300/CBP co-activators. *Nat. Cell Biol.* *2*, 232–239.
- Moss, E.G. (2007). Heterochronic genes and the nature of developmental time. *Curr. Biol.* *17*, R425–34.
- Murray, T.V. a, McMahon, J.M., Howley, B. a, Stanley, A., Ritter, T., Mohr, A., Zwacka, R., and Fearnhead, H.O. (2008). A non-apoptotic role for caspase-9 in muscle differentiation. *J. Cell Sci.* *121*, 3786–3793.
- Murre, C., McCaw, P.S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L.Y., Jan, Y.N., Cabrera, C. V, Buskin, J.N., Hauschka, S.D., and Lassar, a B. (1989). Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* *58*, 537–544.
- Nabeshima, Y., Hanaoka, K., Hayasaka, M., and Esuimi, E. (1993). Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. *Nature* *364*, 532–535.
- Naguibneva, I., Ameyar-Zazoua, M., Nonne, N., Polesskaya, a, Ait-Si-Ali, S., Groisman, R., Souidi, M., Pritchard, L.L., and Harel-Bellan, a (2006a). An LNA-based loss-of-function assay for micro-RNAs. *Biomed. Pharmacother.* *60*, 633–638.
- Naguibneva, I., Ameyar-Zazoua, M., Polesskaya, A., Ait-Si-Ali, S., Groisman, R., Souidi, M., Cuvellier, S., and Harel-Bellan, A. (2006b). The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation. *Nat. Cell Biol.* *8*, 278–284.

- Naidu, P.S., Ludolph, D.C., To, R.Q., Hinterberger, T.J., and Konieczny, S.F. (1995). Myogenin and MEF2 function synergistically to activate the MRF4 promoter during myogenesis. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 2707–2718.
- Neuhold, L.A., and Wold, B. (1993). HLH forced dimers: tethering MyoD to E47 generates a dominant positive myogenic factor insulated from negative regulation by Id. *Cell* *74*, 1033–1042.
- Nonne, N., and Ameyar-Zazoua, M. (2009). Tandem affinity purification of miRNA target mRNAs (TAP-Tar). *Nucleic Acids Research* *38*, e20.
- Nottrott, S., Simard, M.J., and Richter, J.D. (2006). Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 1108–1114.
- Novitch, B.G., Mulligan, G.J., Jacks, T., and Lassar, a B. (1996). Skeletal muscle cells lacking the retinoblastoma protein display defects in muscle gene expression and accumulate in S and G2 phases of the cell cycle. *J. Cell Biol.* *135*, 441–456.
- O'Rourke, J.R., Georges, S. a, Seay, H.R., Tapscott, S.J., McManus, M.T., Goldhamer, D.J., Swanson, M.S., and Harfe, B.D. (2007). Essential role for Dicer during skeletal muscle development. *Dev. Biol.* *311*, 359–368.
- Ogawa, H., Ishiguro, K.-I., Gaubatz, S., Livingston, D.M., and Nakatani, Y. (2002). A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells. *Science* *296*, 1132–1136.
- Ohanna, M., Sobering, A.K., Lapointe, T., Lorenzo, L., Praud, C., Petroulakis, E., Sonenberg, N., Kelly, P. a, Sotiropoulos, A., and Pende, M. (2005). Atrophy of S6K1(-/-) skeletal muscle cells reveals distinct mTOR effectors for cell cycle and size control. *Nat. Cell Biol.* *7*, 286–294.
- Ohtani, K., DeGregori, J., and Nevins, J.R. (1995). Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 12146–12150.
- Okamura, K., Phillips, M.D., Tyler, D.M., Duan, H., Chou, Y., and Lai, E.C. (2008). The regulatory activity of microRNA\* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *15*, 354–363.
- Olsen, P.H., and Ambros, V. (1999). The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev. Biol.* *216*, 671–680.
- Ørom, U.A., Nielsen, F.C., and Lund, A.H. (2008). MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol. Cell* *30*, 460–471.
- Osada, H., and Takahashi, T. (2011). let-7 and miR-17-92: small-sized major players in lung cancer development. *Cancer Sci.* *102*, 9–17.

- Ozaki, T., Okoshi, R., Sang, M., Kubo, N., and Nakagawara, A. (2009). Acetylation status of E2F-1 has an important role in the regulation of E2F-1-mediated transactivation of tumor suppressor p73. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *386*, 207–211.
- Pagliuca, A., Bartoli, P., and Saccone, S. (1995). Molecular cloning of ID4, a novel dominant Negative Helix-Loop-Helix Human Gene on Chromosome 6p21.3-p22. *Genomics.* *27*, 200-203
- Papaoiannou, G., Inloes, J.B., Nakamura, Y., Paltrinieri, E., and Kobayashi, T. (2013). let-7 and miR-140 microRNAs coordinately regulate skeletal development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, E3291–3300.
- Paquin, M.-C., Cagnol, S., Carrier, J.C., Leblanc, C., and Rivard, N. (2013). ERK-associated changes in E2F4 phosphorylation, localization and transcriptional activity during mitogenic stimulation in human intestinal epithelial crypt cells. *BMC Cell Biol.* *14*, 33.
- Pardo, O.E., and Seckl, M.J. (2013). S6K2: The Neglected S6 Kinase Family Member. *Front. Oncol.* *3*, 191.
- Parker, M.H., Perry, R.L.S., Fauteux, M.C., Berkes, C. a, and Rudnicki, M. a (2006). MyoD synergizes with the E-protein HEB beta to induce myogenic differentiation. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 5771–5783.
- Pasquinelli, A.E. (2012). MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat. Rev. Genet.* *13*, 271–282.
- Pasquinelli, a E., Reinhart, B.J., Slack, F., Martindale, M.Q., Kuroda, M.I., Maller, B., Hayward, D.C., Ball, E.E., Degnan, B., Müller, P., et al. (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* *408*, 86–89.
- Pelosi, a, Careccia, S., Lulli, V., Romania, P., Marziali, G., Testa, U., Lavorgna, S., Lo-Coco, F., Petti, M.C., Calabretta, B., et al. (2012). miRNA let-7c promotes granulocytic differentiation in acute myeloid leukemia. *Oncogene* *32*, 3648–3654.
- Penn, B.H., Bergstrom, D. a, Dilworth, F.J., Bengal, E., and Tapscott, S.J. (2004). A MyoD-generated feed-forward circuit temporally patterns gene expression during skeletal muscle differentiation. *Genes Dev.* *18*, 2348–2353.
- Persengiev, S., Kondova, I., and Kilpatrick, D. (1999). E2F4 actively promotes the initiation and maintenance of nerve growth factor-induced cell differentiation. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 6048–6056.
- Petersen, C.P., Bordeleau, M.-E., Pelletier, J., and Sharp, P. a (2006). Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol. Cell* *21*, 533–542.
- Pillai, R.S., Bhattacharyya, S.N., Artus, C.G., Zoller, T., Cougot, N., Basyuk, E., Bertrand, E., and Filipowicz, W. (2005). Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* *309*, 1573–1576.

- Polesskaya, a, Duquet, a, Naguibneva, I., Weise, C., Vervisch, a, Bengal, E., Hucho, F., Robin, P., and Harel-Bellan, a (2000). CREB-binding protein/p300 activates MyoD by acetylation. *J. Biol. Chem.* *275*, 34359–34364.
- Polesskaya, a, Naguibneva, I., Fritsch, L., Duquet, a, Ait-Si-Ali, S., Robin, P., Vervisch, a, Pritchard, L.L., Cole, P., and Harel-Bellan, a (2001). CBP/p300 and muscle differentiation: no HAT, no muscle. *EMBO J.* *20*, 6816–6825.
- Polesskaya, A., Cuvellier, S., Naguibneva, I., Duquet, A., Moss, E.G., and Harel-Bellan, A. (2007). Lin-28 binds IGF-2 mRNA and participates in skeletal myogenesis by increasing translation efficiency. *Genes Dev.* *21*, 1125–1138.
- Polesskaya, A., Degerny, C., Pinna, G., Maury, Y., Kratassiouk, G., Mouly, V., Morozova, N., Kropp, J., Frandsen, N., and Harel-Bellan, A. (2013). Genome-wide exploration of miRNA function in mammalian muscle cell differentiation. *PLoS One* *8*, e71927.
- Pratesi, A., Tarantini, F., and Di Bari, M. (2013). Skeletal muscle: an endocrine organ. *Clin. Cases Miner. Bone Metab.* *10*, 11–14.
- Puri, P., Cimino, L., and Fulco, M. (1998). Regulation of E2F4 Mitogenic Activity during terminal differentiation by its heterodimerization partners for nuclear translocation. *Cancer Res.* 1325–1331.
- Puri, P.L., Sartorelli, V., Yang, X.J., Hamamori, Y., Ogryzko, V. V, Howard, B.H., Kedes, L., Wang, J.Y., Graessmann, a, Nakatani, Y., et al. (1997a). Differential roles of p300 and PCAF acetyltransferases in muscle differentiation. *Mol. Cell* *1*, 35–45.
- Puri, P.L., Avantaggiati, M.L., Balsano, C., Sang, N., Graessmann, a, Giordano, a, and Levrero, M. (1997b). p300 is required for MyoD-dependent cell cycle arrest and muscle-specific gene transcription. *EMBO J.* *16*, 369–383.
- Rabinovich, A., Jin, V.X., Rabinovich, R., Xu, X., and Farnham, P.J. (2008). E2F in vivo binding specificity: comparison of consensus versus nonconsensus binding sites. *Genome Res.* *18*, 1763–1777.
- Rebbapragada, A., Benchabane, H., Wrana, J.L., Celeste, A.J., and Attisano, L. (2003). Myostatin Signals through a Transforming Growth Factor  $\beta$ -Like Signaling Pathway To Block Adipogenesis. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 7230–7242.
- Reed, S. a, Ouellette, S.E., Liu, X., Allen, R.E., and Johnson, S.E. (2007). E2F5 and LEK1 translocation to the nucleus is an early event demarcating myoblast quiescence. *J. Cell. Biochem.* *101*, 1394–1408.
- Rehwinkel, J., Behm-Ansmant, I., Gatfield, D., and Izaurralde, E. (2005). A crucial role for GW182 and the DCP1: DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. *Rna* 1640–1647.
- Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, a E., Bettinger, J.C., Rougvie, a E., Horvitz, H.R., and Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *403*, 901–906.

- Relaix, F., Montarras, D., Zaffran, S., Gayraud-morel, B., Rocancourt, D., Tajbakhsh, S., Mansouri, A., Cumano, A., and Buckingham, M. (2006). Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. *J. Cell Biol.* *172*, 91–102.
- Rempel, R.E., Saenz-Robles, M.T., Storms, R., Morham, S., Ishida, S., Engel, a, Jakoi, L., Melhem, M.F., Pipas, J.M., Smith, C., et al. (2000). Loss of E2F4 activity leads to abnormal development of multiple cellular lineages. *Mol. Cell* *6*, 293–306.
- Rhodes, S.J., and Konieczny, S.F. (1989). Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family. *Genes Dev.* *3*, 2050–2061.
- Riechmann, V., van Crüchten, I., and Sablitzky, F. (1994). The expression pattern of Id4, a novel dominant negative helix-loop-helix protein, is distinct from Id1, Id2 and Id3. *Nucleic Acids Res.* *22*, 749–755.
- Rinn, J., and Chang, H. (2012). Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annu. Rev. Biochem.* *8*–12.
- Rios, A.C., Serralbo, O., Salgado, D., and Marcelle, C. (2011). Neural crest regulates myogenesis through the transient activation of NOTCH. *Nature* *473*, 532–535.
- Ríos, R., Carneiro, I., Arce, V.M., and Devesa, J. (2002). Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *282*, C993–9.
- Roberts, A.B., Anzano, M.A., Lamb, L.C., Smith, J.M., and Sporn, M.B. (1981). New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *78*, 5339–5343.
- Rocheteau, P., Gayraud-Morel, B., Siegl-Cachedenier, I., Blasco, M. a, and Tajbakhsh, S. (2012). A subpopulation of adult skeletal muscle stem cells retains all template DNA strands after cell division. *Cell* *148*, 112–125.
- Rommel, C., Bodine, S.C., Clarke, B. a, Rossman, R., Nunez, L., Stitt, T.N., Yancopoulos, G.D., and Glass, D.J. (2001). Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat. Cell Biol.* *3*, 1009–1013.
- Van Rooij, E., Liu, N., and Olson, E.N. (2008). MicroRNAs flex their muscles. *Trends Genet.* *24*, 159–166.
- Rosebeck, S., and Leaman, D.W. (2008). Mitochondrial localization and pro-apoptotic effects of the interferon-inducible protein ISG12a. *Apoptosis* *13*, 562–572.
- Roush, S., and Slack, F.J. (2008). The let-7 family of microRNAs. *Trends Cell Biol.* *18*, 505–516.
- 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.

- Rybak, A., Fuchs, H., Smirnova, L., Brandt, C., Pohl, E.E., Nitsch, R., and Wulczyn, F.G. (2008). A feedback loop comprising lin-28 and let-7 controls pre-let-7 maturation during neural stem-cell commitment. *Nat. Cell Biol.* *10*, 987–993.
- Salmanidis, M., Pillman, K., Goodall, G., and Bracken, C. (2014). Direct transcriptional regulation by nuclear microRNAs. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *54*, 304–311.
- Sampson, V.B., Rong, N.H., Han, J., Yang, Q., Aris, V., Soteropoulos, P., Petrelli, N.J., Dunn, S.P., and Krueger, L.J. (2007). MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. *Cancer Res.* *67*, 9762–9770.
- Sardet, C., Vidal, M., Cobrinik, D., Geng, Y., Onufryk, C., Chen, a, and Weinberg, R. a (1995). E2F-4 and E2F-5, two members of the E2F family, are expressed in the early phases of the cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 2403–2407.
- Sartorelli, V., Puri, P.L., Hamamori, Y., Ogryzko, V., Chung, G., Nakatani, Y., Wang, J.Y., and Kedes, L. (1999). Acetylation of MyoD directed by PCAF is necessary for the execution of the muscle program. *Mol. Cell* *4*, 725–734.
- Sartori, R., Milan, G., Patron, M., Mammucari, C., Blaauw, B., Abraham, R., and Sandri, M. (2009). Smad2 and 3 transcription factors control muscle mass in adulthood. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *296*, C1248–57.
- Schabort, E.J., van der Merwe, M., Loos, B., Moore, F.P., and Niesler, C.U. (2009). TGF-beta's delay skeletal muscle progenitor cell differentiation in an isoform-independent manner. *Exp. Cell Res.* *315*, 373–384.
- Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., and Hume, D.A. (2004). Interferon-gamma : an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* *75*, 163–189.
- Schuelke, M., and Wagner, K. (2004). Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N. Engl. J. Med.* *350*, 2682–2688.
- Schulze, a, Zeffass, K., Spitkovsky, D., Middendorp, S., Bergès, J., Helin, K., Jansen-Dürr, P., and Henglein, B. (1995). Cell cycle regulation of the cyclin A gene promoter is mediated by a variant E2F site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 11264–11268.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P.D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* *115*, 199–208.
- Seale, P., Sabourin, L.A., Girgis-gabardo, A., Mansouri, A., Gruss, P., Rudnicki, M.A., West, M.S., and Ls, C. (2000). Pax7 Is Required for the Specification of Myogenic Satellite Cells. *Cell* *102*, 777–786.
- Seggerson, K., Tang, L., and Moss, E.G. (2002). Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene lin-28 after translation initiation. *Dev. Biol.* *243*, 215–225.
- Selbach, M., Schwanhäusser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R., and Rajewsky, N. (2008). Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* *455*, 58–63.

Sellers, W.R., Novitch, B.G., Miyake, S., Heith, A., Otterson, G.A., Kaye, F.J., Lassar, A.B., and Kaelin, W.G. (1998). Stable binding to E2F is not required for the retinoblastoma protein to activate transcription, promote differentiation, and suppress tumor cell growth. *Genes Dev.* *12*, 95–106.

Sempere, L., and Freemantle, S. (2004). Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biology*, *5*, R13.1-R13.11.

Sempere, L.F., Dubrovsky, E.B., Dubrovskaya, V. a, Berger, E.M., and Ambros, V. (2002). The expression of the let-7 small regulatory RNA is controlled by ecdysone during metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* *244*, 170–179.

Sen, G., and Sarkar, S. (2007). The interferon-stimulated genes: targets of direct signaling by interferons, double-stranded RNA, and viruses. *Interf. 50th Anniv.* 233–250.

Serra, C., Palacios, D., Mozzetta, C., Forcales, S. V, Morantte, I., Ripani, M., Jones, D.R., Du, K., Jhala, U.S., Simone, C., et al. (2007). Functional interdependence at the chromatin level between the MKK6/p38 and IGF1/PI3K/AKT pathways during muscle differentiation. *Mol. Cell* *28*, 200–213.

Shin, E.K., Shin, A., Paulding, C., Schaffhausen, B., and Yee, A.M.Y.S. (1995). Multiple Changes in E2F Function and Regulation Occur upon Muscle Differentiation. *15*, 2252–2262.

Shirakata, M., Friedman, F.K., Wei, Q., and Paterson, B.M. (1993). Dimerization specificity of myogenic helix-loop-helix DNA-binding factors directed by nonconserved hydrophilic residues. *Genes Dev.* *7*, 2456–2470.

Slack, F.J., Basson, M., Liu, Z., Ambros, V., Horvitz, H.R., and Ruvkun, G. (2000). The lin-41 RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the let-7 regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Mol. Cell* *5*, 659–669.

Slager, H.G., Van Inzen, W., Freund, E., Van den Eijnden-Van Raaij, A.J., and Mummery, C.L. (1993). Transforming growth factor-beta in the early mouse embryo: implications for the regulation of muscle formation and implantation. *Dev. Genet.* *14*, 212–224.

Sokol, N.S. (2012). Small temporal RNAs in animal development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *22*, 368–373.

Sokol, N.S., Xu, P., Jan, Y.-N., and Ambros, V. (2008). *Drosophila* let-7 microRNA is required for remodeling of the neuromusculature during metamorphosis. *Genes Dev.* *22*, 1591–1596.

Soleimani, V.D., Yin, H., Jahani-asl, A., Ming, H., Kockx, C.E.M., Ijcken, W.F.J. Van, Grosveld, F., and Rudnicki, M.A. (2012). Snail Regulates MyoD Binding-Site Occupancy to Direct Enhancer Switching and Differentiation-Specific Transcription in Myogenesis. *Mol. Cell.* *47*, 457–468.

Song, J.-J., Smith, S.K., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. (2004). Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* *305*, 1434–1437.

- Sorrentino, V., Pepperkok, R., Davis, R.L., Ansorge, W., and Philipson, L. (1990). Cell proliferation inhibited by MyoD1 independently of myogenic differentiation. *Nature* 345, 813–815.
- Soulez, M., Rouviere, C.G., Chafey, P., Hentzen, D., Vandromme, M., Lautredou, N., Lamb, N., Kahn, a, and Tuil, D. (1996). Growth and differentiation of C2 myogenic cells are dependent on serum response factor. *Mol. Cell. Biol.* 16, 6065–6074.
- Sparks, R.L., and Scott, R.E. (1986). Transforming growth factor type beta is a specific inhibitor of 3T3 T mesenchymal stem cell differentiation. *Exp. Cell Res.* 165, 345–352.
- Spicer, D., Rhee, J., Cheung, W., and Lassar, A. (1996). Inhibition of Myogenic bHLH and MEF2 transcription factors by the bHLH Protein Twist. *Science* (80-. ). 272, 1476–1480.
- Stefani, G., and Slack, F.J. (2008). Small non-coding RNAs in animal development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 219–230.
- Suh, M.-R., Lee, Y., Kim, J.Y., Kim, S.-K., Moon, S.-H., Lee, J.Y., Cha, K.-Y., Chung, H.M., Yoon, H.S., Moon, S.Y., et al. (2004). Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Dev. Biol.* 270, 488–498.
- Sylvestre, Y., De Guire, V., Querido, E., Mukhopadhyay, U.K., Bourdeau, V., Major, F., Ferbeyre, G., and Chartrand, P. (2007). An E2F/miR-20a autoregulatory feedback loop. *J. Biol. Chem.* 282, 2135–2143.
- Tajbakhsh, S. (2003). Stem cells to tissue: molecular, cellular and anatomical heterogeneity in skeletal muscle. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13, 413–422.
- Tajbakhsh, S., Rocancourt, D., and Buckingham, M. (1996). Muscle progenitor cells failing to respond to positional cues adopt non-myogenic fates in myf-5 null mice. *Nature* 384, 266–270.
- Tamir, Y., and Bengal, E. (2000). Phosphoinositide 3-kinase induces the transcriptional activity of MEF2 proteins during muscle differentiation. *J. Biol. Chem.* 275, 34424–34432.
- Taylor, S.M., and Jones, P.A. (1979). Multiple New Phenotypes Induced Cells Treated with SAzacytidine in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell* 17, 771–779.
- Taylor, W.E., Bhasin, S., Artaza, J., Byhower, F., Azam, M., Willard, D.H., Kull, F.C., and Gonzalez-Cadavid, N. (2001). Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280, E221–8.
- Tedesco, D., and Vesco, C. (2001). MyoD activity upregulates E2F1 and enhances transcription from the cyclin E promoter in differentiating myoblasts lacking a functional retinoblastoma protein. *Exp. Cell Res.* 269, 301–311.
- Thalmeier, K., Synovzik, H., Mertz, R., Winnacker, E.L., and Lipp, M. (1989). Nuclear factor E2F mediates basic transcription and trans-activation by E1a of the human MYC promoter. *Genes Dev.* 3, 527–536.

- La Thangue, N.B., and Rigby, P.W. (1987). An adenovirus E1A-like transcription factor is regulated during the differentiation of murine embryonal carcinoma stem cells. *Cell* 49, 507–513.
- Thomson, D.W., Bracken, C.P., and Goodall, G.J. (2011). Experimental strategies for microRNA target identification. *Nucleic Acids Res.* 39, 6845–6853.
- Tokumaru, S., Suzuki, M., Yamada, H., Nagino, M., and Takahashi, T. (2008). let-7 regulates Dicer expression and constitutes a negative feedback loop. *Carcinogenesis* 29, 2073–2077.
- Tortora, G., and Grabowski, S.. (1994). *Principes d’anatomie et de physiologie (CEC)*.
- Tournay, O., and Benezra, R. (1996). Transcription of the dominant-negative helix-loop-helix protein Id1 is regulated by a protein complex containing the immediate-early response gene Egr-1. *Mol. Cell. Biol.* 16, 2418–2430.
- Trabucchi, M., Briata, P., and Garcia-Mayoral, M. (2009). The RNA-binding protein KSRP promotes the biogenesis of a subset of miRNAs. *Nature* 459, 1010–1014.
- Trendelenburg, A., and Meyer, A. (2009). Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 296, 1258–1270.
- Trimarchi, J.M., Fairchild, B., Wen, J., and Lees, J. a (2001). The E2F6 transcription factor is a component of the mammalian Bmi1-containing polycomb complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 1519–1524.
- Tsang, W.P., and Kwok, T.T. (2008). Let-7a microRNA suppresses therapeutics-induced cancer cell death by targeting caspase-3. *Apoptosis* 13, 1215–1222.
- Vaccarello, G., Figliola, R., Cramerotti, S., Novelli, F., and Maione, R. (2006). p57Kip2 is induced by MyoD through a p73-dependent pathway. *J. Mol. Biol.* 356, 578–588.
- Vaidya, T.B., Rhodes, S.J., Taparowsky, E.J., and Konieczny, S.F. (1989). Fibroblast growth factor and transforming growth factor beta repress transcription of the myogenic regulatory gene MyoD1. *Mol. Cell. Biol.* 9, 3576–3579.
- Vaishnav, Y.N., Vaishnav, M.Y., and Pant, V. (1998). The molecular and functional characterization of E2F-5 transcription factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 242, 586–592.
- Vasudevan, S., Tong, Y., and Steitz, J. a (2007). Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 318, 1931–1934.
- Ventayol, M., Viñas, J.L., Sola, A., Jung, M., Brüne, B., Pi, F., Mastora, C., and Hotter, G. (2014). miRNA let-7e targeting MMP9 is involved in adipose-derived stem cell differentiation toward epithelia. *Cell Death Dis.* 5, e1048.
- Walsh, K., and Perlman, H. (1997). Cell cycle exit upon myogenic differentiation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7, 597–602.

- Wang, J., and Helin, K. (1995). Inhibition of in vitro myogenic differentiation by cellular transcription factor E2F1. *Cell Growth Differ.* 6, 1299–1306.
- Wang, J., and Walsh, K. (1996). Inhibition of retinoblastoma protein phosphorylation by myogenesis-induced changes in the subunit composition of the cyclin-dependent kinase 4 complex. *Cell Growth Differ.* 7, 1471–1478.
- Wang, H., Xu, Q., Xiao, F., Jiang, Y., and Wu, Z. (2008a). Involvement of the p38 Mitogen-activated Protein Kinase alpha, beta, and gamma Isoforms in Myogenic Differentiation. *Mol. Biol. Cell* 19, 1519–1528.
- Wang, Y., Juranek, S., Li, H., Sheng, G., Tuschl, T., and Patel, D.J. (2008b). Structure of an argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex. *Nature* 456, 921–926.
- Wang, Y., Sheng, G., Juranek, S., Tuschl, T., and Patel, D.J. (2008c). Structure of the guide-strand-containing argonaute silencing complex. *Nature* 456, 209–213.
- Wasserman, W.W., and Fickett, J.W. (1998). Identification of regulatory regions which confer muscle-specific gene expression. *J. Mol. Biol.* 278, 167–181.
- Weintraub, H., and Tapscott, S. (1989). Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver, and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 5434–5438.
- Wightman, B., Ha, I., and Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75, 855–862.
- Winter, B., Braun, T., and Arnold, H. (2000). Co-operativity of functional domain in the muscle-specific factor Myf-5. *EMBO J.* 1, 1843–1855.
- Wright, W.E., Sassoon, D. a, and Lin, V.K. (1989). Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *Cell* 56, 607–617.
- Wu, L., Timmers, C., Maiti, B., Saavedra, H.I., Sang, L., Chong, G.T., Nuckolls, F., Giangrande, P., Wright, F. a, Field, S.J., et al. (2001). The E2F1-3 transcription factors are essential for cellular proliferation. *Nature* 414, 457–462.
- Wynsberghe, P. Van, Kai, Z., Massirer, K., Burton, V., Yeo, G., and Pasquinelli, A. (2011). LIN-28 co-transcriptionally binds primary *let-7* to regulate miRNA maturation in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 302–308.
- Xu, Q., and Wu, Z. (2000). The insulin-like growth factor-phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signaling pathway regulates myogenin expression in normal myogenic cells but not in rhabdomyosarcoma-derived RD cells. *J. Biol. Chem.* 275, 36750–36757.
- Yee, a S., Reichel, R., Kovetski, I., and Nevins, J.R. (1987). Promoter interaction of the E1A-inducible factor E2F and its potential role in the formation of a multi-component complex. *EMBO J.* 6, 2061–2068.

- Yeom, K.-H., Lee, Y., Han, J., Suh, M.R., and Kim, V.N. (2006). Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for Drosha in primary miRNA processing. *Nucleic Acids Res.* *34*, 4622–4629.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., and Cullen, B.R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* *17*, 3011–3016.
- Yin, H., Louis-jeune, C., Perdiguero, E., Liu, Q., Zha, X., Pranckeviciene, E., and Mun, P. (2012). Comparative expression profiling identifies differential roles for Myogenin and p 38 a MAPK signaling in myogenesis. *Journal of Mol. Cell. Biol.* 1–12.
- Zacksenhaus, E., Jiang, Z., Chung, D., Marth, J.D., Phillips, R. a, and Gallie, B.L. (1996). pRb controls proliferation, differentiation, and death of skeletal muscle cells and other lineages during embryogenesis. *Genes Dev.* *10*, 3051–3064.
- Zammit, P., Heslop, L., and Hudon, V. (2002). Kinetics of myoblast proliferation show that resident satellite cells are competent to fully regenerate skeletal muscle fibers. *Exp. Cell Research* *281*, 39–49.
- Zanou, N., and Gailly, P. (2013). Skeletal muscle hypertrophy and regeneration: interplay between the myogenic regulatory factors (MRFs) and insulin-like growth factors (IGFs) pathways. *Cell. Mol. Life Sci.* *70*, 4117–4130.
- Zentella, A., and Massagué, J. (1992). Transforming growth factor beta induces myoblast differentiation in the presence of mitogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 5176–5180.
- Zhang, J.M., Wei, Q., Zhao, X., and Paterson, B.M. (1999a). Coupling of the cell cycle and myogenesis through the cyclin D1-dependent interaction of MyoD with cdk4. *EMBO J.* *18*, 926–933.
- Zhang, P., Wong, C., and Liu, D. (1999b). p21CIP1 and p57KIP2 control muscle differentiation at the myogenin step. *Genes Dev.* *13*, 213–224.
- Zhang, X., Zuo, X., Yang, B., Li, Z., Xue, Y., Zhou, Y., Huang, J., Zhao, X., Zhou, J., Yan, Y., et al. (2014). MicroRNA Directly Enhances Mitochondrial Translation during Muscle Differentiation. *Cell* *158*, 607–619.
- Zhao, C., Sun, G., Li, S., Lang, M.-F., Yang, S., Li, W., and Shi, Y. (2010). MicroRNA let-7b regulates neural stem cell proliferation and differentiation by targeting nuclear receptor TLX signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 1876–1881.
- Zhu, C.-H., Mouly, V., Cooper, R.N., Mamchaoui, K., Bigot, A., Shay, J.W., Di Santo, J.P., Butler-Browne, G.S., and Wright, W.E. (2007). Cellular senescence in human myoblasts is overcome by human telomerase reverse transcriptase and cyclin-dependent kinase 4: consequences in aging muscle and therapeutic strategies for muscular dystrophies. *Aging Cell* *6*, 515–523.
- Zhu, H., Shyh-Chang, N., Segrè, A. V, Shinoda, G., Shah, S.P., Einhorn, W.S., Takeuchi, A., Engreitz, J.M., Hagan, J.P., Kharas, M.G., et al. (2011). The Lin28/let-7 axis regulates glucose metabolism. *Cell* *147*, 81–94.

Zhuang, Y., Kim, C., Bartelmez, S., Cheng, P., Groudine, M., and Weintraub, H. (1992). Helix-loop-helix transcription factors E12 and E47 are not essential for skeletal or cardiac myogenesis, erythropoiesis, chondrogenesis, or neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 12132–12136.

Zipprich, J., Bhattacharyya, S., Mathys, H., and Filipowicz, W. (2009). Importance of the C-terminal domain of the human GW182 protein TNRC6C for translational repression. *Rna* 781–793.

Zisoulis, D.G., Kai, Z.S., Chang, R.K., and Pasquinelli, A.E. (2012). Autoregulation of microRNA biogenesis by let-7 and Argonaute. *Nature* 486, 541–544.