



HAL
open science

Aspects biochimiques et cellulaires de la dérégulation du processus myogénique chez des souris hypomorphes pour le gène Pofut I

Bilal Al Jaam

► **To cite this version:**

Bilal Al Jaam. Aspects biochimiques et cellulaires de la dérégulation du processus myogénique chez des souris hypomorphes pour le gène Pofut I. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2016. Français. NNT : 2016LIMO0086 . tel-01428814

HAL Id: tel-01428814

<https://theses.hal.science/tel-01428814>

Submitted on 6 Jan 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

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

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Spécialité : *Biologie moléculaire et cellulaire*

Présentée et soutenue par

Bilal AL JAAM

Le 6 Décembre 2016

Thèse de Doctorat

**Aspects biochimiques et cellulaires de la
dérégulation du processus myogénique chez
des souris hypomorphes pour le gène *Pofut1***

**Université
de Limoges**

Ecole Doctorale 524
Biologie, Santé
Faculté des Sciences
et Techniques

Unité de Génétique
Moléculaire Animale
UMR 1061 INRA
Université de Limoges

Thèse co-dirigée par :

Sébastien LEGARDINIER et Abderrahman MAFTAH

JURY

Président du jury

Jean-Michel PETIT, Professeur, Université de LIMOGES

Rapporteurs

Tony LEFEBVRE, Professeur, Université de Lille 1

Pascal MAIRE, Directeur de Recherche INSERM, Université Paris Descartes

Examineurs

Delphine DUPREZ, Directrice de Recherche CNRS, Université Pierre et Marie Curie, PARIS

Samar EL-HAMOUI, Professeur associé, Université Libanaise

Véronique BLANQUET, Professeur, Université de LIMOGES

Abderrahman MAFTAH, Professeur, Université de LIMOGES

Sébastien LEGARDINIER, Maître de conférences, Université de LIMOGES

DEDICACES

A mes parents,

A mes frères

REMERCIEMENTS

Et c'est ainsi que cette aventure s'achève !

Le seul moyen de se délivrer d'une tentation, c'est d'y céder paraît-il ! Alors j'y cède en disant un grand **Merci** aux personnes qui ont cru en moi et qui m'ont permis d'arriver au bout de cette thèse. Ce rapport est le fruit d'un travail de recherche qui a duré 4 ans.

A l'issue de la rédaction de ce rapport, je suis convaincu que la thèse est loin d'être un travail solitaire. En effet, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail doctoral sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, la bonne humeur et l'intérêt manifestés à l'égard de ma recherche m'ont permis de progresser dans cette phase délicate de « l'apprenti-chercheur ».

Tout d'abord, je tiens à remercier Monsieur **Tony LEFEBVRE**, Professeur à l'Université de Lille 1, ainsi que Monsieur **Pascal MAIRE**, Directeur de recherche à l'Université Paris Descartes, qui me font l'honneur de juger ce travail en tant que rapporteurs, en espérant que ce manuscrit de thèse retienne leur intérêt et qu'il leur soit agréable à lire. Je tiens également à exprimer ma reconnaissance à Madame **Delphine DUPREZ**, Directeur de recherche à l'Université Pierre et Marie Curie de Paris, Madame **Samar EL-HAMOUI**, Professeur associé à l'Université Libanaise et Madame **Véronique BLANQUET**, Professeur à l'Université de Limoges, pour avoir accepté d'évaluer ce travail en tant qu'examinatrices. Je remercie particulièrement Monsieur **Jean-Michel PETIT**, Professeur à l'Université de Limoges, de me faire l'honneur de présider mon jury de soutenance de thèse malgré ses nombreuses occupations.

J'adresse mes très sincères remerciements à mon directeur de thèse, Monsieur **Abderrahman MAFTAH**, Professeur à l'université de Limoges et Directeur de l'équipe *Glycosylation et Myogenèse* au sein de l'UMR 1061 – INRA, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. Je lui suis reconnaissant pour le temps qu'il a su m'accorder, ses qualités pédagogiques et scientifiques ainsi que sa franchise et sa sympathie. J'ai beaucoup appris à ses côtés et je lui adresse toute ma gratitude.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à « mon chef » spirituel et scientifique, Monsieur **Sébastien LEGARDINIER**, Maître de Conférences à l'Université de Limoges, pour m'avoir encadré, formé et supporté tout au long de ces années au laboratoire. Tu as su me transmettre tes connaissances scientifiques et techniques avec une si grande patience et tant de pédagogie que ce qui n'était pour moi que du '*chinois*' est devenu clair et limpide. Tu m'as appris à être rigoureux et méthodique et c'est grâce à ton aide précieuse et tes remarques pertinentes que j'ai pu mener à bien ce travail de thèse. Merci de ne m'avoir jamais laissé tomber malgré les situations difficiles que j'ai vécues. Je me considère chanceux de t'avoir comme chef. Bien que cette thèse ait été débutée au zoo avec le singe vert d'Afrique, et malgré tous les obstacles et les soucis personnels et professionnels que j'ai eus, on a réussi finalement à la clôturer. Tes mots d'encouragements (va bosser feignasse), de consolation (pleure pas Jeannette), d'accueil (va-t'en) et de respect (mange ta babouche) vont rester dans ma tête pour un bon moment.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Madame **Agnès GERMOT**, Maître de Conférences à l'Université de Limoges, qui a tout fait pour m'aider à réaliser ce projet scientifique, que ce soit en Master ou en thèse. Agnès, je te remercie pour m'avoir fait bénéficier de ton grand savoir et ton intérêt. Ton insistance à me faire goûter la cuisine française a parfois payé.

Grande pensée à Dr. **Daniel Petit** qui m'a permis de me lever motivé, le cœur léger et l'esprit tranquille depuis le début de ma thèse. Très humblement, je voudrais te dire merci pour ton soutien, tes multiples encouragements et les moments que tu m'as consacrés.

Un grand merci à mes compagnons de route :

Vincent (*Le Français*), le roi du barbecue 😊, merci pour ta disponibilité et ton aide précieuse depuis mon arrivée (*le Libanais*).

Audrey (Zora), ma colocataire dans le 104. Je te remercie pour ta compagnie et ta bonne humeur.

Amel, un merci spécial pour ton soutien moral et tes qualités humaines. Je suis reconnaissant pour tout ce que tu as fait pour moi.

Alexandre, mon ami bosseur. Merci pour ton dynamisme et ton implication dans mon projet de thèse. Je te souhaite une bonne carrière d'épigénéticien.

Ahmad, mon copain de jeunesse, Danke für deine moralische Unterstützung in meinen Schwierigen Zeiten 😊.

Bien sûr, je n'ose pas oublier **Claire**, ma fidèle amie. Un merci énorme qui va jusqu'au Liban 😊.

Florian, merci pour ton aide précieuse. Je te laisse avec grand plaisir le soin de t'occuper des souris cax.

Je tiens à remercier de tout cœur **Rayan**, celle qui a souffert autant que moi pendant cette thèse mais qui m'a pourtant toujours encouragé à aller jusqu'au bout de mes ambitions.

Mes derniers remerciements et non les moindres, s'adressent à ma belle **Rola** ♥. Ton soutien moral était sans faille et très important dans la dernière phase de cette aventure.

Je remercie également l'équipe technique, et plus particulièrement **Karine Pasquier**, pour son aide technique avec les souris.

Je remercie l'Association Libanaise pour la Recherche Scientifique (**LASeR**) pour avoir financé cette thèse en m'accordant une allocation d'excellence de recherche. Je remercie également l'Union Européen (**FEDER**) et la région Limousine pour avoir cofinancé ce projet.

Enfin, les mots les plus simples étant les plus forts, j'adresse toute mon affection à ma famille, et surtout à ma maman qui m'a fait comprendre que la vie n'est pas faite que de problèmes que l'on peut résoudre grâce à des formules

mathématiques et des algorithmes. Malgré mon éloignement depuis de (trop)nombreuses années, leur intelligence, leur confiance, leur tendresse, leur amour me portent et me guident tous les jours. Merci pour avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Est-ce un bon endroit pour dire ce genre de choses ? Je n'en connais en tous cas pas de mauvais. Je vous aime ♥.

“Les personnes les plus formidables sont celles qui ont connu l'échec, la souffrance, le combat intérieur, la perte et qui ont su surmonter leur détresse”

*Elisabeth Kubler-Ross
(1926-2004)
Psychiatre et Essayiste*

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS	1
LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX.....	5
RESUME.....	11
ABSTRACT	13
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....	15
AVANT-PROPOS	19
EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	23
Chapitre I. Développement musculaire anté- et post-natal	25
<i>I. La somitogenèse.....</i>	29
I.1 Formation des somites par segmentation mésodermique	29
I.2 Régulation spatio-temporelle du processus de segmentation	31
I.2.1 Horloge de segmentation liée à des oscillations transcriptionnelles	33
I.2.2 Front de détermination lié aux gradients de morphogènes.....	39
<i>II. La myogenèse embryonnaire et fœtale.....</i>	39
II.1 Les principaux facteurs de transcription impliqués dans la myogenèse.....	41
II.1.1 Les facteurs de régulation myogénique ou MRFs.....	41
II.1.2 Les facteurs de transcription de la famille Pax	43
II.2 Les différentes étapes de la myogenèse	47
II.2.1 Détermination des cellules mésodermiques en progéniteurs musculaires	47
II.2.2 Migration des progéniteurs et détermination en myoblastes	49
II.2.3 Prolifération des myoblastes	51
II.2.4 Différentiation en myotubes	53
II.2.5 Formation des myotubes matures.....	59
II.2.6 Formation des fibres musculaires.....	61
<i>III. La croissance et la régénération musculaire post-natale.....</i>	63
III.1 Les cellules satellites : cellules souches musculaires adultes	63
III.1.1 Origine des cellules satellites.....	65
III.1.2 Hétérogénéité des cellules satellites	65

III.1.3	Maintien ou retour à l'état quiescent des cellules satellites.....	67
III.1.4	Activation des cellules satellites	69
III.2	Hypertrophie des fibres musculaires en croissance.....	71
III.2.1	Rôle des cellules satellites	71
III.2.2	Rôle de la synthèse protéique	73
III.3	Régénération des fibres musculaires.....	75

Chapitre II. La myogenèse sous le contrôle de plusieurs voies de signalisation..... 79

I. La voie de signalisation Notch..... 79

I.1	Structures des récepteurs et des ligands NOTCH.....	83
I.1.1	Structures des récepteurs NOTCH.....	83
I.1.2	Structures des ligands de NOTCH	89
I.2	Glycosylations des principaux acteurs de la voie Notch.....	93
I.2.1	Glycosylations des récepteurs NOTCH.....	93
I.2.2	Glycosylation des ligands de NOTCH	103
I.3	La Voie canonique de Notch	105
I.3.1	Présentation à la surface des récepteurs NOTCH sous forme hétérodimétrique ...	107
I.3.2	Présentation à la surface des ligands DSL de NOTCH	109
I.3.3	Interactions entre les récepteurs NOTCH et leurs ligands.....	109
I.3.4	Clivages protéolytiques des récepteurs NOTCH	123
I.3.5	Interactions du NICD avec d'autres protéines nucléaires	129
I.3.6	Gènes cibles de la voie Notch	131
I.4	La voie non canonique de Notch	135

II. Autres voies de signalisation impliquées dans la myogenèse 137

II.1	La voie de signalisation Wnt	137
II.2	La voie de signalisation IGF-1	139
III.3	La voie de la Myostatine.....	143

Chapitre III. La protéine O-fucosyltransférase 1 (POFUT1) 147

I. Introduction..... 147

I.1	Du gène à la protéine.....	149
I.1.1	Le gène <i>Pofut1</i>	149

I.1.2	Les variants transcriptionnels	149
I.1.3	La protéine POFUT1	151
II.	Structure tridimensionnelle de POFUT1.....	151
III.	Fonctions biologiques de POFUT1.....	153
III.1	NOTCH et leurs ligands, des protéines cibles de choix.....	155
III.2	Les autres protéines cibles de POFUT1	157
IV.	Modèles animaux	159
IV.1	Les souris KO pour <i>Pofut1</i>	159
IV.2	Les souris hypomorphes pour <i>Pofut1</i>	161
PROJET DE THESE		165
RESULTATS		169
Publication N°1.....		173
Publication N°2.....		181
DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES		191
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		217
ANNEXES		259

LISTE DES ABREVIATIONS

ATP: Adenosine Triphosphate	EGF: Epidermal Growth Factor
ADAM: A Disintegrin and Metalloproteinase	EOGT: EGF domain-specific <i>O</i> -linked <i>N</i> -acetylglucosamine Transferase
AMACO: A domain-containing protein similar to Matrilin and Collagen	FAK: Focal Adhesion Kinase
ANK: Ankyrin	FGF: Fibroblast Growth Factor
APC: Adenomatous Polyposis <i>Coli</i>	FGFR: Fibroblast Growth Factor Receptor
APP: Amyloide Protein Precursor	Fz: Frizzled
ARG: Arginine	GalNAc: <i>N</i> -Acétylgalactosamine
bHLH: basic Helix-Loop-Helix	GALNT11: <i>N</i> -Acétylgalactosaminyl -transférase 11
BMP: Bone Morphogenetic Protein	GDF8: Growth Differentiation Factor 8
CAP: Adenylyl Cyclase-Associated Protein	GDP: Guanosine 5'-Diphosphate
CBF1: Centromere-Binding Protein 1	GlcNAc: <i>N</i> -Acétylglucosamine
cePOFUT1: <i>Caenorhabditis elegans</i> protein <i>O</i> -fucosyltransferase 1	GLP-1: Glucagon-like Peptide-1
CS: Cellules Satellites	HAT: Histone Acétyltransférase
NECD: Notch Extracellular Domain	HD: Heterodomain
CD34: Cluster of Differentiation 34	HDAC: Histone Désacétylase
Cdk: Cyclin-dependent Kinase	Hes: Hairy/Enhancer of Split
CRD: Cysteine Rich Domain	Hey: Hairy/Enhancer of Split-related with YRPW Motif
Dact1: Dishevelled-binding antagonist of β -catenin1	Heyl: Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif-like
DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole	HGF: Hepatocyte Growth Factor
Des: Desmine	hsEGF12: <i>Homo sapiens</i> EGF-like 12
Dkk1: Dickkopf-related protein 1	IGF1: Insulin Growth Factor 1
DII1: Delta-like 1	IGFBPs: Insulin-like Growth Factor Binding Proteins
DNER: Delta and Notch-like Epidermal Growth factor-related Receptor	IL-4: Interleukin-4
DSL: Delta/Serrate/Lag-2	IR: Insulin Receptor
DOS: Delta and OSM-11 like	IRS1: Insulin Receptor Substrate 1
Dusp4/6: Dual specificity protein phosphatase 4/6	KDEL: Lysine-Aspartate-Glutamate-Leucine
	KO: knockout

Lfng: Lunatic fringe

LNR: Lin12/Notch Repeat

LRP5/6: Lipoprotein Related Protein 5/6

Maml: Mastermind-like 1

Man: Mannose

MDCS: Myoblastes Dérivés de Cellules Satellites

Mef: Myocyte enhancer factor

MESP2: Mesoderm posterior protein 2

Mfng: Manic fringe

MRF: Myogenic Regulatory Factor

Myf: Myogenic factor

MyHC: Myosin Heavy Chain

MyoD: Myoblast Determination protein

Myog: Myogenin

N-CAM: Neural Cell Adhesion Molecule

NECD: Notch Extracellular Domain

Neu: Neuramin

NFAT: Nuclear Factor of Activated T-cells cytoplasmic

NICD: Notch Intracellular Domain

Nkd1: Protein naked cuticle homolog 1

NLS: Nuclear Localization Signal

Npnt: Nephronectin

Nrarp: Notch-regulated ankyrin repeat-containing protein

Pax: Paired box protein

PDGF: Platelet Derived Growth Factor

Pen: Presenilin enhancer

PEST: Proline, Glutamate, Sérine, Thréonine

PI3k: Phosphatidylinositol 3-kinase

Pitx: Pituitary homeobox

Pofut: Protein O-fucosyltransferase

Poglut: Protein O-glucosyltransferase

PSM: Presomitic Mesoderm

RAM: RBPj Associated Molecule

RAPTOR: Regulatory-Associated Protein of mTOR

Rbpj: Recombining binding protein suppressor of hairless

RE: Réticulum Endoplasmique

Rfng: Radical fringe

Shh: Sonic hedgehog

TACE: Tumor necrosis factor Alpha Converting Enzyme

TAD: Transactivation Domain

TCF/LEF: T Cell factor/Lymphoid enhancer factor

TGF: Transforming Growth Factor

TNF: Transforming Necrosis Factor

TSR: Trombospondin Type 1 Repeat

UDP: Uridine Diphosphate

Wnt: Wingless

WT: Wild type

Xyl: Xylose

Xxylt1: Xyloside xylosyltransferase 1

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Anatomie du muscle squelettique.

Figure 2 : Evolution du mésoderme.

Figure 3 : Formation des somites.

Figure 4 : Régionalisation des somites et origine des muscles squelettiques du tronc et des membres.

Figure 5 : Horloge de segmentation.

Figure 6 : Rythmicité de la segmentation.

Figure 7 : Régulation de l'expression des gènes cycliques appartenant aux voies de Notch, FGF et Wnt.

Figure 8 : Préparations squelettiques d'embryons mutants pour *Hes7* et *Lfng*.

Figure 9 : Stades de développement du dermomyotome et du myotome.

Figure 10 : Motif bHLH.

Figure 11 : Facteurs de signalisation cellulaire impliqués dans la myogenèse embryonnaire.

Figure 12 : Migration de cellules précurseurs des muscles vers les bourgeons des membres.

Figure 13 : Migration des myoblastes.

Figure 14 : Hiérarchie des facteurs de transcription régulant la progression de la lignée myogénique.

Figure 15 : Les protéines impliquées dans l'adhésion et la migration myoblastique chez la souris.

Figure 16 : Les voies de signalisation impliquées dans la fusion myoblastique.

Figure 17 : Les protéines spécifiques exprimées au cours de la différenciation myogénique.

Figure 18 : Composition en protéines du sarcomère.

Figure 19 : Les différents marqueurs des cellules satellites.

Figure 20 : Divisions symétrique et asymétrique des cellules satellites activées.

Figure 21 : Voies IGF-1/Akt/mTOR et Myostatine impliquées dans la croissance musculaire post-natale.

Figure 22 : Rôle de la voie Notch dans la somitogenèse, la myogenèse embryonnaire, la croissance et la régénération musculaire post-natale.

Figure 23 : Les récepteurs NOTCH et leurs ligands canoniques.

Figure 24 : Les récepteurs NOTCH.

Figure 25 : Composition d'un domaine EGF-like.

Figure 26 : Organisation structurale du récepteur NOTCH1 murin.

Figure 27 : Activation de la voie Notch chez la drosophile.

Figure 28 : Ligands canoniques et non canoniques des récepteurs NOTCH.

Figure 29 : Organisation structurale des ligands DLL1 et Jagged1.

Figure 30 : O-fucosylation de répétitions EGF-like.

Figure 31 : O-glycosylation de répétitions EGF-like.

Figure 32 : Sites potentiels de O-fucosylation des ligands de NOTCH.

Figure 33 : Voie canonique de signalisation Notch.

Figure 34 : Types d'interaction de NOTCH avec son ligand Delta.

Figure 35 : Modulation de la signalisation Notch par FRINGE.

Figure 36 : Les enzymes de la famille ADAM.

Figure 37 : Modèle d'activation de la voie Notch par une cellule exprimant le ligand Delta.

Figure 38 : Le complexe de la γ -sécrétase.

Figure 39 : Les ligands non-canoniques de Notch.

Figure 40 : La voie de signalisation canonique et non canonique de Wnt.

Figure 41 : La Voie IGF-1/Akt.

Figure 42 : Voies de signalisation de la Myostatine.

Figure 43 : Structure du gène *Pofut1* et de ses variants d'épissage chez la souris.
Description des protéines correspondantes.

Figure 44 : Alignement de quelques séquences protéiques de POFUT1.

Figure 45 : Structure cristalline de CePOFUT1 en complexe avec le GDP-fucose.

Figure 46 : Représentation des surfaces électrostatiques de CePOFUT1 et *hsEGF12*.

Figure 47 : La mutation *cax*.

Figure 48 : Phénotypes squelettiques variables et défauts de somitogenèse chez les souris mutantes *Pofut1^{cax/cax}*.

LISES DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques des fibres lentes (I) et rapides (II).

Tableau 2 : Liste non exhaustive des protéines sécrétées et membranaires comportant des répétitions EGF-like avec des sites potentiels de *O*-fucosylation.

Tableau 3 : Sites d'expression et fonctions des gènes *Hes*.

Tableau 4 : Spécificité et localisation des fucosyltransférases chez l'homme et chez la souris.

La **croissance musculaire postnatale** chez la souris s'effectue principalement par une **hypertrophie** et un allongement des fibres musculaires. L'augmentation de l'aire des fibres est contrôlée par plusieurs voies de signalisation telle que **la voie Notch**, qui est impliquée dans l'activation des **cellules satellites** (CS) en début de croissance musculaire postnatale chez la souris. La *O*-fucosylation, médiée par la protéine *O*-fucosyltransférase 1 (**POFUT1**), des répétitions EGF-like de la partie extracellulaire des récepteurs **NOTCH** joue un rôle déterminant dans la modulation des interactions récepteur-ligand (R-L), nécessaires à l'activation de la voie Notch.

Les souris **Pofut1^{cax/cax}** sont hypomorphes pour le gène *Pofut1* et nos résultats montrent, en plus de malformations squelettiques, une hypertrophie musculaire post-natale, pas d'hyperplasie et une réduction du pool de CS. Pour comprendre l'origine de cette hypertrophie, des cultures primaires de myoblastes dérivés de CS (**MDCS**) de muscles squelettiques ont été réalisées dans des conditions de prolifération ou de différenciation. Les MDCS **Pofut1^{cax/cax}** présentent une activité réduite de la signalisation Notch, due à une moins bonne interaction R-L provoquée par une *O*-fucosylation amoindrie des répétitions EGF-like. Il en résulte une diminution de l'expression de **Pax7**, marqueur de l'état indifférencié, et une dérégulation de l'expression des facteurs régulateurs de la myogenèse (**Myod**, **Myf5** et **Myogénine**). La conséquence ultime est la réduction de la proportion en progéniteurs Pax7+/MyoD- au profit de cellules Pax7-/MyoD+ engagées dans la différenciation. Ces observations sont en accord avec la **différenciation précoce** des MDCS **Pofut1^{cax/cax}**.

Nos résultats indiquent que cette hypertrophie musculaire post-natale chez les souris **Pofut1^{cax/cax}** est due à une propension plus importante des CS activées à se différencier et à fusionner avec des fibres pré-existantes plutôt que retourner à l'état de quiescence.

Mots clés : Muscle, Hypertrophie, Cellules satellites, Notch, Pofut1

Postnatal muscle growth in mice mainly occurs by **hypertrophy** and by an increase of myofibres length. This increase in myofibres area is controlled by multiple signaling pathways such as **Notch signaling**, which is involved in activation of **satellite cells** (SC) at the beginning of postnatal muscle growth in mice. The *O*-fucosylation of EGF-like repeats within the extracellular domain of **NOTCH** receptors, mediated by protein *O*-fucosyltransferase 1 (**POFUT1**), plays a key role in the modulation of receptor-ligand interactions (R-L), necessary for activation of Notch signaling.

Pofut1^{cax/cax} mice are hypomorphic for the *Pofut1* gene. In addition to skeletal defects, our results show postnatal muscular hypertrophy, no hyperplasia and a reduced pool of SC. To understand the origin of this hypertrophy, primary cultures of myoblasts derived from SC (**SCDM**) from skeletal muscles were studied in proliferating and differentiating conditions. *Pofut1*^{cax/cax} SCDM showed a reduced Notch signaling due to a less efficient R-L interactions provoked by a low *O*-fucosylation of EGF-like repeats. This results in decreased expression of **Pax7**, a marker of undifferentiated state, and a change in the expression of myogenic regulatory factors (**Myod**, **Myf5** and **Myogenin**). Subsequently, the proportion of Pax7+/MyoD- progenitors decreased while the proportion of Pax7-/MyoD+ cells committed in differentiation increased. These findings corroborate **early differentiation** of *Pofut1*^{cax/cax} SCDM.

Our results indicate that this postnatal muscle hypertrophy in *Pofut1*^{cax/cax} mice is due to the fact that activated satellite cells are more prone to differentiate and fuse with pre-existing myofibres that returning to quiescence.

Keywords : Muscle, Hypertrophy, Satellite cells, Notch, Pofut1

🌀 PUBLICATIONS

Reduced Notch signaling leads to postnatal skeletal muscle hypertrophy in *Pofut1*^{cax/cax} mice.

Al Jaam B, Heu K, Pennarubia F, Segelle A, Magnol L, Germot A, Legardinier S, Blanquet V and Maftah A. Open Biol 2016 Sep;6(9). (Impact factor en 2015: 5,36).

Protein O-fucosyltransferase 1 expression impacts myogenic C2C12 cell commitment via Notch signaling pathway.

Der Vartanian A., Audfray A., **Al Jaam B.**, Janot M., Legardinier S., Maftah A. and Germot A. Mol Cell Biol 2015 Jan;35(2):391-405. (Impact factor en 2015: 4,68)

🌀 COMMUNICATIONS

🌀 Congrès Nationaux

Rôle de la O-fucosylation dans le contexte d'une lignée myoblastique murine C2C12 sous-exprimant le gène *Pofut1*.

Bilal AL JAAM, Audrey DER VARTANIAN, Aymeric AUDFRAY, Nathalie DUPRAT, Sébastien LEGARDINIER, Abderrahman MAFTAH et Agnès GERMOT. *Journées du Groupe Français des Glycosciences (GFG) 2012. Lille, 21-25 mai 2012.*

Knockdown of *Pofut1* in myoblast C2C12 cell line impairs Notch signaling pathway and myogenic differentiation.

Audrey DER VARTANIAN, **Bilal AL JAAM**, Aymeric AUDFRAY, Nathalie DUPRAT, Sébastien LEGARDINIER, Abderrahman MAFTAH and Agnès GERMOT. *8th international symposium on glycosyltransferases (GlycoT). June 5-9th 2012, Hannover, Germany.*

Myogenic process deregulation in mice with the Pofut1^{CAX} mutation.

Bilal AL JAAM, Abderrahman MAFTAH, Sébastien LEGARDINIER. 16^{ème} séminaire des thésards du département de génétique animale. Amboise, 2 et 3 avril 2013.

↳ Congrès internationaux

O-fucosylation of Notch receptor is critical for myogenic development

AL JAAM Bilal, HEU K, BLANQUET V, MAFTAH A and LEGARDINIER S. 11th Jenner glycobiology and medicine symposium. April 20-21st 2015 – Paris – France.

AVANT-PROPOS

Les muscles squelettiques sont les principaux muscles chez les vertébrés, qui contribuent grandement à leur masse corporelle. Ils jouent un rôle essentiel au sein de l'organisme et permettent, en synergie avec d'autres tissus, le mouvement du fait de la contractibilité des cellules musculaires (ou « **myofibres** »). Les myofibres ont la particularité de posséder des cellules souches appelées **cellules satellites**, qui sont localisées en périphérie et qui participent non seulement à la croissance musculaire post-natale périnatale mais également à la régénération des fibres musculaires endommagées.

L'Unité de Génétique Moléculaire Animale (UMR1061-INRA) a engagé de nombreux travaux visant à mieux connaître et comprendre le développement musculaire. Le travail de ma thèse a été effectué au sein de l'équipe « Glycosylation et Myogenèse », dirigée par le Professeur Abderrahman MAFTAH, dont l'objectif principal est d'étudier **l'implication de la glycosylation dans la régulation du développement musculaire**. Des travaux de recherche portant sur des fucosyl-, glucosyl- et sialyltransférases sont abordés pour élucider les relations entre ces modifications post-traductionnelles et la régulation de la myogenèse en utilisant notamment différents modèles cellulaires et animaux. Dans ce contexte, mon travail de thèse a porté essentiellement sur **l'implication de la O-fucosylation dans la régulation du processus de différenciation de la cellule musculaire squelettique**.

Chez les mammifères, le développement du muscle squelettique est finement contrôlé par plusieurs voies de signalisation, dont **la voie de signalisation Notch** (Mayeuf and Relaix 2011). La voie Notch n'est activée que suite à l'interaction du récepteur Notch avec un de ses ligands de la famille DSL (Delta/Serrate/Lag-2). Cette interaction nécessite la présence de résidus O-fucose, greffés par la protéine **O-fucosyltransférase 1 (POFUT1)**, au niveau des répétitions EGF-like de la partie extracellulaire du récepteur Notch. L'implication de la voie Notch et ainsi de POFUT1 dans le développement embryonnaire et musculaire a été investiguée. Chez la souris, le KO de *Notch* provoque des défauts sévères dans la somitogenèse, et le KO de *Pofut1* est létal (Shi and Stanley 2003).

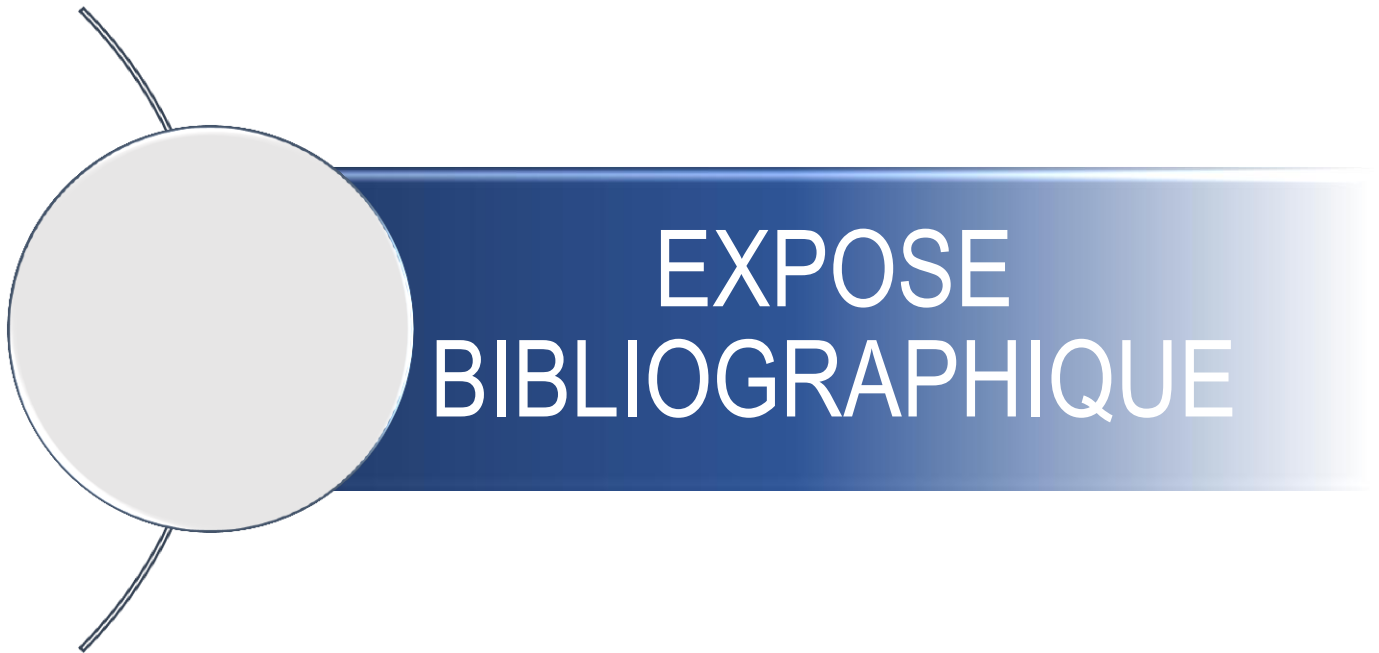
En 2009, une mutation spontanée affectant l'expression du gène *Pofut1* a été identifiée chez la souris (Schuster-Gossler, Harris et al. 2009). Il s'agit de l'insertion d'un rétrotransposon de

type IAP (Intracisternal A Particle) au niveau de l'intron 4 du gène *Pofut1*, qui génère un allèle hypomorphe et provoque par la suite une **diminution du niveau d'expression du gène** et par conséquent de la protéine POFUT1. Cet allèle a été appelé ***Pofut1^{cax}*** car il génère, notamment, une **forte compaction du squelette axial** (**cax** pour « compact axial skeleton »). D'une façon remarquable, les souris homozygotes pour cet allèle sont viables et constituent donc un modèle intéressant pour évaluer l'effet de la sous-expression de *Pofut1* sur le développement musculaire chez la souris et en particulier sur la croissance musculaire post-natale.

Mon travail de thèse a donc eu pour objectif d'étudier l'effet de la sous-expression de *Pofut1* sur la différenciation myogénique *in vitro* et la croissance musculaire post-natale chez la souris. Deux approches complémentaires ont été conduites :

i- Des analyses phénotypiques (préparations squelettiques) et morphométriques (mesures de la taille du corps et de la queue, poids corporel et des muscles...) ont été effectuées pour les souris ***Pofut1^{cax/cax}*** et comparées à celles obtenues pour les souris sauvages. Elles ont été complétées par des analyses immunohistochimiques de coupes transversales de muscles squelettiques d'intérêt. Plusieurs paramètres ont été examinés (nombre et aire moyenne des fibres, nombre de noyaux et de cellules satellites par fibre) chez des souris adultes *Pofut1^{cax/cax}* et sauvages, âgées de 5, 12 et 24 semaines.

ii- Des études complémentaires ont été effectuées sur des cellules d'origine myoblastique au cours de leur prolifération et différenciation *in vitro*. J'ai participé à un travail caractérisant la différenciation de la lignée myoblastique murine C2C12 sous-exprimant *Pofut1* (travail mené dans le cadre de la thèse de Audrey Der Vartanian en 2015). Plus récemment, mon activité a été consacrée majoritairement à l'analyse approfondie des myoblastes dérivés des cellules satellites (**MDCS**), issus d'un pool de muscles squelettiques provenant des souris *Pofut1^{cax/cax}* ou sauvages. Pour ces deux modèles cellulaires, nous avons examiné les capacités de prolifération et de fusion des myoblastes, l'expression des facteurs régulateurs de la myogenèse (MRFs) et de *Pax7* ainsi que les proportions de cellules exprimant *Pax7* et /ou *Myod* au cours de la différenciation. Etant donné que la voie de signalisation Notch est dépendante de la O-fucosylation, nous avons précisément analysé l'impact de la sous-expression de *Pofut1* sur l'activation de cette voie

A decorative graphic consisting of a grey circle on the left, partially overlapping a dark blue horizontal bar that extends to the right. The text 'EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE' is written in white, uppercase letters on the blue bar.

EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE

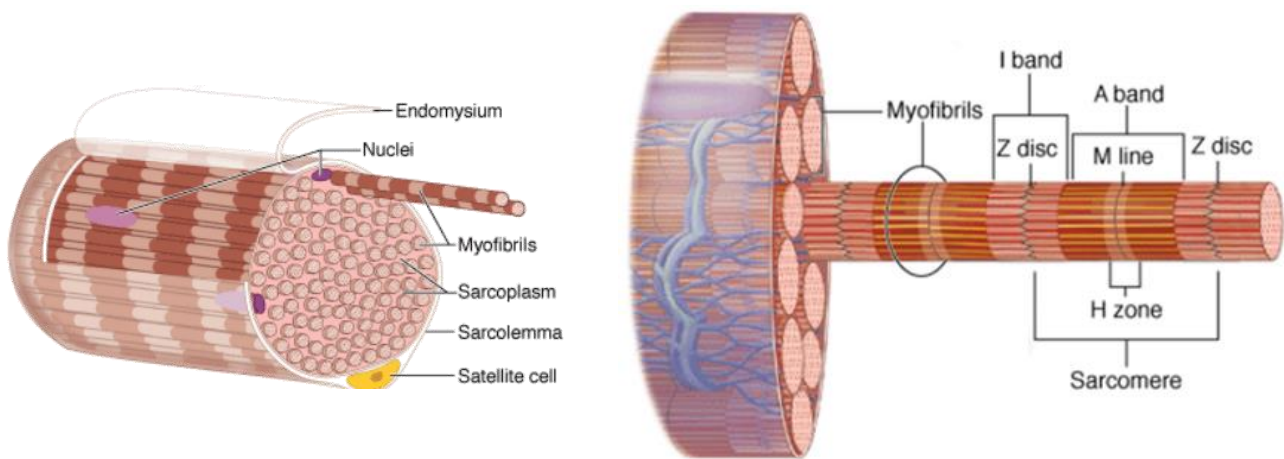
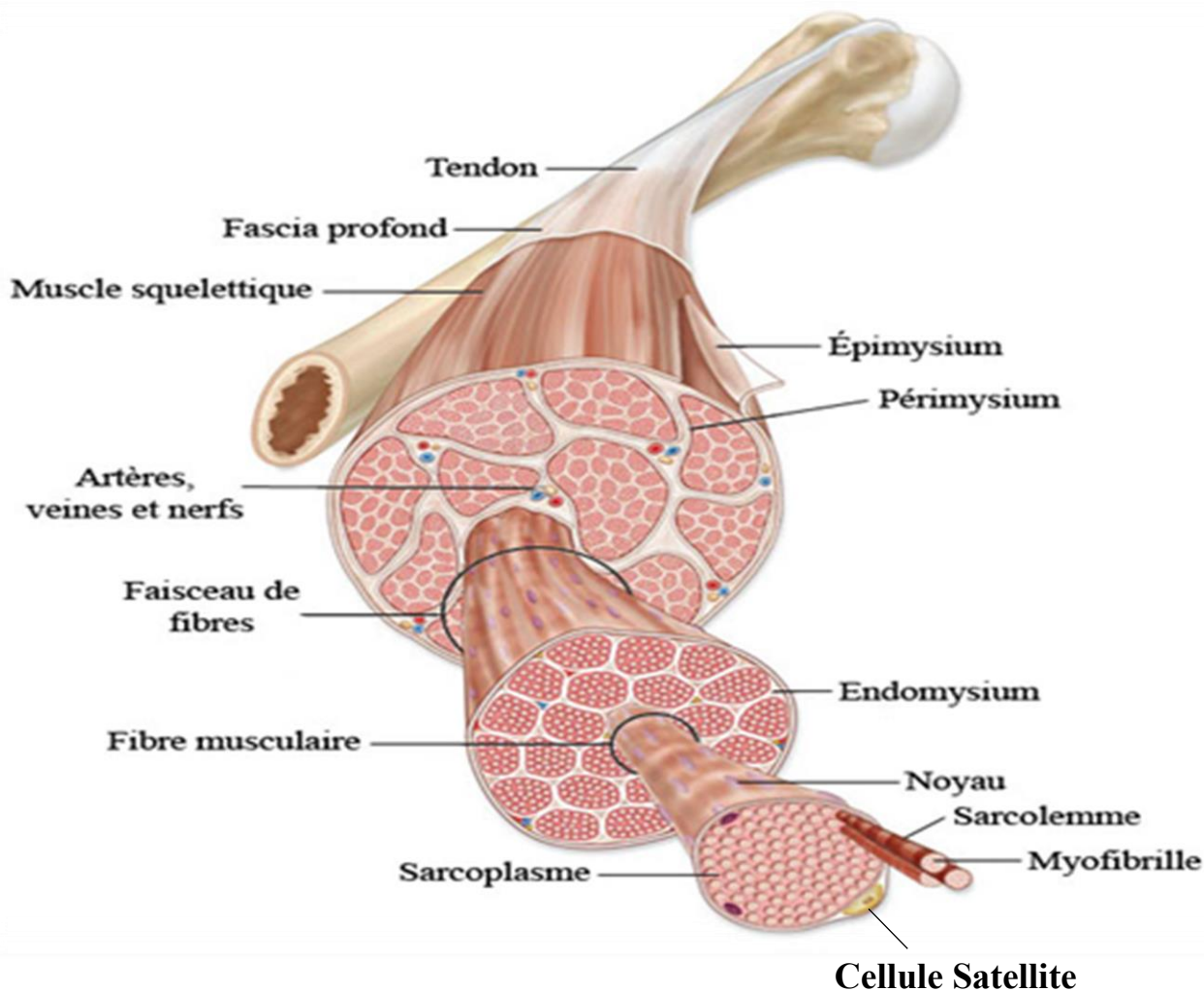


Figure 1 : Anatomie du muscle squelettique.

Le muscle squelettique, attaché à l'os, par un tendon est délimité par deux membranes : le fascia profond à l'extérieur et l'épimysium plus en profondeur. Le muscle squelettique est formé de plusieurs faisceaux de fibres. Ces faisceaux sont entourés d'une membrane appelée périmysium et sont irrigués dans la matrice extracellulaire par des artères et des veines. Les fibres musculaires à l'intérieur des faisceaux sont entourées d'un tissu conjonctif appelé endomysium. À l'intérieur de chaque fibre musculaire, on retrouve des myofibrilles. Des cellules mononucléées situées à la périphérie des fibres musculaires, appelées cellules satellites, sont nécessaires à la régénération musculaire.

(<http://svt.ghediri.com/bac-sciences/10/neurophysiologie/20/fonctionnement-muscle-squelettique.html>).

Chapitre I. Développement musculaire anté- et post-natal

Chez les animaux, le **tissu musculaire** constitue, avec trois autres tissus (épithélial, conjonctif et nerveux), l'ensemble des tissus de l'organisme. Par son aptitude à convertir l'énergie chimique en énergie mécanique, il est impliqué dans différentes fonctions telles que l'activité locomotrice, le maintien de la posture, la préhension, la respiration pulmonaire, la circulation sanguine, la progression des aliments et le remplissage de la vessie. Il est composé de **fibres musculaires contractiles**, dont le cytosquelette comprend majoritairement des filaments intermédiaires à Desmine ainsi que des microfilaments d'actine et de myosine assurant la contraction musculaire. Cette contraction musculaire est indépendante de la volonté lorsqu'elle est contrôlée par le système nerveux autonome (dit viscéral ou végétatif). C'est le cas des muscles lisses qui possèdent des fibres fusiformes mononucléées à contraction lente et qui forment la paroi contractile des organes creux tels que la vessie, le tube digestif et les artères. C'est également le cas du muscle strié cardiaque (ou myocarde), qui est un muscle épais et creux constitué de cardiomyocytes se contractant de manière rythmique. Le **muscle strié squelettique**, attaché aux os par les tendons, permet de générer le mouvement et participe activement au métabolisme du corps entier. Il est constitué de plusieurs faisceaux de fibres multinucléées (**Figure 1**), capables de se contracter de manière volontaire, sous le contrôle du système nerveux central (dit cérébro-spinal). Chaque fibre musculaire (ou rhabdomyocyte) est constituée de myofibrilles, de plusieurs centaines de noyaux localisés en périphérie contre la membrane plasmique (ou sarcolemme) et de cellules souches mononucléées dites satellites car localisées entre la membrane sarcolemmique et la lame basale (**Figure 1**).

En fonction de leur morphologie et leurs propriétés contractiles et métaboliques, plusieurs types de fibres musculaires existent chez les mammifères. En se basant sur l'étude de l'activité ATPasique des fibres au niveau de la **chaîne lourde de la myosine (MyHC)** (Brooke and Kaiser 1970), la **vitesse de contraction** (Brooke and Kaiser 1970), la **couleur des fibres** (blanches ou rouges) (Ashmore and Doerr 1971) ainsi que leur **activité métabolique**, glycolytiques ou oxydatives (Peter, Barnard et al. 1972), trois principaux types de fibres ont été défini : **type I** à contraction lente (activité ATPasique faible), métabolisme oxydatif et

Type de fibres	I	IIA	IIX	IIB
Contraction	Lente	Rapide		
MyHC	I	Ila	IIx	I Ib
Activité ATPasique	Faible	Forte		
Métabolisme	Oxydatif	Oxydo-glycolytique		Glycolytique
Résistance à la fatigue	***	**	*	*
Nombre de mitochondries	***	**	*	*

Tableau 1 : Caractéristiques des fibres lentes (I) et rapides (II), classées en fonction de leur composition en chaînes lourdes de myosine (MyHC), de leur activité ATPasique et de leur métabolisme (<https://www6.inra.fr/productions-animales/2003-Volume-16/NumerO-2-2003/Dossier-Typologie-et-ontogenese-des-fibres-musculaires>).

résistantes à la fatigue, **type II** à contraction rapide (activité ATPasique forte) et métabolisme oxydo-glycolytique (IIA et IIX) ou glycolytique (IIB) en général moins résistantes à la fatigue (**Tableau 1**). D'autres classifications distinguant les fibres lentes des fibres rapides en lien avec leurs propriétés contractiles se basent sur la nature des isoformes des chaînes lourdes de myosine retrouvées dans ces fibres (Schiaffino and Reggiani 1996). Outre ces quatre types de fibres, dites pures car elles ne renferment qu'une seule isoforme de MyHC, l'utilisation d'anticorps anti-MyHC a également permis de mettre en évidence des fibres dites hybrides, qui peuvent exprimer simultanément 2 à 4 isoformes différentes de MyHC. Les muscles ne sont d'ailleurs jamais constitués d'un seul type de fibres mais souvent d'un type dominant (ex : fibres lentes dans le muscle soléaire ou *Soleus*, fibres rapides dans le muscle tibial ou *Tibialis* et fibres mixtes dans les muscles Quadriceps et Gastrocnémien ou *Gastrocnemius*, muscles étudiés dans la partie résultats).

L'**homéostasie musculaire** permet aux muscles de conserver leur intégrité. Après une blessure musculaire induite par un traumatisme ou un exercice physique intense, le muscle strié squelettique est capable de conserver sa masse musculaire en remplaçant les fibres lésées par de nouvelles fibres pleinement fonctionnelles, suite à l'intervention des cellules satellites dont l'activation conduit à des cellules mononucléées prolifératives (ou myoblastes), qui vont se différencier et fusionner pour former de nouvelles fibres musculaires. En l'absence de toute lésion et de processus régénératif, les cellules satellites restent à l'état quiescent. Elles se distinguent facilement par leur localisation (sous la lame basale), leur morphologie (fusiforme et rapport nucléocytoplasmique élevé) et l'expression de certains marqueurs spécifiques tels que **PAX7** (Charge and Rudnicki 2004; Kuang and Rudnicki 2008).

Après une description du processus de **somitogenèse** et de sa régulation (I.), je vais m'intéresser à la **myogenèse embryonnaire** (II.), initiée par des progéniteurs musculaires d'origine somitique puis à la **croissance et à la régénération postnatale des muscles squelettiques** (III.), dépendant en grande partie de **l'activation des cellules souches musculaires, les cellules satellites**.

Dorsal view at E7.0

Cross-section at E7.0

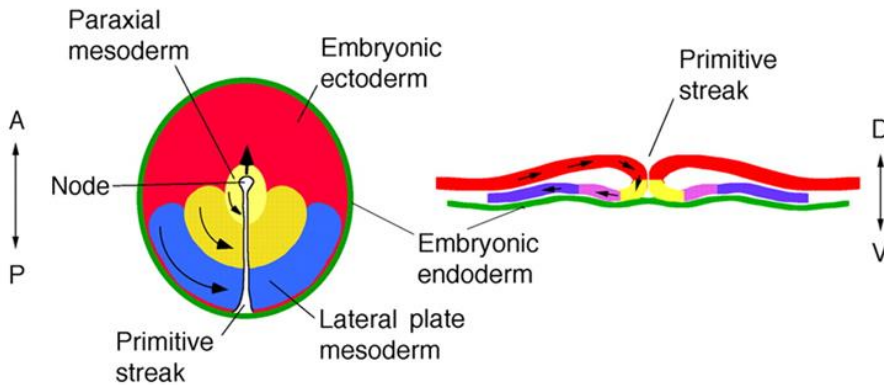


Figure 2 : Evolution du mésoderme.

Au cours de la gastrulation de la souris, l'embryon forme l'ectoderme (rouge), le mésoderme (violet, rose et jaune) et l'endoderme (vert). Le mésoderme est métamérisé en 3 structures: le mésoderme paraxial (jaune), le mésoderme intermédiaire (rose) et le mésoderme latéral (bleu) (Dressler 2009).

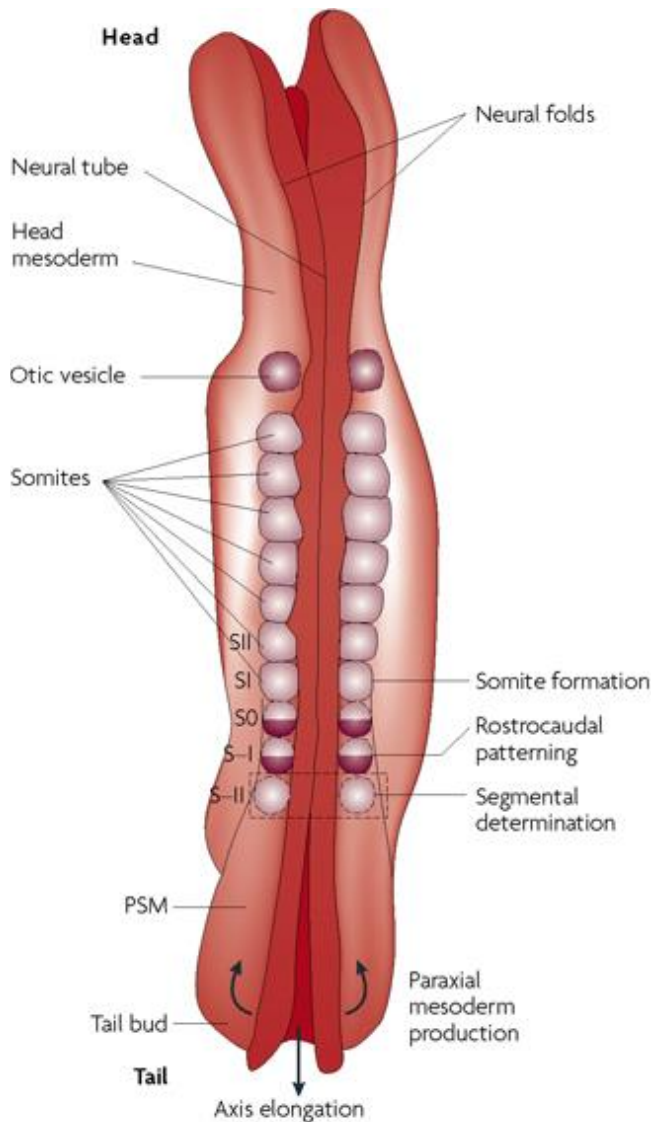


Figure 3 : Formation des somites.

La formation des somites est réalisée à partir du mésoderme présomitique paraxial (PSM) du bourgeon caudal dans le sens antéro-postérieur. Les somites les plus antérieurs vont donner naissance aux os du crâne et aux vertèbres cervicales. Les somites suivants vont être impliqués dans la formation de la colonne vertébrale. Les somites sont numérotés en fonction de leur ordre d'apparition : S0 est le somite en cours de formation, S-I et S-II les somites déjà segmentés. Les flèches noires indiquent le mouvement des cellules du mésoderme paraxial à partir du bourgeon caudal (Dequeant and Pourquie 2008).

I. La somitogenèse

I.1 Formation des somites par segmentation mésodermique

Au cours de la gastrulation, les métazoaires triploblastiques possèdent un feuillet embryonnaire intermédiaire appelé **mésoderme** (ou mésoblaste) en plus des feuillets externe (ectoderme) et interne (endoderme) (Bentzinger, Wang et al. 2012). Le mésoderme de l'embryon triploblastique est ensuite anatomiquement séparé en mésoderme paraxial, intermédiaire et latéral (Dressler 2009; Bentzinger, Wang et al. 2012) (**Figure 2**). La majorité des muscles squelettiques (muscles du tronc et des membres) dérive du **mésoderme paraxial** et seulement quelques-uns (certains muscles de la tête) proviennent de l'ectoderme. Chez les vertébrés, le mésoderme paraxial, qui se situe de part et d'autre du tube neural, va se segmenter en structures épithéliales symétriques et répétées appelées **somites**, étudiées pour la première fois en 1672 par Marcello Malpighi (Piccolino 1999). Ces premières structures métamériques vont se former de manière rythmique et transitoire, de part et d'autre du tube neural et de la notochorde (Christ and Ordahl 1995; Dequeant and Pourquie 2008), à partir du **mésoderme présomitique (PSM)** et au fur et à mesure de l'allongement antéro-postérieur de l'embryon (Dequeant and Pourquie 2008). Ainsi, les somites les plus proches de la tête sont donc les premiers formés (**Figure 3**).

Ce processus de segmentation serait apparu de manière indépendante chez les vertébrés et les invertébrés au cours de l'évolution mais ce sont les mêmes gènes qui contrôlèrent ce processus. L'exosquelette des invertébrés et l'endosquelette des vertébrés (ou colonne vertébrale) sont les manifestations bien visibles des résultats de la segmentation du mésoderme ou **somitogenèse**, qui a lieu très précocement au cours de l'embryogenèse. Les premiers somites apparaissent très tôt après la gastrulation et se réorganisent pour former deux tissus différents, non seulement sur le plan structural mais aussi dans le destin des cellules précurseurs qu'ils contiennent. En effet, la partie ventrale des somites forme le **sclérotome** de type mésenchymateux, qui contient les précurseurs du cartilage et des os et qui participera donc à la formation des côtes ainsi que des vertèbres et disques intervertébraux constituant la colonne vertébrale. La partie dorsale des somites se transforme en **dermomyotome**, qui se scindera en deux structures, le **dermatome** à l'origine

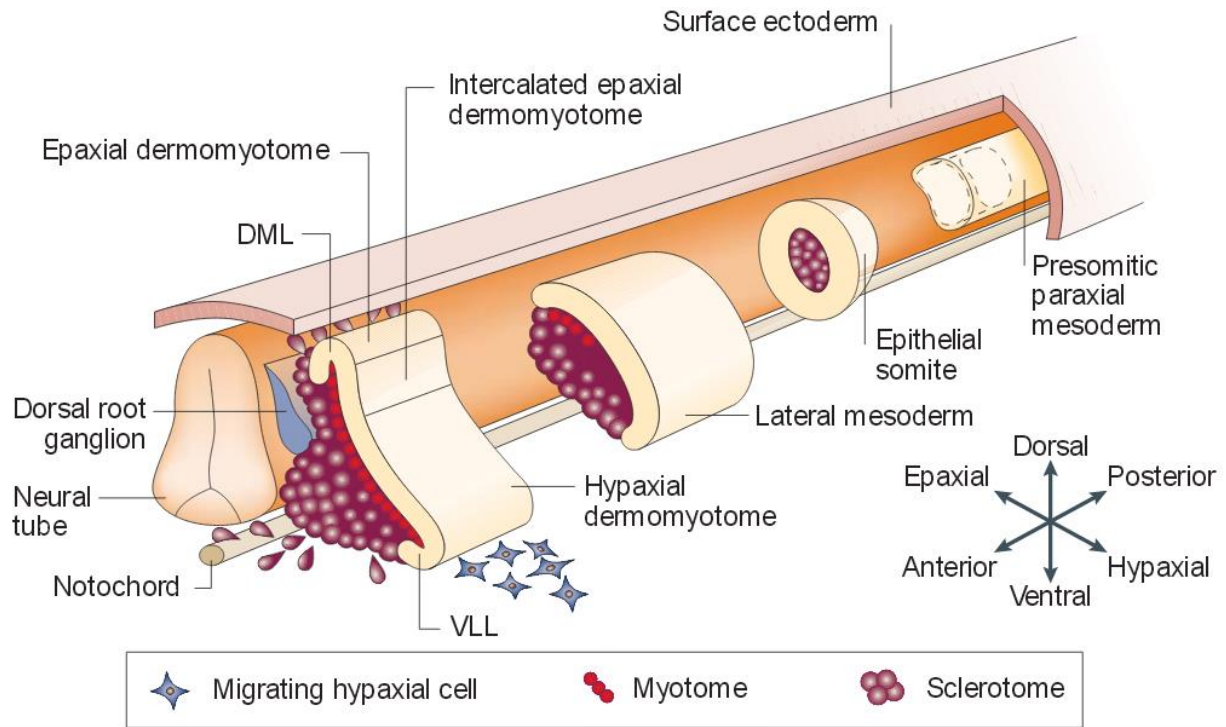


Figure 4: Régionalisation des somites et origine des muscles squelettiques du tronc et des membres.

Le mésoderme paraxial présomitique est situé de part et d'autre du tube neural et de la notochorde. Sa segmentation en somites se produit le long de l'axe dorso-ventral dans le sens antéro-postérieur. En réponse à des signaux provenant de la notochorde et du tube neural, les somites se différencient en dermomyotome (hypaxial et épaxial) ainsi qu'en sclérotome, à l'origine du cartilage et des os des vertèbres et des côtes. Les cellules des lèvres médio-dorsale (DML) et ventro-latérale (VLL) migrent sous le dermomyotome pour former respectivement le myotome épaxial (muscles du dos) et le myotome hypaxial (muscles du tronc). Des cellules de la VLL subissent une transition épithélio-mésenchymateuse, se détachent pour migrer vers les bourgeons des membres où ils formeront les muscles (Parker, Seale et al. 2003).

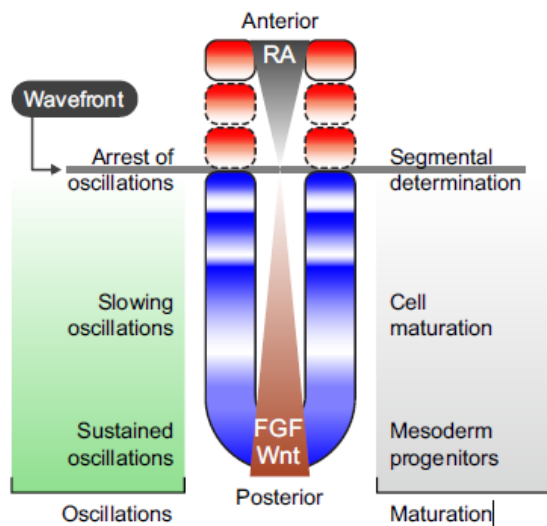


Figure 5: Horloge de segmentation.

La formation des somites commence dans la région antérieure de l'embryon et évolue vers la partie caudale. Elle dépend des oscillations moléculaires des cellules du PSM (en lien avec la taille et le nombre des somites) et du front de détermination (fixant la position des somites). La fréquence des oscillations des gènes cycliques diminuent graduellement dans le sens postéro-antérieur à l'approche du front de détermination, qui se situe à l'interface entre deux gradients opposés de morphogènes (RA contre FGF/Wnt) (Oates, Morelli et al. 2012).

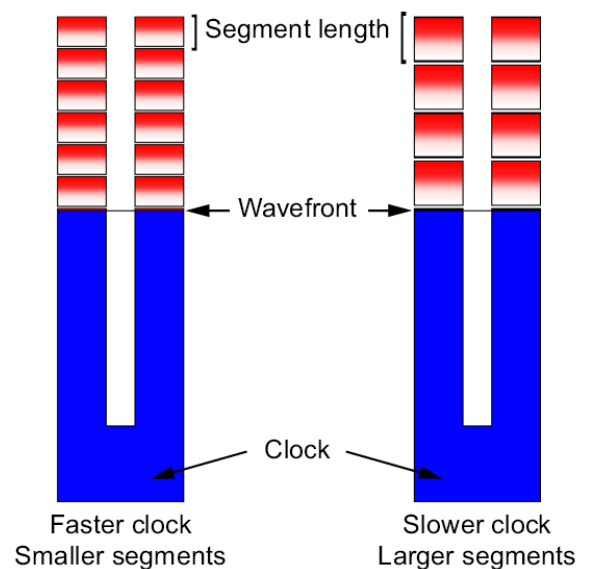


Figure 6: Rythmicité de la segmentation.

La taille et le nombre des somites sont déterminés par la fréquence des oscillations initiées dans le PSM. Des oscillations rapides vont former un grand nombre de somites de petite taille tandis que des oscillations plus lentes sont à l'origine de moins de somites mais de taille plus importante (Oates, Morelli et al. 2012).

du derme du dos et le **myotome** à l'origine des muscles du tronc et des membres (Parker, Seale et al. 2003; Bentzinger, Wang et al. 2012; Musumeci, Castrogiovanni et al. 2015) (**Figure 4**).

I.2 Régulation spatio-temporelle du processus de segmentation

Chez les vertébrés, la segmentation mésodermique de l'embryon générant les somites se fait de manière séquentielle et rythmée grâce à un **mécanisme oscillant** appelé "**horloge de segmentation**" (Oates, Morelli et al. 2012). C'est un mécanisme très conservé au cours de l'évolution mais qui fait apparaître des différences entre espèces dans la vitesse de formation des somites (une paire de somites se forme toutes les 2h chez la souris et toutes les 6h chez l'homme) et dans le nombre précis de paires de somites formées. Le modèle appelé "**clock and wavefront**" est le premier modèle, qui propose une régulation spatio-temporelle de cette segmentation (Cooke and Zeeman 1976). Il suggère l'existence d'une "horloge" (clock), caractérisée par l'**expression cyclique** ou **oscillatoire** de gènes, qui oscillent de manière soutenue dans les cellules du PSM de la partie caudale et de plus en plus lentement en se rapprochant de la partie rostrale (antérieure) de l'embryon. Ces oscillations sont stoppées dans une zone appelée "**front de détermination**" (**wavefront**), où une concentration précise en morphogènes (FGF, Wnt et acide rétinoïque) va amener les cellules à changer localement de propriétés et donner naissance à une future paire de somites (**Figure 5**).

La segmentation mésodermique (ou **somitogenèse**) dépend donc d'une horloge moléculaire oscillante, réglée par l'expression dans le PSM de gènes cycliques appartenant aux voies de signalisation **Notch**, **FGF** et **Wnt**. Elle dépend aussi de gradients antagonistes de morphogènes (**FGF**, **Wnt**, **acide rétinoïque**) (Bentzinger, Wang et al. 2012) entre les parties antérieure et postérieure du PSM, qui vont définir la position du front de détermination. L'horloge moléculaire et le front de détermination vont donc agir ensemble pour positionner les futurs somites et contrôler leur taille, leur nombre et la rythmicité de leur formation (**Figure 6**).

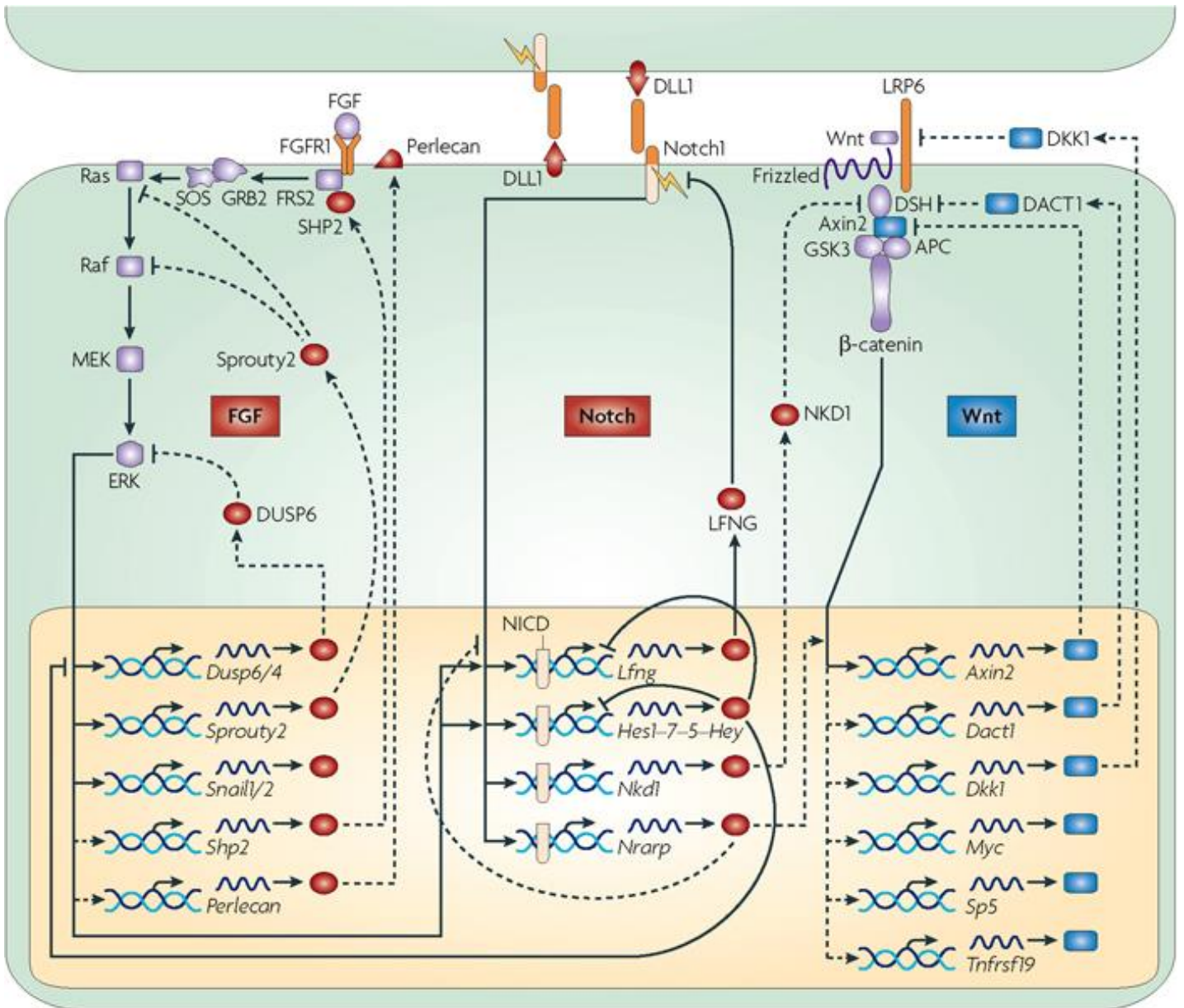


Figure 7: Régulation de l'expression des gènes cycliques appartenant aux voies de Notch, FGF et Wnt.

Les gènes cycliques des voies FGF et Notch oscillent en opposition de phase aux gènes cycliques de la voie Wnt. Des boucles rétro-inhibitrices existent pour chaque voie ainsi que des régulations entre les voies, qui permettent de coordonner l'ensemble des gènes cycliques du PSM chez la souris (Dequeant and Pourquie 2008).

I.2.1 Horloge de segmentation liée à des oscillations transcriptionnelles

Sur le plan moléculaire, l'horloge de segmentation peut être assimilée à un oscillateur transcriptionnel, où les gènes cycliques contrôlés par les voies de signalisation Notch, Wnt et FGF, vont être exprimés périodiquement et pour certains de manière opposée dans le PSM (Notch et FGF, en opposition de phase avec Wnt) (**Figure 7**). Pour chacune de ces trois voies interconnectées, l'expression cyclique des gènes est régulée par des rétrocontrôles négatifs. Des études génétiques et pharmacologiques suggèrent que l'activité de la voie canonique de Notch joue un rôle majeur dans la régulation de l'horloge de segmentation et donc de la somitogenèse chez la souris. En effet, des défauts dans la morphologie des somites (taille et positionnement) ont été décrits chez des souris mutantes pour les gènes *Notch1* et *Rbpj* (Conlon, Reaume et al. 1995; Oka, Nakano et al. 1995). Les voies de signalisations Wnt et FGF ont aussi leur importance puisqu'elles contrôlent l'activité périodique de la voie de signalisation Notch, qui en retour, contrôle les gènes cycliques impliqués dans la formation des somites (Hofmann, Schuster-Gossler et al. 2004). Les interactions entre ces trois voies de signalisation sont nécessaires pour la segmentation somitique (**Figures 7**).

I.2.1.1 Les gènes cycliques des voies de signalisation Notch et FGF agissent de concert

C'est en 1997 que l'existence d'un "oscillateur" régissant le processus de segmentation a été confirmée en montrant l'expression cyclique dans le PSM, de *c-hairy*, un homologue de *Hes1* (gène cible de la voie Notch) et sa propagation dans le sens postéro-antérieur (Palmeirim, Henrique et al. 1997). L'activation de la voie signalisation Notch, induite par la liaison de DLL1 au récepteur Notch1 dans le PSM, entraîne des clivages protéolytiques du récepteur, qui libère sa partie intracellulaire (NICD clivé). La signalisation Notch est clairement liée à l'horloge de la segmentation, puisque des oscillations coordonnées dans les niveaux de NICD clivé sont observées dans le PSM des souris (Huppert, Ilagan et al. 2005). Une fois transloqué au noyau, le NICD va activer un certain nombre de gènes cibles, dont les gènes *Hes1*, *Hes5*, *Hes7* et *hey1*, qui sont exprimés de manière cyclique chez les mammifères (Palmeirim, Henrique et al. 1997; Jouve, Palmeirim et al. 2000; Leimeister, Dale et al. 2000; Bessho, Miyoshi et al. 2001; Dunwoodie, Clements et al. 2002; Masamizu, Ohtsuka et al. 2006)

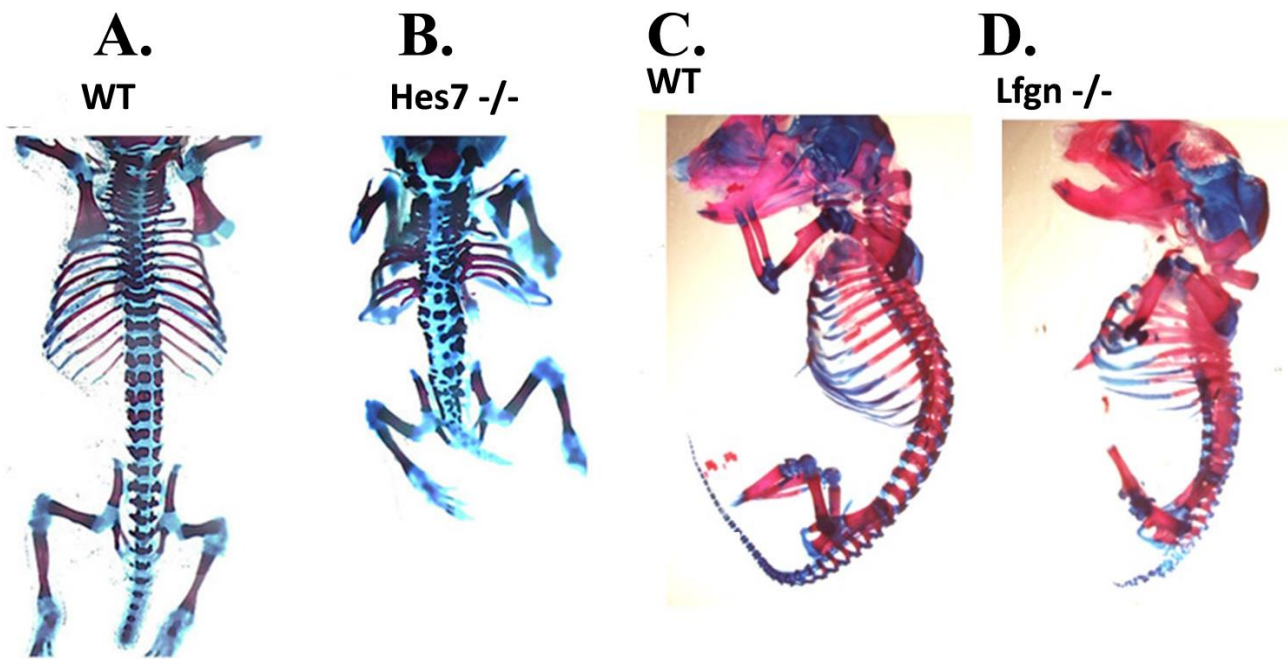


Figure 8 : Préparations squelettiques d'embryons mutants pour *Hes7* et *Lfng*.

(A-B) : Les embryons de souris *Hes7*^{-/-} présentent un corps plus court et des malformations des vertèbres et des côtes par comparaison aux embryons sauvages (Fujimuro, Matsui et al. 2014). (C-D) : Les embryons de souris *Lfng*^{-/-} présentent des défauts dans la formation des somites, qui se manifestent par un axe vertébral et une queue plus courts ainsi que des malformations des côtes voire une diminution de leur nombre (Adapté de (Oginuma, Takahashi et al. 2010)).

(Figure 7). Parmi ces 4 membres, c'est **Hes7** et son expression cyclique, qui semble jouer le rôle le plus important dans la segmentation. En effet, l'absence d'expression de ce gène cible entraîne une désorganisation dans la formation des somites, avec pour conséquence la formation de vertèbres et de côtes soudées ainsi qu'une perte d'expression de gènes cycliques des autres voies de signalisation (Bessho, Sakata et al. 2001) (Figure 8). D'autre part, son expression persistante conduit également à la fusion des somites (Hirata, Bessho et al. 2004). Dans le PSM, *Hes7* peut aussi réprimer sa propre transcription par rétrocontrôle négatif (Bessho, Hirata et al. 2003) ainsi que la transcription de *Lunatic fringe* (*Lfng*), autre gène cible de la voie de signalisation Notch. *Lfng* code une *N*-acétylglucosaminyltransférase, qui peut ajouter un *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) aux fucoses *O*-liés présents dans certaines répétitions EGF-like de la partie extracellulaire des récepteurs NOTCH et participer ainsi à la modulation des interactions récepteurs-ligands (Bruckner, Perez et al. 2000; Moloney, Panin et al. 2000). Les oscillations de *Lfng* sont également cruciales pour la segmentation puisque la perte ou la persistance permanente de son expression provoque, comme pour *Hes7*, de sévères défauts dans la formation somites (Evrard, Lun et al. 1998; Zhang and Gridley 1998; Serth, Schuster-Gossler et al. 2003). *Lfng*, qui oscille en phase avec *Hes7* (Bessho, Sakata et al. 2001), inhibe à son tour la voie Notch (Figure 7), ce qui entraîne une boucle de rétroaction négative. Ces rétrocontrôles négatifs de *Hes7* et *Lfng* permettent d'assurer leur expression oscillatoire de manière synchronisée dans le PSM, jouant ainsi un rôle central dans le contrôle de l'horloge de segmentation (Dale, Maroto et al. 2003; Oates, Morelli et al. 2012).

L'activation de la voie Ras/Raf/MAPK, induite par la fixation des ligands FGF sur leurs récepteurs, entraîne également l'expression de gènes cycliques (Figure 7). Les récepteurs ainsi activés induisent la phosphorylation du transducteur de signal Ras, qui alors active Raf et des MAP-kinases, MEK et ERK1/2. La conséquence est que de nombreux gènes cibles vont être à leur tour activés au niveau du PSM, dont un certain nombre de gènes cycliques : *Dusp4/6*, *Sprouty2*, *Snail1/2*, *Shp2* et *Perlecan* (Dequeant, Glynn et al. 2006). Les gènes *Dusp* et *Sprouty2* conservent leur expression cyclique, du fait de l'inhibition de la voie Ras/Raf/MAPK par rétrocontrôle négatif.

La voie Notch est régulée et régule en retour la voie de signalisation FGF par *Hes7*, avec pour conséquence une synchronisation de leurs oscillations. C'est la voie FGF, qui agit en amont de la voie Notch puisque la signalisation FGF induit dans le bourgeon caudal l'expression oscillante de *Hes7*, qui alors est propagée et maintenue au niveau du PSM antérieur par la voie de signalisation Notch. Chez la souris, *Hes7* régule en retour l'expression cyclique de *Dusp4*, inhibiteur de la signalisation FGF (Niwa, Masamizu et al. 2007).

I.2.1.2 Les gènes cycliques des voies Notch et Wnt, en opposition de phase

L'activation de la voie de signalisation de Wnt dans des cellules conduit à la stabilisation de la β -caténine, qui pénètre dans le noyau pour activer l'expression des gènes cibles, tels que ceux de la famille TCF/LEF (Dequeant and Pourquie 2008). Parmi les gènes cycliques de la voie Wnt, on trouve les gènes codant les facteurs de transcription *SP5* (Weidinger, Thorpe et al. 2005) et *Myc* (*c-myc*) ainsi que le gène codant un récepteur de la famille TNF, *Tnfrsf19* (He, Sparks et al. 1998; Dequeant, Glynn et al. 2006) (**Figure 7**). On trouve également les gènes codant l'axine 2 (Aulehla, Wehrle et al. 2003), Dickkopf-1 (*Dkk1*) (Glinka, Wu et al. 1998) et *Dact1* (dishevelled-binding antagonist of β -catenin1), qui maintiennent leur expression cyclique, par une rétro-inhibition de la voie Wnt. Par conséquent, les oscillations de ces inhibiteurs peuvent entraîner la fluctuation rythmique des niveaux d'expression de β -caténine. L'inactivation de nombreux gènes tels que *Dkk1*, *Sp5* et *Myc* produit des défauts de segmentation, confirmant le rôle de la signalisation Wnt au cours de la segmentation chez la souris (Harrison, Houzelstein et al. 2000; Trumpp, Refaeli et al. 2001; MacDonald, Adamska et al. 2004).

Les gènes cibles de la voie Notch, comme *Nkd1* et *Nrarp*, s'expriment également de manière cyclique dans le PSM. *Nrarp* (Notch-regulated ankyrin-repeat protein) est un gène cible de la voie canonique de Notch (Krebs, Deftos et al. 2001; Pirot, van Grunsven et al. 2004), qui exerce d'une part une inhibition de l'expression des autres gènes cibles de la voie Notch en s'associant au NICD et au CSL (Lamar, Deblandre et al. 2001) et d'autre part une activation de la voie Wnt en stabilisant le facteur de transcription majeur de la voie Wnt appelé LEF1 (Ishitani, Matsumoto et al. 2005). Le gène cyclique *Nkd1* est un inhibiteur de la signalisation

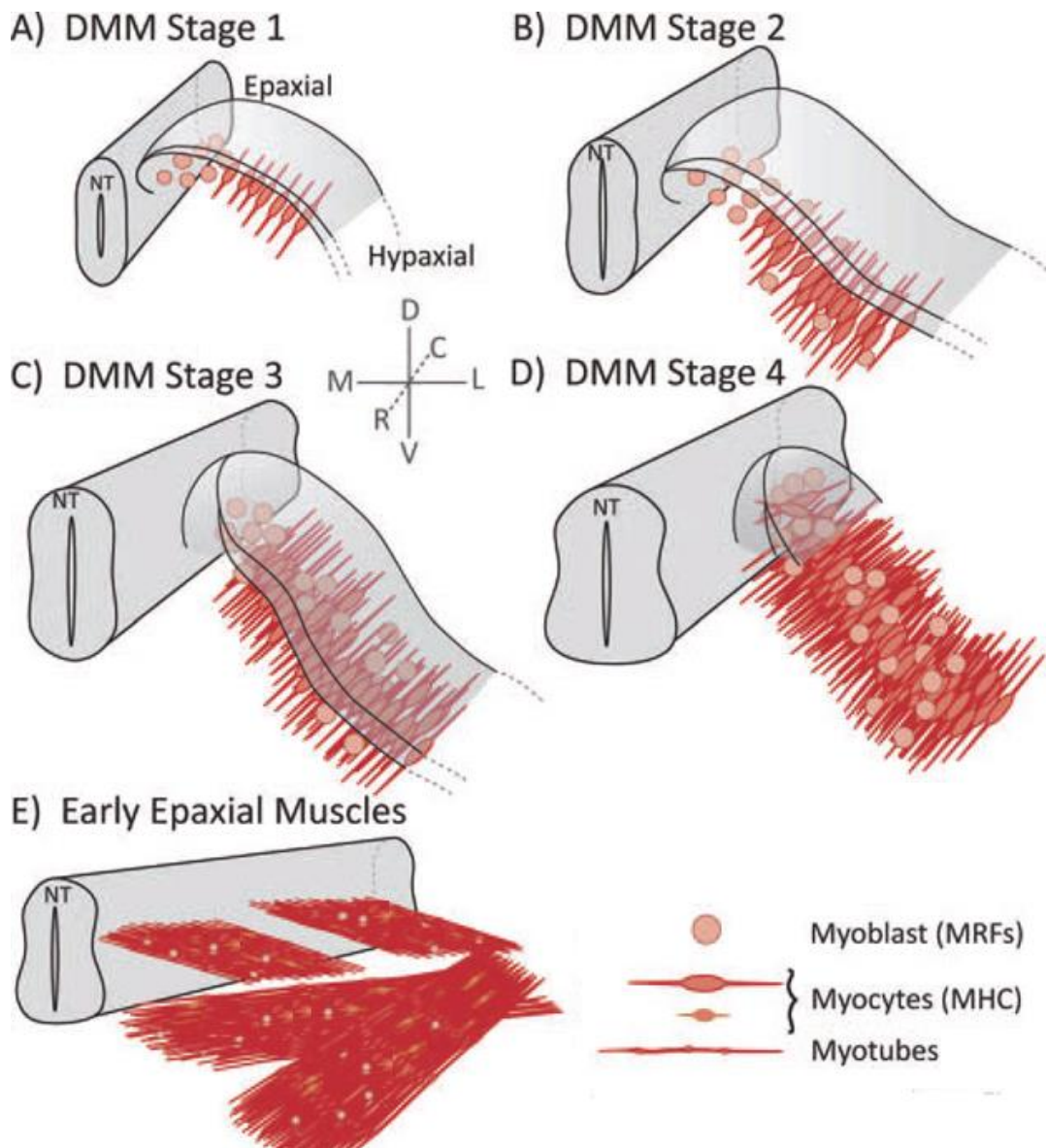


Figure 9 : Stades de développement du dermomyotome et du myotome (DMM).

A : Stade de DMM 1 : Les premiers myoblastes qui se différencient en myocytes proviennent en partie des lèvres du dermomyotome épaxial. **B: stade DMM 2**: Croissance du dermomyotome et accumulation des myocytes et des myoblastes. **C: stade DMM 3**: Augmentation du nombre de myoblastes dérivés des progéniteurs Pax3/Pax7 ainsi que de myocytes. Ces cellules entrent dans le myotome à partir de la partie centrale du dermomyotome. **D: stade DMM 4**: Le dermomyotome central est désépithélialisé, ce qui n'est pas le cas des dermomyotomes hypaxial et épaxial. Les cellules myogéniques commencent à migrer et à s'accumuler. **E : Muscle épaxial** : Seul le début de la formation des muscles épaxiaux est représenté sur la figure (Adapté de (Deries, Goncalves et al. 2012)).

Wnt, qui agit, au contraire de *Nrarp*, en amont de la β -caténine (Ishikawa, Kitajima et al. 2004) (**Figure 7**). Les oscillations cycliques de Notch et Wnt sont perdues dans une suppression conditionnelle de la β -caténine au niveau du PSM (Dunty, Biris et al. 2008). Ces deux gènes pourraient donc expliquer les oscillations en opposition de phase des voies Notch et Wnt.

I.2.2 Front de détermination lié aux gradients de morphogènes

Le front de détermination s'établit à l'équilibre entre deux gradients morphogénétiques antagonistes (**Figure 5**). Les signalisations Wnt et FGF sont très actives et régulent les oscillations transcriptionnelles de leurs gènes cibles au niveau du PSM postérieur près du bourgeon caudal et beaucoup moins dans les somites nouvellement formés de la partie antérieure du PSM, ce qui génère un **gradient morphogénétique antéro-postérieur** (**Figure 5**). Ce gradient Wnt/FGF est antagonisé par un **gradient postéro-antérieur** d'acide rétinoïque. Ces gradients Wnt/FGF et acide rétinoïque définissent le front de détermination, c'est-à-dire le seuil à partir duquel les cellules du PSM arrêtent leurs oscillations transcriptionnelles et commencent à exprimer d'autres facteurs tels que MESP2 (Mesoderm posterior protein 2), qui réprime l'activité Notch et spécifie ainsi les frontières du futur segment somitique (Morimoto, Takahashi et al. 2005). Ainsi, la perturbation de l'une des voies de signalisations Wnt/FGF ou de la quantité d'acide rétinoïque peut entraîner un changement de fréquence des oscillations de l'horloge moléculaire présomitique, dont la conséquence sera un changement de position du front de détermination et une variation de la longueur des somites formés (Richmond and Oates 2012). En effet, une fréquence ralentie des oscillations entraîne la formation de somites plus longs et une fréquence plus rapide engendre les effets inverses (Oates, Morelli et al. 2012) (**Figure 6**).

II. La myogenèse embryonnaire et fœtale

La **myogenèse embryonnaire** est initiée au niveau des somites matures, au sein desquels on retrouve le premier muscle embryonnaire formé appelé **myotome**. Celui-ci est formé à partir des lèvres latérales du dermomyotome (Deries, Goncalves et al. 2012) (**Figure 9**). Le myotome hypaxial (ou hypomère) est à l'origine des muscles hypo-axiaux des parois

Motif bHLH

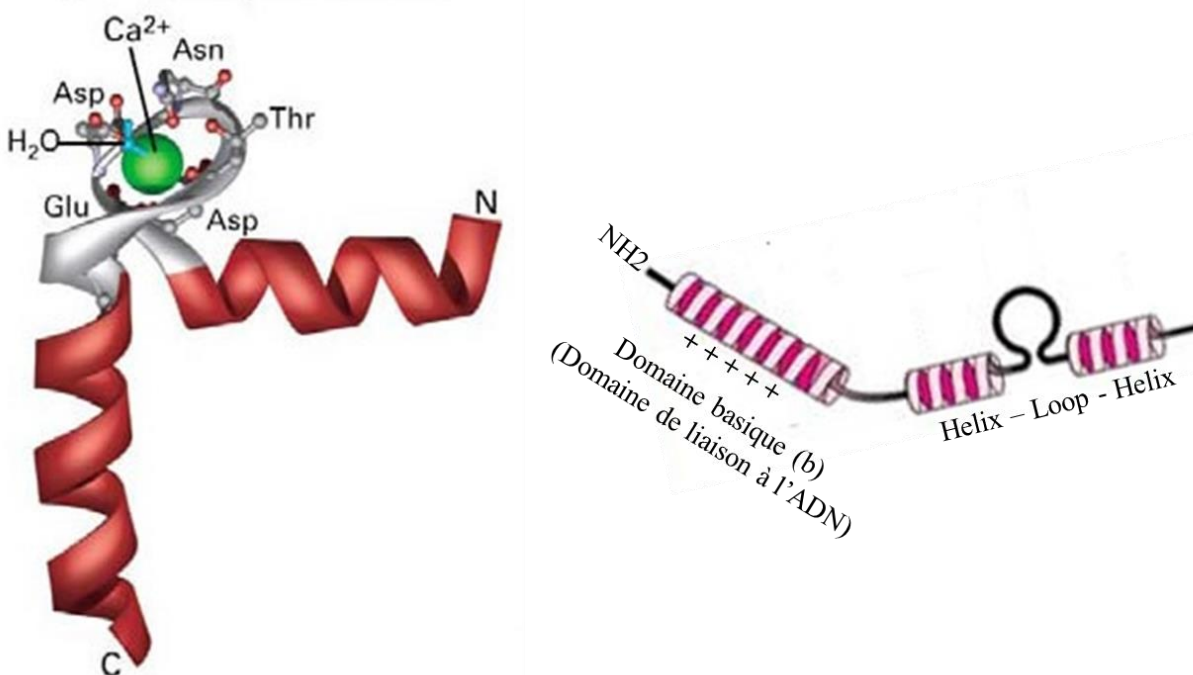


Figure 10 : Motif bHLH.

Les MRFs et les facteurs de transcription Pax contiennent des motifs bHLH, constitués d'un domaine basique N-terminal nécessaire à la liaison à l'ADN et un domaine hélice-boucle-hélice C-terminal, impliqué dans la dimérisation. Le calcium est impliqué dans la stabilisation du motif (https://lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=helix-loop-helix+motifs&lang=1).

ventrales et latérales du thorax et de l'abdomen alors que le myotome épaxial (ou épimère) est à l'origine des muscles épi-axiaux profonds du dos (Bentzinger, Wang et al. 2012) (**Figure 4**). Les muscles des membres proviennent quant à eux de cellules progénitrices exprimant *Pax3* d'origine myotomale, qui ont migré vers les bourgeons des membres après avoir exprimé le proto-oncogène *c-met* codant une tyrosine kinase (Buckingham, Bajard et al. 2003). Une fois arrivées au niveau des bourgeons des membres, ces cellules expriment des facteurs myogéniques de détermination (*MyoD*, *Myf5*) pour initier la myogenèse (Tajbakhsh and Buckingham 1994). Ainsi, la myogenèse est composée de plusieurs étapes. Après spécification des cellules mésodermiques, les progéniteurs musculaires se différencient en **myoblastes**, qui prolifèrent puis sortent du cycle cellulaire pour fusionner et se différencier en cellules multinucléées, les **myotubes**. Après cette myogenèse primaire, la plupart des myoblastes restants fusionnent avec les myotubes préformés pour former des myotubes matures (myogenèse secondaire). Ces myotubes matures formeront ensuite des **fibres musculaires** contractiles, qui abriteront des cellules souches (Musumeci, Castrogiovanni et al. 2015). Au cours de toutes ces phases, de nombreux facteurs interviennent dont les facteurs de régulation myogénique (ou MRFs) et les facteurs de transcription de la famille Pax.

II.1 Les principaux facteurs de transcription impliqués dans la myogenèse

II.1.1 Les facteurs de régulation myogénique ou MRFs

Les **MRFs** rassemblent 4 membres : MyoD, Myf5, la myogénine (ou MyoG) et MRF4 (ou Myf6). Ce sont des facteurs de transcription spécifiques du muscle, impliqués dans le contrôle de la myogenèse. Sur le plan structural, ils ont en commun des domaines très conservés, avec d'une part un **domaine de liaison à l'ADN riche en résidus d'acides aminés basiques** et d'autre part un motif de type hélice-boucle-hélice (**bHLH**, basic helix-loop-helix), relativement hydrophobe (**Figure 10**). Le domaine basique permet leur liaison spécifique aux séquences consensus de type E-box (5'-CANNTG-3') de l'ADN (Massari and Murre 2000) et le **motif HLH favorise leur dimérisation** avec d'autres protéines contenant ce type de motif bHLH. Sur le plan fonctionnel, MyoD et Myf5, qui sont nécessaires à la détermination/spécification des myoblastes, sont des MRFs dits primaires tandis que MyoG

et MRF4 sont des MRFs secondaires, qui régulent la différenciation terminale par l'activation de protéines musculaires spécifiques (Gerhart, Elder et al. 2006). C'est le laboratoire de Weintraub qui a été le premier à découvrir et à caractériser MyoD en tant que protéine nucléaire. L'expression hétérologue de MyoD dans des fibroblastes conduit à leur transformation en cellules musculaires fonctionnelles, capables de fusionner (Davis, Weintraub et al. 1987). En effet, MyoD est capable de se lier à l'ADN pour activer certains gènes cibles, qui provoquent l'arrêt de la prolifération et induisent la détermination myogénique. Par la suite, des études ont montré que les autres MRF, à savoir Myf5, MyoG et MRF4, étaient également capables d'induire la transformation des lignées cellulaires non musculaires en cellules musculaires (Braun, Buschhausen-Denker et al. 1989; Edmondson and Olson 1989; Rhodes and Konieczny 1989). Cependant, ces MRFs peuvent être redondants, puisque MyoD ou Myf5 seul est suffisant pour la détermination et la survie des myoblastes (Rudnicki and Jaenisch 1995).

Pour activer leurs gènes cibles impliqués dans la myogenèse embryonnaire, les MRFs doivent coopérer de manière synergique avec le facteur de transcription Mef-2 (Myocyte enhancer factor-2) qui comporte plusieurs isoformes (Breitbart, Liang et al. 1993; Molkentin, Firulli et al. 1996; Black and Olson 1998; Lu, McKinsey et al. 2000; Dodou, Xu et al. 2003). En effet, la myogénine et Mef-2 agissent en synergie pour activer le promoteur de *MRF4* pendant la myogenèse (Naidu, Ludolph et al. 1995).

II.1.2 Les facteurs de transcription de la famille Pax

Les gènes ***Pax*** (*paired box*) sont impliqués dans le développement embryonnaire, en particulier dans l'identité cellulaire de structures embryonnaires telles que le tube neural et les somites. Ces structures embryonnaires se distinguent par l'expression différentielle des gènes *Pax*. En effet, le tube neural n'exprime *Pax3* et *Pax7* que dans sa partie dorsale et les différentes parties des somites différenciés expriment spécifiquement des gènes *Pax* (*Pax1* dans le sclérotome et *Pax3* dans le dermomyotome). Par l'expression des gènes *Pax*, les cellules embryonnaires seront donc positionnées à des endroits précis le long de l'axe antéro-postérieur et par rapport à l'axe dorso-ventral. Après la naissance, très peu de gènes *Pax* interviennent dans le maintien des fonctions cellulaires.

Bien que la famille Pax comporte 9 membres, la myogenèse est principalement contrôlée par les facteurs de transcription **Pax3** et **Pax7**, dont un des deux est au moins présent chez tous les vertébrés (Noll 1993). Ces deux facteurs jouent un rôle dans la spécification myogénique et le développement de différents tissus (Buckingham and Rigby 2014). Au niveau embryonnaire, le dermomyotome de souris exprime *Pax3* et *Pax7* de manière différentielle : *Pax7* est fortement exprimé au niveau du domaine central tandis que *Pax3* est préférentiellement exprimé au niveau des lèvres dorsale et ventrale (Kassar-Duchossoy, Giacone et al. 2005). Ce sont les cellules progénitrices exprimant *Pax3*, qui n'ont pas encore exprimé de marqueurs myogéniques, qui se détachent des lèvres du dermomyotome hypaxial pour migrer sur de longues distances et initier la formation des muscles dans les bourgeons des membres (Kassar-Duchossoy, Giacone et al. 2005). L'expression de *Pax3* conditionne l'expression du facteur de détermination myogénique *Myod* et donc la formation des muscles. L'expression de *Pax7* au contraire n'est pas indispensable au développement musculaire chez l'embryon, du fait du rôle compensateur de *Pax3*. Cependant, cette expression de *Pax7* est indispensable pour la spécification et le maintien des cellules satellites. En effet, une absence totale de cellules satellites est observée dans les muscles squelettiques *Pax7*^{-/-}, en dépit de l'expression de *Pax3* (Seale, Sabourin et al. 2000; Buckingham and Relaix 2007). Les cellules satellites proviennent majoritairement de cellules progénitrices *Pax3/Pax7*, qui se positionnent en périphérie des fibres musculaires pendant la période périnatale (Buckingham 2006). Chez les embryons doubles mutants *Pax3/Pax7*, le programme myogénique est arrêté, provoquant une perte conséquente de muscles squelettiques mais le myotome peut se former malgré tout (Relaix, Rocancourt et al. 2005), sans doute du fait que l'expression précoce de *Myf5* y est indépendante de l'expression de *Pax3* et *Pax7*.

Tous ces résultats soulignent bien l'importance de *Pax3* et *Pax7* au niveau de la myogenèse embryonnaire, fœtale et adulte, de par leur rôle dans la détermination des progéniteurs myogéniques ainsi que dans la détermination et le maintien des cellules satellites, qui sont impliquées dans la croissance et la régénération musculaire post-natales.

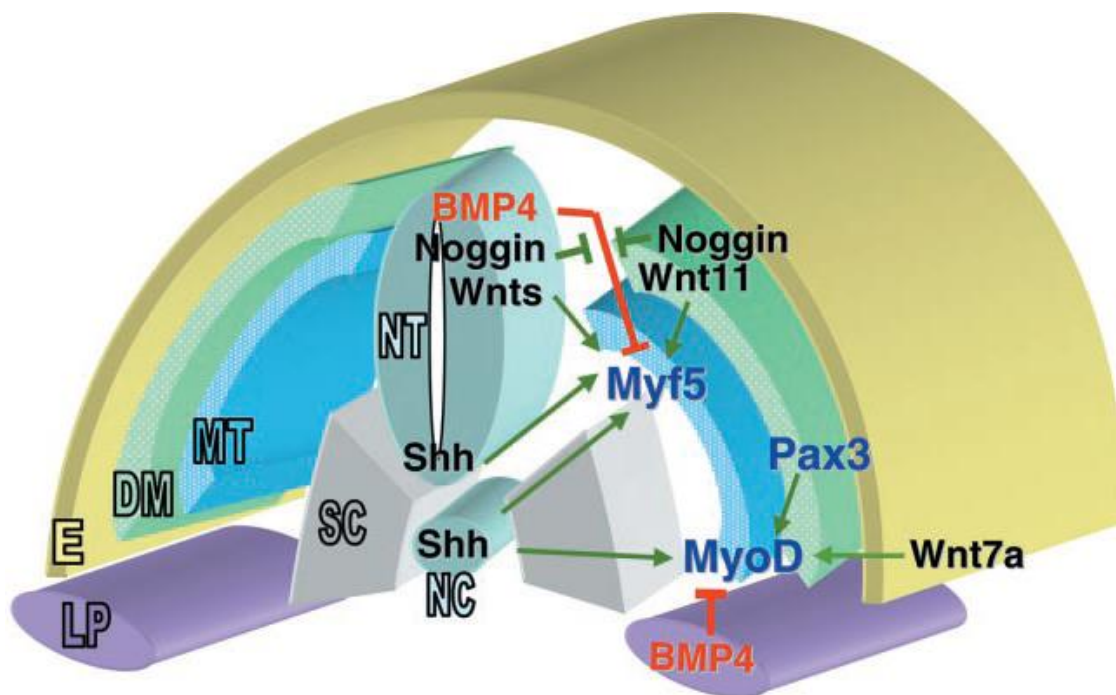


Figure 11 : Facteurs de signalisation cellulaire impliqués dans la myogenèse embryonnaire.

L'expression des facteurs myogéniques primaires (Myf5 et MyoD) au niveau du myotome est sous la dépendance de signaux activateurs (Wnts, Shh, Noggin, Pax3) et inhibiteurs (BMP4), provenant des tissus environnants (tube neural, notochorde, dermomyotome et ectoderme). Ces signaux antagonistes (Wnt, BMP) vont déterminer la taille du myotome. Plus tardivement, sous l'influence des Wnt, toutes les cellules co-expriment MyoD et Myf5 (Charge and Rudnicki 2004).

II.2 Les différentes étapes de la myogenèse

II.2.1 Détermination des cellules mésodermiques en progéniteurs musculaires

A part les muscles de la tête, les **muscles squelettiques** dérivent essentiellement de cellules mésodermiques précurseurs d'**origine somitique**, dont la spécification en progéniteurs musculaires est régulée par des signaux antagonistes émis par les tissus environnants (tube neural, notochorde et ectoderme). La spécification en lignée myogénique au niveau du dermomyotome requiert l'expression de *Myod* et *Myf5*. Ces deux MRFs sont des marqueurs de spécification de la lignée musculaire (Pownall, Gustafsson et al. 2002; Charge and Rudnicki 2004). Les souris KO pour *Myf5* présentent une myogenèse embryonnaire retardée, qui se déroule normalement car *MyoD* peut compenser l'absence de *Myf5* (Braun, Rudnicki et al. 1992). Inversement, le KO de *MyoD* est compensé par l'expression de *Myf5* (Rudnicki, Braun et al. 1992). Par contre, l'expression d'au moins un de ces deux facteurs de détermination est nécessaire puisque le double KO *Myod:Myf5* entraîne la perte totale du muscle squelettique chez les souris, qui meurent peu de temps après la naissance (Rudnicki, Schnegelsberg et al. 1993; Kablar, Asakura et al. 1998).

L'expression de *Myf5* au niveau du myotome épaxial est induite principalement par différentes molécules provenant du tube neural (Wnt1, Wnt3, Sonic hedgehog (Shh)) et de la notochorde (Shh) (Charge and Rudnicki 2004) (**Figure 11**). De faibles niveaux d'expression de *Shh*, conjointement à une forte expression des protéines Wnt, permettent d'induire l'expression de *Myf5*. L'expression de *MyoD* est alors activée par *Myf5*. Au niveau du myotome hypaxial, l'expression *Myf5*-indépendante de *MyoD* est induite suite à l'action d'autres molécules provenant soit de l'ectoderme dorsal (Wnt7a) soit du mésoderme latéral (BMP4, FGF5) (Musumeci, Castrogiovanni et al. 2015). L'expression de ces deux MRFs primaires (*Myf5* et *MyoD*) peut être inhibée par BMP4 (Bone morphogenetic protein 4), qui à son tour peut subir l'action inhibitrice de Shh et Noggin. Ces signaux antagonistes (Wnt, BMP) vont déterminer la taille du myotome. Plus tardivement, sous l'influence des Wnt, toutes les cellules co-expriment *MyoD* et *Myf5*.

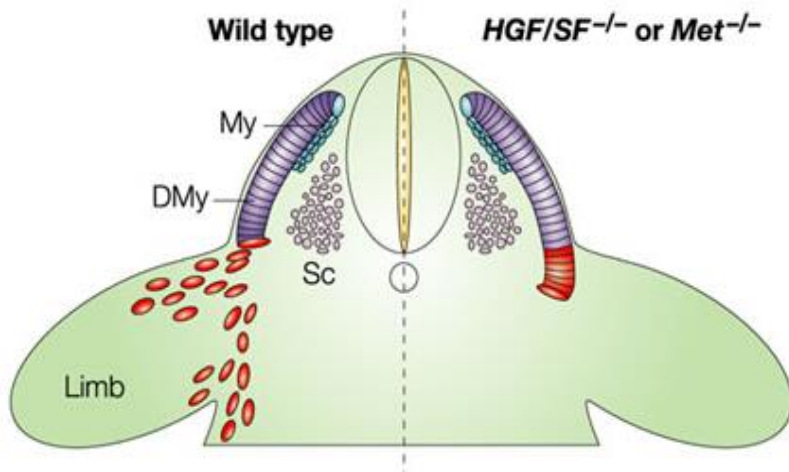


Figure 12 : Migration de cellules précurseur des muscles vers les bourgeons des membres.

Pendant le développement embryonnaire normal, les cellules progénitrices (rouge) se détachent du dermomyotome (DMy) après expression de c-met et migrent vers les bourgeons des membres. Chez les embryons $HGF^{-/-}$ et $c-met^{-/-}$, ces cellules sont incapables de se détacher et s'accumulent dans le myotome (My) (Birchmeier, Birchmeier et al. 2003).

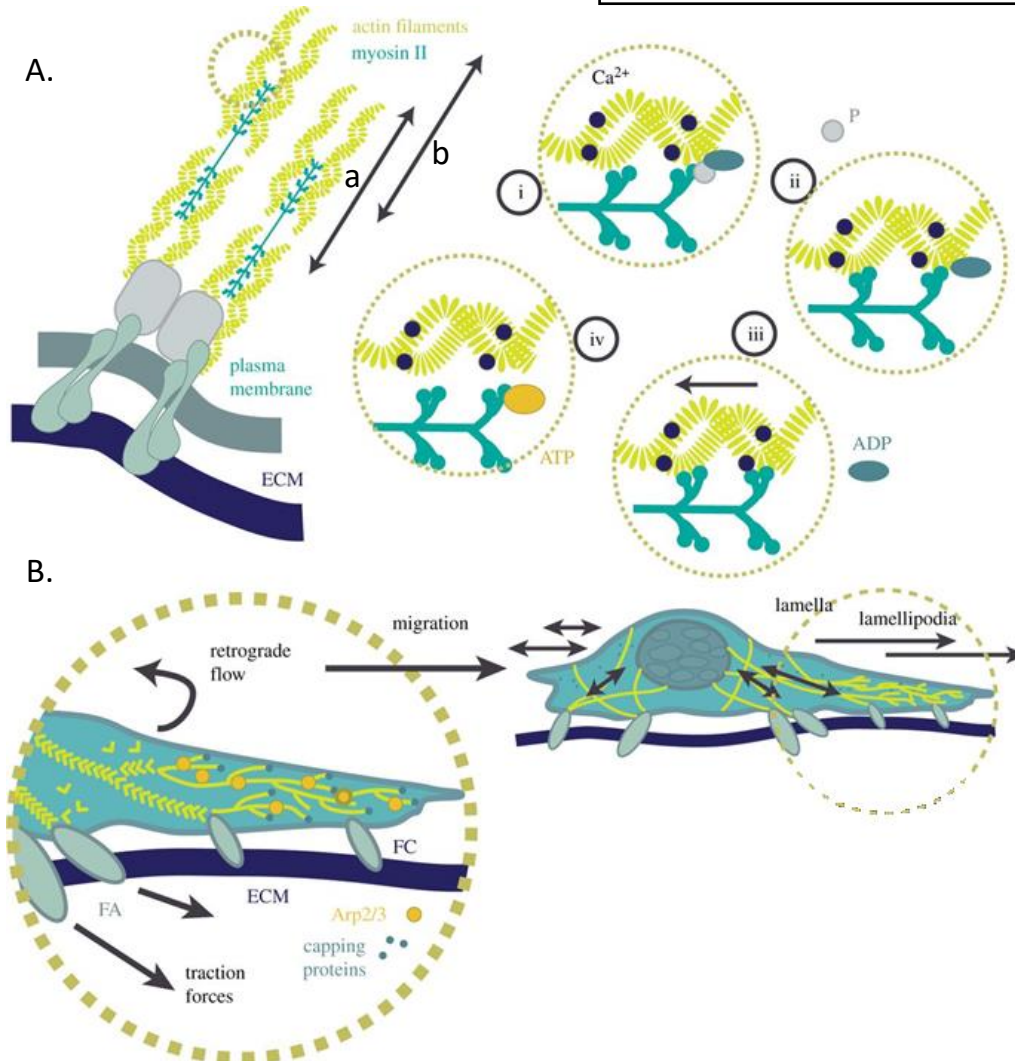


Figure 13 : Migration des myoblastes.

A. Génération de la force intracellulaire. La contraction de l'acto-myosine permet le déplacement du myoblaste dans la matrice extracellulaire. L'hydrolyse de l'ATP en présence de calcium intracellulaire (i) permet la liaison de la myosine à l'actine en formant des ponts transversaux (ii). La réorientation de la myosine (contractée) vers le centre du sarcomère (iii) génère une force de **traction** qui va permettre le déplacement de la cellule (par l'extension des lamellipodes) (a : première position de la myosine ; b : deuxième position). Enfin, la liaison de l'ATP à la myosine la libère de l'actine (iv).

B. Propulsion cellulaire : Le complexe Arp2/3 (permet la polymérisation de l'actine) pousse les lamellipodes (formées par les forces de traction) de la cellule contre la membrane plasmique par ses ramifications qui se lient avec les protéines FAs (protéines de la MEC). Ces liaisons protéiques (Arp2/3-FAs) sont fortes et permettent la stabilisation de la liaison de la cellule avec la MEC. La propulsion de la cellule se fait grâce à la génération successive des forces de traction générées par la contraction de l'acto-myosine (A.). FA : Focal Adhesion (complexe d'adhésion de la MEC). FC : forme mature de la FA. (Haase and Pelling 2015).

Au niveau des bourgeons des membres, la détermination myogénique ne se réalise qu'au moment de l'arrivée des cellules progénitrices migratoires, provenant du dermomyotome hypaxial et co-exprimant *Pax3* et *c-met* (Buckingham, Bajard et al. 2003).

II.2.2 Migration des progéniteurs et détermination en myoblastes

Les cellules se séparent du myotome, puis migrent sur des distances plus ou moins grandes avant de générer des myoblastes prolifératifs. *Pax3* est fortement impliqué dans la spécification myogénique précoce et dans la migration des précurseurs myogéniques vers les bourgeons des membres (Williams and Ordahl 1994; Daston, Lamar et al. 1996). L'expression du récepteur tyrosine kinase *c-met* est nécessaire au détachement des cellules progénitrices *Pax3*⁺ de la région dorso-latérale du dermomyotome et donc à leur migration vers les bourgeons des membres (Buckingham and Rigby 2014). L'interaction de *c-met* avec son ligand, HGF, est également importante pour guider la migration de ces cellules progénitrices (Birchmeier and Brohmann 2000) (**Figure 12**). Une fois que celles-ci atteignent le membre, l'expression de *Pax3* diminue au détriment de l'activation de *Myf5* (Mankoo, Collins et al. 1999).

Les cellules progénitrices *Pax3/c-met* migrent sur de plus grandes distances vers les bourgeons des membres, où leur **détermination en myoblastes** conduira à la formation des muscles des membres. **La migration des myoblastes** se fait en plusieurs étapes et dépend de prolongements cytoplasmiques transitoires (filopode, lamellipode), qui vont former des plaques d'adhérence pour exercer une force de traction, propulsant les cellules vers l'avant. La migration cellulaire est facilitée soit par des moteurs moléculaires (Veigel and Schmidt 2011) soit par une polymérisation de l'actine (Ji, Lim et al. 2008). Récemment un modèle a établi le mécanisme de migration des myoblastes C2C12 injectés chez la souris (Haase and Pelling 2015) (**Figure 13**). La migration des myoblastes nécessite aussi l'intervention de systèmes protéolytiques pour réduire la résistance générée par la matrice extracellulaire, une étude dans ce sens a montré l'importance des métalloprotéases MMP2 (El Fahime, Torrente et al. 2000). Pour favoriser la différenciation, la mobilité cellulaire des myoblastes diminue considérablement (Powell 1973; Griffin, Apponi et al. 2010), en devenant insensibles à plusieurs inducteurs de la migration, tels que les facteurs de croissance HGF et PDGF (Griffin, Apponi et al. 2010). La moindre mobilité augmente la probabilité de contact

cellule-cellule, déclenchant ainsi la différenciation (Krauss, Cole et al. 2005) par fusion des myoblastes entre eux ou avec des myotubes naissants (Nowak, Nahirney et al. 2009).

II.2.3 Prolifération des myoblastes

Les myoblastes apparaissant au niveau du dermomyotome co-expriment tardivement *Myod* et *Myf5*, qui sont impliqués dans le contrôle de la prolifération des myoblastes. En effet, ces 2 MRFs sont impliqués dans la régulation du cycle cellulaire. Les complexes protéiques du cycle cellulaire tels que Cdk2-Cycline E (Tintignac, Leibovitch et al. 2000) et Cdk1-Cycline B (Batonnet-Pichon, Tintignac et al. 2006) permettent l'**inhibition de MyoD** et donc favorise la sortie des cellules du cycle (Kitzmann and Fernandez 2001). **MyoD induit la différenciation** des myoblastes par ses fonctions d'inhibiteur du cycle cellulaire. Le maintien de la phase proliférative des myoblastes va donc dépendre du niveau faible d'expression de *MyoD* qui est sans doute inactivé lorsqu'il est phosphorylé par le complexe cycline E-cdk2.

Les myoblastes peuvent être maintenus à l'état prolifératif sous l'action de facteurs de croissance. La signalisation FGF médiée par FGFR1 régule la prolifération et la différenciation des myoblastes. Les premières études ont identifié FGF1 et FGF2 comme des facteurs qui contribuent à l'activation de la prolifération des myoblastes et retardent leur différenciation (Gospodarowicz, Weseman et al. 1976; Linkhart, Clegg et al. 1980; Linkhart, Clegg et al. 1981; Kardami, Spector et al. 1985; Clegg, Linkhart et al. 1987; Seed, Olwin et al. 1988). La surexpression de l'allèle sauvage *Fgfr1* dans les myoblastes prolonge la prolifération cellulaire et retarde la différenciation myogénique *in vitro* (Patel, Funk et al. 1999; Scata, Bernard et al. 1999).

Dans l'embryon, des signaux coordonnent la prolifération et la différenciation des progéniteurs myogéniques. La myostatine, membre de la famille TGF beta, agit *in vivo* pour réguler l'équilibre entre la prolifération et la différenciation des progéniteurs musculaires embryonnaires, en agissant sur l'activation de *p21* (connu aussi sous le nom de *Cdkn1a*) et de *Myod* (Manceau, Gros et al. 2008). D'autres travaux ont également montré que *Pax3* agit directement en amont des composants de la signalisation FGF, qui à leur tour régulent également l'équilibre entre le pool des progéniteurs des myoblastes en prolifération et en différenciation (Lagha, Kormish et al. 2008).

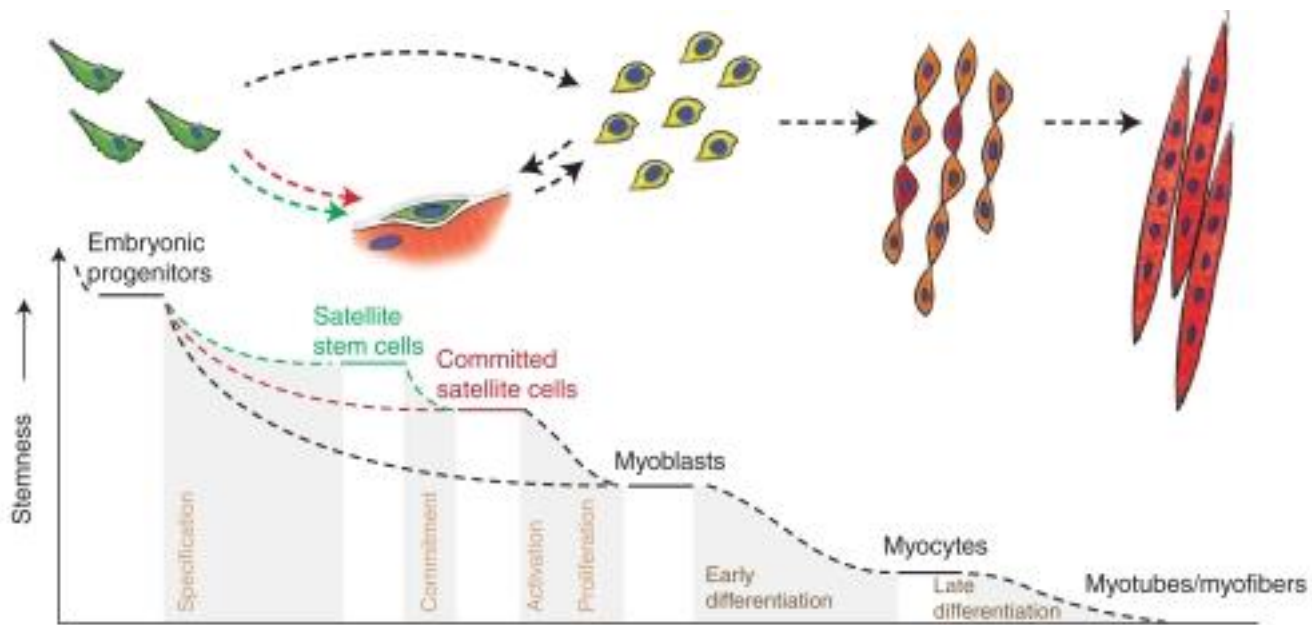


Figure 14 : Hiérarchie des facteurs de transcription régulant la progression de la lignée myogénique.

Les cellules satellites, en périphérie des fibres musculaires et majoritairement quiescentes à l'âge adulte, proviennent de progéniteurs musculaires exprimant Pax3 et Pax7. Lors de leur sortie de l'état quiescent (activation), elles se déterminent en myoblastes prolifératifs par l'expression de Myf5 ou MyoD. Soit ces cellules Pax7+ perdent l'expression de MyoD et retournent à l'état quiescent soit elles la maintiennent et se différencient en myocytes, qui expriment la myogénine (*MyoG*). L'expression des facteurs de différenciation terminale, tels que *MyoG* et *MRF4*, est requise pour la fusion des myocytes en cellules multinucléées appelées myotubes, impliqués dans la formation ultérieure de fibres musculaires (Adaptée (Bentzinger, Wang et al. 2012)).

Tant que les facteurs de croissance tels que FGF sont disponibles, les myoblastes continuent à proliférer et ne peuvent entrer en différenciation. L'arrêt de la prolifération et le déclenchement de la différenciation myogénique dépendent aussi du taux d'expression de la protéine MyoD. MyoD favorise l'arrêt du cycle cellulaire en activant l'inhibiteur du cycle cellulaire *p21* (Halevy, Novitch et al. 1995). L'expression de la myogénine, suivie de l'expression de *p21* induite par MyoD, favorise également la sortie du cycle cellulaire et l'engagement des myoblastes dans le processus de différenciation (Andres and Walsh 1996).

II.2.4 Différenciation en myotubes

La fusion des myoblastes est une étape fondamentale dans la différenciation musculaire, qui peut impliquer des dizaines de milliers de myoblastes. La **fusion des myoblastes** est un processus séquentiel et spato-temporel très finement régulé, qui se déroule sur une période de temps assez limitée et en différents sites (**Figure 14**). Si on considère la myogenèse qui conduit à la formation des muscles squelettiques des membres, la différenciation démarre dans la région proximale des membres et coïncide avec la diminution des concentrations en facteurs de croissance, tels que le FGF. Les myoblastes prolifératifs marqués par l'expression de *MyoD* et/ou de *Myf5*, sortent du cycle cellulaire lorsqu'ils co-expriment *Myog* et *p21*.

II.2.4.1 Expression des MRF tardifs

Le début de la différenciation des myoblastes engendre des myocytes qui expriment alors un autre MRF tardif appelé *MRF4* (ou *Myf6*) ainsi que des gènes codant des protéines spécifiques du muscle telles que la chaîne lourde de la myosine (MyHC) et la créatine kinase. Les myocytes mononucléés fusionnent alors pour former des cellules multinucléées très allongées appelées myotubes (Charge and Rudnicki 2004; Musumeci, Castrogiovanni et al. 2015) (**Figure 14**). Le **myogénine** et le **MRF4** sont les MRFs secondaires, qui régulent la différenciation terminale et permettent l'activation de la transcription de gènes codant des protéines musculaires spécifiques (Gerhart, Elder et al. 2006).

La myogénine se lie à la région de régulation de plusieurs gènes musculaires spécifiques et active leur expression (Meadows, Cho et al. 2008; Musumeci, Castrogiovanni et al. 2015). Les souris KO pour *Myog* présentent une létalité périnatale, due à une perturbation grave de la différenciation des myoblastes et l'incapacité de former les fibres musculaires normales (Hasty, Bradley et al. 1993; Nabeshima, Hanaoka et al. 1993).

MRF4 a un profil d'expression biphasique dans l'embryon de souris pendant le développement. Il est exprimé de façon transitoire dans le myotome de la souris à E9 (Jin, Kim et al. 2007). Son expression diminue à E11.5, et reprend à E16.0 lors de la différenciation des fibres musculaires (Summerbell, Halai et al. 2002; Berkes and Tapscott 2005). Ainsi, son profil d'expression temporelle complexe suggère des rôles potentiels dans la détermination musculaire et la différenciation terminale (Jin, Kim et al. 2007).

L'utilisation d'une série de différents mutants *Myf5*, a montré que le KO de *Myf5* altère également la fonction de MRF4 (Kassar-Duchossoy, Gayraud-Morel et al. 2004). Cependant, la présence d'un seul allèle fonctionnel de *MRF4* conserve des aspects mineurs de la myogenèse embryonnaire dans les souris double KO *Myf5:MyoD* (Bentzinger, Wang et al. 2012). L'analyse des souris KO pour la myogénine a révélé une réduction de l'expression de plusieurs marqueurs de différenciation, tels que la chaîne lourde de la myosine (MyHC) et MRF4, tandis que les niveaux sont normaux pour MyoD (Hasty, Bradley et al. 1993; Nabeshima, Hanaoka et al. 1993). De même, des souris déficientes en MRF4 présentent un retard de la voie myogénique qui se manifeste par retard du développement du myotome, des malformations squelettiques avec des côtes malformées (Patapoutian, Yoon et al. 1995; Rawls, Morris et al. 1995; Zhang, Behringer et al. 1995; Yoon, Olson et al. 1997). Phénotypiquement, le cloisonnement somitique est normal au cours du développement, mais se manifeste dans la formation de fibres musculaires diffuses et une abondance de myoblastes indifférenciés dans les étapes ultérieures de la myogenèse (Bentzinger, Wang et al. 2012). Prises ensemble, ces études suggèrent un modèle dans lequel *Myf5* et *MyoD* sont capables de déclencher la différenciation des myoblastes (Figure 14).

II.2.4.2 Processus de fusion

Le processus de fusion myoblastique implique plusieurs types de cellules (myocyte, myotube), qui expriment différentes molécules de reconnaissance et d'adhésion cellulaire, cruciales pour une fusion précise et efficace (Abmayr and Pavlath 2012). Avant de fusionner, les **myoblastes s'allongent en myocytes** et subissent des changements métaboliques importants avec un contenu en mitochondries et en réticulum sarcoplasmique qui augmente.

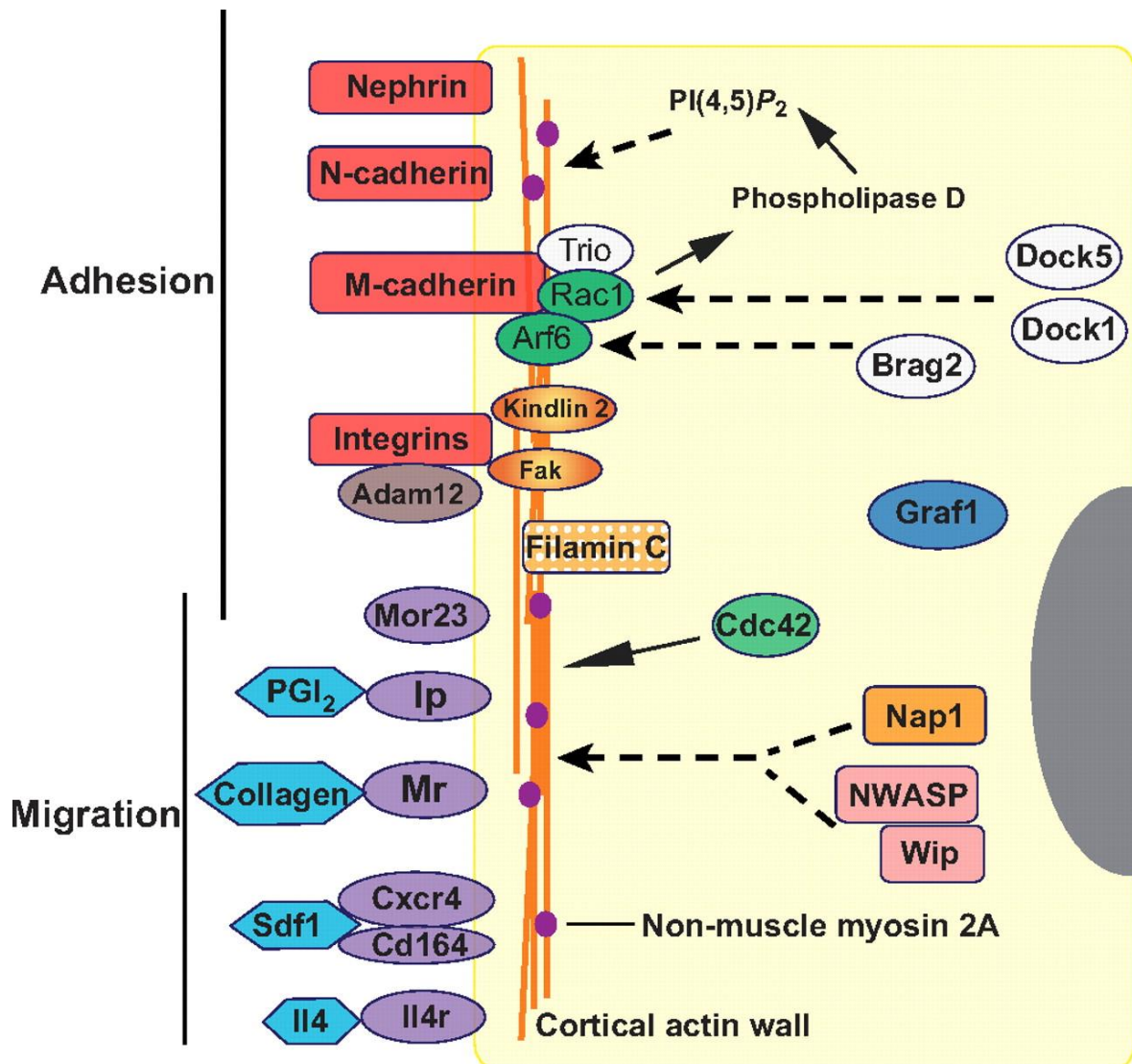


Figure 15 : Les protéines impliquées dans l'adhésion et la migration myoblastique chez la souris.

Les protéines impliquées dans les mécanismes d'adhésion myoblastique et menant vers la fusion font partie essentiellement de la famille des cadhérines et des intégrines. D'autres protéines membranaires telles que le récepteur à l'IL4 sont impliquées dans les mécanismes migratoires (Abmayr and Pavlath 2012).

Le **contact cellule-cellule** entre deux cellules musculaires, indispensable à la fusion, est favorisé par la présence de molécules d'adhésion en surface (Cifuentes-Diaz, Nicolet et al. 1995; Schwander, Leu et al. 2003; Lafuste, Sonnet et al. 2005; Brzoska, Bello et al. 2006) (**Figure 15**). A titre d'exemple, la M-cadhérine est nécessaire à la formation des myotubes *in vitro* (Zeschngk, Kozian et al. 1995; Charrasse, Comunale et al. 2006) mais pas *in vivo* (Hollnagel, Grund et al. 2002), suggérant que d'autres cadhérines (ex : N-cadhérine) ou molécules d'adhésion cellulaire (ex : intégrines) peuvent fonctionnellement compenser l'absence de M-cadhérine. Le rôle des intégrines a été étudié et l'élimination de l'intégrine $\beta 1$, associée par hétérodimérisation à différentes intégrines α ($\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 9$...), diminue la fusion des myoblastes *in vitro* et *in vivo* (Schwander, Leu et al. 2003; Lafuste, Sonnet et al. 2005; Brzoska, Bello et al. 2006), démontrant son caractère indispensable à un processus de fusion efficace. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est nécessaire à la promotion de la différenciation myoblastique puisque l'interaction de cette intégrine avec la fibronectine de la matrice extracellulaire permet l'alignement des myocytes, nécessaire à leur fusion. Au niveau des sites de contact intercellulaires, les membranes sont juxtaposées et stabilisées par des protéines telles que la Myoferline et la Dysferline (Musumeci, Castrogiovanni et al. 2015). Il semblerait aussi que les rafts lipidiques, qui concentrent localement différentes molécules d'adhésion, s'accumulent au niveau des sites de contact intercellulaires (Mukai, Kurisaki et al. 2009) et que la présence de cholestérol au niveau de ces structures permettrait de maintenir la rigidité des points de contact, nécessaires à l'adhésion des cellules myogéniques entre elles (Abmayr and Pavlath 2012).

En outre, l'implication de plusieurs voies de signalisation a été suggérée, parmi lesquelles on trouve des voies dont l'activation est calcium-dépendante (**Figure 16**). Parmi ces voies, on trouve la voie de signalisation impliquant la protéine **FAK**, dont le rôle dans la fusion myoblastique *in vitro* et *in vivo* a été démontré (Quach, Biressi et al. 2009). La liaison de protéines de la matrice extracellulaire (fibronectine, vitronectine ...) aux intégrines $\beta 1$ conduit à la phosphorylation de FAK, facilitant ainsi sa liaison avec des protéines de signalisation comme Src, Cas et Paxilline. Le complexe protéique ainsi formé induit l'activation de la Caveoline-3 et de l'intégrine $\beta 1D$ pour favoriser la fusion des myoblastes (Hindi, Tajrishi et al. 2013).

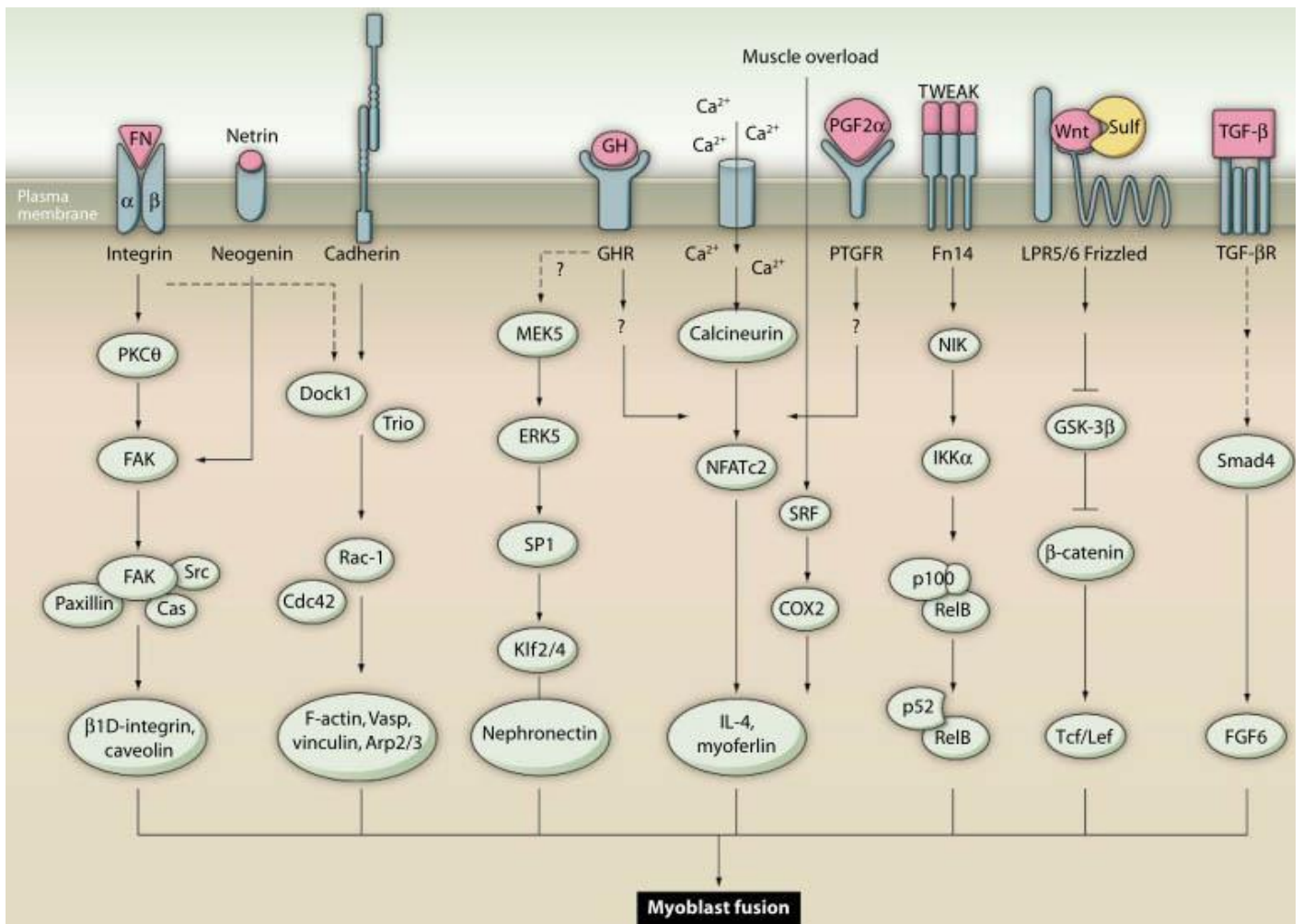


Figure 16 : Les voies de signalisation impliquées dans la fusion myoblastique.

Plusieurs voies de signalisation, impliquant ou non des molécules d'adhésion, contrôlent la fusion myoblastique. A titre d'exemples, on retrouve la voie calcique NFAT/IL4, la voie Wnt/ β -caténine et la voie TGF- β /Smad (adapté de (Hindi, Tajrishi et al. 2013) et <http://mglinets.narod.ru/slova8/myoblFus.htm>).

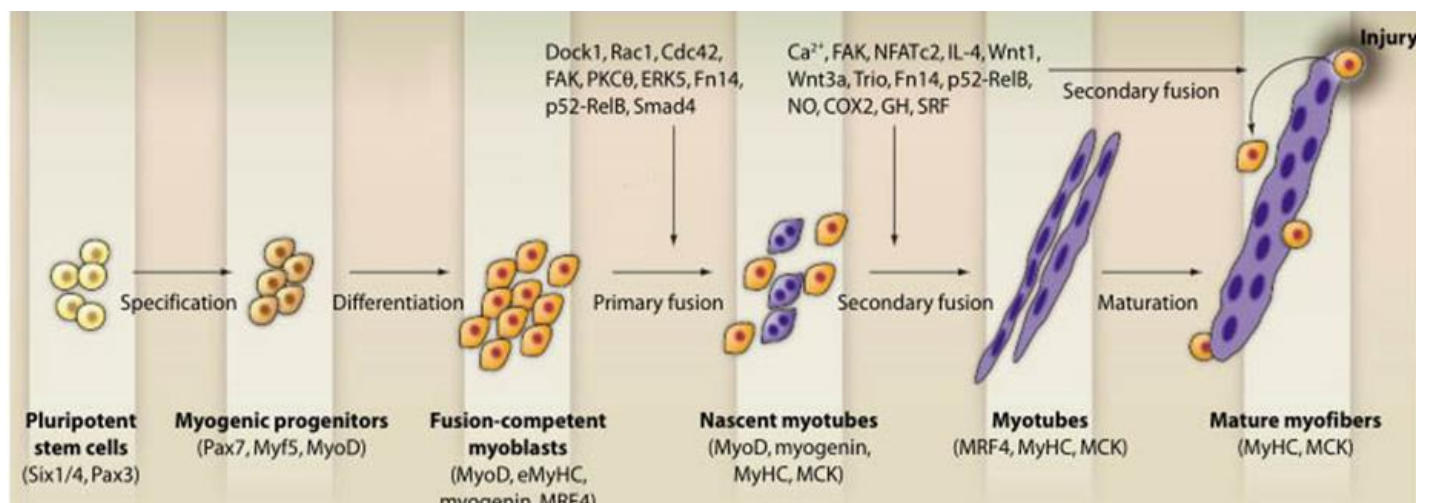


Figure 17 : Les protéines spécifiques exprimées au cours de la différenciation myogénique.

Les cellules souches exprimant Pax3 vont exprimer Pax7 puis se déterminer en progéniteurs myogéniques (myoblastes), qui expriment les MRF primaires (Myf5, MyoD). L'expression des MRF secondaires (MyoG, MRF4) est plus tardive et concerne des myoblastes différenciés et allongés (myocytes), compétents pour la fusion. Ces myocytes fusionnent entre eux pour former des myotubes naissants (fusion primaire) ou avec des myotubes déjà formés (fusion secondaire). Dans ces deux processus de fusion, de très nombreuses molécules sont impliquées ainsi que dans le processus de maturation des myotubes en fibres musculaires contractiles. Lors du processus de régénération musculaire induit par une blessure, les cellules satellites en périphérie des fibres musculaires sont activées, prolifèrent et migrent vers le site lésé où elles fusionneront avec les fibres musculaires endommagées (fusion secondaire) (adapté de (Hindi, Tajrishi et al. 2013).

Les voies de signalisation de 4 **MAPKs** (ERK1/2, JNK, p38 et ERK5) sont parmi les voies les plus activées pendant la fusion cellulaire (Quach, Biressi et al. 2009). La protéine ERK5 fait partie de la voie de signalisation MEK5-ERK5-SP1-Klf2/4-Npnt, qui est capable de déclencher la fusion myoblastique chez les mammifères (Hindi, Tajrishi et al. 2013).

En plus, la voie de signalisation NFAT (NFATc1-c4), calcium dépendante, régule la prolifération, la différenciation et la fusion myoblastiques (Constantin, Cognard et al. 1996; Horsley and Pavlath 2002; Wu, Peisley et al. 2007). L'augmentation de la quantité du calcium intracellulaire va activer la calcineurine (phosphatase), qui déphosphoryle NFATc et induit sa translocation dans le noyau pour réguler les gènes cibles (Horsley and Pavlath 2002). Parmi les 4 isoformes de NFATc, NFATc2 a été montré comme un élément essentiel à la fusion myoblastique. En effet les souris *Nfatc2*^{-/-} possèdent des myotubes plus petits avec un nombre plus faible de myonuclei (Horsley, Friday et al. 2001).

D'autres voies de signalisation sont impliquées dans la régulation du processus de fusion myoblastique comme la voie **NF-κB**, la voie de **Wnt** et la voie **TGF-β** (Hindi, Tajrishi et al. 2013).

II.2.5 Formation des myotubes matures

En 2003, Horsley et al. ont découvert que l'**interleukine 4** (IL-4), molécule initialement identifiée dans le système immunitaire adulte, était sécrétée par les myotubes et jouait un rôle dans le recrutement d'autres myoblastes pour favoriser la **fusion secondaire (Figure 17)** (fusion myocyte-myotube) et donc la formation de myotubes matures (Horsley, Jansen et al. 2003). Chez l'homme, les premiers myotubes apparaissent au cours de la semaine 5 et à la fin de la semaine 8, la majorité des myotubes sont différenciés en fibres musculaires (Musumeci, Castrogiovanni et al. 2015).

Les travaux se rapportant à la fusion des myoblastes, chez les mammifères dérivent d'études *in vitro* utilisant soit des lignées myoblastiques, telles que les cellules C2C12 (Bajaj, Reddy et al. 2011; Velica and Bunce 2011; Der Vartanian, Audfray et al. 2015) soit des cellules musculaires primaires isolées à partir de souris (Horsley, Jansen et al. 2003). Les myoblastes prolifèrent puis sortent du cycle cellulaire pour s'allonger en myocytes, dont le rapprochement et l'alignement aboutissent à leur fusion et à la formation de petits

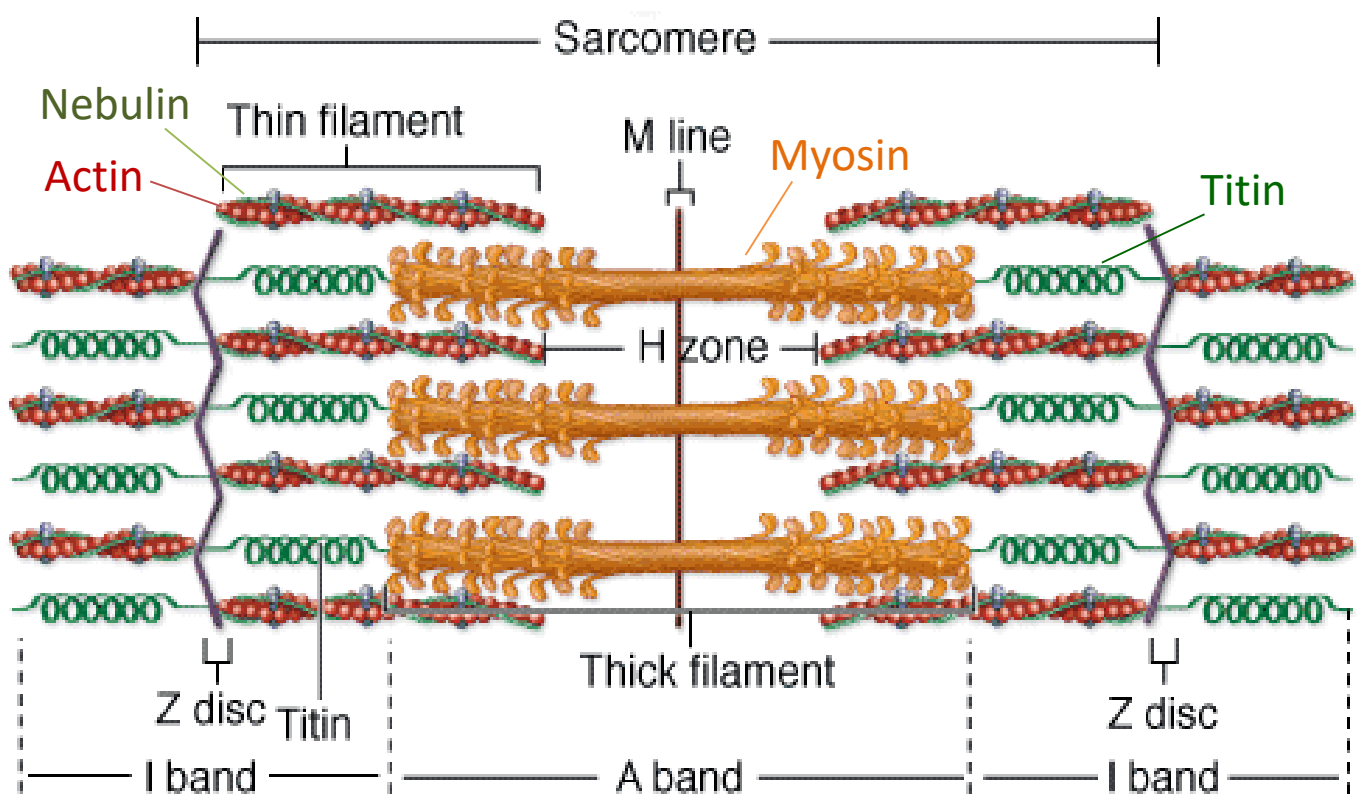


Figure 18 : Composition en protéines du sarcomère.

Les myofibrilles sont des cylindres parallèles allongés dans le sens de la cellule, faits de la succession régulière, bout à bout, de petits cylindres identiques appelés sarcomères. Le sarcomère est l'unité contractile de la myofibre, constituée de filaments épais de myosine et de filaments fins d'actine, qui permettent le raccourcissement du sarcomère lors d'une contraction musculaire. D'autres protéines du sarcomère telles que la titine et la nébuline sont exprimées tardivement dans les fibres musculaires (adaptée de <http://www.gymsante.eu/blog/excentrique-bases-anatomie-1309/>).

myotubes naissants contenant quelques noyaux (**fusion primaire**). Les myocytes peuvent aussi fusionner avec les myotubes naissants pour former des myotubes plus épais avec un contenu beaucoup plus riche en noyaux (**fusion secondaire**) (Abmayr and Pavlath 2012) (**Figure 17**).

II.2.6 Formation des fibres musculaires

Au niveau des membres, la différenciation a lieu dans la région proximale quand les concentrations en FGF sont suffisamment réduites. **Les myoblastes embryonnaires fusionnent pour former des fibres musculaires primaires**, contenant peu de noyaux. Plus tard, **les myoblastes foetaux sont impliqués dans la formation de fibres musculaires secondaires** plus épaisses et plus riches en noyaux, en fusionnant directement avec les fibres primaires pré-formées (Duxson, Usson et al. 1989) (**Figure 17**). Au fur et à mesure de la progression de la myogenèse secondaire, les myoblastes foetaux fusionnent avec les extrémités des deux types de fibres musculaires (primaires et secondaires) pour accroître aussi leur longueur (Zhang and McLennan 1995). Au cours de la myogenèse secondaire, les myofibres expriment différentes isoformes de chaînes lourdes de myosine, ce qui a permis de distinguer les fibres à contraction rapide de celles à contraction lente chez l'adulte (Lyons, Ontell et al. 1990). Parmi les autres protéines spécifiques exprimées dans le muscle, on retrouve de manière séquentielle la Desmine, la Titine, l'Actine et la Nébuline.

A la fin du développement foetal autour de la période périnatale, les cellules satellites, d'origine embryonnaire (Lepper and Fan 2010), se positionnent en périphérie des fibres musculaires entre la lame basale et la membrane sarcolemmique. Ces cellules satellites, impliquées dans la croissance et la régénération musculaire, permettent d'assurer le maintien de la masse musculaire et sont maintenues à l'état quiescent à l'âge adulte dans les conditions physiologiques normales.

L'étape finale de la myogenèse est la **maturation de la fibre musculaire**, qui se caractérise par l'assemblage des myofibrilles formant des bandes transversales et l'apparition de l'unité fonctionnelle excitable et motrice du muscle, le sarcomère (Musumeci, Castrogiovanni et al. 2015) (**Figure 18**).

III. La croissance et la régénération musculaire post-natale

Lors de la période post-natale chez les mammifères, il semblerait que l'augmentation de la masse musculaire soit essentiellement due à l'augmentation du volume des fibres musculaires (**hypertrophie**) et non à l'augmentation de leur nombre (**hyperplasie**). Ceci est particulièrement bien démontré chez la souris (Rowe and Goldspink 1969; Nimmo and Snow 1983; White, Bierinx et al. 2010) alors que chez les rongeurs et les porcs, une légère hyperplasie des fibres musculaires a été observée peu après la naissance (Swatland 1975; Leeson and Summers 1984; Rehfeldt and Fiedler 1984), sans doute du fait de l'allongement des fibres pré-existantes plutôt qu'à la production de nouvelles fibres (Ontell and Kozeka 1984).

L'**augmentation de la masse musculaire postnatale par hypertrophie** des fibres musculaires en début de période postnatale peut être le résultat d'un **anabolisme protéique accru** et/ou de la **fusion des fibres musculaires préexistantes avec des myocytes** issus des cellules souches musculaires adultes, les cellules satellites (White, Bierinx et al. 2010; Pallafacchina, Blaauw et al. 2013). Bien que minoritaires puisqu'elles ne représentent à l'âge adulte que 2 à 6% des noyaux des myofibres, les cellules satellites sont essentielles et constituent le pool de cellules souches musculaires adultes, capables d'assurer leur auto-renouveau ainsi que la croissance et la régénération musculaire post-natale (Kuang and Rudnicki 2008; Brack and Rando 2012; Fry, Lee et al. 2014).

III.1 Les cellules satellites : cellules souches musculaires adultes

Le muscle squelettique est un organe relativement exposé à différents types de lésions (lésion musculaire, blessure, pathologie....) et son haut potentiel régénératif est assuré par la présence de **cellules satellites**, cellules mononucléées localisées en périphérie des fibres entre le sarcolemme et la lame basale (**Figure 1**). Le micro-environnement constitué par la lame basale forme la "niche" des cellules satellites, dans laquelle la cellule satellite pourra soit restée quiescente soit être activée sous l'action de signaux spécifiques extrinsèques.

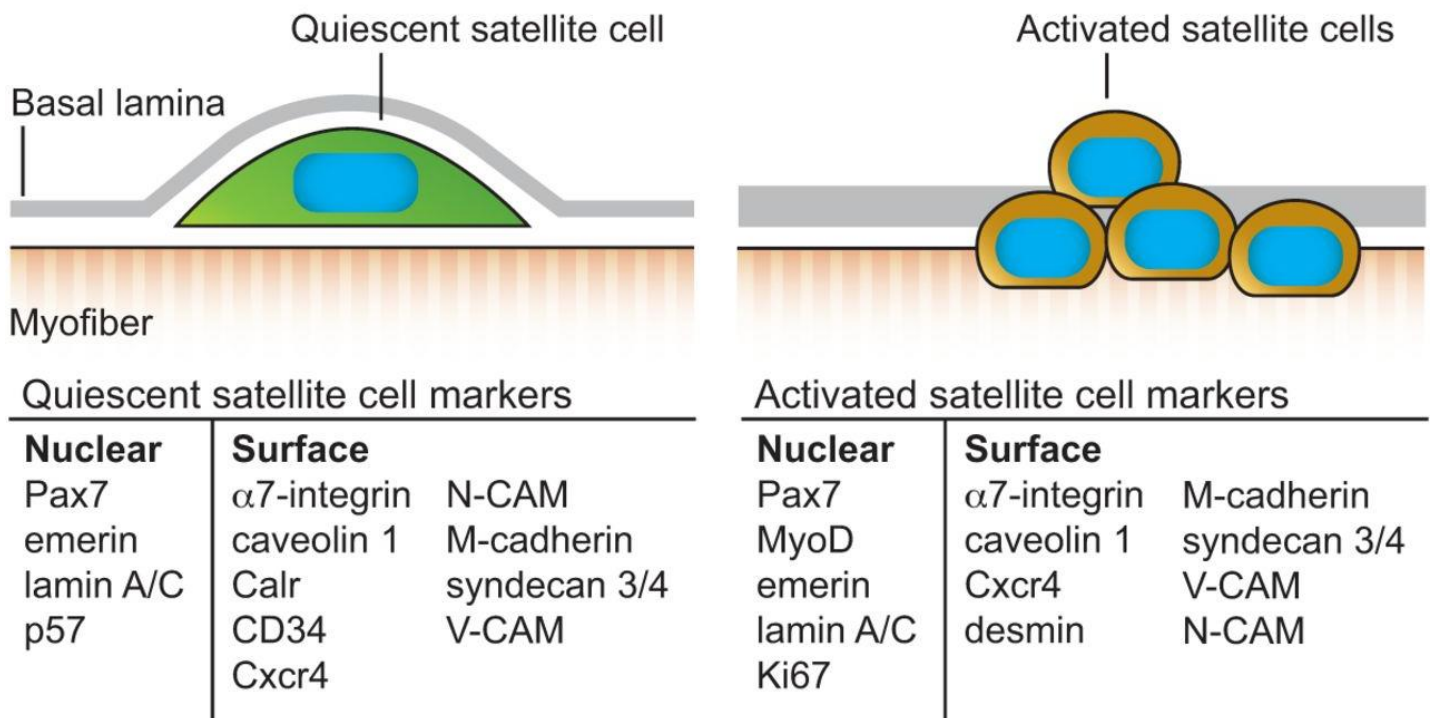


Figure 19 : Les différents marqueurs des cellules satellites

A l'état quiescent, les cellules satellites, localisées entre la lame basale et la membrane sarcoplasmique, expriment un certain nombre de marqueurs nucléaires (ex : Pax7) et cytoplasmiques (ex : CD34) spécifiques. Une fois que ces cellules satellites Pax7+ sont activées, expriment MyoD et un certain nombre d'autres marqueurs, elles prolifèrent et quittent leur niche jusqu'au site lésé ou retournent à l'état quiescent (Dumont, Wang et al. 2015).

III.1.1 Origine des cellules satellites

Lors de l'apparition du dermomyotome au niveau de la partie dorsale des somites, des cellules exprimant *Pax3* et *Pax7* vont être à l'origine des progéniteurs musculaires (Schienda, Engleka et al. 2006; Bentzinger, Wang et al. 2012). Ces cellules Pax+, qui **n'expriment aucun MRF**, sont des **cellules prolifératives** retrouvées aussi au niveau des muscles embryonnaires et fœtaux du tronc et des muscles tout au long du développement (Relaix, Rocancourt et al. 2005). Ce sont ces cellules qui sont à l'origine des progéniteurs musculaires et qui vont adopter une position satellitaire à la fin du développement fœtal chez la souris (E16.5-18.5) (Kassar-Duchossoy, Giacone et al. 2005; Lepper and Fan 2010). A la naissance et tout au long de la vie postnatale d'un organisme, toutes les cellules satellites musculaires expriment *Pax7* (Seale, Sabourin et al. 2000) et parfois co-expriment *Pax3* et *Pax7* dans certains muscles (Relaix, Montarras et al. 2006; Kuang and Rudnicki 2008). Pourtant, seule l'expression de *Pax7* est absolument requise pour assurer le maintien des cellules satellites puisque le KO de *Pax7* chez la souris entraîne, à la naissance, leur disparition quasi-complète (Seale, Sabourin et al. 2000; Kuang, Charge et al. 2006). Le peu de cellules satellites disponible serait pourtant suffisant pour assurer une croissance musculaire quasi-normale (Oustanina, Hause et al. 2004).

III.1.2 Hétérogénéité des cellules satellites

Les cellules satellites sont **hétérogènes** puisqu'elles divergent dans leur origine embryonnaire, leurs propriétés biochimiques et fonctionnelles (Biressi and Rando 2010). Du fait de leurs origines embryonnaires divergentes (muscles de la tête *versus* des membres) et/ou du contexte cellulaire (état quiescent ou activé), les cellules satellites vont exprimer différents marqueurs spécifiques à leur surface (CD34, M-cadhérine, N-CAM...) ou différents gènes spécifiques (*Pax3*, *Pax7*, *Myf5*, *Myod*, *Pitx1*, *Pitx2*....) (**Figure 19**). De plus, il a été montré que toutes les cellules satellites exprimaient *Pax7* mais que 10% d'entre elles n'exprimaient pas *Myf5*, ce qui est une autre source d'hétérogénéité. Deux populations de cellules satellites peuvent être alors distinguées : des **cellules satellites dites souches (PAX7+/Myf5-)** prédisposées à l'auto-renouveau et des **cellules satellites dites myogéniques (PAX7+/Myf5+)**, prédisposées à un engagement dans la différenciation

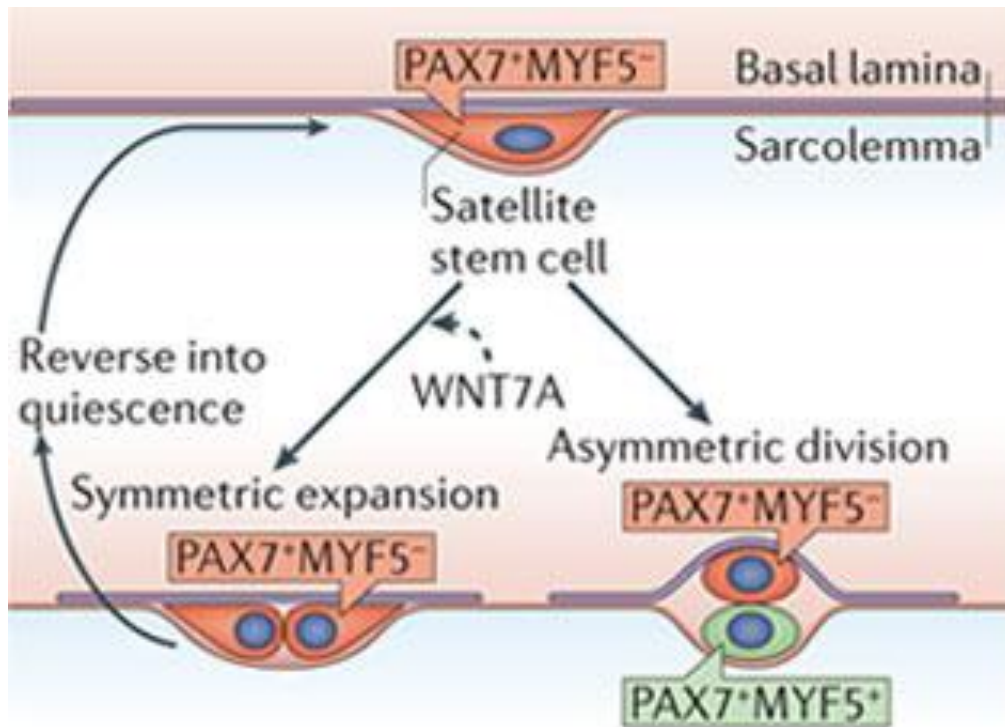


Figure 20 : Divisions symétrique et asymétrique des cellules satellites activées.

Lors de leur activation, les cellules satellites peuvent se diviser de deux manières différentes. A l'état quiescent, les cellules satellites expriment Pax7 mais pas Myf5 (Pax7⁺/Myf5⁻). Ces cellules peuvent se diviser de manière symétrique pour donner naissance à deux cellules filles identiques, qui vont assurer le maintien du pool de cellules satellites par leur retour à l'état quiescent. Elles peuvent également subir une division asymétrique, dont une cellule deviendra quiescente et l'autre sera déterminée en progéniteur myoblastique par l'expression de Myf5 (Wang and Rudnicki 2012).

(Rudnicki, Le Grand et al. 2008) (**Figure 20**). Les cellules PAX7+/Myf5- peuvent, après expression de Myf5 (PAX7+/Myf5+), subir des divisions asymétriques pour générer à nouveau ces deux types de populations satellitaires (Kuang, Kuroda et al. 2007) (**Figure 20**). La capacité des cellules satellites à assurer leur auto-renouvellement ou à s'engager dans la différenciation leur activation est donc essentielle au maintien de la masse musculaire.

Enfin, les cellules satellites sont hétérogènes dans leurs propriétés fonctionnelles régénératrices et donc dans leur capacité à former une certaine quantité de muscle squelettique. En effet, la transplantation de fibres isolées dans des muscles lésés de souris montre des capacités régénératrices différentes en fonction du type de fibre transplanté (Collins, Olsen et al. 2005).

En résumé, l'hétérogénéité des cellules satellites a des conséquences biologiques puisque leur engagement dans tel ou tel autre destin cellulaire (quiescence, prolifération ou différenciation) est étroitement corrélé à l'expression d'un ensemble de gènes spécifiques à un instant t, dans un contexte cellulaire (repos ou activation) et physiologique (néonatal ou adulte) donné.

III.1.3 Maintien ou retour à l'état quiescent des cellules satellites

Les cellules satellites, découvertes en 1961 (Mauro 1961), sont des cellules présentant, dans les conditions physiologiques normales toutes les caractéristiques de cellules au repos (**état quiescent G0**) avec un cytoplasme extrêmement réduit et une hétérochromatine riche (rapport nucléo-cytoplasmique élevé). Elles se distinguent des noyaux post-mitotiques, non seulement par leur localisation sous la lame basale mais aussi par leur extraordinaire capacité à proliférer puis se différencier ou revenir à l'état quiescent. La majorité des cellules satellites à l'état quiescent expriment différents marqueurs tels que CD34, Myf5, M-Cadhérine mais aussi de manière ubiquitaire le facteur de transcription Pax7 (Mouly and Beauchamp 2003) (**Figure 19**).

Dans les muscles squelettiques adultes, les cellules satellites sont à l'état quiescent dans les conditions physiologiques normales (Schultz, Gibson et al. 1978). Le maintien de cet état

de repos est nécessaire à la pérennisation du pool de cellules satellites (Bjornson, Cheung et al. 2012; Mourikis, Gopalakrishnan et al. 2012), même si ce pool diminue considérablement avec l'âge (Gibson and Schultz 1983; Brack, Bildsoe et al. 2005).

III.1.4 Activation des cellules satellites

Lors de la croissance musculaire périnatale ou lors des processus de régénération musculaire consécutifs à une lésion des fibres musculaires, les cellules satellites peuvent sortir de leur état quiescent et entrer soit en prolifération puis en différenciation pour augmenter ou maintenir la masse musculaire soit retourner à l'état quiescent pour assurer leur auto-renouvellement (Charge and Rudnicki 2004; Collins, Olsen et al. 2005). Une fois activées, elles peuvent migrer à distance pour rejoindre et réparer les myofibres lésés.

Les cellules satellites se distinguent des cellules quiescentes par un rapport nucléocytoplasmique plus faible, lié à un enrichissement en organites intracellulaires et une diminution de la quantité d'hétérochromatine offrant plus d'accessibilité aux facteurs de transcription. Leur activation, caractérisée par l'expression de MyoD et/ou Myf5 et la perte du CD34 (Mouly and Beauchamp 2003), conduit à la formation de myoblastes, qui vont proliférer (cellules Pax7+/MyoD+) puis se différencier (Pax7-/MyoD+) pour fusionner avec des fibres pré-existantes et réparer les fibres lésées. C'est PAX7, qui régule les niveaux d'expression de MyoD et Myf5 dans les cellules satellites (Rudnicki, Le Grand et al. 2008), qui sont les MRFs impliqués dans la détermination myogénique. En effet, soit les cellules satellites activées s'engagent dans la différenciation en exprimant les MRFs précoces tels que MyoD et Myf5 et en diminuant l'expression de *Pax7* soit elles reviennent à l'état quiescent en maintenant une expression forte de *Pax7*, inhibant ainsi l'expression de *Myod* et par conséquent de la myogénine (Olguin and Olwin 2004). Cette inhibition de la myogénine par PAX7 est réciproque puisque la myogénine peut aussi affecter directement l'expression de *Pax7* (Olguin, Yang et al. 2007).

III.2 Hypertrophie des fibres musculaires en croissance

III.2.1 Rôle des cellules satellites

Les cellules musculaires présentent en périphérie, sous le sarcolemme, plusieurs centaines de noyaux dits post-mitotiques, du fait de leur incapacité à se diviser. Au début de la croissance musculaire postnatale, ce nombre de noyaux totaux par fibre augmente de manière significative et il a été montré par des expériences de marquage à la thymidine tritiée que les cellules responsables de l'apparition de ces nouveaux noyaux étaient les cellules satellites (Moss and Leblond 1971), localisées entre le sarcolemme et la lame basale (Mauro 1961).

A la naissance, on retrouve jusqu'à 30% de cellules satellites dans les muscles des rongeurs (rat, souris) (Pallafacchina, Blaauw et al. 2013). Après une vague de prolifération intense au cours des trois semaines postnatales, **une partie de la descendance des cellules satellites est incorporée dans les myofibres** en croissance fournissant les noyaux post-mitotiques et **l'autre partie reste entre le sarcolemme et la lame basale, fixant ainsi le nombre définitif de cellules satellites retrouvées quiescentes chez l'adulte**. Dans les muscles squelettiques adultes, les cellules satellites PAX7+ ne représentent que 3 à 6% du nombre de noyaux retrouvés en périphérie des fibres musculaires et ce pourcentage diminue de manière significative au cours du vieillissement de l'organisme (Gibson and Schultz 1983; Brack, Bildsoe et al. 2005).

Au début de la vie postnatale, **les cellules satellites des muscles en croissance sont activées et prolifèrent intensément. La plupart d'entre elles se différencient et fusionnent avec des fibres musculaires pré-existantes pour accroître leur volume et entraîner ainsi leur hypertrophie** et leur contenu en nombre de noyaux (**accrétion myonucléaire**) (White, Bierinx et al. 2010; Ropka-Molik, Eckert et al. 2011). **D'autres cellules retournent à l'état quiescent et assurent le renouvellement du pool de cellules satellites** (Zammit, Relaix et al. 2006).

Il est très difficile de démontrer *in vivo* que l'hypertrophie musculaire responsable de la croissance musculaire en début de période postnatale est essentiellement due à l'activation des cellules satellites et à leur fusion avec les fibres musculaires existantes plutôt qu'à un

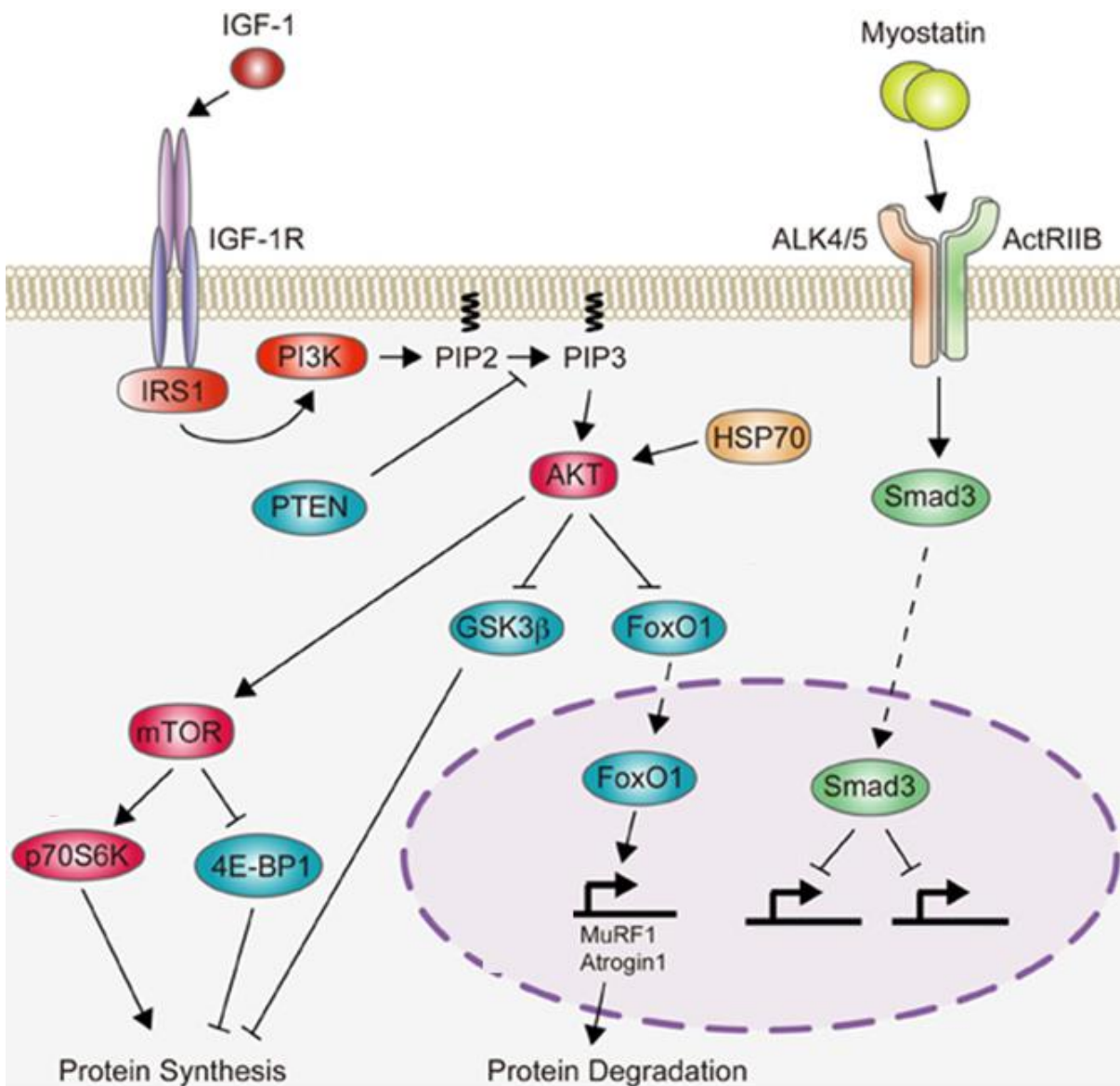


Figure 21 : Voies IGF-1/Akt/mTOR et Myostatine impliquées dans la croissance musculaire post-natale.

Le facteur de croissance IGF-1 active la voie AKT/mTOR et la synthèse des protéines en inhibant FoxO1 qui est responsable de la dégradation des protéines qui est une des protéines cibles de la voie myostatine. AKT peut aussi activer mTOR qui à son tour induit la synthèse des protéines en activant p70S6K et inhibant 4E-BP1. Finalement, AKT inhibe la GSK3 β , inhibiteur de la synthèse protéique. Par contre, la voie de la Myostatine joue un rôle dans le développement musculaire en empêchant la différenciation des cellules satellites et la prolifération des cellules musculaires. Sa voie canonique en activant Smad3 permet l'inhibition des gènes responsable de la synthèse protéique (adaptée de (Hitachi and Tsuchida 2013)).

anabolisme protéique accru. En effet, des expériences de rayonnement ont montré que l'activation des cellules satellites et l'hypertrophie musculaire étaient bloquées par des rayons X ou gamma, ce qui suggère un rôle essentiel et incontournable de cellules satellites dans l'hypertrophie musculaire (Rosenblatt, Yong et al. 1994; Li, Akimoto et al. 2006). Cependant, l'interprétation de cette expérience est compliquée en raison des effets possibles de ces rayonnements sur la synthèse protéique des myofibres irradiés (Adams, Caiozzo et al. 2002).

III.2.2 Rôle de la synthèse protéique

Chez les mammifères, **la croissance embryonnaire et périnatale des muscles squelettiques** par hypertrophie des myofibres **dépend essentiellement de l'accrétion myonucléaire**, conséquence de l'activation et de la fusion des cellules satellites avec les fibres musculaires existantes. **Dans les phases plus tardives** du développement musculaire postnatal, **l'hypertrophie musculaire ne dépend plus** de l'activation des cellules satellites (McCarthy and Esser 2007; Rehfeldt 2007) mais **essentiellement du taux de synthèse protéique** augmenté, au détriment de la dégradation protéique (Sandri 2008; Pallafacchina, Blaauw et al. 2013). Cependant, les cellules satellites seraient activées et responsables de l'ajout de nouveaux noyaux dans les fibres musculaires dans le cas d'**hypertrophie compensatrice** (un mécanisme qui intervient lorsque l'un des deux organes formant une paire ne peut plus remplir sa fonction : ainsi, l'autre se surdéveloppe pour compenser) (Moss and Leblond 1971; Schiaffino, Bormioli et al. 1976).

Deux voies de signalisation majeures contrôlent la synthèse protéique, la voie IGF1/Akt/mTOR et la voie de la myostatine, associée aux Smad2/3 (Schiaffino, Dyar et al. 2013) (**Figure 21**).

i- **La voie IGF1/AKT/mTOR régule positivement la synthèse protéique** en activant mTOR et inhibe la dégradation protéique en réprimant le facteur de transcription FoxO (Schiaffino and Mammucari 2011). Ainsi l'induction temporaire de l'expression du gène codant la protéine AKT conduit à une hypertrophie des fibres musculaires (Blaauw, Canato et al. 2009). De la même manière, la surexpression muscle-spécifique d'IGF1 dans des souris transgéniques entraîne une augmentation significative de la masse et de la force musculaire (Musaro, McCullagh et al. 2001). L'ajout de nouveaux noyaux dans ces muscles

ii- hypertrophiés serait due à l'activation de cellules satellites (Barton-Davis, Shoturma et al. 1999).

iii- La myostatine ou GDF8 (Kirk, Oldham et al. 2000), membre de la famille TGF- β , est **un régulateur négatif de la croissance musculaire** puisque son blocage ou son absence provoque une hypertrophie musculaire (Pallafacchina, Blaauw et al. 2013). Les fibres musculaires hypertrophiques des souris KO pour la myostatine contiennent quasiment autant de noyaux que dans les contrôles, ce qui atténue l'importance des cellules satellites dans cette hypertrophie (Amthor, Otto et al. 2009). Contrairement à ce qui est observé chez es souris surexprimant IGF1, les muscles hypertrophiques des souris KO pour la myostatine sont moins performants, notamment par la perte de la force musculaire spécifique (Qaisar, Renaud et al. 2012).

Ceci a été corrélé à l'absence d'ajout de nouveaux noyaux par les cellules satellites dans les muscles de souris KO pour la myostatine, ce qui entraîne une diminution du domaine myonucléaire, à savoir le volume de cytoplasme défini dans lequel chaque noyau peut contrôler la transcription des gènes.

Une partie des recherches actuelles portant sur différentes pathologies, qui entraînent une fonte musculaire telles que certaines maladies neuromusculaires, visent à mieux comprendre les mécanismes qui régulent la croissance et le maintien de la masse musculaire. Le but recherché est de pallier à cette fonte musculaire en agissant sur ces deux voies de signalisation IGF1 et myostatine, en favorisant la croissance musculaire soit par un blocage de la myostatine soit en mimant les effets de l'IGF1 ou d'autres facteurs de croissance (Pallafacchina, Blaauw et al. 2013).

III.3 Régénération des fibres musculaires

En plus de leur rôle dans la croissance musculaire postnatale, **les cellules satellites jouent un rôle central dans la réparation des fibres lésées** (Mayeuf and Relaix 2011). Des expériences de transplantations de fibres isolées dans des muscles de souris montrent bien que les quelques cellules satellites présentes au sein des fibres transplantées sont capables à elles seules de régénérer les muscles endommagés (Collins, Olsen et al. 2005). Ces expériences ont démontré que les cellules satellites étaient capables non seulement de

réparer les fibres endommagées mais aussi de s'auto-renouveler intensément pour repeupler les muscles transplantés. (Collins, Olsen et al. 2005; Collins 2006). En effet, une étude a démontré que des muscles squelettiques appauvris en cellules satellites ne pouvaient se réparer eux-mêmes suite à une blessure (McCarthy, Mula et al. 2011). Ces extraordinaires capacités d'auto-renouveaulement sont mises à profit dans différentes thérapies ciblant le muscle (Grefte, Kuijpers-Jagtman et al. 2007; Ciciliot and Schiaffino 2010).

Chapitre II. La myogenèse sous le contrôle de plusieurs voies de signalisation

Le développement du muscle squelettique chez les mammifères est un processus complexe, dont le déroulement est finement contrôlé par plusieurs voies de signalisation (Notch, Wnt, PI3K/Akt, MAPK, Myostatine, Smad...) qui vont agir en synergie ou de manière antagoniste. La voie de signalisation Notch joue un rôle clé dans le développement embryonnaire et post-natal du muscle squelettique. Tout comme la voie de signalisation des Smad induite par le TGF- β et la voie de la myostatine (Lin, Arnold et al. 2002), la voie Notch inhibe la différenciation musculaire (Buas and Kadesch 2010) alors qu'au contraire, les voies Wnt (Brack, Conboy et al. 2008) et p38-MAP Kinase (MAP-K) (Kondoh, Sunadome et al. 2007) la favorisent. Quant à la voie PI3K/Akt, elle joue un rôle prépondérant dans la croissance musculaire post-natale, en provoquant une hypertrophie des fibres musculaires par augmentation de la synthèse protéique (Cabane, Coldefy et al. 2004).

I. La voie de signalisation Notch

La voie de signalisation Notch est un mécanisme dépendant d'interactions cellulaires, qui joue un rôle essentiel dans le développement des métazoaires et les processus de maturation cellulaire. Ce mécanisme très conservé influe sur le destin cellulaire, en régulant non seulement le potentiel de différenciation mais aussi le taux de prolifération et la mort programmée des cellules par apoptose (Artavanis-Tsakonas, Rand et al. 1999; Miele and Osborne 1999).

Une des premières mutations décrites pour le gène *Notch* a produit un phénotype "d'entailles ou encoches" (traduction de "Notch") à l'extrémité des ailes chez la drosophile femelle hétérozygote alors qu'elle provoque la létalité dès le stade embryonnaire chez la femelle homozygote et le mâle hémizyote (Mohr 1919). Ce n'est qu'en 1985 que le clonage et le séquençage du gène *Notch* de drosophile révèle une protéine supposée membranaire de 2703 résidus d'acides aminés, qui comporte 36 répétitions de type EGF-like d'environ 40 acides aminés chacune (Wharton, Johansen et al. 1985). Dès lors, on soupçonne fortement

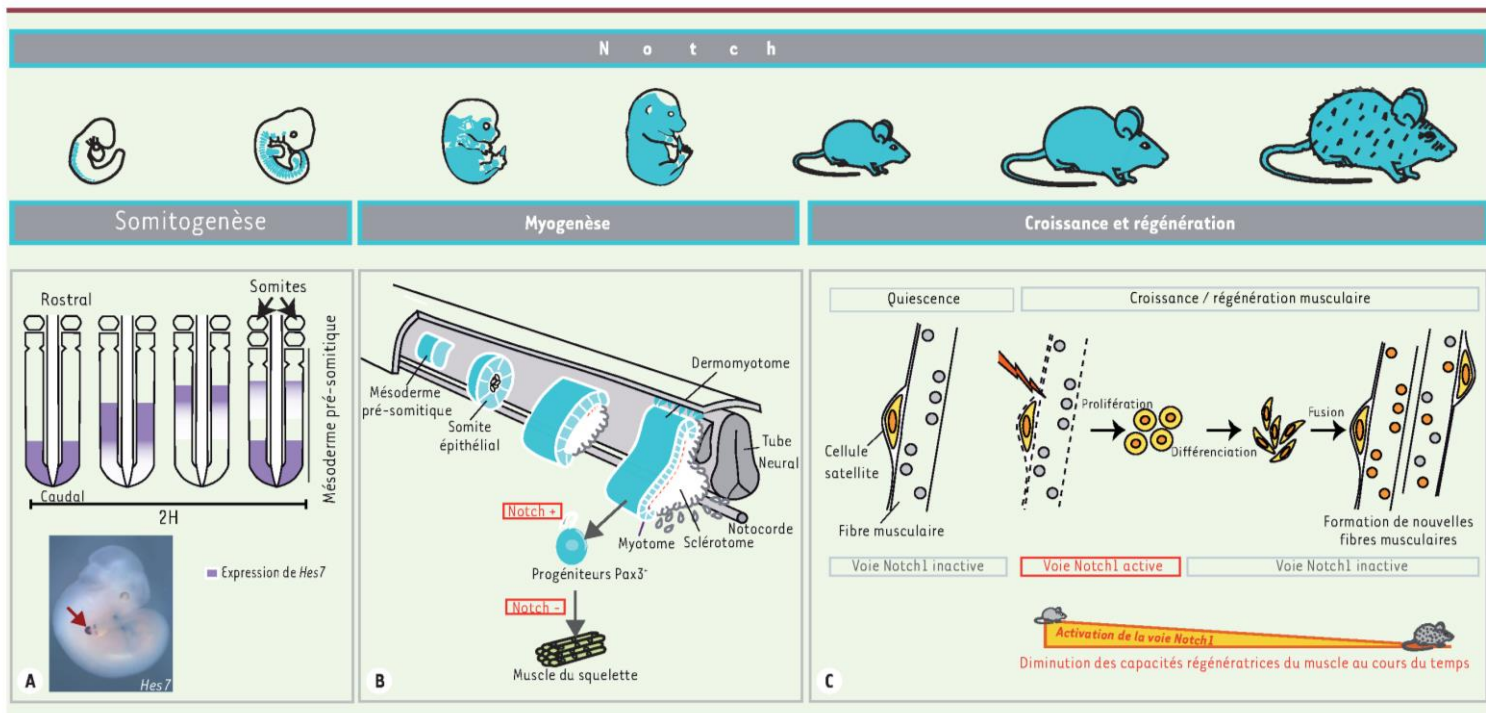


Figure 22 : Rôle de la voie Notch dans la somitogenèse, la myogenèse embryonnaire, la croissance et la régénération musculaire post-natale.

(A) Les somites se forment à partir du mésoderme présomitique (PSM) du bourgeon caudal dans le sens antéro-postérieur. Leur nombre et leur taille dépendent notamment de l'expression d'un certain nombre de gènes cycliques tels que *Hes7* (en violet). L'oscillation dans l'expression de ces gènes définit le rythme de formation des somites (une paire de somites toutes les 2H chez la souris). L'expression du gène *Hes7* est mise en évidence par hybridation *in situ* (flèche rouge) au niveau du PSM d'un embryon de 10,5 jours. **(B)** Evolution des somites au cours du développement embryonnaire. La désorganisation de la partie ventrale des somites épithéliaux aboutit à la formation du sclérotome, structure précurseur des os et du cartilage tandis que la partie dorsale reste épithéliale et forme le dermomyotome, à partir duquel naît le myotome (1er muscle embryonnaire). Des progéniteurs Pax3⁺ se détachent du dermomyotome hypaxial et migrent vers les bourgeons des membres pour y former les muscles squelettiques. **(C)** Les cellules, localisées à la périphérie des fibres entre la lame basale et le sarcolemme, sont majoritairement quiescentes chez l'adulte avec une voie Notch inactive. Lors du début de la croissance musculaire postnatale et de processus régénératifs suite à des blessures, les cellules satellites sont activées suite à l'expression de *Delta1* à la surface des cellules musculaires et l'activation de Notch1. Leur sortie de l'état quiescent se fait au profit d'une prolifération intense, processus à l'issue duquel certaines cellules retournent à l'état quiescent pour pérenniser le réservoir de cellules satellites et d'autres se différencient pour fusionner avec des fibres musculaires déjà présentes ou former de nouvelles myofibres. Au cours du vieillissement, l'activation de la voie Notch1 est moindre et les capacités régénératrices du muscle s'amenuisent (Mayeuf and Relaix 2011).

la protéine NOTCH de jouer un rôle dans les interactions cellulaires nécessaires à la spécialisation de certains tissus, comme le système nerveux au cours du développement (Artavanis-Tsakonas 1988). Chez la drosophile, il n'y a qu'un seul récepteur NOTCH, qui peut interagir avec deux ligands nommés Delta et Serrate (Rebay, Fleming et al. 1991). Les études menées chez la drosophile (Struhl and Adachi 1998) et le nématode *Caenorhabditis elegans* (Greenwald 1998) aboutissent à la découverte progressive du mode de fonctionnement de la voie de signalisation Notch. En réponse à la liaison du ligand, le récepteur NOTCH est clivé et sa partie intracellulaire libérée, appelée alors **NICD**, est transloquée au noyau pour jouer le rôle de facteur de transcription et activer l'expression de gènes cibles (Struhl and Adachi 1998). Chez les vertébrés dont l'homme et la souris sont les modèles les plus étudiés, des événements de duplications au cours de l'évolution ont abouti à l'apparition de quatre récepteurs NOTCH (NOTCH1-4) et de cinq ligands (Delta-like 1, 3, 4 et Jagged 1, 2) (Kopan and Ilagan 2009).

Plusieurs études ont montré **l'implication de la voie Notch dans la somitogenèse, le développement des muscles squelettiques** au stade embryonnaire mais aussi dans **la croissance et la régénération musculaire post-natale** (Mayeuf and Relaix 2011) (**Figure 22**). Lors de la myogenèse postnatale ou après lésion musculaire, les cellules satellites Pax3/7 positives expriment *Notch1* et *Delta1* activant ainsi la voie de signalisation Notch et provoquant la sortie de leur état quiescent afin de proliférer. C'est l'inhibition de la voie Notch, qui induit alors la différenciation en myotubes, qui fusionnent pour former des fibres musculaires. En parallèle, un réservoir de cellules satellites est constitué pour assurer plus tard un nouveau processus d'activation lié à la croissance ou à la régénération musculaire (Collins, Olsen et al. 2005; Buckingham and Montarras 2008). En effet, des expériences montrent que l'activation de la voie Notch induite par DELTA (voie canonique) conduit à la diminution de l'expression de *Myod* (Kopan, Nye et al. 1994), entraînant ainsi l'inhibition de la différenciation myogénique et le maintien des cellules progénitrices dans un état indifférencié (Hirsinger, Malapert et al. 2001). Bien que la répression de l'expression de *Myod* puisse être la conséquence de l'activation CBF1-dépendante du gène cible *Hes1* induite par la signalisation Delta (Kuroda, Tani et al. 1999), il semblerait que l'activation de la signalisation Notch par une voie CBF1-indépendante dite "non canonique" entraîne également une inhibition de la différenciation musculaire (Shawber, Nofziger et al. 1996).

Figure 23 : Les récepteurs NOTCH et leurs ligands canoniques.

Les mammifères possèdent 4 récepteurs NOTCH (NOTCH1 à 4) et 5 ligands membranaires dont 2 appartiennent à la famille Jagged (Jagged 1 et 2) et 3 à la famille Delta-like (DII1, 3 et 4). Les parties extracellulaires des récepteurs comportent une trentaine de répétitions EGF-like (36 répétitions pour NOTCH 1 et 2, 34 pour NOTCH 3 et 29 pour NOTCH 4) tandis que celles des ligands en comportent beaucoup moins (16 répétitions pour Jagged1 et 2, seulement 8 pour DII1 et 4 et enfin 6 répétitions pour DII3). Les récepteurs possèdent en plus une région de régulation négative NRR juxtamembranaire, comprenant notamment des répétitions LNR (Lin-12/Notch repeat). Tous les ligands canoniques possèdent un domaine DSL (Delta/Serrate/lag-2) N terminal, indispensable aux interactions avec les domaines extracellulaires des récepteurs Notch. Les ligands Jagged ont la particularité de posséder un domaine riche en cystéines (CRD) juxtamembranaire.

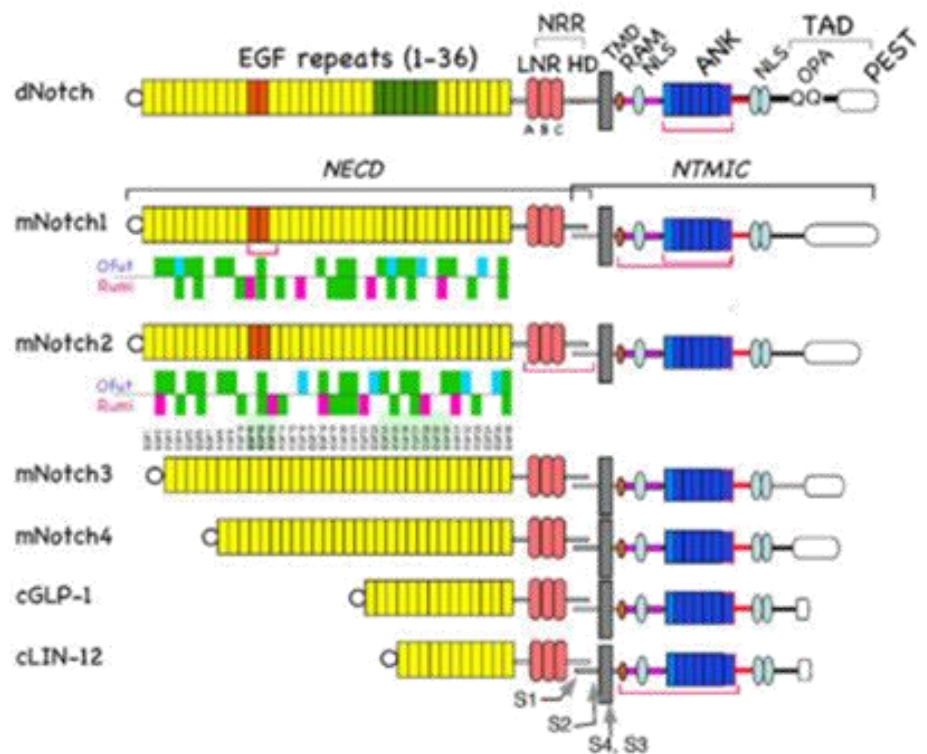
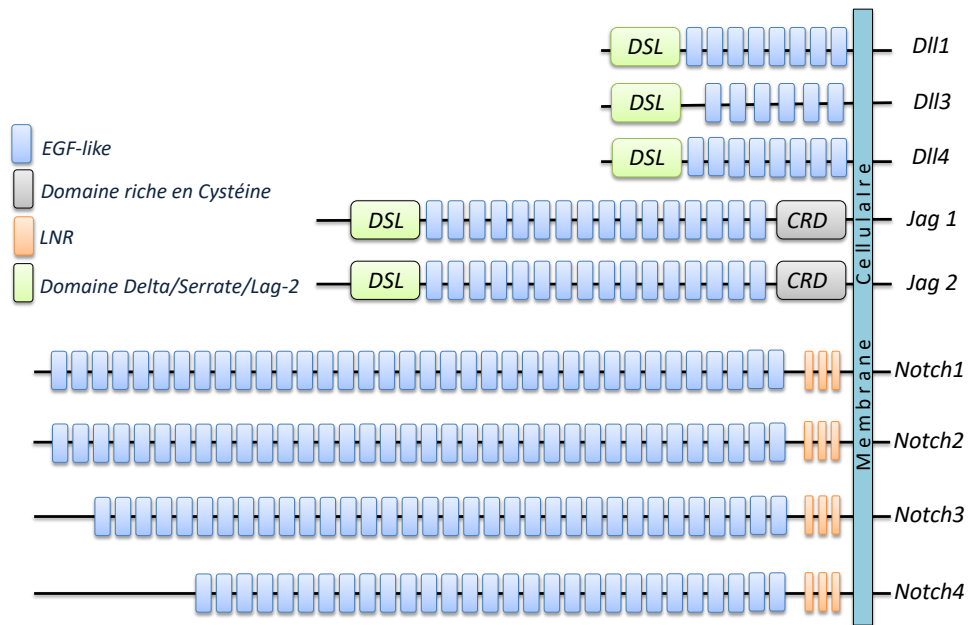


Figure 24 : Les récepteurs Notch.

Les récepteurs Notch diffèrent de façon notable par le nombre de répétitions EGF-like qu'ils contiennent au niveau de leur domaine extracellulaire (NECD). Comme pour la drosophile, les récepteurs Notch 1 et 2 possèdent 36 répétitions EGF-like, dont les répétitions 11 et 12 (en rouge) sont impliquées dans la modulation des interactions avec les ligands. La région Abruptex (en vert) correspondant aux répétitions 24-29 du récepteur Notch de drosophile est également impliquée dans la modulation des interactions et donc dans l'activation de la voie Notch. Il ne manque que quelques répétitions EGF-like aux récepteurs Notch 3 et 4 de mammifères. Par contre, chez *C.elegans*, les récepteurs GLP et LIN-12 ne comportent plus que 14 et 11 répétitions respectivement. Les sites potentiels de O-fucosylation (vert) et de O-glucosylation (rose) sont montrés. Les répétitions EGF-like sont suivies d'une région de régulation négative (NRR) comportant 3 répétitions LNR et un domaine d'hétérodimérisation (HD). Les parties intracellulaires sont peu différentes avec notamment une région constituée de 7 répétitions ankyrine et flanquée de séquences de localisation nucléaires (NLS) et des domaines de transactivation (TAD) (Kopan and Ilagan 2009).

Le rôle de la voie de signalisation Notch dans la myogenèse post-natale est donc **de maintenir le réservoir de cellules satellites en inhibant leur différenciation** et en favorisant leur auto-renouvellement, ce qui garantit ainsi l'homéostasie du tissu musculaire.

I.1 Structures des récepteurs et des ligands NOTCH

Chez la drosophile, il n'existe qu'un seul récepteur NOTCH et deux ligands (Delta et Serrate) alors que chez les mammifères, il existe 4 récepteurs NOTCH (NOTCH 1-4) et 5 ligands (Delta-like (Dll) 1, 3, 4 et Jagged 1, 2) (**Figure 23**). Si on ne considère que la voie canonique de Notch, les récepteurs et les ligands sont pour la majorité d'entre eux ancrés par un seul passage transmembranaire et comportent dans leur partie extracellulaire des répétitions de type EGF-like, favorisant leurs interactions (Kopan and Ilagan 2009). Ces domaines EGF-like sont retrouvés aussi dans la partie extracellulaire de plusieurs glycoprotéines membranaires comme les intégrines, dans certaines glycoprotéines sécrétées comme les laminines de la matrice extracellulaire (Wouters, Rigoutsos et al. 2005) et les facteurs de coagulation (facteurs VII, IX, XII...) (Harris, Ling et al. 1992). Ces domaines EGF-like sont donc majoritairement impliqués dans les interactions protéine-protéine.

I.1.1 Structures des récepteurs NOTCH

Les récepteurs NOTCH sont des **protéines membranaires multi-domaines de type I**, exprimés à la surface des cellules sous forme d'**hétérodimères**, suite au clivage protéolytique trans-golgien du site **S1** de la protéine "précurseur", catalysé par une convertase de type furine (Brou and Logeat 2006). Deux parties protéiques peuvent être alors distinguées : une partie extracellulaire fortement glycosylée (**NECD** pour Notch Extra Cellular Domain), associée de manière non covalente à une partie intracellulaire (**NICD** pour Notch Intra Cellular Domain).

La partie extracellulaire du récepteur NOTCH **NECD** est formée de 36 répétitions EGF-like chez la drosophile, de 29 à 36 répétitions chez les mammifères (NOTCH1, 2, 3, 4 en contiennent respectivement 36, 36, 34, 29) et beaucoup moins chez *C.elegans* (11 répétitions pour LIN-12 et 14 répétitions pour GLP-1) (**Figure 24**).

Figure 25 : Composition d'un domaine EGF-like.

Un domaine EGF-like comporte 30 à 40 résidus, dont 6 résidus cystéine conservés (en jaune) établissant 3 ponts disulfure. Plusieurs monosaccharides peuvent être ancrés par des liaisons O-glycosidiques sur des résidus sérine et/ou thréonine. Les sites de O-glycosylation, de O-fucosylation et de O-GlcNAcylation sont respectivement représentés en vert, bleu et en rose et parfois retrouvés au sein de séquences consensus conservées ($C^2X_4(S/T)C^3$ pour la O-fucosylation et $C^1X_4SXP^2$ pour la O-glycosylation). Des sites d'hydroxylation de résidus aspartate ou asparagine (en rouge) sont également retrouvés. Ce type de domaine est retrouvé au sein de nombreuses glycoprotéines sécrétées et dans la partie extracellulaire de protéines membranaires telles que les récepteurs Notch et leurs ligands.

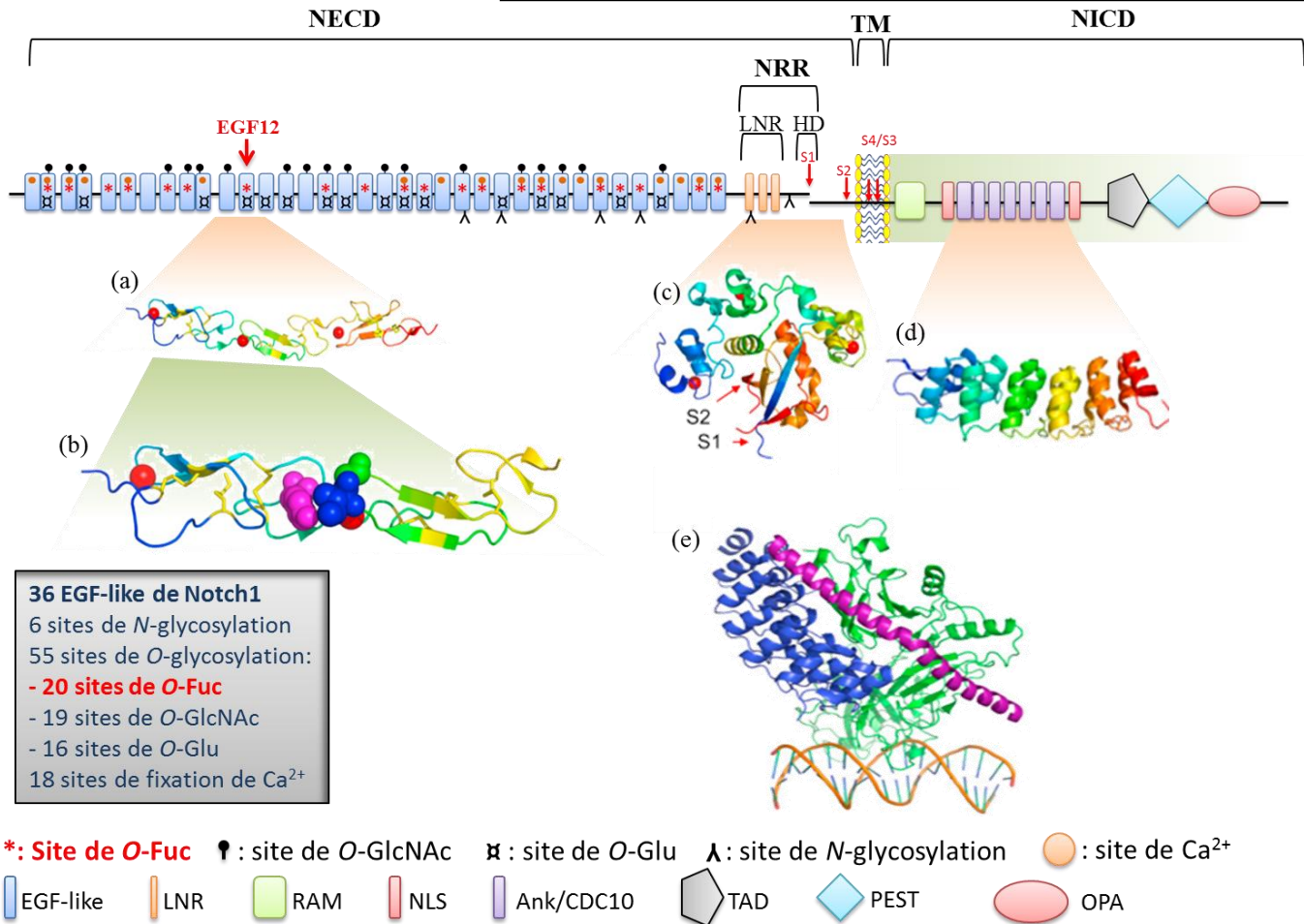
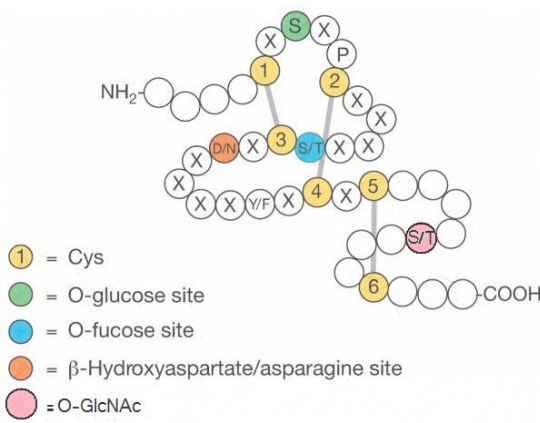


Figure 26 : Organisation structurale du récepteur Notch1 murin.

La partie extracellulaire de Notch1 (**NECD**) est formée de 36 répétitions EGF-like et d'une région de régulation négative (**NRR**) englobant 3 répétitions LNR (Lin-12/Notch repeats) ainsi qu'un domaine d'hétérodimérisation (**HD**) comportant le site de clivage protéolytique S1. Le NECD et le NICD, issus du clivage protéolytique du polypeptide Notch immature au niveau du site S1, sont associées de manière non covalente. Le NECD comporte des sites de N glycosylation, plusieurs types de sites de O-glycosylation (O-fucosylation, O-GlcNAcylation, O-glycosylation) et plusieurs sites de fixation du calcium (en orange). La partie intracellulaire (**NICD**) traverse la membrane plasmique et possède des sites de clivages protéolytiques juxta- (**S2**) et intramembranaires (**S3** et **S4**). Le NICD comporte un domaine RAM de liaison au complexe de transcription CSL, une région constituée de 7 répétitions ankyrines située entre deux séquences de localisation nucléaires (NLS) ainsi que d'autres domaines (TAD, PEST et OPA). Les structures 3D montrent que les répétitions EGF-like telles que les répétitions 11-13 (a) sont formées de plusieurs brins bêta reliés par des boucles et de résidus de nature hydrophobe (boules bleues et roses) (b). Elles peuvent être également associées au calcium (en rouge). La structure 3D de la région NRR montre l'enfouissement du site S2, qui n'est pas accessible à l'état de repos (c) et celle des répétitions ankyrine révèle plutôt des structures en hélices alpha (d). La structure 3D du complexe transcriptionnel trimérique composé du **CSL** (vert), du **NICD** (bleu) et de **Maml** (violet) est montrée et sa fixation sur le promoteur des gènes cibles symbolisée (e) (inspirée de (Sandri, Sandri et al. 2004; Chillakuri, Sheppard et al. 2012; Takeuchi and Haltiwanger 2014).

Chaque répétition EGF-like est un petit motif de 30 à 40 résidus d'acides aminés, stabilisés par trois ponts disulfure entre 6 cystéines conservés (entre C₁ et C₃, C₂ et C₄, C₅ et C₆) (**Figure 25**) et est organisée en deux feuillets bêta : un feuillet majeur N-terminal et un feuillet mineur C-terminal reliés entre eux par une boucle. Plusieurs protéines contiennent un seul type de domaine EGF-like comme NOTCH et ses ligands par exemple, qui contiennent seulement des domaines de type hEGF (avec principalement 8 résidus entre C5-C6) (Wouters, Rigoutsos et al. 2005). La structure tridimensionnelle (3D) du NECD n'est pas connue, et encore moins celle du récepteur NOTCH entier. La taille importante et l'abondance de structures glycaniques dans la région NECD sont des obstacles majeurs à sa cristallisation mais aussi à la résolution de sa structure par RMN. Par contre, la structure 3D de certaines régions du NECD a été résolue par diffraction aux rayons X ou RMN de protéines recombinantes exprimées chez *E. coli* la plupart du temps ou de protéines synthétisées par voie chimique (**Figure 26**). Il s'agit essentiellement de la 12^{ème} répétition EGF-like du récepteur NOTCH1 murin (Hiruma-Shimizu, Hosoguchi et al. 2010), essentielle aux interactions ligand-récepteur (Rebay, Fleming et al. 1991), qui dépendent de la présence d'un fucose O-lié porté par cette répétition (Rampal, Arboleda-Velasquez et al. 2005). Il s'agit également de la région comprenant les répétitions EGF-like 11-13 du récepteur NOTCH1 humain, exprimées chez *E. coli* en tant que protéines recombinantes sauvages (Hambleton, Valeyev et al. 2004; Cordle, Johnson et al. 2008) ou mutées (Taylor, Takeuchi et al. 2014) sur le site de O-fucosylation de la 12^{ème} répétition. Il ressort de ces études que les répétitions EGF-like adoptent une certaine conformation en forme de bâtonnet, rigidifiée par la fixation de calcium et que l'allongement, par un GlcNAc, du fucose O-lié localisé sur la thréonine T466 de la répétition EGF12 n'affecte pas la conformation des protéines EGF11-13. Le NECD comporte aussi une région de régulation négative (**NRR**), comprenant 3 répétitions **LNR** (Lin-12/Notch repeats) et un domaine d'hétérodimérisation juxtamembranaire (**HD**) riche en résidus cystéine. Cette région NRR est impliquée dans le maintien du récepteur dans sa conformation de repos (Greenwald 1994), l'empêchant ainsi d'être clivé et activé en absence de liaison avec un ligand (Sanchez-Irizarry, Carpenter et al. 2004). En effet, le site de clivage protéolytique S2 est localisé dans cette région NRR et donc en l'absence de liaison avec le ligand, il n'est pas accessible au clivage protéolytique du NECD par les ADAM métalloprotéases (Kovall and Blacklow 2010).

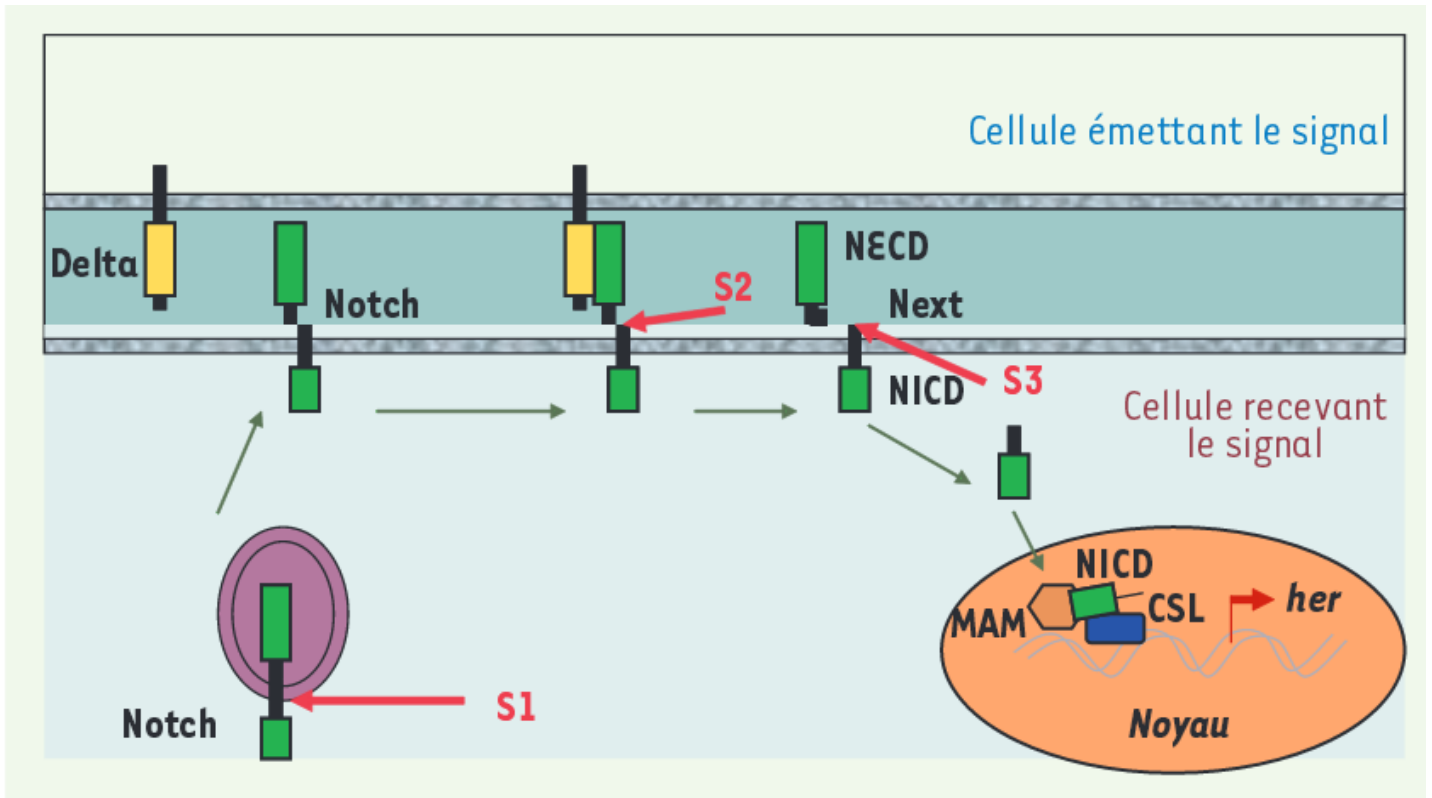


Figure 27 : Activation de la voie Notch chez la drosophile.

Dans la cellule réceptrice, le récepteur Notch est exprimé à la surface sous forme hétérodimérique, suite au clivage protéolytique du site S1 de la chaîne polypeptidique précurseur catalysé par une enzyme de type furine. Quand une cellule émettrice exprimant le ligand Delta s'approche de la cellule réceptrice, il y a interaction entre les domaines extracellulaires du récepteur et du ligand qui provoque l'exposition du site S2 à un deuxième clivage par une métalloprotéase de type TACE. Le domaine extracellulaire du récepteur Notch (NECD) se détache du reste du récepteur appelé Next. Next est le substrat du complexe de la γ -sécrétase, qui libère le fragment intracellulaire du récepteur (NICD), après clivage du site S3. Le NICD migre dans le noyau où il forme un complexe activateur de la transcription avec CSL et MAM (Chitnis 2006; Joulia-Ekaza and Cabello 2007).

La structure 3D de la région NRR a été résolue par diffraction aux rayons X ou par RMN pour les récepteurs NOTCH1 (Vardar, North et al. 2003; Gordon, Vardar-Ulu et al. 2009; Wu, Cain-Hom et al. 2010), NOTCH2 (Gordon, Vardar-Ulu et al. 2007) et NOTCH 3 (Xu, Choi et al. 2015) humains. L'étude de ces structures montre que le clivage S1 par la furine n'entraîne que très peu de changement structural au niveau de la région NRR des récepteurs NOTCH1 et 2. Ces structures 3D du NECD sont très informatives mais ne peuvent pas rendre compte de la stricte réalité puisque le NECD est, comme pour toutes les parties extracellulaires de récepteurs, fortement glycosylée. En effet, elle contient des chaînes *N*-glycanniques mais aussi *O*-glycanniques de différents types (*O*-fucosylation, *O*-glucosylation....), qui confèrent aux récepteurs NOTCH une certaine flexibilité et une grande hétérogénéité structurale, freins à leur cristallisation. Pour faciliter cette cristallisation, la plupart des structures résolues pour le NECD sont réalisées à partir de protéines recombinantes exprimées en grande quantité dans la bactérie et qui, du fait de l'absence de glycosylations, offre une grande homogénéité structurale.

La partie intracellulaire **NICD**, une fois détachée de la membrane, est transloquée au noyau et interagit avec d'autres facteurs de transcription pour activer les gènes cibles. Le détachement du NICD de la membrane nécessite deux clivages protéolytiques successifs (**Figures 26 et 27**). Un premier clivage est réalisé par une métalloprotéase de la famille **ADAM** (ADAM17/TACE, ADAM10) (Brou, Logeat et al. 2000; Hartmann, de Strooper et al. 2002) au niveau du site **S2** de la région NRR, qui est exposé à la suite d'un changement conformationnel du récepteur induit par la liaison d'un ligand (Gordon, Vardar-Ulu et al. 2007). Le clivage S2 libère ainsi de la membrane le NECD, qui reste associé au ligand. Le récepteur NOTCH ainsi dépourvu de sa partie extracellulaire, appelé **NEXT**, va subir deux clivages protéolytiques catalysés par une préséniline possédant une activité gamma-sécrétase : le clivage du site intramembranaire **S3**, qui va entraîner la libération du NICD de la membrane (Struhl and Greenwald 1999; Mumm, Schroeter et al. 2000) et le clivage du site **S4**, situé juste en amont de S3 dans la région membranaire, qui va conduire à la libération dans l'espace extracellulaire d'un peptide d'une vingtaine de résidus d'acides aminés appelé N β (Okochi, Steiner et al. 2002).

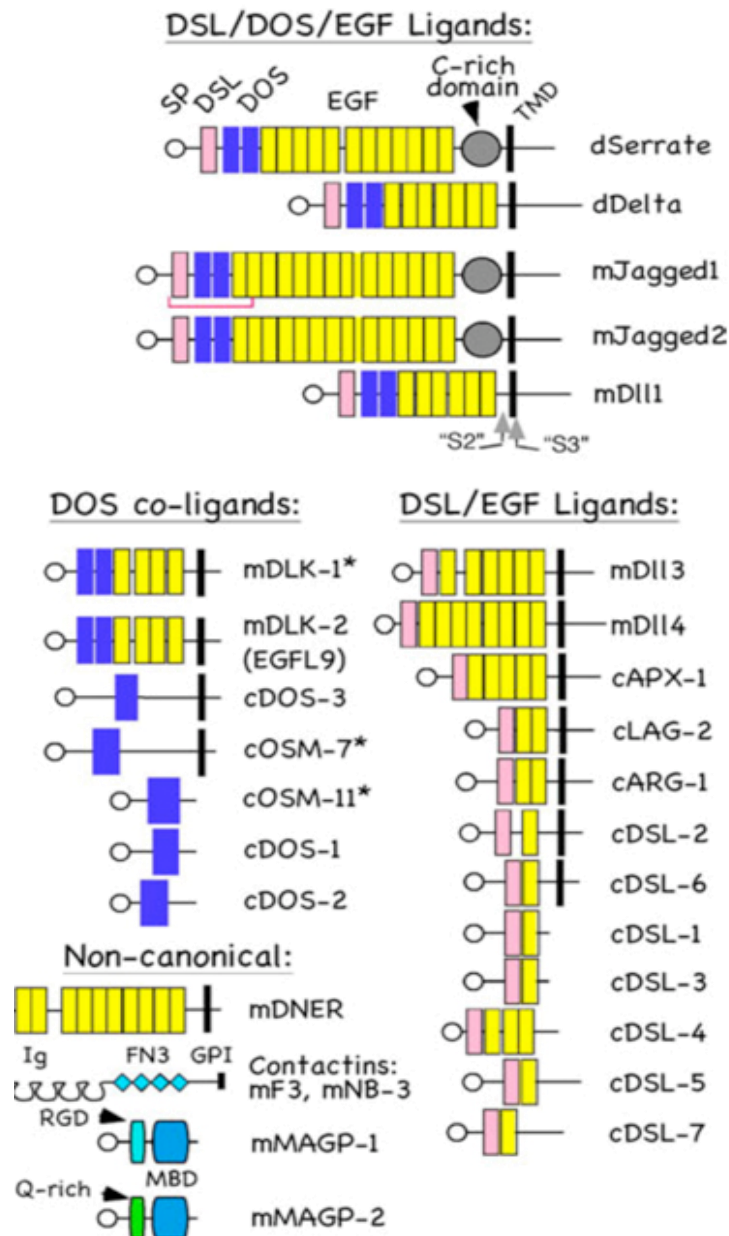


Figure 28 : Ligands canoniques et non canoniques des récepteurs Notch.

Parmi les ligands canoniques de Notch, des sous-groupes peuvent être distingués en fonction de la nature des répétitions qui les constituent. Les ligands les plus décrits dans la littérature et retrouvés chez la drosophile (dSerrate et dDelta) et les mammifères (mJagged1&2, mDII1) comprennent un domaine DSL, des domaines DOS (EGF spécialisés) et des répétitions EGF-like (famille DSL/DOS/EGF). Chez *C.elegans*, un grand nombre de ligands (membranaires ou non) ne comportent qu'un domaine DSL et une ou plusieurs répétitions EGF-like (pas de domaines DOS)(famille DSL/EGF). Les ligands de cette famille, à laquelle appartiennent également mDII3 et 4, peuvent agir seuls ou en combinaison avec des co-ligands DOS. Les ligands non canoniques ne comportent pas de domaines DSL et DOS mais peuvent contenir des répétitions EGF-like comme mDNER. Ils pourraient faciliter l'activation de Notch par des ligands DSL et/ou les co-ligands DOS (Kopan and Ilagan 2009).

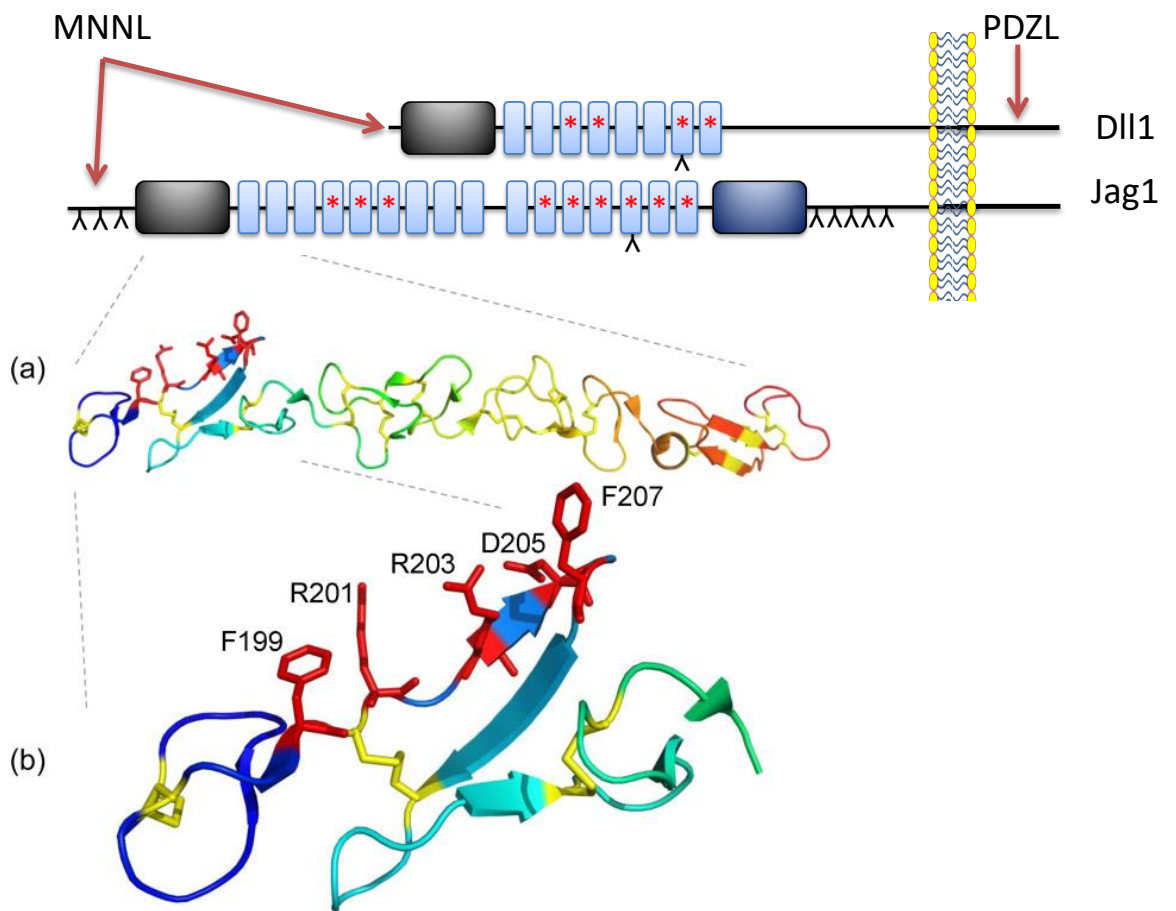
Le NICD est constitué de plusieurs domaines fonctionnels, dont un domaine juxtamembranaire appelé **RAM** (RBP-Jk-associated molecule), suivi d'une région de 7 répétitions ankyrine (**ANK**) (Lubman, Korolev et al. 2004) (PDB) flanquée de deux signaux de localisation nucléaire (**NLS**) et d'un domaine de transactivation (**TAD**). Ces domaines seraient impliqués dans l'interaction du NICD avec des facteurs de transcription, tels que ceux de la famille **CSL** (CBF-1(RBPj) chez les vertébrés/Su(H) chez la drosophile/Lag-1 chez *C. elegans*). En effet, le domaine RAM interagit fortement avec le domaine beta en forme trèfle du CSL (RBPj) (Lubman, Ilagan et al. 2007) alors que les répétitions Ankyrine du NICD sont impliquées dans l'interface entre le CSL et le co-activateur transcriptionnel Mastermind (Wilson and Kovall 2006). La formation du complexe ternaire NICD/CSL/Mastermind, dont on connaît la structure 3D, induit un changement conformationnel du CSL, qui pourrait expliquer la conversion du CSL de sa forme répresseur à la forme activateur.

Dans sa partie C-terminale, le NICD contient un domaine très conservé, riche en résidus proline, glutamate, sérine, thréonine d'où son acronyme **PEST** (Egan, St-Pierre et al. 1998), qui est responsable de la stabilisation de NICD et de sa dégradation (Sriuranpong, Borges et al. 2002). Enfin, on trouve un domaine **OPA** très riche en résidus glutamine, qui est capable d'amplifier l'activation transcriptionnelle des gènes cibles médiée par le NICD.

I.1.2 Structures des ligands de NOTCH

La plupart des ligands de NOTCH sont des protéines transmembranaires de type 1, avec une très courte partie cytoplasmique. En fonction de la composition modulaire de leurs parties extracellulaires, ils peuvent être classés en plusieurs familles (Kopan and Ilagan 2009) (**Figure 28**).

La famille classique des ligands DSL comprend les **ligands DSL/DOS/EGF**, qui contiennent, en partant de l'extrémité N-terminale, un motif DSL (Delta, Serrate, Lag-2), un domaine DOS (Delta and OSM-11 like proteins) (Komatsu, Chao et al. 2008) constitué de deux répétitions EGF-like spécialisées ainsi que des répétitions de type EGF-like. Ces domaines DSL et répétitions EGF-like assurent ensemble une bonne interaction avec les récepteurs NOTCH (Shimizu, Chiba et al. 1999). Les représentants de cette famille sont les ligands Delta et Serrate de drosophile, qui contiennent un domaine DOS suivi respectivement de 7 et 12



EGF-like de Dll1 et Jagged 1

-1:9 sites de N-glycosylation respectivement
-4:9 sites de O-Fuc respectivement
 -18 sites de fixation de Ca²⁺ respectivement

*****: Site de O-fuc

λ: site de N-glycosylation

EGF-like

CRD

DSL

Figure 29 : Organisation structurale des ligands Dll1 et Jagged1.

Les ligands Dll1 et Jagged1 sont des ligands canoniques de Notch, qui sont constitués d'un domaine MNNL N-terminal stabilisé par des ponts disulfure, suivi d'un domaine DSL essentiel pour les interactions avec les récepteurs et de plusieurs répétitions EGF-like. Le ligand Jagged1 possède en plus un domaine riche en résidus cystéine (domaine CRD). Les sites potentiels de O-fucosylation sont représentés (astérisques rouges) ainsi que les sites prédits pour la N-glycosylation (λ).

(a) La structure 3D de la région comportant le DSL et les 3 premières répétitions EGF-like de Jagged1 humain montre un arrangement quasi linéaire des répétitions EGF-like, stabilisées par des ponts disulfure (en jaune).

(b) Le domaine DSL adopte un repliement particulier avec quelques brins bêta, stabilisé par des ponts disulfure. Les résidus situés entre les positions 199 et 207 et orientés du même côté sont cruciaux pour les interactions avec le récepteur. Leurs chaînes latérales sont représentées en rouge (Inspiré de (Chillakuri, Sheppard et al. 2012))

répétitions EGF-like. Chez les mammifères, les ligands DLL1, Jagged 1 et Jagged 2, qui font également partie de cette famille DSL/DOS/EGF avec un domaine DOS suivi de répétitions EGF-like (6-14), partagent une grande homologie structurale avec les ligands Delta et Serrate de *Drosophila* (Bray, Takada et al. 2008). Les ligands Serrate/Jagged se distinguent des ligands Delta/DLL1 par la présence en amont de la région transmembranaire d'un domaine riche en cystéines (CRD), dont la fonction n'est pas bien documentée. Tous ces ligands, sauf DLL3, possèdent un domaine PDZ dans leur partie intra-cytoplasmique, qui est impliqué dans les interactions avec d'autres protéines à motif PDZ associées à la membrane (**Figure 29**). Ces domaines PDZ sont impliqués dans l'organisation des jonctions intercellulaires (Popovic, Bella et al. 2011) et bien d'autres mécanismes.

Dans la famille **DSL/EGF**, le domaine DOS est absent. On retrouve chez *C. elegans* beaucoup de représentants de cette famille (LAG-2, ARG-1 et DSL 1-7) et chez les mammifères les ligands DLL3 et 4. Ces ligands DSL/EGF peuvent agir seuls comme DLL4 ou en combinaison avec des **co-ligands DOS** (DLK1-2, DOS1-3, OSM7 et 11), qui constituent une autre famille de ligands auxquels il manque le domaine d'interaction DSL. Il est probable que DLK-1 ne puisse directement activer Notch mais plutôt jouer le rôle d'antagoniste vis-à-vis des récepteurs (Bray, Takada et al. 2008).

Juste en amont du DSL des ligands DLL et Jagged, 4 résidus semblent importants puisqu'ils constituent le domaine **MNNL**, qui est stabilisé par des liaisons disulfures et sujet à de nombreuses mutations (**Figure 29**). Les mutations de Jagged1 humain au niveau de ce domaine sont responsables du syndrome d'Alagille (Chillakuri, Sheppard et al. 2012), qui se manifeste par une cardiopathie congénitale, un faciès caractéristique, une déformation typique des vertèbres et des anomalies au niveau des yeux. Du côté cytosolique, un domaine de PDZL a été identifié pour certains ligands de vertébrés (Jagged1, DLL1 et 4). Ce domaine PDZL facilite l'interaction avec des protéines adhérentes et est important dans l'adhésion cellule-cellule. Il permet l'inhibition de la motilité cellulaire (Mizuhara, Nakatani et al. 2005).

Il existe également des ligands non canoniques de Notch comme **DNER**, qui ne contiennent ni de domaine DOS ni de domaine DSL et dont le rôle serait de favoriser l'activation par des ligands DSL et/ou co-ligands DOS.

I.2 Glycosylations des principaux acteurs de la voie Notch

Les récepteurs NOTCH et leurs ligands sont en majorité **des glycoprotéines membranaires**. Bien que leur partie intra-cytoplasmique puisse être sujette, comme toute protéine cytoplasmique, à une *O*-glycosylation des résidus sérine ou thréonine par des résidus *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) (Kreppel, Blomberg et al. 1997; Hart, Housley et al. 2007), leur partie extracellulaire peut être la cible de plusieurs types de glycosylation. En effet, on peut retrouver au niveau des répétitions EGF-like des *N*-glycannes et des *O*-glycannes ancrés par différents monosaccharides (fucose, glucose, xylose et GlcNAc) (Takeuchi and Haltiwanger 2014). En dehors des répétitions EGF-like, on retrouve également des *N*-glycannes mais aussi des *O*-glycannes de type mucine ancrés par des résidus *N*-acétylgalactosamine (GalNAc).

I.2.1 Glycosylations des récepteurs NOTCH

I.2.1.1 Les *N*-glycosylations des récepteurs NOTCH

Les *N*-glycannes sont des structures oligosaccharidiques liées de manière covalente par un GlcNAc (fucosylé ou non) à des résidus asparagine, retrouvés au niveau des séquences consensus tripeptidiques de type Asn-Xaa-Ser/Thr d'une protéine (Xaa étant n'importe quel acide aminé sauf la proline) (Pless and Lennarz 1977). Tous les *N*-glycannes comportent le motif pentasaccharidique commun $(\text{GlcNAc})_2(\text{Man})_3$ (Man pour mannose), sur lequel sont branchés soit des résidus mannose (type poly/oligomannose), soit des résidus GlcNAc (type complexe) soit les deux (type hybride) (Stanley, Schachter et al. 2009).

Les récepteurs NOTCH de mammifères et leurs ligands sont, comme toutes les glycoprotéines membranaires, synthétisés au niveau du réticulum endoplasmique rugueux (RER), dans lequel la *N*-glycosylation est initiée par le transfert d'un précurseur oligosaccharidique de 14 résidus, du dolichol phosphate (lipide activé) à la chaîne polypeptidique en cours d'élongation. La maturation des glycoprotéines se poursuit dans l'appareil de Golgi, qui est seul capable d'élaborer les 3 types de *N*-glycannes.

Peu de données dans la littérature sont disponibles sur la *N*-glycosylation des récepteurs NOTCH. A titre d'exemples, les récepteurs NOTCH1 humain et murin contiennent chacun six sites potentiels de *N*-glycosylation selon la base de données UniProt

Proteins

Plasminogen activators

Urokinase, uPA

Tissue-type plasminogen activator, tPA

Bat salivary plasminogen activator

Blood clotting factors

Factor VII

Factor IX^a

Factor XII

EGF-CFC proteins

Human Cripto

Mouse Cripto

Notch receptors

Drosophila Notch^a

CHO Notch1^a

Mouse Notch1^a

Thrombospondin

PMP-C (Locust)

Notch ligands

Drosophila Delta^a

Drosophila Serrate^a

Human *Jagged1*^a

Rat *Delta-like 1*^a

^a O-Fucose further elongated by Fringe.

Tableau 2 Liste non exhaustive des protéines sécrétées et membranaires comportant des répétitions EGF-like avec des sites potentiels de O-fucosylation. (Panin, Shao et al. 2002)

(<http://www.uniprot.org>), dont quatre sont localisés au sein de répétitions EGF-like et d'autres au niveau de la région comportant les répétitions LNR (**Figure 26**).

Certains travaux anciens suggéraient déjà la présence de *N*-glycannes sur le récepteur Notch de drosophile en reliant l'existence de glycoformes potentielles du récepteur à la prédiction *in silico* de sites de *N*-glycosylation (Johansen, Fehon et al. 1989) mais l'occupation réelle de ces sites n'a pas été démontrée. Cependant, des études dans des lignées mutantes de cellules CHO capables seulement de synthétiser des *N*-glycannes de type poly-mannose et non de type complexe suggèrent que cette altération dans la structure des *N*-glycannes n'a pas d'effet majeur sur l'activité d'un récepteur NOTCH de nature mammalienne (CHO et souris) (Moloney, Shair et al. 2000; Takeuchi and Haltiwanger 2014).

I.2.1.2 Les *O*-glycosylations des récepteurs NOTCH

Comme pour la *N*-glycosylation, une séquence consensus existe pour certains types de *O*-glycosylations. C'est le cas notamment de la *O*-fucosylation, la *O*-glucosylation et la *O*-*N*-acétylglucosaminylation des domaines EGF-like. Ces séquences consensus ont été définies par comparaison de plusieurs glycoprotéines d'espèces différentes comportant des domaines EGF-like, dont les récepteurs NOTCH.

I.2.1.2.1 *O*-fucosylation des domaines EGF-like

La *O*-fucosylation d'un domaine EGF-like a été identifiée la première fois pour l'activateur de plasminogène de type Urokinase (Kentzer, Buko et al. 1990) puis sur l'activateur tissulaire de plasminogène (Harris, Leonard et al. 1991), les facteurs de coagulation du sang de type VII, IX, XII (Bjoern, Foster et al. 1991; Harris, Ling et al. 1992; Nishimura, Takao et al. 1992), le récepteur NOTCH des mammifères (Moloney, Shair et al. 2000), la protéine Cripto (Schiffer, Foley et al. 2001) et plus récemment sur l'agrine (Kim, Chandrasekharan et al. 2008), la protéine AMACO (Gebauer, Muller et al. 2008) et le ligand DLL1 de souris (Muller, Rana et al. 2014) (**Tableau 2**). Alors que les recherches dans les bases de données identifient plus de 100 protéines contenant des domaines EGF-like répétés avec cette séquence consensus (Rampal, Luther et al. 2007), ce sont les récepteurs NOTCH qui sont les protéines les plus abondamment *O*-fucosylées, si l'on se fie à la grande quantité de séquences consensus qu'ils renferment (**Figure 26**).

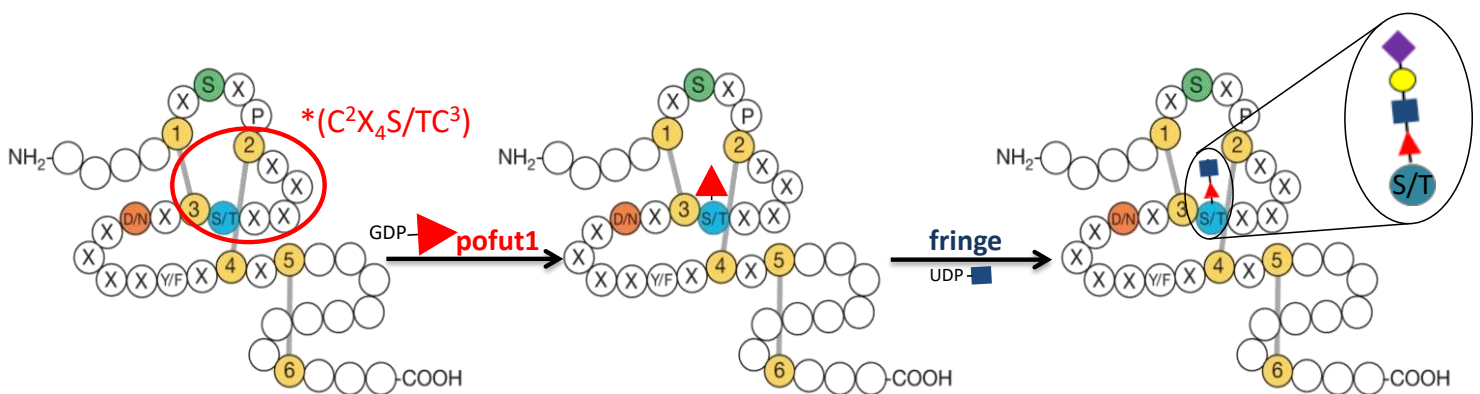


Figure 30 : O-fucosylation de répétitions EGF-like.

Au sein d'une répétition EGF-like, la sérine ou thréonine de la séquence consensus de O-fucosylation $C^2X_4(S/T)C^3$ peut être occupée par un résidu fucose, ajouté par l'enzyme Pofut1 dans le réticulum endoplasmique à partir d'un sucre nucléotidique donneur, le GDP-fucose. Au cours de la maturation de la glycoprotéine dans le Golgi, ce résidu fucose O-lié peut être ou non allongé en un O-fucosylglycane tétrasaccharidique sialylé, suite à l'ajout successif d'un GlcNAc en $\beta 1,3$ par une glycosyltransférase de la famille Fringe ($\beta 1-3$ -GlcNAcT), d'un galactose en $\beta 1,4$ et d'un acide sialique en $\alpha 2,3$ ou $2,6$ (Haines and Irvine 2003).

La *O*-fucosylation des domaines répétés EGF-like, que l'on retrouve notamment sur les récepteurs NOTCH et leurs ligands, est catalysée par une GDP-fucose protéine *O*-fucosyltransférase 1 : **Ofut1** chez la drosophile (Okajima and Irvine 2002) et **POFUT1** chez les mammifères (Wang, Lee et al. 1996). Cette enzyme transfère un **résidu fucose sur la sérine ou thréonine** d'une séquence consensus de type **C²XXXX(S/T)C³** (où X est un acide aminé quelconque et où C2 et C3 sont les 2^{ème} et 3^{ème} cystéines conservées) d'une glycoprotéine en cours de synthèse dans le RER. Ce résidu fucose *O*-lié peut être ou non allongé en tétrasaccharide sialylé par l'action de plusieurs autres glycosyltransférases (**Figure 30**). Un résidu GlcNAc peut être ajouté au résidu fucose *O*-lié suite à l'action d'une β 1,3-*N*-acétylglucosaminyltransférase de la famille Fringe chez la drosophile (Haines and Irvine 2003). Trois homologues de Fringe existent chez les mammifères : Lunatic, Manic et radical Fringe (Cohen, Bashirullah et al. 1997; Johnston, Rauskolb et al. 1997). Des travaux ultérieurs ont démontré que Fringe est un modulateur de l'activité de Notch (Bruckner, Perez et al. 2000; Moloney, Panin et al. 2000) et suggèrent que l'allongement du fucose *O*-lié par Fringe favoriserait la liaison au ligand delta, au détriment d'une liaison avec le ligand Serrate chez la drosophile (Panin, Papayannopoulos et al. 1997; Freeze and Haltiwanger 2009).

Dans la plupart des cas, le fucose *O*-lié, qui est allongé par Fringe en disaccharide de type GlcNAc β 1-3Fuc, est allongé en tétrasaccharide sialylé de type Neu5Ac α 2,3/2,6Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Fuc suite à l'action d'une β 1,4 galacosyltransférase et d'une sialyltransférase (**Figure 30**).

I.2.1.2.2 O-glycosylation et O-xylosylation des domaines EGF-like

La *O*-glucosylation de domaines EGF-like a été montrée pour plusieurs facteurs de coagulation (VII, IX) (Hase, Kawabata et al. 1988), la protéine Z (Nishimura, Kawabata et al. 1989; Iwanaga, Nishimura et al. 1990) et la thrombospondine (Nishimura, Yamashita et al. 1992) et elle se révèle la plupart du temps sous forme trisaccharidique avec deux résidus xylose successifs sur le glucose *O*-lié.

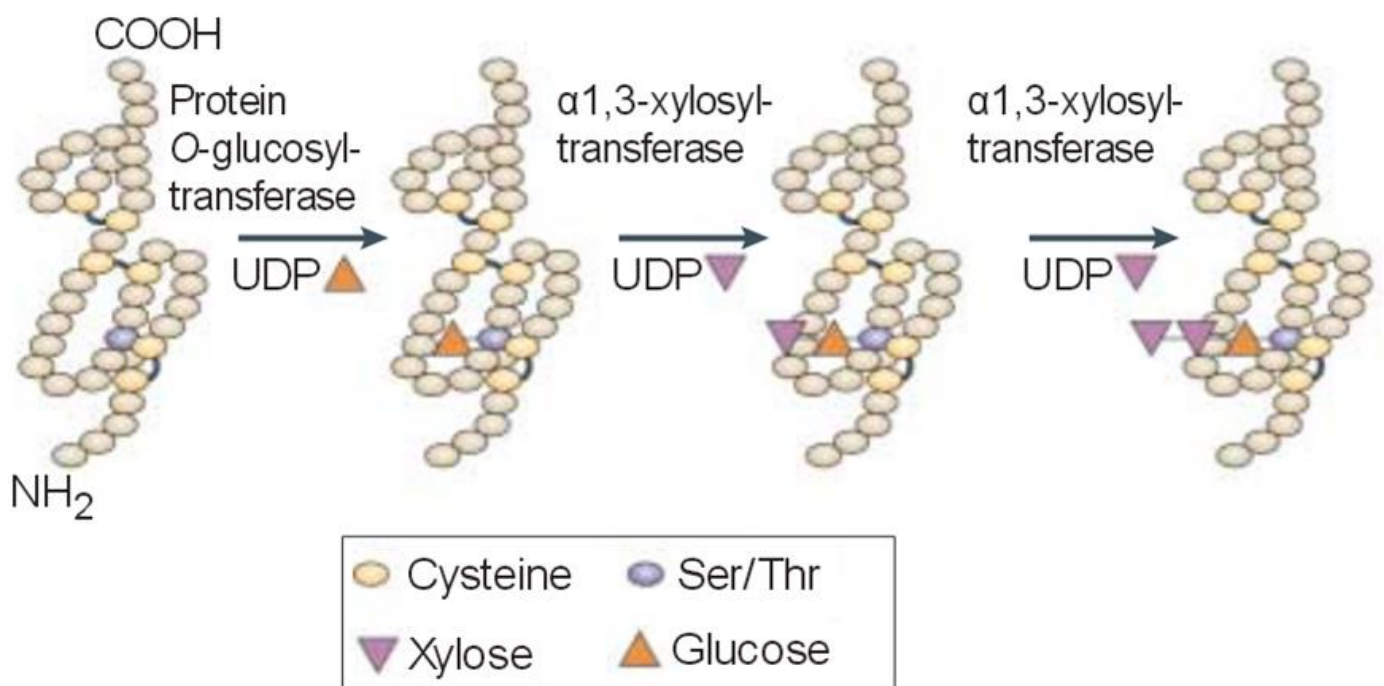


Figure 31 : O-glycosylation de répétitions EGF-like.

Au sein d'une répétition EGF-like, la sérine de la séquence consensus de O-glycosylation $C^1X_SXPC^2$ peut être occupée par un résidu glucose, ajouté par la protéine O-glucosyltransférase (Poglut) dans le réticulum endoplasmique à partir du substrat donneur UDP-glucose. Ce glucose O-lié peut être ensuite allongé en O-glycosylglycane trisaccharidique xylosylé suite à l'ajout successif de 2 résidus xylose en $\alpha 1,3$ (modifiée de (Haines and Irvine 2003)).

La O-glycosylation des domaines répétés EGF-like, retrouvée aussi sur les récepteurs NOTCH tels que le récepteur NOTCH1 (Moloney, Shair et al. 2000), est catalysée par une UDP-glucose protéine O-glycosyltransférase (Shao, Luo et al. 2002) appelé Rumi chez la drosophile (Acar, Jafar-Nejad et al. 2008; Irvine 2008) et POGLUT chez les mammifères. Elle catalyse le transfert d'un résidu glucose sur la sérine d'une séquence consensus de type C^1XSXPC^2 (où X est un acide aminé quelconque et où C1 et C2 sont les 1^{ère} et 2^{ème} cystéines conservées) (Shao, Luo et al. 2002) d'une glycoprotéine en cours de synthèse dans le RER (**Figure 31**). Rumi possède un peptide signal, un domaine CAP10 (Acar, Jafar-Nejad et al. 2008) et un signal de rétention dans le réticulum endoplasmique de type **KDEL**, ce qui indique que Rumi est bien une protéine soluble du RER. Trois homologues Rumi existent chez les mammifères. Seuls celui avec la plus grande homologie avec Rumi de drosophile (appelée POGLUT1) **montre une activité enzymatique O-glycosyltransférase *in vitro* et une activité protéine O-xylosyltransférase**, comme c'est d'ailleurs le cas chez la drosophile. Rumi peut donc transférer soit un glucose soit une xylose sur les séquences consensus de O-glycosylation de domaines EGF-like de NOTCH (Takeuchi, Fernandez-Valdivia et al. 2011). Par contre, la fonction des autres homologues Rumi (appelés KDELC1 et KDELC2) est inconnue.

Le résidu glucose O-lié des récepteurs NOTCH peut être ou non allongé en un trisaccharide xylosylé de type $Xyl\alpha 1-3Xyl\alpha 1-3Glc\beta 1-O-EGF$ (Whitworth, Zandberg et al. 2010), suite à l'action d'une des deux UDP-xylose:glucoside xylosyltransferases (Gxylt1 or Gxylt2) (Xxylt1) puis d'une UDP-xylose:xyloside xylosyltransferase (Xxylt1) (Takeuchi, Fernandez-Valdivia et al. 2011) (**Figure 31**).

La prédiction *in silico* de protéines possédant la nouvelle séquence consensus révisée de O-glycosylation $C^1XSX(\underline{A/P})PC^2$ (Rana, Nita-Lazar et al. 2011), fait ressortir une quarantaine de protéines, dont les récepteurs NOTCH sont bien les plus représentés (Rana, Nita-Lazar et al. 2011). L'inactivation de *Poglut1* dans les souris entraîne une létalité embryonnaire avec des embryons présentant de nombreux défauts de développement tels que des défauts de somitogenèse, de cardiogenèse, de développement du tube neural ou bien de remodelage vasculaire (Fernandez-Valdivia, Takeuchi et al. 2011), indiquant clairement que la O-glycosylation est nécessaire à l'activation de la voie Notch impliquée dans ces processus (Acar, Jafar-Nejad et al. 2008; Benham 2012).

I.2.1.2.3 O-N-acétylglucosaminylation des domaines EGF-like

Depuis longtemps, il était accepté que l'ajout d'un GlcNAc *O*-lié sur une sérine ou une thréonine ne se réalisait que sur des protéines cytoplasmiques et nucléaires des métazoaires (Hart, Haltiwanger et al. 1989; Whelan and Hart 2006). Cependant, des études en spectrométrie de masse sur le récepteur Notch de drosophile ont bouleversé ce dogme. En effet, il s'avère que la répétition EGF-like 20 du récepteur Notch de drosophile était non seulement *O*-fucosylée et *O*-glucosylée mais portait aussi un GlcNAc *O*-lié entre les 5^{ème} et 6^{ème} cystéines (Matsuura, Ito et al. 2008). En utilisant un anticorps anti-GlcNAc, les régions EGF1-10 et EGF22-31 sont également révélées par Western blot, ce qui signifie que le GlcNAc *O*-lié peut se retrouver sur une ou plusieurs de leurs répétitions EGF-like (Matsuura, Ito et al. 2008). Des études ultérieures ont montré que des glycoprotéines sécrétées de la matrice extracellulaire telles que la thrombospondine pouvaient être également porteuses de ce type de modification post-traductionnelle (Hoffmann, Liu et al. 2012).

Le récepteur NOTCH1 murin est également porteur de résidus *O*-GlcNAc, ajoutés par une *O*-GlcNAc transférase atypique spécifique des EGF, localisée dans le réticulum endoplasmique et appelée **EOGT1**, similaire à l'enzyme EOGT retrouvée chez la drosophile. L'activité de cette enzyme, augmentée en présence de manganèse, serait importante pour **les processus d'adhésion cellulaire**. Il semblerait aussi que ce GlcNAc *O*-lié soit allongé par un galactose, formant ainsi un motif *N*-acétyllactosamine *O*-lié (Sakaidani, Ichiyanagi et al. 2012). La séquence consensus $C^5X_2GX-(S/T)GX_2C^6$ a été définie comme la séquence d'ancrage de résidus *O*-GlcNAc sur les glycoprotéines membranaires telles que NOTCH et les protéines sécrétées (Alfaro, Gong et al. 2012).

Le rôle des GlcNAc *O*-liés dans la signalisation Notch a été établi chez la drosophile. Les mutants *Eogt*^{-/-} possèdent des défauts dans le développement embryonnaire, la neurogenèse et la formation des ailes, qui sont des processus contrôlés par la voie de Notch (Sakaidani, Nomura et al. 2011).

I.2.1.2.4 Les autres types de O-glycosylations retrouvés sur les récepteurs NOTCH

En plus de l'ajout de différents monosaccharides (fucose, GlcNAc, glucose, xylose), allongés ou non en chaînes oligosaccharidiques, sur les résidus sérine et/ou thréonine des répétitions

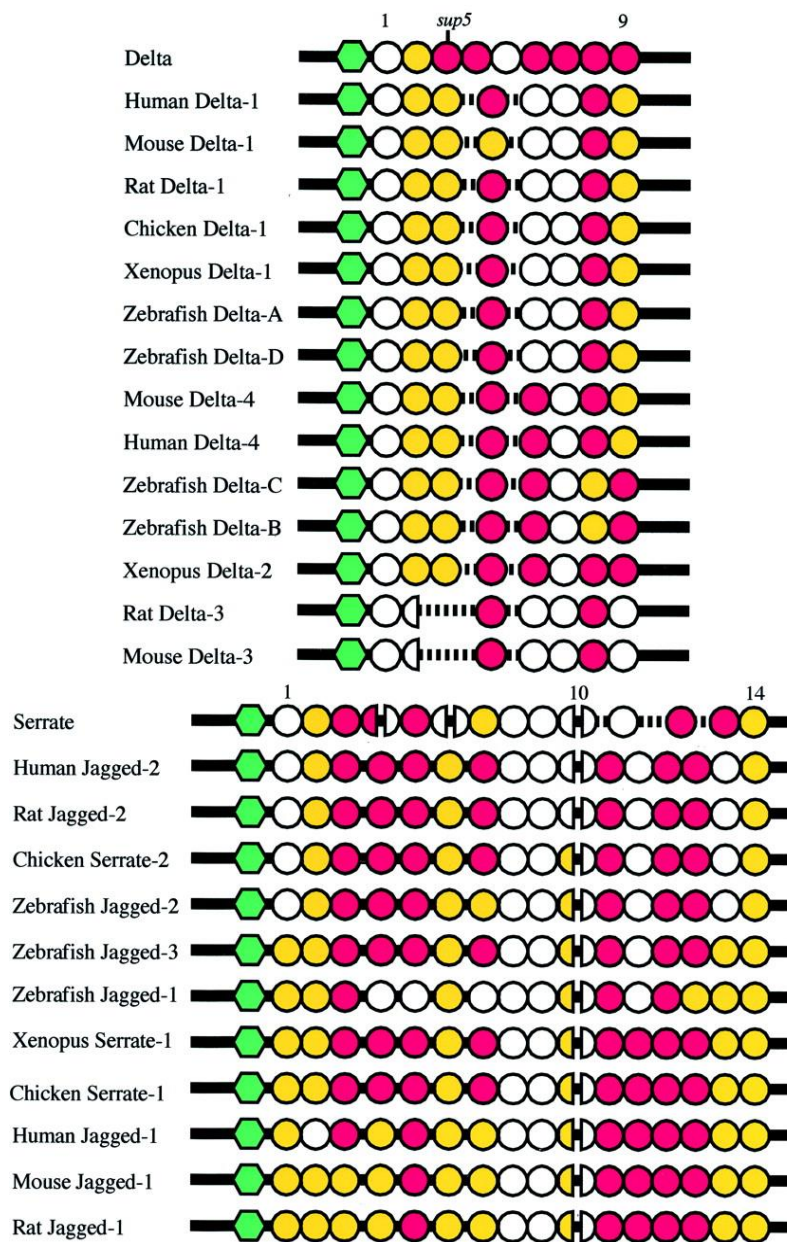


Figure 32 : Sites potentiels de *O*-fucosylation des ligands de Notch.

Sites potentiels de *O*-fucosylation retrouvés au niveau des domaines extracellulaires de Serrate/Jagged et des ligands des familles Delta et Jagged dans différentes espèces. Le DSL est représenté sous forme d'hexagone vert et les répétitions EGF-like sous forme de boules de couleurs différentes (les répétitions non fucosylées sont en blanc, celles portant la séquence consensus de *O*-fucosylation C²XXGG(S/I)C³ sont en rouge et celles avec la séquence consensus C²X₃₋₅(S/I)C³ en jaune)

EGF-like de NOTCH, on retrouve un autre type de *O*-glycosylation dans le NECD. Il s'agit de la *O*-glycosylation de type mucine, qui se caractérise par l'ajout de résidus GalNAc *O*-liés sur des résidus sérine et/ou thréonine et qui jouerait un rôle régulateur dans l'activation de la voie Notch (Boskovski, Yuan et al. 2013). Ce type de *O*-glycosylation est très fréquemment retrouvé sur les glycoprotéines membranaires et les protéines sécrétées. Ce n'est donc pas étonnant d'en retrouver aussi sur le récepteur NOTCH mais il est intéressant de noter que l'ajout de ces *O*-GalNAc ne concerne pas du tout les répétitions EGF-like. Les *O*-glycannes de type *O*-GalNAc sont uniquement localisés dans **la région NNR de NOTCH** en aval du site de clivage S2 (Takeuchi and Haltiwanger 2014) et jouent étonnamment un rôle en faveur du clivage du site S2 par ADAM17 et donc en faveur d'une activation de la voie Notch (Boskovski, Yuan et al. 2013).

Il s'agit de la *N*-acétylgalactosaminyltransférase 11 ou **GALNT11**, qui est responsable de cette *O*-glycosylation de type GalNAc sur le NECD (Boskovski, Yuan et al. 2013). Il n'y a **pas de séquence consensus** pour ce type de glycosylation et la spécificité des isoformes de GALNT semble être redondante dans de nombreux cas. Pour ces raisons, il est difficile d'identifier les cibles biologiquement pertinentes pour ce type de glycosylation.

I.2.2 Glycosylation des ligands de NOTCH

Des sites potentiels de *N*-glycosylation, *O*-fucosylation, *O*-glucosylation et *O*-*N*-acétylglucosaminylation sont présents au niveau des répétitions EGF-like des ligands DSL de NOTCH (Panin, Shao et al. 2002; Stanley and Okajima 2010; Takeuchi and Haltiwanger 2014) mais peu de travaux démontrent l'occupation réelle de tous ces sites. Toutefois, il a été démontré que les ligands DSL de NOTCH pouvaient être *O*-fucosylés mais aussi *O*-*N*-acétylglucosaminylés.

I.2.2.1 Les ligands DSL de NOTCH sont *O*-fucosylés

En utilisant une séquence consensus de *O*-fucosylation élargie ($C^2X_{3-5}(S/T)C^3$), une analyse de séquences révèle la présence de multiples sites consensus de *O*-fucosylation au niveau des répétitions EGF-like des ligands DSL de NOTCH, à savoir les ligands des familles Serrate/Jagged et Delta (Panin, Shao et al. 2002) (**Figure 32**). Après l'expression des ligands

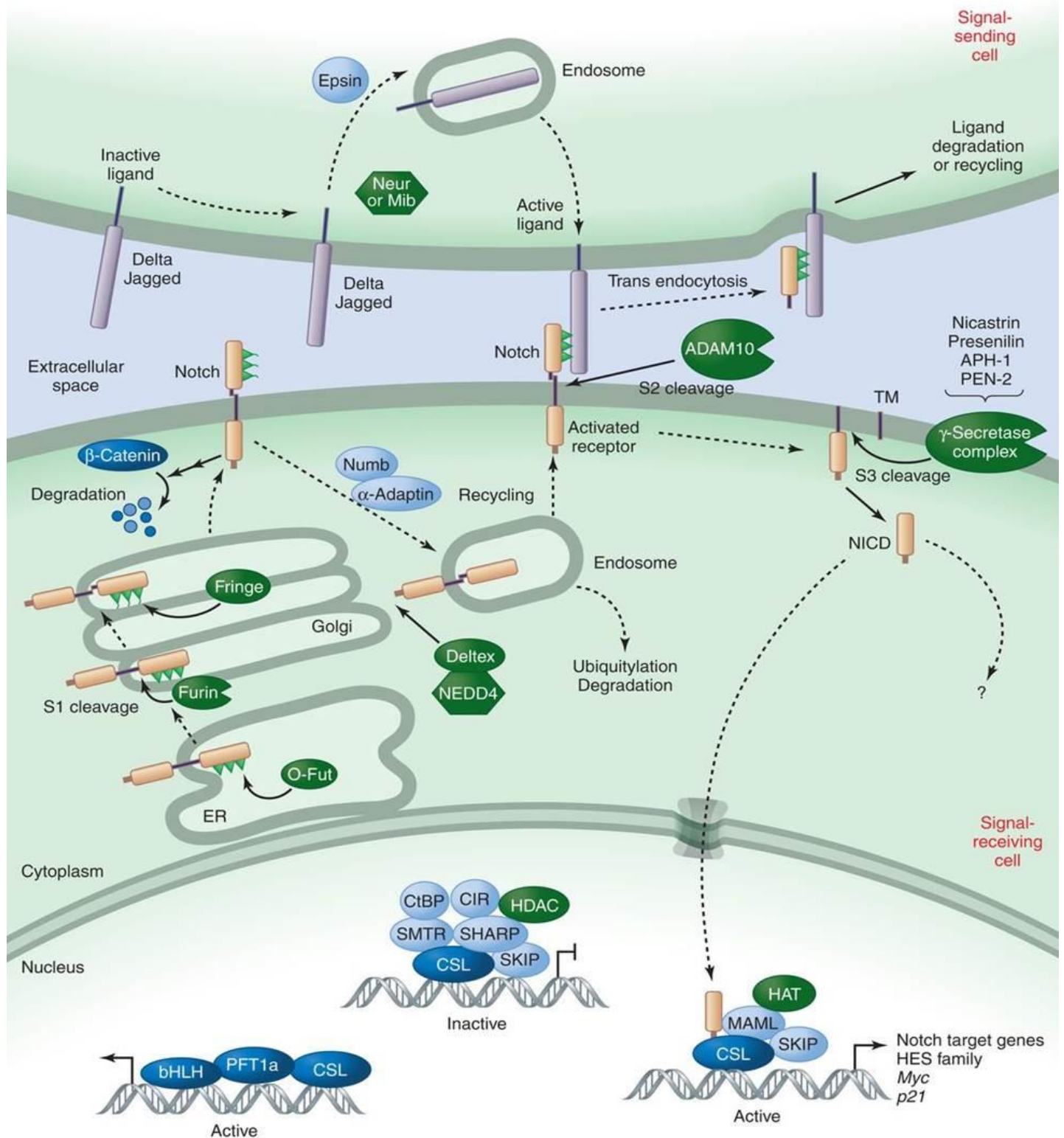


Figure 33 : Voie canonique de signalisation Notch.

Après clivage du site S1 de la chaîne polypeptidique précurseur par une furine, le récepteur est exprimé sous forme hétérodimérique à la surface de la cellule réceptrice et peut interagir avec un ligand de la famille Delta ou Jagged, exprimé à la surface de la cellule émettrice. Après interactions récepteurs-ligands, la cellule émettrice exerce une force de traction sur le récepteur Notch, qui expose alors son site S2 au clivage par ADAM10. Le récepteur Notch, débarrassé du NECD, est alors clivé par le complexe de la gamma-sécrétase au niveau du site S3 et le NICD libéré est majoritairement transloqué dans le noyau, où il activera un certain nombre de gènes cibles, en interagissant notamment avec CSL et MAML (Kopan 2012).

DLL1 de rat et Jagged1 humain dans les cellules CHO et leur purification, l'analyse chromatographique de leurs chaînes *O*-glycanniques obtenues après β -élimination montre qu'ils sont bien *O*-fucosylés sur leurs domaines EGF-like et que ces fucoses *O*-liés peuvent être allongés en disaccharides après expression de la β 1,3-*N*-acétyl-glucosaminyltransférase Manic Fringe dans les cellules CHO Lec1 (cellules incapables d'élaborer des *N*-glycannes de type complexe avec des fucoses périphériques). La détection également des *O*-fucosylglycannes tétrasaccharidiques sialylés montre bien qu'une fois que Fringe a agi, les structures disaccharidiques (Fucose-GlcNAc) peuvent être allongées suite à l'action des galactosyl- et sialyltransférases endogènes des cellules CHO. Les ligands Delta et Serrate de drosophile sont également *O*-fucosylés et cibles de Fringe (Panin, Shao et al. 2002).

I.2.2.2 Les ligands DSL de NOTCH sont *O*-N-acétylglucosaminylés

Après des études préliminaires qui montraient que le ligand Delta était détecté en Western blot par un anticorps spécifique des résidus *O*-GlcNAc (Matsuura, Ito et al. 2008), il a été montré plus tard par la même technique que la transfection d'EOGT dans des cellules S2 entraînait bien l'ajout de GlcNAc *O*-liés sur les ligands Delta et Serrate de Notch de drosophile, (Muller, Jenny et al. 2013).

I.3 La Voie canonique de Notch

Chez les mammifères, la voie canonique de Notch implique l'interaction d'un des 4 récepteurs NOTCH avec un des 5 ligands de la famille DSL, les ligands Delta-like (DLL1, 3, 4) et Jagged (1,2). Ces interactions vont dépendre de plusieurs paramètres et notamment des proportions de récepteurs et de ligands exprimés à la surface des cellules en interactions mais aussi des multiples glycosylations de ces deux types de partenaires.

Après clivage protéolytique du site S1 dans le Golgi, le récepteur NOTCH est exporté sous forme d'hétérodimère à la surface d'une cellule réceptrice et peut soit être endocyté pour être dégradé ou recyclé à la membrane soit interagir avec un de ses ligands, Delta-like ou Jagged (**Figure 33**). Ces interactions, modulées par les glycosylations de leurs parties extracellulaires, vont rendre le site S2 accessible au clivage protéolytique par une ADAM protéase, libérant ainsi le NECD qui sera ensuite endocyté avec le ligand par la cellule

émettrice. Le récepteur NOTCH, appelé alors Next, est clivé au niveau des sites S3 et S4, ce qui autorise le NICD à se détacher de la membrane pour être transloqué au noyau, où il va activer un certain nombre de gènes cibles dépendant du facteur de transcription CSL(CBF1) (Kopan 2012). Cependant, des études sur la drosophile et chez les mammifères montrent que des récepteurs NOTCH peuvent rester dans la membrane sous forme non clivée et activer la voie Notch indépendamment du CSL (Bush, diSibio et al. 2001) ce qui rend la régulation de cette voie de signalisation relativement complexe. En effet, la voie de signalisation Notch est régulée à de multiples points clés, qui concernent la répartition et la proportion des récepteurs et des ligands présents à la surface des cellules émettrices et réceptrices, les interactions ligand-récepteurs modulées par la glycosylation, les clivages protéolytiques modulés par des protéases spécifiques, l'activation ou non des gènes cibles.

I.3.1 Présentation à la surface des récepteurs NOTCH sous forme hétérodimétrique

Les gènes de souris codant NOTCH1 et NOTCH2 sont portés par le chromosome 2, tandis que ceux codant NOTCH3 et NOTCH4 sont portés par le chromosome 17. Comme toute glycoprotéine présente à la membrane plasmique, les ARNm codant les récepteurs NOTCH sont traduits au niveau du réticulum endoplasmique rugueux (RER) suite à leur adressage par un peptide signal. C'est dans le RER que ces récepteurs d'environ 300 à 350 kDa vont subir la plupart de leurs modifications post-traductionnelles, à savoir le clivage de leur peptide signal mais aussi l'ajout des chaînes *N*-glycanniques et des monosaccharides (fucose, glucose, xylose et GlcNAc) *O*-liés. Ces différentes glycosylations vont permettre aux récepteurs d'acquies leur conformation définitive et faciliter leur trafic intracellulaire vers la membrane plasmique. Le passage des récepteurs dans l'appareil de Golgi aura deux grandes conséquences : la maturation de leurs chaînes *N*- et *O*-glycanniques mais aussi le clivage au niveau du site S1 par une convertase de type furine formant ainsi un hétérodimère, composé du NECD (≈ 180 kDa) et du NICD (≈ 120 kDa) (**Figure 33**). C'est sous cette forme d'hétérodimères non covalents que les récepteurs NOTCH matures sont majoritairement présentés à la membrane plasmique (Logeat, Bessia et al. 1998). Le clivage du site S1 n'influe pas de manière significative sur la structure 3D de la région NRR des récepteurs NOTCH1 et 2 humains. L'absence de clivage S1 modifie la quantité de récepteurs NOTCH1 présents à la

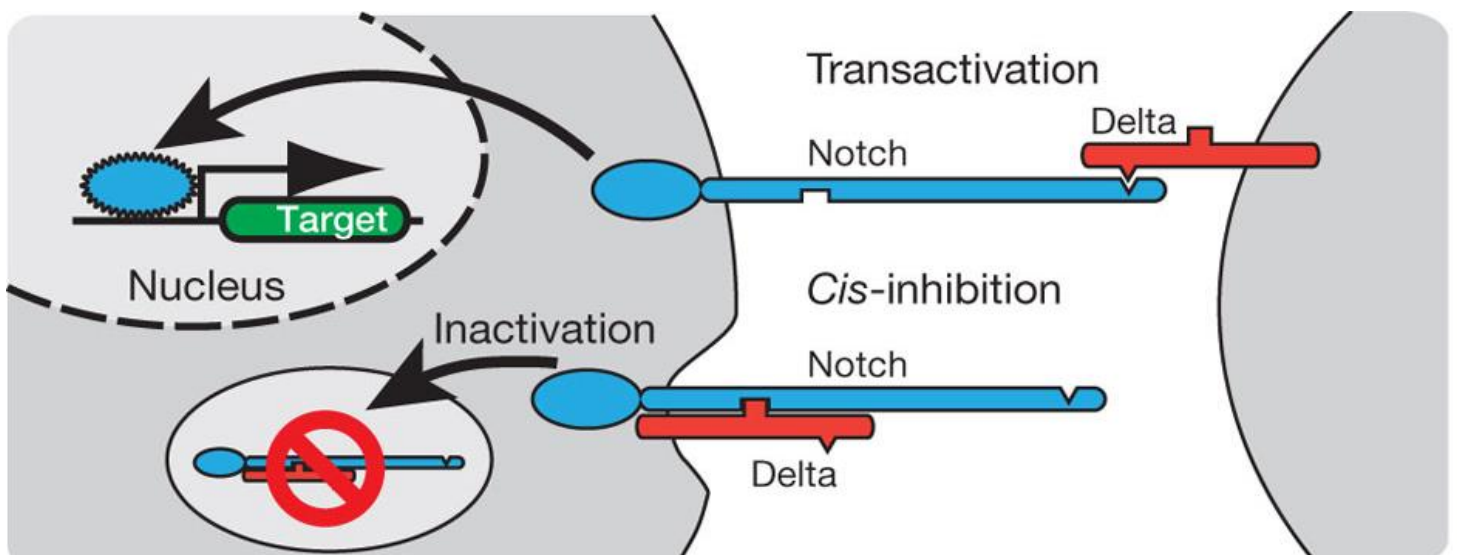


Figure 34 : Types d'interaction de Notch avec son ligand Delta.

Dans la transactivation, l'interaction se fait entre le récepteur Notch d'une cellule réceptrice et son ligand Delta porté par une cellule émettrice. Ceci conduit à l'activation de la voie Notch uniquement dans la cellule réceptrice et ainsi à la transcription de gènes cibles. Lorsque Notch et son ligand Delta exprimés par la même cellule interagissent, la voie Notch est inactivée par cis-inhibition (Panin, Shao et al. 2002; Sprinzak, Lakhapal et al. 2010).

surface alors qu'elle n'affecte pas NOTCH2 (Gordon, Vardar-Ulu et al. 2009). Plusieurs protéines incluant Numb, une α -adaptine et les ubiquitine ligases E3 telles que Deltex et Nedd4, peuvent réguler les quantités de récepteurs NOTCH présents à la surface cellulaire, en orientant les récepteurs NOTCH endocytés soit vers la dégradation par le protéasome soit vers un recyclage à la membrane (Kopan 2012) (Figure 33).

I.3.2 Présentation à la surface des ligands DSL de NOTCH

Les ligands Delta et Jagged sont exprimés majoritairement à la surface d'une cellule dite émettrice, après avoir suivi le même trafic intracellulaire que les récepteurs NOTCH et avoir subi les mêmes types de *N*- et *O*-glycosylation, même si ce n'est que très peu décrit dans la littérature. De la même manière que pour les récepteurs NOTCH, il existe des ubiquitine ligases E3 (Neur et MIB), qui vont ubiquitinyler le domaine intracellulaire des ligands inactifs présents à la surface et provoquer leur endocytose médiée par l'epsine. Après cette endocytose, ces ligands peuvent être à nouveau exprimés à la surface et interagir avec un des récepteurs NOTCH de la cellule réceptrice (Kopan 2012) (Figure 33). Ainsi, les taux de ligands présents à la surface de la cellule émettrice à un temps *t* sont également régulés.

I.3.3 Interactions entre les récepteurs NOTCH et leurs ligands

I.3.3.1 Les différents modes d'interactions

Deux types d'interactions ligand-récepteur sont possibles dans la voie canonique de Notch. Dans l'interaction **trans**, un ligand de la famille DSL de NOTCH exprimé à la surface d'une cellule émettrice interagit avec un récepteur NOTCH d'une cellule réceptrice, initiant ainsi la signalisation Notch (de Celis and Bray 1997). Dans l'interaction **cis**, le ligand et le récepteur sont exprimés par la même cellule ce qui entraîne une cis-inhibition de la voie de Notch (Micchelli, Rulifson et al. 1997) (Figure 34). La cis-inhibition permet donc de déterminer si une cellule est émettrice (ligand abondant par rapport au récepteur) ou réceptrice (récepteur abondant par rapport au ligand) (Sprinzak, Lakhanpal et al. 2010). Dans certains cas, le ligand et le récepteur sont séparés en différents sous-domaines pour permettre la transmission et la réception simultanée des signaux par une même cellule (Luty, Rodeberg et al. 2007).

Il est bien établi que l'EGF12 du récepteur et le domaine DSL des ligands sont majoritairement responsables de la trans-activation de la voie Notch, qui n'est cependant optimale qu'avec la contribution d'autres répétitions EGF-like du récepteur. Bien que les exigences moléculaires pour les interactions en cis soient moins claires, il semblerait que l'existence d'un site de liaison dans le domaine DSL de Jagged1 humain autorise les deux types d'interactions, cis et trans (Cordle, Johnson et al. 2008). La région Abruptex (EGF24-29) du récepteur NOTCH de drosophile (de Celis and Bray 2000) ainsi que la région EGF10-12 (Becam, Fiuza et al. 2010) sont impliquées dans la cis-inhibition de la voie Notch.

I.3.3.2 Nature des interactions

Une étude récente par microscopie à force atomique montre que l'interaction entre une cellule exprimant le récepteur NOTCH et une cellule exprimant le ligand Delta est plutôt forte (Ahimou, Mok et al. 2004), ce qui signifie qu'une force physique relativement importante est nécessaire pour dissocier et activer le récepteur. L'activation de Notch dépend essentiellement des interactions dynamiques entre les récepteurs et les ligands membranaires lors d'un contact direct cellule-cellule.

I.3.3.3 Les régions impliquées dans les interactions récepteur-ligand

I.3.3.3.1 Les régions de NOTCH contenant des sites de liaison aux ligands

- La région comprenant la répétition EGF-like 12

Pour élucider les mécanismes d'interactions entre le récepteur NOTCH et ses ligands, des études préliminaires ont été réalisées avec différentes constructions du récepteur NOTCH, plus ou moins délété au niveau de ses motifs EGF, combinées à des tests d'agrégation de cellules S2 de drosophile (Rebay, Fleming et al. 1991). Ces tests d'agrégation reposaient sur la découverte que des cellules exprimant NOTCH formaient, de manière spécifique et dépendante du calcium, des agrégats avec des cellules exprimant Delta (Fehon, Kooh et al. 1990). Il ressortait de ces études que les **EGF11** et **12** du récepteur NOTCH de drosophile ou de xénope étaient nécessaires et suffisantes pour médier des interactions *in vitro* avec les ligands Delta et Serrate (Rebay, Fleming et al. 1991). Une mutation ponctuelle de l'EGF12 entraîne un phénotype sévère avec perte de fonction, validant l'importance de cette

répétition dans les interactions récepteur-ligand (de Celis, Barrio et al. 1993). Différentes études ultérieures montrent que c'est l'EGF12 qui constitue le site calcium-dépendant majeur de liaison aux ligands des familles Delta et Jagged (Rand, Lindblom et al. 1997; Cordle, Redfieldz et al. 2008; Chillakuri, Sheppard et al. 2012). Des études sur le récepteur Notch de drosophile suggèrent qu'il n'y aurait pas de différences d'affinité de liaison entre les ligands, Delta et Serrate, et le récepteur (Klug and Muskavitch 1999).

- La région appelée Abruptex comprenant les répétitions 24 à 29

Des mutations spécifiques localisées dans la région Abruptex (**EGF 24-29**) du récepteur de drosophile entraîne une diminution de la capacité du récepteur à se lier à ses ligands (de Celis and Garcia-Bellido 1994; de Celis and Bray 2000). Les mutations Abruptex rendraient Notch résistantes aux effets négatifs de la cis-interaction (de Celis and Bray 2000).

I.3.3.3.2 Les régions des ligands impliquées dans la liaison aux récepteurs NOTCH

Le domaine **DSL** (Delta/Serrate/LAG-2) des ligands est nécessaire aux cis- et trans-activations du récepteur NOTCH (Cordle, Johnson et al. 2008). La structure 3D obtenue par diffraction aux rayons X de Jagged1 associé aux trois répétitions EGF-like (11-13) de NOTCH1 humain montre une structure étirée en forme de bâtonnet et des similarités structurales entre le DSL et les répétitions EGF (Cordle, Johnson et al. 2008). Le DSL offre une surface de liaison à NOTCH par le regroupement de plusieurs résidus chargés positivement, dont les mutations nuisent aux interactions avec le récepteur (Cordle, Johnson et al. 2008). En association avec quelques-unes des premières répétitions EGF-like, le DSL assure une bonne interaction avec les récepteurs NOTCH (Shimizu, Chiba et al. 2001).

Malgré l'importance de ces régions d'intérêt (EGF12, Abruptex, DSL) dans la modulation des interactions récepteurs-ligands, il semblerait que plusieurs autres répétitions EGF du récepteur, contribuent, de manière substantielle, aux interactions récepteur-ligand (Fleming 1998; Xu, Lei et al. 2005) et notamment du fait de leurs multiples *O*-glycosylations (Bruckner, Perez et al. 2000; de Celis and Bray 2000).

I.3.3.4 Modulation des interactions par la *O*-glycosylation des récepteurs

Après ajout des différents monosaccharides *O*-liés (fucose, GlcNAc, glucose et/ou xylose) dans le RER, les récepteurs NOTCH et/ou leurs ligands vont être acheminés vers l'appareil de

Golgi, où d'autres glycosyltransférases vont pouvoir allonger ou non les résidus *O*-liés. Le rôle de Fringe, qui peut allonger le fucose *O*-lié avec un GlcNAc, est assez bien documenté. C'est l'ensemble de ces glycosylations du NECD, qui va déterminer la spécificité d'interactions avec tel ou tel autre ligand et aussi l'amplitude de réponse des récepteurs NOTCH activés. C'est en 2000 qu'il a été montré que le récepteur NOTCH1 exprimé dans des cellules CHO était à la fois *O*-fucosylé et *O*-glucosylé sur ses répétitions EGF-like mais aussi que ces résidus fucose et glucose *O*-liés pouvaient être respectivement allongés en *O*-fucosylglycane tétrasaccharidique sialylé comme dans le facteur IX de coagulation et en *O*-glucosylglycane trisaccharidique (Moloney, Shair et al. 2000) (Figure 30 et 31). Les récepteurs NOTCH ainsi que leurs ligands contiennent de nombreuses répétitions EGF-like, présentant des sites consensus très conservés de *O*-fucosylation et de *O*-glucosylation (Figure 26 et 29), ce qui a très rapidement fait émerger un rôle potentiel de ces *O*-glycosylations dans les interactions récepteur-ligand et donc dans l'activation de la voie Notch.

I.3.3.4.1 Implication des fucoses *O*-liés et des *O*-fucosylglycannes

De nombreux travaux ont porté sur la cartographie des sites *O*-fucosylés des récepteurs NOTCH essentiellement mais aussi sur la structure de ces glycosylations particulières. Pour le récepteur NOTCH1, ces séquences prédites représentent plus de la moitié des répétitions : 20/36 (Figure 26). Sur ces 20 sites potentiels, 11 sites (EGF2,3,4,5,7,12,17,20,23,25, 35) sont prouvés expérimentalement chez la drosophile comme étant occupés par des résidus fucose *O*-liés (Panin, Shao et al. 2002; Lei, Xu et al. 2003; Xu, Haines et al. 2007; Matsuura, Ito et al. 2008; Rana, Nita-Lazar et al. 2011). Chez la souris, sur 20 sites potentiels de *O*-fucosylation (Figure 26), seul l'EGF12 a été démontré expérimentalement comme étant *O*-fucosylé (Hiruma-Shimizu, Hosoguchi et al. 2010). Ces résidus fucose *O*-liés sont ou non allongés par Fringe, qui ajoute avec un GlcNAc lié en β 1,3 et qui permet un allongement ultérieur en un tétrasaccharide sialylé suite à l'action d'une galacosyltransférase et d'une sialyltransférase (Figure 30).

En 2000, un rôle pour Fringe est proposé : l'allongement du fucose *O*-lié par un GlcNAc conduit à une augmentation de l'affinité de liaison du récepteur NOTCH au ligand Delta

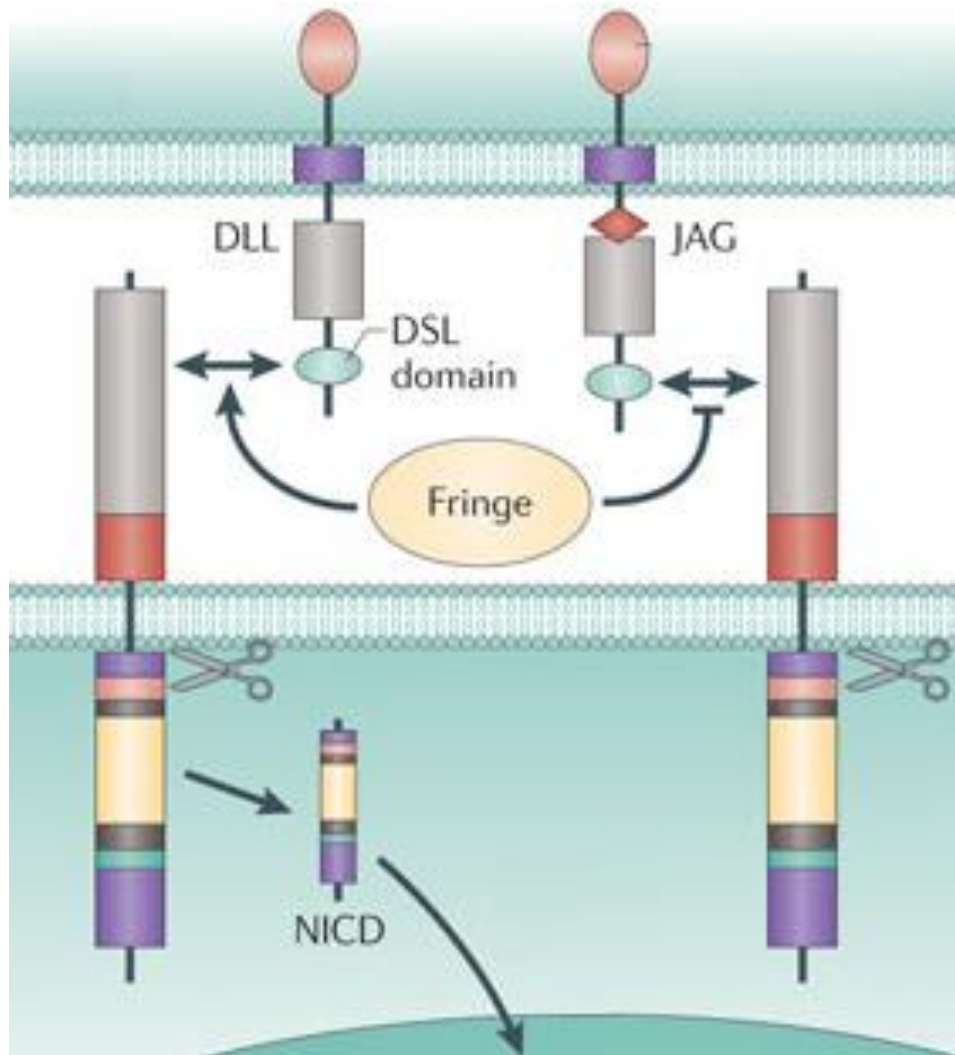


Figure 35 : Modulation de la signalisation Notch par Fringe.

L'allongement des résidus fucose *O*-liés des répétitions EGF-like de Notch, par une glycosyltransférase de la famille Fringe, favorise l'interaction avec les ligands de la famille Delta et au contraire l'inhibe avec les ligands de la famille Jagged (ou Serrate) (Ranganathan, Weaver et al. 2011).

(Bruckner, Perez et al. 2000), quel que soit le mode d'interaction, cis ou trans (Moloney, Panin et al. 2000). Au contraire, l'action de Fringe entraînerait une diminution d'affinité de liaison au ligand Jagged. Ainsi, suite à l'action de Fringe, l'interaction de NOTCH avec DLL1 est favorisée, au détriment d'une interaction avec Jagged (Hicks, Johnston et al. 2000; Kato, Kawaguchi et al. 2010) (**Figure 35**).

En fonction de leur séquence en acides aminés, Fringe aurait une préférence pour certaines répétitions EGF, comme la répétition **EGF12**, qui constitue le site principal de liaison du ligand et certaines répétitions de la région Abruptex (EGF24-29) (Shao, Moloney et al. 2003) ou de l'équivalent de cette région chez les mammifères (Sharma, Rangarajan et al. 2013). En étudiant des EGF12 produits chimiquement et renaturés, il semblerait que non seulement le résidu fucose *O*-lié, naturellement porté par la thréonine, stabilise la conformation du feuillet β antiparallèle de l'EGF12 mais aussi que l'ajout d'un GlcNAc entraîne un changement structural assez important de la région fucosylée (Hiruma-Shimizu, Hosoguchi et al. 2010), ce qui va dans le sens d'une régulation des interactions récepteur-ligand dépendante de Fringe. Les mutations des sites de *O*-fucosylation de l'EGF12 et de l'EGF26 (*O*-fucosylation potentielle) entraînent des effets contradictoires. La signalisation Notch médiée par Delta-1 et Jagged 1 est diminuée lorsque l'on mute l'EGF12 et augmentée lorsque la mutation porte sur l'EGF26 (Rampal, Li et al. 2005).

Très récemment, il a été montré de manière contradictoire que l'allongement du fucose *O*-lié de l'EGF12 par Fringe augmentait l'affinité de liaison de la protéine humaine recombinante EGF11-13 aussi bien pour DLL1 que pour Jagged1 (Taylor, Takeuchi et al. 2014). Ceci pourrait signifier que l'inhibition via Fringe de la signalisation Notch induite par Jagged (Takeuchi and Haltiwanger 2010) ferait intervenir d'autres répétitions porteuses de *O*-fucosylglycannes dans le contexte physiologique, où le NECD des récepteurs NOTCH est présent dans son intégralité. Plus largement, l'EGF12 n'est pas la seule répétition impliquée dans les interactions et l'activation de la voie Notch. En effet, les souris homozygotes pour un récepteur NOTCH1 dépourvu de fucoses *O*-liés sur leur EGF12 sont viables et fertiles et ne ressemblent donc pas aux souris KO pour *Notch1* (Ge and Stanley 2008).

Chez les mammifères, 3 gènes ayant des homologies avec le gène *fringe* de drosophile ont été isolés : *Lunatic Fringe (Lfng)*, *Manic Fringe (Mfng)* et *Radical Fringe (Rfng)*. Tous ces

gènes codent des β 1,3GlcNAc transférases golgiennes, spécifiques des fucoses *O*-liés (Munro and Freeman 2000) et exprimées de manière différentielle au cours de l'embryogenèse. En modulant les interactions récepteurs-ligands, ces enzymes de la famille Fringe vont donc jouer un rôle dans l'activation ou non de la voie Notch. Chez les mammifères, seul le gène *Lfng* est exprimé dans le PSM (Cohen, Bashirullah et al. 1997) et joue un rôle fondamental dans la régulation de l'horloge de segmentation puisqu'il fait partie des gènes cycliques. Il y inhibe l'activation de la voie de Notch par rétrocontrôle négatif (Dequeant, Glynn et al. 2006).

La délétion du premier exon de *Lfng* génère un allèle null, qui entraîne chez les souris homozygotes un phénotype de corps beaucoup plus ramassé avec des queues plus courtes et une diminution de la viabilité à la naissance et avant le sevrage (Evrard, Lun et al. 1998). Ce KO de *Lfng* entraîne des défauts importants de somitogenèse à partir du PSM, notamment dans la formation des limites (ou frontières) entre les somites, rendant ainsi leur individualisation impossible. Ceci conduit à d'importantes malformations squelettiques telles qu'un corps et une queue raccourcis, des côtes et vertèbres fusionnées ou même des vertèbres partiellement formées (Evrard, Lun et al. 1998; Stauber, Sachidanandan et al. 2009). Ces observations phénotypiques sont similaires à celles observées plus récemment chez les souris *Pofut1*^{cax/cax}, hypomorphes pour le gène *Pofut1* (Schuster-Gossler, Harris et al. 2009) (**voir chapitre III**).

I.3.3.4.2 Implication des glucoses *O*-liés et des *O*-glucosylglycanes

Pour le récepteur NOTCH1, les séquences prédites pour la *O*-glucosylation représentent quasiment la moitié des répétitions EGF-like : 16/36 (**Figure 26**). Sur ces 16 sites potentiels, 8 sites (**EGF4,9,14,16,17,19,20,27**) sont démontrés expérimentalement chez la drosophile comme étant occupés par des résidus glucose *O*-liés (Acar, Jafar-Nejad et al. 2008; Matsuura, Ito et al. 2008; Rana, Nita-Lazar et al. 2011). Il semblerait que la plupart de ces sites occupés contribuent à la modulation des interactions récepteurs-ligands et donc à l'activation de la signalisation Notch (Acar, Jafar-Nejad et al. 2008; Fernandez-Valdivia, Takeuchi et al. 2011), ce qui n'est pas surprenant puisque des glucoses *O*-liés sont présents, comme les résidus fucoses *O*-liés, au niveau de l'EGF12 et la région Abruptex (EGF27) qui sont des domaines de

liaison du ligand (Takeuchi and Haltiwanger 2014). Les glucoses *O*-liés sont surtout concentrés dans la région EGF9-20 (6 EGF/10), où ils sont la plupart du temps allongés en di- ou trisaccharides (Lee, Sethi et al. 2013).

Chez la drosophile, l'absence de Rumi chez des mutants sensibles à la température entraîne une accumulation intracellulaire et à la surface d'un récepteur Notch mal conformé, qui ne peut être clivé par ADAM10/TACE/Kuz/SUP-17 (Acar, Jafar-Nejad et al. 2008). Ces résultats démontrent bien que la *O*-glucosylation du récepteur NOTCH, au même titre que la *O*-fucosylation, module les interactions récepteurs-ligands et joue un rôle important dans l'activation de la voie de signalisation Notch. Chez la drosophile, la mutation de Shams, qui est l'enzyme responsable de l'ajout de xyloses sur les résidus glucoses *O*-liés, entraîne une inactivation de la voie Notch. L'ajout de *O*-glucoses par Rumi favoriserait donc les interactions récepteurs-ligands et donc l'activation de la voie Notch tandis que l'allongement de ces *O*-glucoses par des xyloses l'inhiberait. De manière plus précise, ce sont les résidus *O*-glucoses xylosylés de la région EGF16-20 du récepteur Notch de drosophile qui sont responsables de la diminution d'expression du récepteur Notch à la surface cellulaire (Lee, Sethi et al. 2013).

Très récemment, l'importance de *Poglut1* a été montrée chez les mammifères, homme et souris. La perte de *Poglut1* chez la souris entraîne un phénotype plus sévère et plus précoce que chez les mutants *Notch*, ce qui révèle que POGLUT1 modifie d'autres cibles que les récepteurs NOTCH. A titre d'exemple, la *O*-glucosylation de la protéine Crumbs2 favorise la gastrulation chez la souris (Ramkumar, Harvey et al. 2015). Des mutations de *Poglut1*, comme de *Pofut1*, ont été retrouvées dans certaines maladies de la peau touchant la pigmentation, comme la maladie de Dowling-Degos (Basmanav, Oprisoreanu et al. 2014).

I.3.3.4.3 Implication des *N*-acétylglucosamines *O*-liés

Les *O*-GlcNAc sont présents sur le récepteur NOTCH, au niveau des régions EGF1-10 et EGF22-32 et de l'EGF20 (Matsuura, Ito et al. 2008). Des mutations d'*Eogt1* et des anomalies dans l'activation de la voie Notch ont été rapportées dans le syndrome d'Adams-Oliver et dans deux études différentes (Hassed, Wiley et al. 2012; Cohen, Silberstein et al. 2014), ce

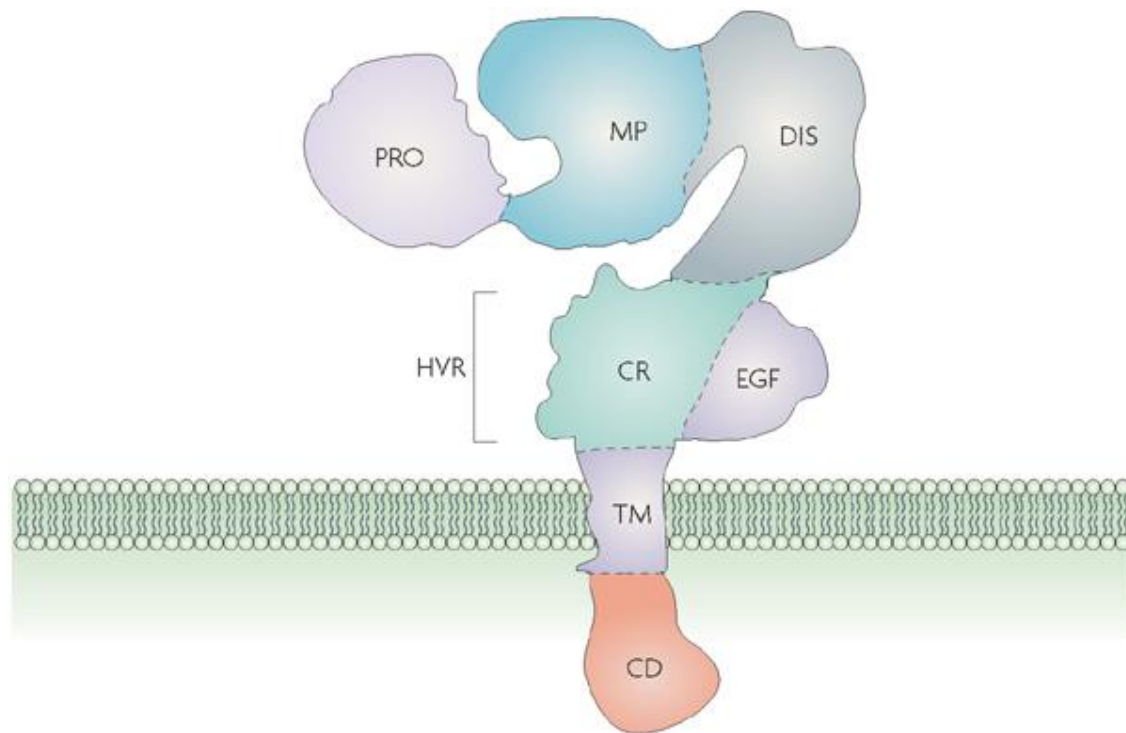


Figure 36 : Les enzymes de la famille ADAM.

Les protéines transmembranaires de la famille Adam sont des protéines modulaires avec, dans la région extracellulaire, un domaine métalloprotéase N-terminal (MP) régulé par un propeptide (Pro), un domaine catalytique de type disintégrine (Dis), un domaine riche en cystéines (CR) et un domaine EGF-like (EGF). Elles possèdent un seul domaine transmembraniare (TM) et possèdent différents sites de liaison SH3 dans leur domaine cytoplasmique C-terminal (CD) (Murphy 2008)

qui suggère que les *O*-GlcNAc jouent aussi un rôle dans la modulation des interactions NOTCH-ligands.

I.3.3.5 Modulation des interactions par l'*O*-glycosylation des ligands

Les ligands de Notch de drosophile, Delta et Serrate, sont *O*-fucosylés (Panin, Shao et al. 2002). Des analyses par spectrométrie de masse ont montré que les répétitions EGF-like 3, 4, 7 et 8 de DLL1 de souris étaient également *O*-fucosylés (Muller, Rana et al. 2014). Ces *O*-fucosylations ne semblent pas impacter la fonction des ligands chez la drosophile ou chez les mammifères (Muller, Rana et al. 2014), contrairement à ce que l'on observe pour les récepteurs NOTCH.

I.3.4 Clivages protéolytiques des récepteurs NOTCH

Suite aux interactions récepteurs-ligands, le site S2 de la région NRR du récepteur est exposé et clivé par des protéases de la famille ADAM. Ce clivage protéolytique est nécessaire à l'activation de la voie Notch et indispensable à l'exposition ultérieure du site S3, dont le clivage par le complexe de la gamma-sécrétase conduira à la libération de NICD.

I.3.4.1 Clivage du site S2 et devenir du NECD

Les protéases majoritairement impliquées dans le clivage du site **S2** sont des protéases de la famille **ADAM**, qui sont des protéines à un seul passage transmembranaire impliquées dans la protéolyse de protéines de surface cellulaire, modulant ainsi les interactions cellule-cellule et cellule-matrice (Blobel 2005). Ces protéases ADAM possèdent principalement un domaine catalytique de type métalloprotéase dont l'activation dépend du zinc, un domaine disintégrine et un domaine riche en cystéines (**Figure 36**). La protéolyse des récepteurs NOTCH et de leurs ligands émerge comme l'une des fonctions clés des ADAM protéases. ADAM17, appelée aussi *TACE* (tumor necrosis factor- α -converting enzyme), a été la première protéase incriminée dans ce clivage du récepteur NOTCH (Brou, Logeat et al. 2000; Mumm, Schroeter et al. 2000). Pourtant, chez la souris, ADAM10 serait la protéase majoritairement impliquée dans l'activation de la voie Notch. En effet, la perte de *TACE/ADAM17* n'entraîne pas de phénotype aussi marqué que celui observé chez les souris KO pour *Notch1* (Peschon, Slack et al. 1998). Par contre, les souris déficientes en *ADAM10*

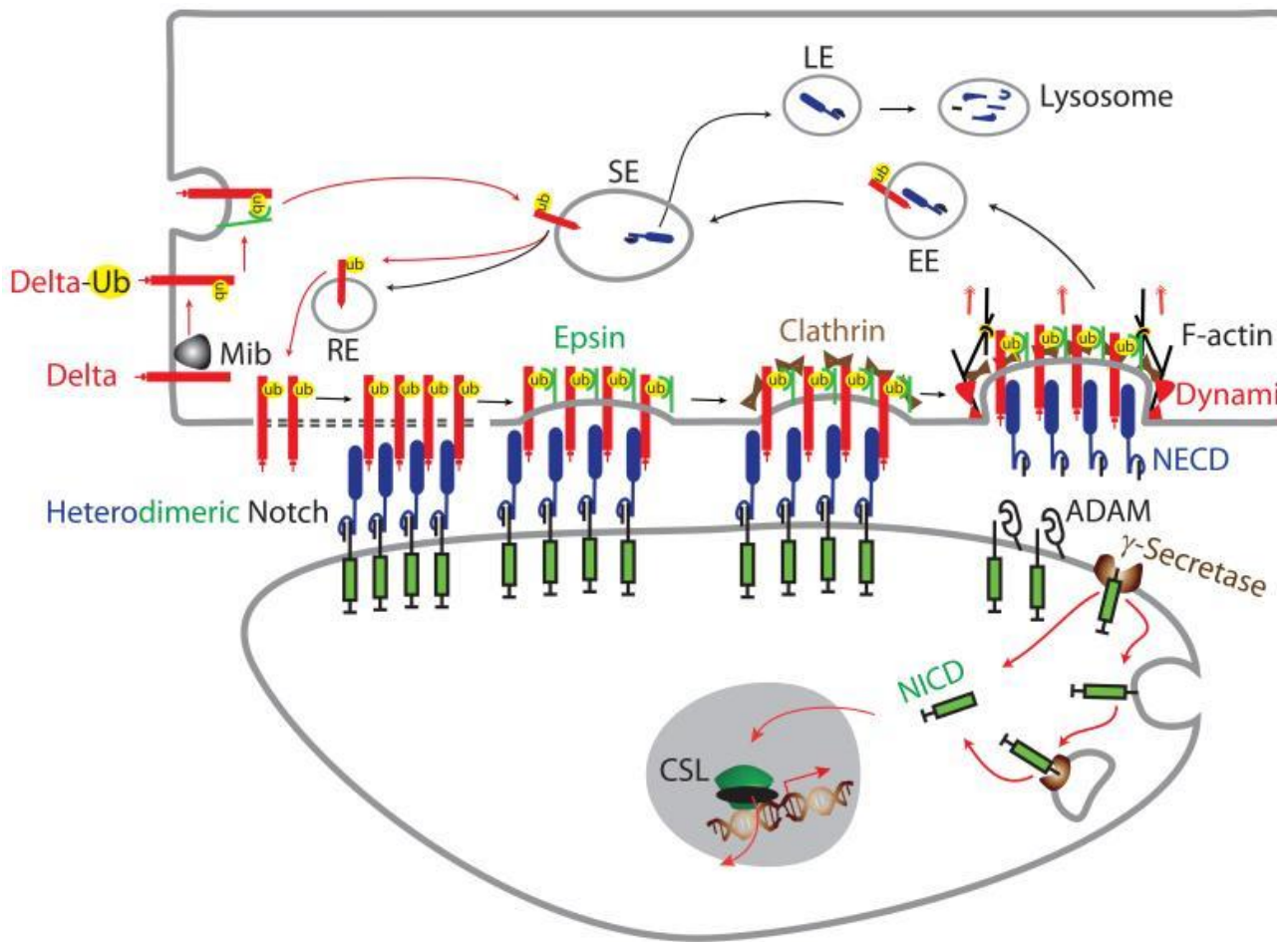


Figure 37 : Modèle d'activation de la voie Notch par une cellule exprimant le ligand Delta.

Avant toute interaction avec le récepteur Notch, le ligand Delta exprimé à la surface de la cellule émettrice est activé par ubiquitinylation via Mib puis internalisé suite à l'interaction de son ubiquitine avec l'epsine. Il sera ensuite soit dégradé par les lysosomes soit ré-exprimé à la surface, pour interagir avec un récepteur Notch de la cellule réceptrice. Par recrutement de l'epsine puis de la clathrine, les ligands ubiquitinylés commencent à être endocytés par la cellule émettrice, ce qui génère des forces de traction à l'égard du récepteur Notch. Le récepteur Notch se retrouve à l'état dissocié : le NECD reste lié à son ligand puis est endocyté par la cellule émettrice pour être soit dégradé par les lysosomes soit recyclé et ré-exprimé à la surface afin d'activer à nouveau d'autres cellules adjacentes. Le récepteur Notch, débarrassé de son NECD, expose alors son site S2 au clivage protéolytique par une ADAM protéase. Par la suite, le clivage des sites S3/S4 par le complexe de la gamma-sécrétase entraîne la libération du NICD et la translocation de celui-ci au noyau pour activer des gènes cibles(D'Souza, Meloty-Kapella et al. 2010).(EE, Early endosome, LE, late endosomes, RE, recycling endosomes, SE, sorting endosomes)

montrent une létalité à E9.5 (Hartmann, de Strooper et al. 2002), avec un phénotype sévère similaire à celui des souris KO pour *Notch1* (Shi and Stanley 2003) ou double KO pour les γ -sécrétases appelées présénilines 1 et 2 (Herreman, Hartmann et al. 1999). Il semblerait en fait que ADAM10 soit impliquée dans la voie canonique de Notch, où le clivage du récepteur est la conséquence de la fixation d'un ligand alors que ADAM17 serait plus incriminée dans la voie non canonique de Notch, indépendante de la fixation des ligands (Bozkulak and Weinmaster 2009).

Des études structurales, basées sur la cristallisation de la région NRR de NOTCH2 humain, révèlent que la région NRR est dans une conformation inactive dite « d'auto-inhibition » en l'absence de ligand (Gordon, Vardar-Ulu et al. 2007). Au sein de cette région globulaire NRR, le site de clivage extracellulaire S2 est profondément enfoui en raison d'une interaction importante entre le domaine LNR et le domaine d'hétérodimérisation (HD), qui possèdent tous deux des structures de type α - β -sandwich étroitement entrelacées pour maintenir la région NRR dans cette configuration inactive (Chillakuri, Sheppard et al. 2012). Une étude par RMN a montré que chacune des trois répétitions LNR est stabilisée par trois ponts disulfures et un ion calcium (Vardar, North et al. 2003). Le rôle de cet ion Ca^{2+} est important dans le maintien de l'état inactif de la région NRR puisqu'en son absence, on observe une activation du récepteur avec libération du NICD de manière indépendante du ligand (Rand, Grimm et al. 2000). En temps normal, le site S2 n'est pas accessible pour le clivage S2 par les ADAM. L'interaction du récepteur avec son ligand induit une invagination de la cellule émettrice (qui porte le ligand lié au NECD) avec ou sans changement conformationnel au niveau du site S2, ce qui va permettre l'exposition de ce site et donc son clivage (Chillakuri, Sheppard et al. 2012) (**Figure 37**).

En cas d'absence d'interaction avec le récepteur NOTCH, le ligand Delta est la cible d'une ubiquitinylation par **Mib**, avant d'être endocyté avec l'epsine par la cellule émettrice puis recyclé à la membrane en tant que ligand capable de se fixer à son récepteur (D'Souza, Meloty-Kapella et al. 2010) (**Figure 37**). Le ligand, qui se lie au récepteur NOTCH de la cellule réceptrice, recrute l'epsine via son ubiquitinylation, ce qui conduit à la formation d'invaginations de la cellule émettrice, recouvertes de clathrine. Ce sont ces invaginations de la cellule émettrice qui permettent de générer une force physique nécessaire à la

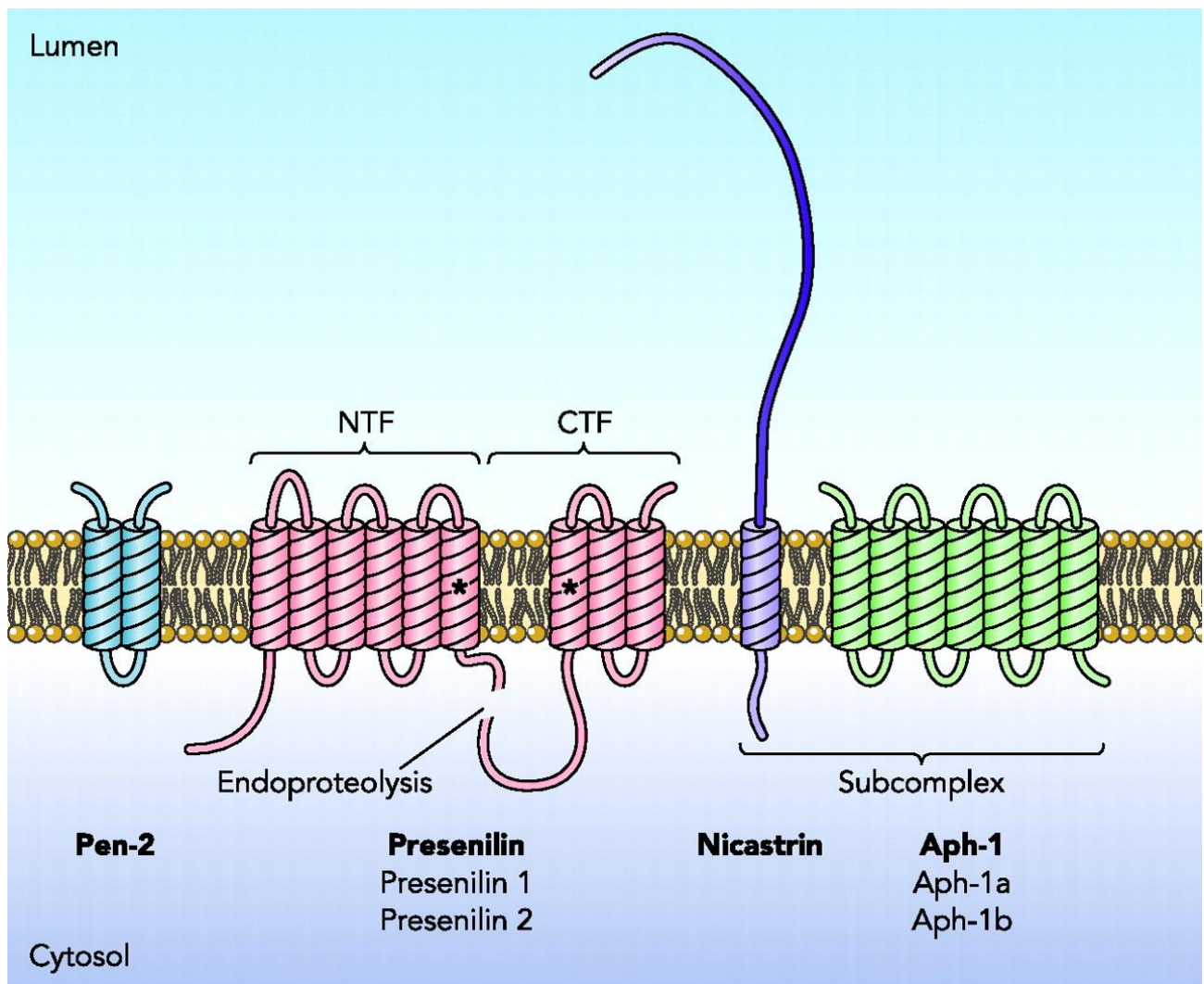


Figure 38 : Le complexe de la γ -sécrétase.

Le complexe de la γ -sécrétase est composé de quatre protéines transmembranaires hydrophobes : la préséniline, la nicastrine, Aph-1 (2 isoformes : Aph-1a et 1b) et Pen-2. La Préséniline (2 isoformes : préséniline 1 et 2) contient le domaine catalytique du complexe, impliquant deux résidus aspartates localisés dans les segments transmembranaires 6 et 7 (astérisques). Une fois les 4 protéines assemblées, le préséniline subit une endoprotéolyse au niveau de la boucle unissant les segments transmembranaires 6 et 7, ce qui n'empêche ses domaines N-terminal (NTF) et C-terminal (CTF) de rester associés de manière non covalente (Wakabayashi and De Strooper 2008).

dissociation du récepteur NOTCH (mécanisme lift and cut) (Fortini 2009; Chillakuri, Sheppard et al. 2012) : le NECD reste accroché au ligand et est alors endocyté par la cellule émettrice. Une fois internalisé, ce complexe ligand-NECD se dissocie dans les endosomes précoces. Le ligand sera ensuite recyclé et le NECD dégradé par les lysosomes de la cellule émettrice. Le récepteur NOTCH ainsi débarrassé de sa partie extracellulaire, suite au clivage du site S2 par une ADAM protéase, s'expose alors à d'autres clivages protéolytiques par le complexe de la γ -sécrétase.

I.3.4.2 Clivage des sites S3/S4 et devenir du NICD libéré

Une fois le clivage S2 réalisé, le **complexe de la γ -sécrétase** va pouvoir cliver les sites protéolytiques membranaires (**S3/S4**) du récepteur NOTCH. Le clivage du site S3 de NOTCH, entre les résidus **G1743 et V1744** (Schroeter, Kisslinger et al. 1998), permet la libération du NICD, qui sera transloqué au noyau pour activer les gènes cibles et le clivage au niveau du site **S4** va libérer le peptide N β (Okochi, Steiner et al. 2002).

Ce complexe de la γ -sécrétase comprend 4 sous-unités, dont la nicastrine, la protéine précurseur de l'amyloïde (APP), la préséniline et enfin PEN-2 (presenilin enhancer 2) qui stabilise le complexe (**Figure 38**). Le rôle catalytique de la préséniline vis-à-vis du récepteur NOTCH a été mis en évidence chez la souris (De Strooper, Annaert et al. 1999) et la drosophile (Struhl and Greenwald 1999), en montrant que cette préséniline entraînait bien la libération du NICD après interaction d'un ligand avec le récepteur NOTCH. Il a été montré aussi que cette préséniline pouvait cliver plusieurs protéines membranaires de type I telles que le récepteur NOTCH et la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) (De Strooper, Annaert et al. 1999) à l'origine de la formation des plaques amyloïdes du cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Xia and Wolfe 2003). Parmi plus de 60 autres protéines proposées comme substrats de la γ -sécrétase (De Strooper, Iwatsubo et al. 2012), plusieurs ligands DSL de mammifères et d'invertébrés sont des cibles potentielles. Toutefois, si cette protéolyse des ligands est effective, sa signification réelle dans la signalisation Notch reste à déterminer. Elle pourrait contribuer à réguler l'expression des ligands à la surface des cellules ou à générer des fragments intracellulaires solubles, qui à l'image du NICD iraient activer des gènes cibles (LaVoie and Selkoe 2003).

Les KO de la préséniline ou son inhibition par des inhibiteurs de γ -sécrétase conduisent, comme pour les KO des acteurs de la voie Notch (*Rbpj*, *Hes*) (Fukada, Yamaguchi et al. 2011; Bjornson, Cheung et al. 2012; Mourikis, Gopalakrishnan et al. 2012), à une forte diminution d'activation de la voie Notch. En effet, empêcher le clivage efficace du site S3 entraîne une diminution importante de la quantité intracellulaire de NICD clivé et par conséquent une diminution d'activation des gènes cibles. Cependant, les souris Knock-in possédant un récepteur NOTCH1 muté sur son site S3 (**V1744G**) présentent un phénotype hypomorphe dans l'expression des gènes cibles de la voie Notch, montrant que le clivage du NICD est certes moindre mais possible. En effet, il a été montré que le clivage du site S3 ne se faisait pas uniquement entre les résidus G1743 et V1744 mais également à trois autres positions situées plus en aval (entre les résidus 1744-1745 (site +1), 1745-1746 (site +2), 1746-1747 (site +3)) (Tagami, Okochi et al. 2008). Bien que le site S3 soit le site le plus efficacement clivé par le complexe de la γ -sécrétase, il semblerait que tous les sites le soient. Cependant, il semblerait que seul le clivage entre les résidus G1743 et V1744 entraîne la libération d'un NICD stable, capable d'activer la voie Notch de manière efficace.

I.3.5 Interactions du NICD avec d'autres protéines nucléaires

Une seule protéine nucléaire est capable de lier le NICD et répondre à l'activation de la voie Notch. Il s'agit du **CSL (CBF1/Su(H)/Lag-1)** (Kopan and Ilagan 2009), **appelée CBF1 ou RBP-Jk** chez les vertébrés. **Le CSL est une protéine de liaison à l'ADN**, qui interagit avec de nombreuses protéines et qui participe à la formation soit de complexes répresseurs avec les histones désacétylases (HDAC) soit de complexes activateurs avec le NICD et d'autres protéines comme les histones acétyltransférases (HAT), qui déroulent la chromatine (Kopan 2012).

Le CSL peut former un complexe répresseur, en s'associant avec des co-activateurs (p300/CBP) et d'autres protéines co-répresseurs (SMRT, SPEN, ...) (Fiuza and Arias 2007). La chromatine est maintenue dans un état transcriptionnel silencieux et l'ARN polymérase II ne peut donc pas transcrire les gènes cibles. Dans la plupart des conditions physiologiques, les récepteurs NOTCH non liés sont dégradés dans les lysosomes. Au contraire, lors de l'activation de la voie de signalisation Notch, le récepteur NOTCH qui a fixé un ligand est clivé et le NICD libéré. Une fois transloqué au noyau, le NICD s'associe au CSL par sa région

multi-domaines RAM/Ankyrine/TAD et recrute le co-activateur MASTERMIND (MAML) pour former un complexe protéique activateur. Le trimère CSL/NICD/MAML autorise le recrutement d'autres co-activateurs nucléaires comme l'histone acétyltransférase p300, qui va permettre de décompacter la chromatine et autoriser la transcription des gènes cibles par l'ARN polymérase II. La liaison de MAML à p300 et à une CDK8 dépendante des cyclines (Fryer, White et al. 2004) permet la phosphorylation de p300 et l'hyperphosphorylation du domaine PEST du NICD, qui va être ubiquitinylé par Fbw7/Sel10 (Hubbard, Wu et al. 1997). Ainsi, le complexe activateur pourra être désassemblé pour éviter une activation continue du signal. L'importance de RBP-Jk dans la voie de Notch a été montrée en utilisant une lignée fibroblastique obtenue à partir d'embryons RBP-Jk^{-/-} et transfectée avec une construction codant le NICD. Dans ces conditions expérimentales, aucune trans-activation de Notch n'est possible sauf après addition d'une construction permettant l'expression d'un RBP-Jk exogène. Ceci démontre le rôle fondamental de RBP-Jk dans l'activation des gènes cibles de la voie Notch (Kato, Taniguchi et al. 1997). RBP-Jk est impliqué dans le maintien de l'état indifférencié de progéniteurs musculaires et la formation des cellules satellites (Vasyutina, Lenhard et al. 2007).

Les embryons Rbp-jk^{-/-} meurent au stade embryonnaire E9.5, après formation de quelques somites désorganisés et d'autres défauts (Oka, Nakano et al. 1995). Le phénotype des embryons Rbp-jk^{-/-} est légèrement plus sévère que celui des embryons Notch1^{-/-}, ce qui montre que les autres récepteurs NOTCH ne peuvent pas activer non plus leurs gènes cibles par la voie canonique.

I.3.6 Gènes cibles de la voie Notch

Selon le contexte et les organes considérés au cours du développement embryonnaire chez les vertébrés, les gènes cibles de Notch seront activés de manière différentielle par le complexe de transcription de Notch (associant notamment NICD, CSL et MAML) au cours de la stimulation de la voie canonique ligand-dépendante (Cave 2011).

Parmi les gènes cibles les plus décrits, on retrouve les gènes des familles *Hes* (*hairy* and enhancer of split-1) et *Hey* (*Hairy-related transcription factor*), qui codent des facteurs de transcription jouant le rôle de répresseurs transcriptionnels. Sur le plan structural, ils

	Expression	Fonction	Référence
Hes1	<i>CNS, PNS</i>	Répression de la neurogenèse	(Ishibashi, Ang et al. 1995; Ohtsuka, Ishibashi et al. 1999)
	<i>PSM (cyclique)</i>	Pas connue	(Jouve, Palmeirim et al. 2000)
Hes2	<i>CNS, PNS</i>	Pas connue	(Nishimura, Isaka et al. 1998)
Hes3	<i>CNS, PNS</i>	Répression de la neurogenèse	(Hirata, Hibasami et al. 2001; Hatakeyama, Bessho et al. 2004)
Hes4	(absent chez la souris)		
Hes5	<i>CNS, PNS</i>	Répression de la neurogenèse	(Ohtsuka, Ishibashi et al. 1999)
	<i>PSM (cyclique)</i>	Pas connue	(Dunwoodie, Clements et al. 2002)
Hes6	<i>CNS, PNS</i>	Initiation de la neurogenèse (antagoniste Hes1)	(Bae, Bessho et al. 2000)
Hes7	<i>PSM (cyclique)</i>	Segmentation des somites	(Bessho, Miyoshi et al. 2001)

Tableau 3 : Sites d'expression et fonctions des gènes *Hes*.

(Adapté de (Kageyama, Ohtsuka et al. 2007)). Mettre l'abréviation dans la légende du tableau (Système Nerveux Central, ...)

contiennent, comme les MRFs, un domaine basique associé à un domaine hélice-boucle-hélice (bHLH) (**Figure 11**).

Dans de nombreux organes, la prolifération et la différenciation cellulaires sont régulées par les gènes de la famille *Hes*, qui jouent un rôle dans le maintien des cellules progénitrices et en régulent le destin cellulaire (Kageyama, Ohtsuka et al. 2007). Il existe sept membres de la famille *Hes* (*Hes1-7*) mais *Hes 4* est absent chez la souris (**Tableau 3**). Certains membres de la famille *Hes*, tels que *Hes1*, *Hes5* et *Hes7* peuvent réguler leur propre expression par un rétrocontrôle négatif et sont impliqués dans l'activité oscillatoire du PSM et donc dans l'horloge de segmentation somitique (Dequeant, Glynn et al. 2006) (**Figure 7**).

Chez les mammifères, les gènes cibles de Notch les plus décrits sont les facteurs de transcription *Hes1*, *Hes5* et *Hey1* (Kageyama and Ohtsuka 1999) et peuvent être activés suite à la signalisation induite par NOTCH1, comme c'est le cas aussi de *Hes7*, *Hey2* et *HeyL* (sous-famille des *Hes*, avec le motif YRPW). *Hey1* et *Hey2* endogènes sont positivement régulés par le NICD dans différentes lignées cellulaires (Iso, Sartorelli et al. 2001).

Parmi les autres gènes cibles de la voie de Notch, on retrouve *Nrarp* chez les embryons de Xénope, qui exerce un rétrocontrôle négatif sur la voie de Notch en codant une protéine capable de se complexer directement avec le CSL et le NICD de NOTCH1, ce qui réduit les quantités de NICD disponibles pour activer d'autres gènes cibles (Lamar, Deblandre et al. 2001). L'expression de la protéine Deltex chez la drosophile peut être régulée également par le NICD. Cette protéine cytosolique est capable de se fixer aux répétitions Ankyrine du domaine intracellulaire de NOTCH (Diederich, Matsuno et al. 1994) et de jouer un rôle de régulateur dans sa signalisation (Matsuno, Diederich et al. 1995). Les homologues murins pour *Deltex* (*Deltex 1, 2, 3* et *Deltex2DeltaE*) sont impliqués dans la signalisation Notch et la neurogenèse (Kishi, Tang et al. 2001). Le rôle de DELTEX dans la signalisation Notch n'est pas clair puisque tantôt elle l'active (Matsuno, Diederich et al. 1995) tantôt elle l'inhibe (Sestan, Artavanis-Tsakonas et al. 1999). En plus de son domaine de liaison aux répétitions Ankyrine de NOTCH (Zweifel, Leahy et al. 2005), elle possède une activité E3 ubiquitine ligase (Takeyama, Aguiar et al. 2003) et pourrait donc ubiquitinyler NOTCH et jouer un rôle dans son endocytose.

	Ligand	Ligand Structure	Notch-binding region of ligand	Ligand-binding region of Notch	Effect on Notch signaling
INTEGRAL MEMBRANE-BOUND	Dlk-1/Pref-1	EGF-like (6 cys) TM	EGF1-2 or EGF5-6	EGF10-11 or EGF12-13	<i>cis</i> -inhibition/ <i>trans</i> -activation?
	DNER	EGF-like (8 cys)	DNER EGF1-2	Full-length*	<i>trans</i> -activation
	Jedi	EMI EGF-like (8 cys)	Not tested	Not tested	inhibition (as secreted protein)
GPI-LINKED MEMBRANE-BOUND	F3/Contactin1	IgCAM FNIII GPI	Full-length*	EGF1-13, EGF 22-34	<i>trans</i> -activation
	NB3/Contactin6	IgCAM FNIII GPI	Full-length*	EGF22-34	<i>trans</i> -activation
SECRETED	scabrous	Q FReD	Full-length*	Full-length*	<i>trans</i> -activation
	wingless	S-palmitoylation site	Full-length*	EGF19-36	<i>trans</i> -activation
	OSM-11	DQS	Full-length*	EGF1-6	<i>trans</i> -activation
	CCN3/NOV	IGFBP TSP-1 VWF-C CTCK	C-terminal cysteine knot	EGF repeats	<i>cis</i> -activation/ modulator?
	MAGP-2	MBD Q	Matrix binding domain	EGF repeats	<i>cis</i> -activation/ modulator?
	MAGP-1	MBD RGD	Full-length*	Full-length*	<i>cis</i> -activation/ modulator?
	TSP2	NT Coiled-coil VWF-C TSP-1 Calcium-binding wire Lectin-like module	Full-length*	EGF1-11	Agonist** (<i>cis</i>)
	YB-1	NT CSD Charged zipper	Full-length*	EGF13-33	<i>cis</i> -activation
	EGFL7	EMI EGF-like (6 cys)	Emilin domain and EGF1-2	EGF7-12 (N1, N2, N4), EGF6-11 (N3)	antagonist (<i>cis</i> and <i>trans</i>)***, agonist (<i>cis</i>)****

Figure 39 : Les ligands non-canoniques de Notch.

Les ligands non-canoniques de Notch ne comportent pas de domaines DSL mais peuvent avoir des répétitions EGF-like comme Dlk-1, DNER et Jedi, qui sont toutes des protéines membranaires intégrales impliquées dans la *trans*-activation et/ou la *cis*-inhibition. D'autres ligands non canoniques peuvent être à ancrage GPI ou sécrétés. C'est parmi ces derniers que se trouve la plus grande diversité structurale (D'Souza, Meloty-Kapella et al. 2010).

D'autres gènes cibles de Notch ont été décrits dans divers contextes physiologiques et/ou pathologiques. A titre d'exemple, la voie de Notch, en activant le gène *cd25* (récepteur à l'interleukine 2), joue un rôle dans l'engagement de cellules progénitrices vers des cellules de la lignée T. La fixation du NICD sur le CSL peut aussi entraîner l'activation du gène codant la chaîne α du pré-TCR (*pT α*) et du gène *Gata3*, induisant ainsi la différenciation T (Deftos and Bevan 2000; Amsen, Antov et al. 2007; Fang, Yashiro-Ohtani et al. 2007). D'autres gènes cibles de Notch peuvent être ou non associés au cancer selon leurs niveaux d'expression tels que *c-Myc* dans les lymphomes et leucémies (Weng, Millholland et al. 2006) et les gènes codant la cycline D1 (Ronchini and Capobianco 2001) et *p21/Waf1* (Rangarajan, Talora et al. 2001).

Enfin, d'autres gènes cibles de Notch ont été découverts tels que ceux codant *NF-kappaB2* (Oswald, Liptay et al. 1998), *Ifi202*, *Ifi204*, *IfiD3* et *ADAM19* (Deftos and Bevan 2000) mais aussi *Notch1* et *Notch3* eux-mêmes (Weng, Millholland et al. 2006). La liste est loin d'être exhaustive puisque l'expression de tous ces gènes cibles dépend du contexte et du type cellulaire chez de nombreuses espèces.

I.4 La voie non canonique de Notch

Les ligands canoniques de NOTCH de la famille DSL sont responsables majoritairement de la signalisation Notch, impliquée dans divers processus fondamentaux et décisions cellulaires. Cependant, il existe également des ligands dits non canoniques, sans DSL et avec d'innombrables structures différentes (protéines membranaires intégrales ou à ancrage GPI et protéines sécrétées) (**Figure 39**), qui pourraient activer Notch et ainsi avoir des effets pléiotropes (D'Souza, Meloty-Kapella et al. 2010). Ces ligands non canoniques peuvent conduire soit à des cis-inhibitions (inhibiteurs naturels) soit à des trans-activations de la voie Notch. A titre d'exemple, le ligand non canonique DLK1 (Delta-like 1), qui est une protéine intégrale ne contenant que 6 répétitions EGF-like dans sa partie extracellulaire, ne serait capable d'interagir qu'en cis avec le récepteur NOTCH. DLK-1 peut être clivé par une ADAM protéase et conduire majoritairement à une cis-inhibition de la voie Notch.

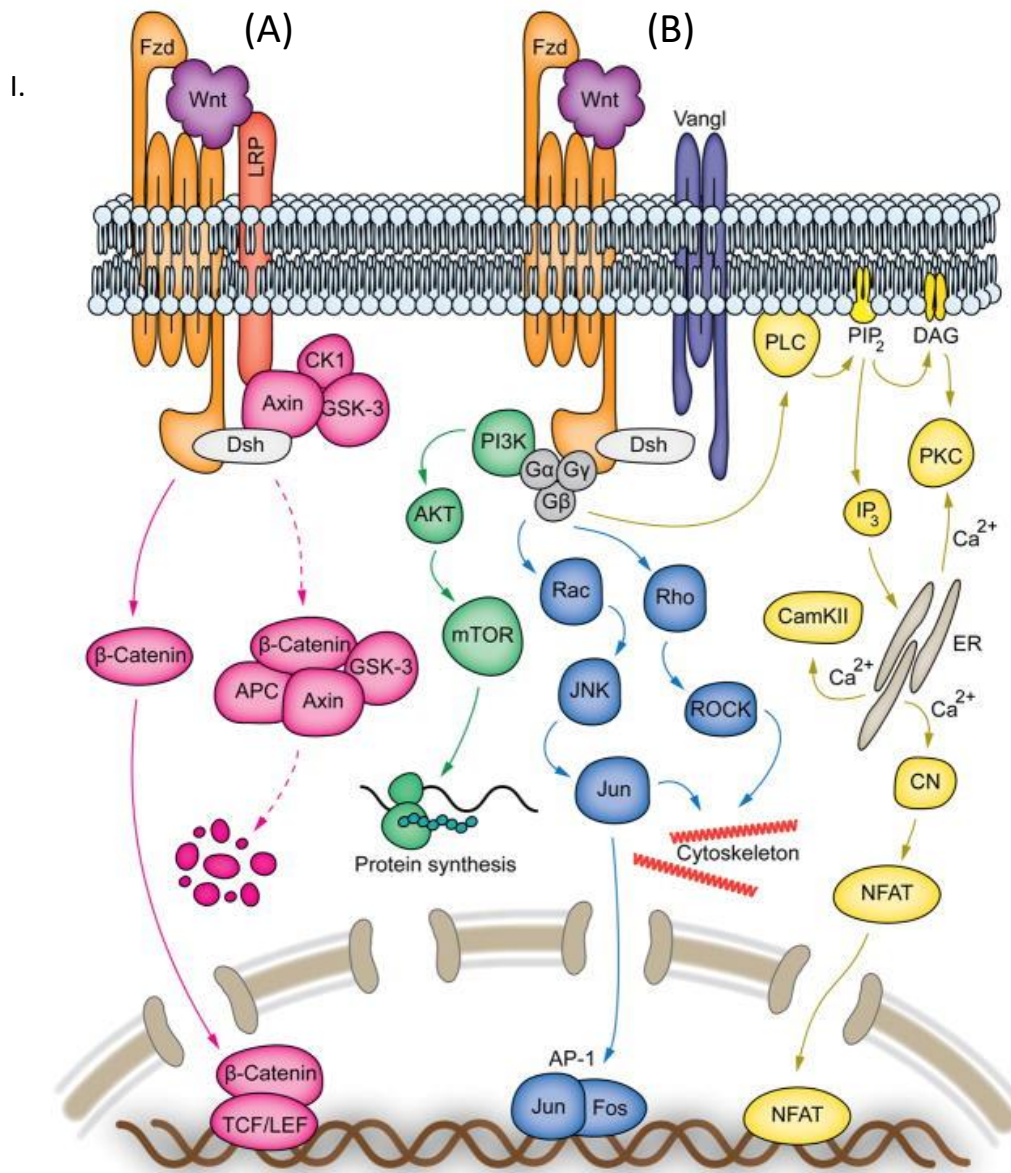


Figure 40 : La voie de signalisation canonique et non canonique de Wnt.

(A) La voie canonique de Wnt est médiée par les récepteurs Frizzled (Fzd) associés aux co-récepteurs LRP. En l'absence de Wnt, la β -caténine forme un complexe de dégradation avec APC, l'axine et GSK-3 (flèche rose en pointillés). Dans ce complexe, la β -caténine est phosphorylée pour être ensuite dégradée par le protéasome après polyubiquitinylation. La liaison de Wnt aux récepteurs Fzd/LRP induit la phosphorylation de la protéine dishevelled (Dsh), qui entraîne l'inactivation du complexe de dégradation et l'accumulation de la β -caténine dans le cytoplasme. Celle-ci est alors transloquée dans le noyau où elle se lie avec les facteurs de transcription TCF/LEF pour activer les gènes cibles. **(B)** La voie non-canonique de Wnt est médiée par le récepteur Fzd seul. L'interaction de Wnt avec le récepteur peut conduire à l'activation de la voie PI3K/AKT/mTOR, via les petites protéines G hétérotrimériques. L'activation de cette voie favorise la synthèse des protéines (en vert) et serait impliquée dans l'hypertrophie des fibres musculaires. La signalisation non-canonique de Wnt médiée par les protéines G ($G\alpha$, $G\beta$, $G\gamma$ en gris) permet également, suite à une cascade d'activations, d'activer Jun qui entre dans le noyau pour activer d'autres gènes cibles de Wnt Fos. Enfin, une dernière voie non-canonique (Wnt/ Ca^{2+}) est impliquée dans certains processus comme l'adhésion et le mouvement cellulaire au cours de la gastrulation. Dans cette voie Wnt/ Ca^{2+} , il y a activation de la phospholipase C (PLC), qui clive le PIP_2 en deux second messagers : le diacylglycérol (DAG) et l'inositol tri-phosphate (IP_3). IP_3 stimule la libération de calcium par le réticulum endoplasmique, activant ainsi de nombreuses kinases dépendantes du calcium comme PKC et CamKII ainsi que la calcineurine (CN) phosphatase, qui active le facteur de transcription NFAT (facteur nucléaire des cellules T activées) (von Maltzahn, Chang et al. 2012).

II. Autres voies de signalisation impliquées dans la myogenèse

Le développement musculaire est un processus finement régulé. En dehors de la voie Notch, plusieurs autres voies de signalisation agissent en synergie pour permettre la myogenèse et la croissance musculaire postnatale, en contrôlant notamment l'équilibre entre synthèse et dégradation protéique. Dans cette partie, je parlerai brièvement des voies majoritairement impliquées, telles que les voies **Wnt**, **IGF-1/Akt/mTOR** et **myostatine**.

II.1 La voie de signalisation Wnt

Les protéines **Wnt** constituent une grande famille de 19 membres (Miller 2002). Elles régulent de nombreux processus tels que la prolifération cellulaire, la polarité cellulaire et la détermination des destinées cellulaires dans le développement embryonnaire ainsi que l'homéostasie tissulaire chez l'adulte (Logan and Nusse 2004; MacDonald, Tamai et al. 2009). Elles jouent également un rôle dans **le maintien de l'état indifférencié des cellules souches** (Katoh 2008).

Les interactions Wnt-récepteurs peuvent donc provoquer une variété de réponses intracellulaires (Nusse 2012), suite à l'activation du complexe de transcription **β -caténine/TCF** de la voie Wnt canonique (**Figure 40**). En l'absence des protéines Wnt, plusieurs complexes protéiques impliquant notamment les protéines APC (polypose adénomateuse coli) et l'axine favorisent la phosphorylation de la β -caténine par la sérine/thréonine kinase GSK3- β (glycogène synthase kinase-3). La β -caténine phosphorylée sera polyubiquitinylée pour être dégradée par le protéasome (Katoh 2008). Les Wnt (ou Wingless type), qui sont des **glycoprotéines sécrétées**, peuvent **former un complexe ternaire avec leurs récepteur Frizzled (Fz)** et corécepteur LRP5/6 (Lipoprotein related protein 5/6) (**Figure 40**). La formation du complexe trimérique Wnt/Fz/LRP va permettre l'activation de la voie canonique Wnt dépendante de la β -caténine, en recrutant l'Axine et la protéine Dishevelled (Dsh)) (Katoh 2008; Asciutti, Akiri et al. 2011). La fixation de la protéine

Dsh inhibe l'action de phosphorylation de la kinase GSK3- β sur la β -caténine. La β -caténine non phosphorylée sera donc stabilisée, accumulée et transloquée au noyau où elle va interagir avec différents facteurs de transcription nucléaires de la famille TCF/LEF (T-Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor) pour activer des gènes cibles (Kawano and Kypta 2003). La β -caténine fonctionne donc comme un co-activateur transcriptionnel pour induire l'expression des gènes cibles qui contrôlent plusieurs processus biologiques tels que la myogenèse embryonnaire dans les somites (Abu-Elmagd, Robson et al. 2010).

II.2 La voie de signalisation IGF-1

L'IGF1 ou insulin-like growth factor-1 est une hormone peptidique ressemblant à l'insuline jouant le rôle de facteur de croissance majeur chez l'adulte alors qu'IGF2 serait prépondérant au stade fœtal. Sous l'action de l'hormone de croissance (GH), le foie sécrète IGF1 qui peut ainsi rejoindre différentes cibles cellulaires dont les muscles, qui portent à leur surface des récepteurs à l'IGF1 et à l'insuline. L'existence de protéines de liaison, appelées IGFBPs (insulin-like growth factor binding proteins), permet de limiter les effets d'IGF1 en le séquestrant et jouent ainsi un rôle de régulateur négatif.

Le récepteur à l'IGF1 (IGF-1R) est tétramérique (2 sous-unités α reliées à 2 sous-unités β transmembranaires) comme le récepteur à l'insuline et peut interagir avec IGF-1 ou IGF-2 (et plus faiblement avec l'insuline) tandis que le récepteur à l'IGF2 (IGF-2R), qui est de structure monomérique, ne peut lier qu'IGF2 et ne possède pas d'activité catalytique (Vigneri, Tirro et al. 2015). **L'IGF1R est généralement considéré comme un récepteur contrôlant la croissance cellulaire**, contrairement au récepteur à l'insuline qui contrôle plutôt le métabolisme énergétique. L'IGF-1R peut donc réguler la prolifération cellulaire mais aussi la survie (protection contre l'apoptose) et l'angiogenèse. Il est impliqué, comme le récepteur à l'insuline (IR), dans la formation et la progression tumorale chez l'homme (Frasca, Pandini et al. 2008). Les protéines de liaison à l'IGF1 (IGF-BP) peuvent donc agir comme suppresseurs de tumeur en limitant la biodisponibilité de l'IGF1 (Bowers, Rossi et al. 2015), bien que d'autres travaux aient suggéré que ces IGFBP pouvaient aussi avoir des effets pro-tumoraux, indépendamment d'IGF1 (Firth and Baxter 2002).

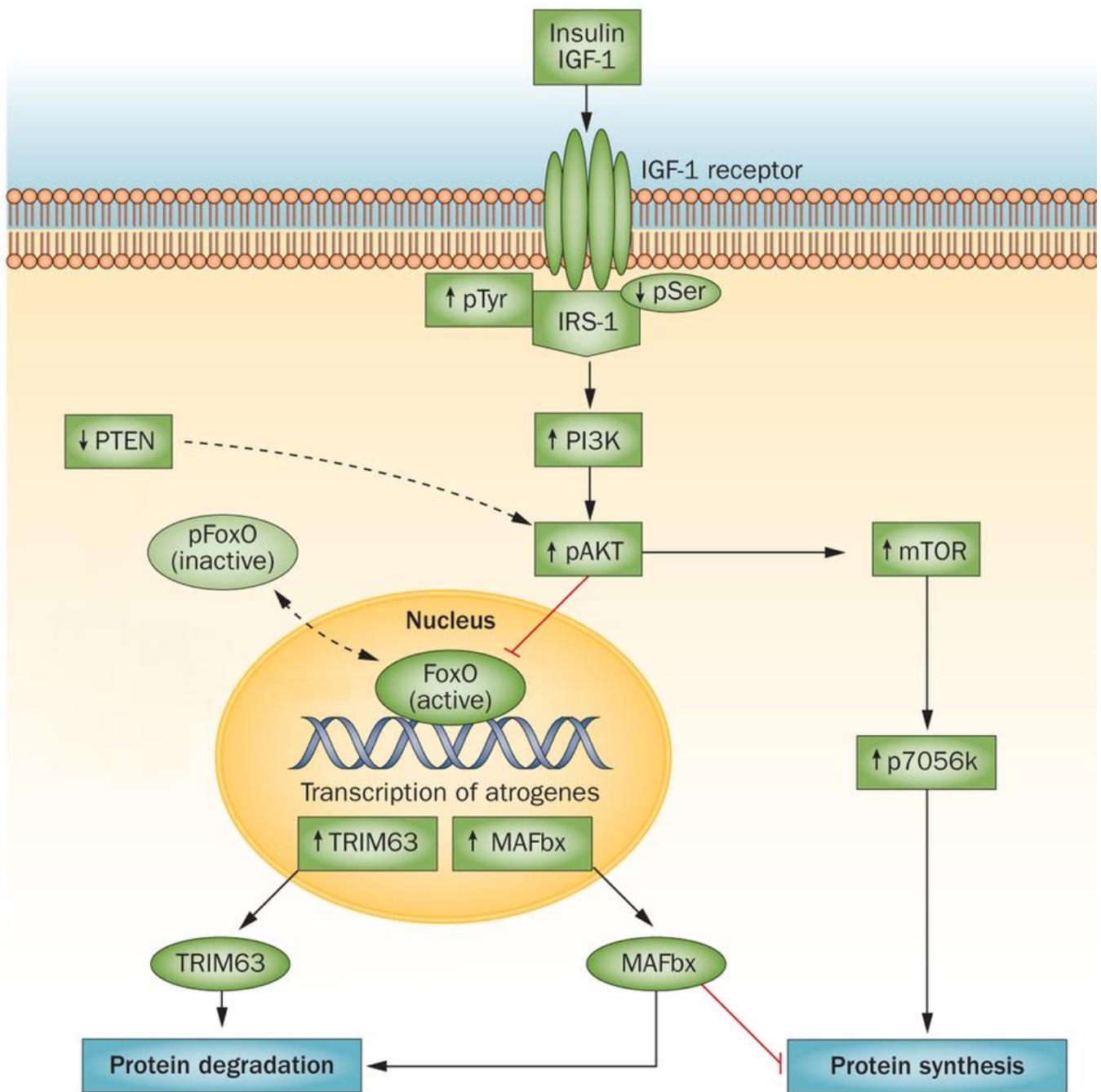


Figure 41 : La Voie IGF-1/Akt.

La liaison de l'insuline au récepteur de l'IGF-1 stimule la phosphorylation de la tyrosine d'IRS-1. L'activation de IRS-1 stimule la voie PI3K/Akt, ce qui conduit à la phosphorylation de Akt, qui active mTOR conduisant à la synthèse des protéines impliquée dans l'hypertrophie musculaire. En l'absence de pAkt, FoxO actif augmente la transcription de l'E3 ubiquitine ligases MAFbx et TRIM63, entraînant une atrophie musculaire. Sa phosphorylation par AKT inhibe son activité et par la suite inhibe la dégradation protéique. La protéine PTEN inhibe AKT et donc est considérée comme un régulateur négatif de la croissance protéique. Abréviations: FoxO, boîte forkhead protéines O; IGF, le facteur de croissance de type insuline; IRS-1, le substrat du récepteur de l'insuline 1; MAFbx, F-box seule protéine 32; mTOR, cible mammalienne de la Rapamycine; p, phosphorylé; PI3K, le phosphatidylinositol 3-kinase; PTEN, phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate 3-phosphatase et double spécificité protéine phosphatase; TRIM63, E3 ubiquitine protéine ligase TRIM63 (Sandri, Sandri et al. 2004; Wang and Mitch 2014).

L'IGF-1 peut induire l'hypertrophie musculaire, comme c'est le cas de souris transgéniques surexprimant IGF1 (Coleman, DeMayo et al. 1995; Musaro, McCullagh et al. 2001). La liaison de l'IGF-1 à son récepteur induit un changement conformationnel dans le récepteur IGF-1R, ce qui entraîne sa trans-phosphorylation sur des résidus tyrosine de son domaine à activité tyrosine kinase. Le domaine tyrosine kinase est alors activé et peut ainsi phosphoryler d'autres tyrosines présentes sur les chaînes β du récepteur, conduisant à une autophosphorylation du récepteur, mais aussi sur des protéines substrats telles que le substrat du récepteur de l'insuline 1 appelé IRS-1 (**Figure 41**). IRS1 active la phosphatidylinositol-3-OH kinase (PI3K), qui va phosphoryler le phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PIP2) ancré à la membrane pour produire du phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3). Ce PIP3 est reconnu par d'autres kinases cellulaires telles que la **protéine kinase B (PKB) appelée aussi Akt** ou la (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1/2). Des travaux ont démontré qu'Akt1, une des 3 isoformes d'Akt (Akt1-3), était activée pendant l'hypertrophie musculaire et qu'elle était même suffisante pour l'induire *in vitro* et *in vivo* (Bodine, Stitt et al. 2001; Rommel, Bodine et al. 2001; Takahashi, Kureishi et al. 2002). Une fois activé, **Akt phosphoryle tout un éventail de substrats, y compris des protéines qui interviennent dans la synthèse des protéines, la croissance cellulaire et la survie cellulaire** (Vivanco and Sawyers 2002). Le contrôle de l'activité d'Akt se fait par la régulation de la phosphorylation de ses sites de liaison (S/T) des groupements phosphate. En effet, Akt phosphorylée peut être la cible de deux phosphatases, SHIP et PTEN. La surexpression de PTEN provoque la déphosphorylation d'Akt, ce qui entraîne son inactivation avec comme conséquence une diminution de la masse musculaire. Le promoteur du gène *Pten* peut être la cible de gènes cibles de Notch, tels que *c-myc* et *Hes1*. En effet, ces deux gènes cibles de Notch peuvent réprimer l'activation transcriptionnelle de *Pten*, ce qui conduit à une diminution de la quantité protéique de PTEN et donc à une inhibition moins forte de la voie Akt/mTOR (Bermudez Brito, Goulielmaki et al. 2015).

Akt est une sérine/thréonine kinase, qui peut activer mTOR par phosphorylation directe ou par phosphorylation de TSC2 (inhibiteur de mTOR), ce qui provoque l'inhibition de celui-ci. Ainsi, mTOR peut réguler la traduction et la synthèse protéique, le cycle cellulaire ou l'apoptose selon les cibles protéiques touchées. En complexe avec la protéine RAPTOR

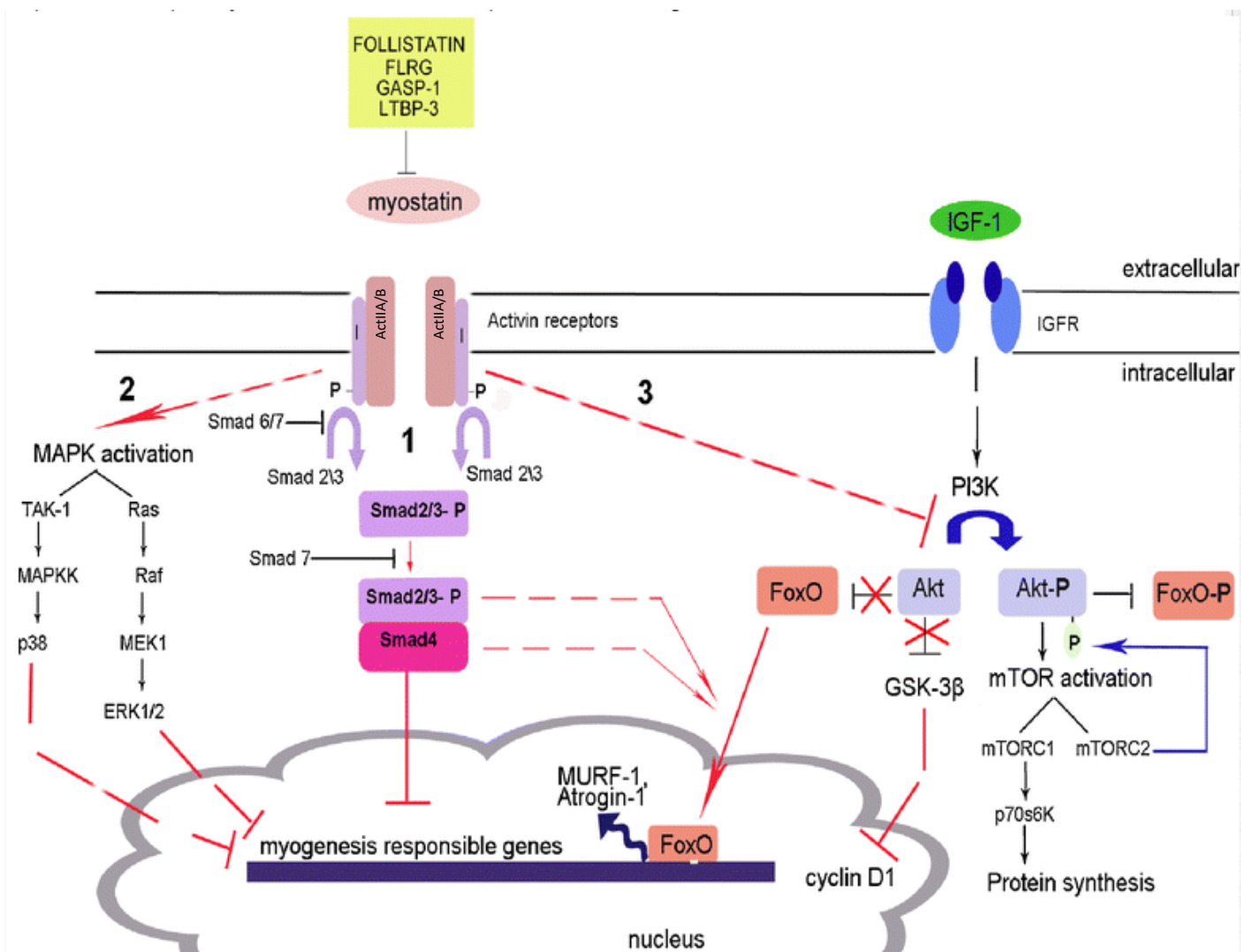


Figure 42 : Voies de signalisation de la Myostatine.

1 : Voie canonique dépendante des Smad. La myostatine se lie à ActRIIA/B et induit le recrutement du récepteur à l'activine de type I. Ainsi constitué, le récepteur activé entraîne la phosphorylation des Smad2/3, qui peuvent alors se lier à Smad4 pour former un complexe trimérique, dont la translocation au noyau va conduire à l'inactivation de gènes impliqués dans la myogenèse comme les MRF. Smad6 et Smad7 peuvent également inhiber cette voie. **2 : Activation des MAPK.** L'activation de la voie MAPK médiée par la myostatine permet d'activer différentes cascades aboutissant à l'activation soit de p38 (TAK-1/MAPKK/p38) soit de ERK1/2 (Ras/Raf/MEK1/ERK1/2), ce qui conduit également à l'inhibition de l'expression des MRF. **3 : Inhibition de la signalisation Akt.** La phosphorylation de AKT est permise normalement par la PI3K, dont l'activation peut être la conséquence de la fixation d'IGF1 sur son récepteur à l'IGF1. PI3K est inhibée par la fixation de la myostatine, ce qui entraîne une accumulation d'Akt non phosphorylé. La voie PI3K/Akt/mTOR, responsable de l'activation de la synthèse protéique, n'est donc pas activée. Par contre, FoxO, qui n'est plus inhibé, s'accumule et est transloqué au noyau où il se lie à l'ADN et induit la transcription de l'E3 ubiquitine ligases MURF-1 et atrogin-1 (adaptée de (Sandri, Sandri et al. 2004; Joulia-Ekaza and Cabello 2007; Yang, Zhang et al. 2007; Zhang 2009)).

(regulatory-associated protein of mTOR), mTOR forme le complexe mTORC1, qui active principalement une protéine de liaison de l'eIF4E (4EBP1), libérant de ce fait le facteur de transcription eIF4 et active aussi la kinase S6K1 (ou p70S6K), qui est impliquée dans la synthèse des ribosomes et donc la synthèse protéique. Des études ont montré que la perte ou l'inhibition de PI3K, mTOR ou p70S6K provoque une diminution de la taille des cellules (Leevers, Weinkove et al. 1996; Montagne, Stewart et al. 1999; Zhang, Stallock et al. 2000).

III.3 La voie de la Myostatine

La myostatine, ou GDF-8 (Growth and Differentiation Factor 8) est un membre de la superfamille des TGF- β (Hinck 2012), impliquée dans la croissance et l'homéostasie musculaire chez l'adulte. **Elle est sécrétée principalement par le muscle squelettique et fonctionne comme un régulateur négatif de la croissance musculaire, en inhibant la prolifération et la différenciation myogéniques** (Kirk, Oldham et al. 2000; Lee 2004). En effet, l'inactivation du gène de la myostatine chez des souris KO conduit à une augmentation de la masse musculaire, conséquence d'une hypertrophie et d'une hyperplasie des fibres (McPherron, Lawler et al. 1997). L'augmentation de la masse musculaire observée chez ces souris KO pour la myostatine a été corrélée plus tard à une augmentation du nombre de cellules progénitrices musculaires embryonnaires et à la promotion de leur différenciation terminale par activation de p21 (sortie du cycle cellulaire) et de MyoD (Manceau, Gros et al. 2008).

La myostatine est synthétisée sous forme de prépropeptide. Après clivage du peptide signal et dégradation du propeptide, la myostatine mature peut se fixer aux récepteurs à l'activine (ActIIA et ActIIB), qui sont des récepteurs sérine/thréonine kinase (Lee and McPherron 2001). Le récepteur ActIIB, sur lequel la myostatine se lie de manière préférentielle, est lui-même associé à deux récepteurs de type 1: l'activine receptor-like kinase 4/5 (ALK4/ALK5). La liaison de la myostatine à ces récepteurs ActIIA et ActIIB induit l'activation de la voie canonique dépendante des Smad (Joulia-Ekaza and Cabello 2007), au cours de laquelle il y aura phosphorylation d'ActRIIB et du récepteur associé ALK4/5. L'activation de ces récepteurs entraîne alors la phosphorylation des protéines Smad2/3, qui peuvent s'associer à Smad4 pour être transloqué au noyau et inhiber un certain nombre de gènes cibles, tels que *MyoD* et la myogénine (Joulia, Bernardi et al. 2003) (**Figure 42**). La

myostatine inhibe d'une part la prolifération de myoblastes, en bloquant les cellules dans la phase G1 du cycle cellulaire, ce qui les empêche de passer en phase S (Thomas, Langley et al. 2000). **D'autre part, elle bloque la différenciation des myoblastes en myotubes par inhibition de l'expression de MyoD** (Langley, Thomas et al. 2002), empêchant ainsi la myogénine d'être activée (Joulia, Bernardi et al. 2003).

Seule la liaison de la myostatine à ActIIB peut conduire aussi à l'activation de voies non canoniques telles que les voies Erk1/2, p38/MAPK et JNK (**Figure 42**). Ces 3 voies non canoniques, ne dépendant pas des Smad, vont jouer un rôle dans l'inhibition de la croissance musculaire (Huang, Chen et al. 2011). **La myostatine joue également un rôle d'inhibiteur de la voie de signalisation Akt/mTOR/p70S6K, inhibant ainsi la synthèse protéique.** En effet, la myostatine inhibe l'expression d'Akt (Trendelenburg, Meyer et al. 2009) (**Figure 42**). Cet effet sur la synthèse protéique est le rôle majeur de la myostatine dans le contrôle de la masse musculaire chez l'adulte.

En fonction du contexte physiologique, plusieurs molécules, telles que la follistatine, les protéines Gasp (Brun, Monestier et al. 2012; Monestier, Brun et al. 2012; Brun, Perie et al. 2014) et le propeptide lui-même (formation d'un complexe latent avec la myostatine), peuvent inhiber la myostatine et jouer ainsi un rôle dans le contrôle de la prise de masse musculaire (Hill, Qiu et al. 2003; Amthor, Nicholas et al. 2004). Cette voie de signalisation peut être inhibée par Smad7, qui inhibe la formation des complexes entre Smad2/3 et Smad4 ou par Smurf1, qui va entraîner la dégradation des Smad par ubiquitinylation (Joulia-Ekaza and Cabello 2007) (**Figure 42**).

Homme	Souris	Type de fucosylation	Localisation
FUT 1		Alpha-(1,2)-fucosyltransferase 1	Appareil de Golgi
FUT 2		Alpha-(1,2)-fucosyltransferase 2	
FUT 3		Alpha-(1,3(4))-L-fucosyltransferase 3	
FUT 4		Alpha-(1,3)-fucosyltransferase 4	
FUT 5		Alpha-(1,3)-fucosyltransferase 5	
FUT 6		Alpha-(1,3)-fucosyltransferase 6	
FUT 7		Alpha-(1,3)-fucosyltransferase 7	
FUT 8		Alpha-(1,6)-fucosyltransferase 8	
FUT 9		Alpha-(1,3)-fucosyltransferase 9	
FUT 10		Alpha-(1,3)-fucosyltransferase 10	
FUT 11		Alpha-(1,3)-fucosyltransferase 11	
FUT 12	POFUT1	<i>O</i> -fucosyltransférase des EGF-like	Réticulum endoplasmique
FUT 13	POFUT2	<i>O</i> -fucosyltransférase des TSR	

Tableau 4 : Spécificité et localisation des fucosyltransférases chez l'homme et chez la souris.

POFUT1 : Protéine *O*-fucosyltransférase 1 ; POFUT2 : Protéine *O*-fucosyltransférase 2.

Chapitre III. La protéine O-fucosyltransférase 1 (POFUT1)

I. Introduction

Le **L-fucose** est un aldohexose, qui diffère du L-galactose par la présence au niveau du carbone 6 d'une fonction méthyl (-CH₃) à la place d'une fonction alcool primaire (-CH₂OH). Il est retrouvé en position proximale, latérale et/ou terminale des structures glycaniques de très nombreuses glycoprotéines, où il forme majoritairement avec d'autres monosaccharides des liaisons osidiques de type α 1-2, α 1-3/4 ou α 1-6, suite à l'action de différentes fucosyltransférases golgiennes (Fut1 à 11) (**Tableau 4**). Ces résidus fucose, majoritairement terminaux, sont retrouvés dans des **glycoprotéines impliquées dans le développement embryonnaire**, les réponses inflammatoires et immunitaires.

Il existe également deux protéines O-fucosyltransférases, **POFUT1** (Fut12) et **POFUT2** (Fut13), localisées dans le réticulum endoplasmique (RE) bien que seule POFUT1 contienne un signal de rétention de type **KDEL (RDEF)** (Luo and Haltiwanger 2005; Luo, Koles et al. 2006). Ces deux enzymes sont capables de transférer du fucose à partir du sucre donneur **GDP-fucose** sur des résidus sérine et/ou thréonine de séquences consensus retrouvées dans les répétitions EGF (Epidermal Growth Factor)-like et TSR (Thrombospondin) de différentes glycoprotéines (Wang and Spellman 1998; Luo, Koles et al. 2006). Ces O-fucosylations font partie des modifications post-traductionnelles relativement rares (Harris and Spellman 1993; Gonzalez de Peredo, Klein et al. 2002), qui se produisent dans le RE de manière concomitante à la synthèse et au repliement des domaines EGF-like ou TSR des glycoprotéines. **D'ailleurs, ces petits domaines, qui sont stabilisés par plusieurs ponts disulfure, ne peuvent être O-fucosylés que s'ils sont correctement repliés** (Luo, Nita-Lazar et al. 2006).

La GDP-fucose protéine O-fucosyltransférase 1 (POFUT1), dont le gène n'est cloné chez l'homme qu'en 2001 (Wang, Shao et al. 2001), a été purifiée en tant que **glycoprotéine soluble** à partir d'extraits de cellules CHO puis caractérisée sur le plan biochimique et

Gène *Pofut1*

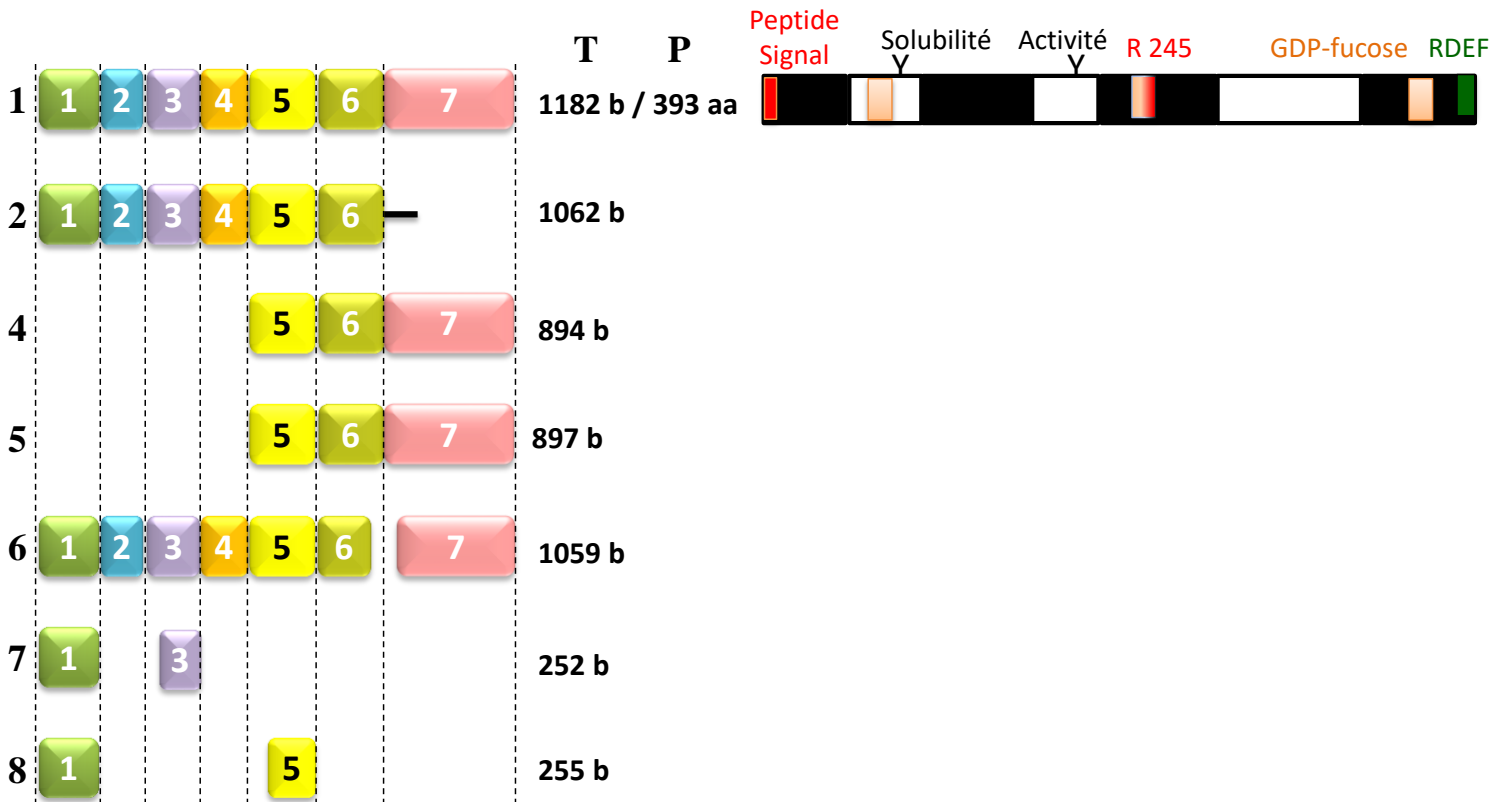


Figure 43 : Structure du gène *Pofut1* et de ses variants d'épissage chez la souris. Description des protéines correspondantes.

Le gène *Pofut1*, localisé sur le chromosome 2 chez la souris, est formé de 7 exons et de 6 introns. Il existe plusieurs variants transcriptionnels d'épissage dont le transcrit sauvage (1182 b), qui résulte du rapprochement des 7 exons. Il code une protéine de 393 résidus d'acides aminés, possédant un peptide signal et un signal de rétention au réticulum endoplasmique (RDEF). La protéine mature de 363 résidus, résidente dans le réticulum, possède deux *N*-glycannes, qui pourraient être impliqués dans la solubilité et l'activité de l'enzyme comme décrit pour l'espèce bovine (Loriol, Audfray et al. 2007). Son activité catalytique est assurée par la présence de 3 sites de fixation du GDP-fucose et d'un résidu basique catalytique, l'arginine 245 (R245). A part le transcrit 6 (1059 b), tous les autres transcrits d'épissage codent des protéines qui pourraient être non fonctionnelles si on considère les éléments manquants.

enzymatique (Wang and Spellman 1998). C'est ainsi qu'il fut démontré que POFUT1 était responsable de la O-fucosylation des domaines EGF. En 2011, la protéine Pofut1 de *C.elegans*, qui ne présente qu'environ 30% d'identité avec POFUT1 humain et murin (Wang, Shao et al. 2001), est cristallisée et sa structure 3D résolue après diffraction aux rayons X (Lira-Navarrete, Valero-Gonzalez et al. 2011). La caractérisation de POFUT2 est plus tardive (Luo, Koles et al. 2006; Luo, Nita-Lazar et al. 2006). Elle est responsable de la O-fucosylation des domaines TSR et sa structure 3D n'est à ce jour toujours pas élucidée. La suite de cet exposé bibliographique portera uniquement sur **POFUT1**.

I.1 Du gène à la protéine

I.1.1 Le gène *Pofut1*

Le gène *Pofut1*, long de 28,71 kpb, est porté par le chromosome 2 ; il est constitué de 7 exons et de 6 introns (**Figure 43**). Il est présent en une seule copie dans tous les génomes séquencés de métazoaires (Loriol, Dupuy et al. 2006) et très largement répandu chez les bilatériens. En 2001, ce gène a été cloné chez l'homme ; il présente 90,4% d'identité avec le gène murin (Wang, Shao et al. 2001). Les orthologues de ce gène chez la drosophile et le nématode *C.elegans* présentent respectivement 41,2 et 29,4% d'identité avec le gène *Pofut1* humain.

I.1.2 Les variants transcriptionnels

Les transcrits du gène *Pofut1* sont retrouvés dans d'innombrables tissus, suggérant le caractère ubiquitaire de l'expression de ce gène. Outre le transcrit dit « sauvage » (**1**) (**Figure 43**), qui code une protéine de 393 résidus d'acides aminés, 7 transcrits alternatifs plus courts sont décrits chez la souris dans la base de données Ensembl (<http://www.ensembl.org>), dont un seul (**3**) ne coderait pas de protéine. Les autres transcrits alternatifs sont faiblement (**2** et **6**) ou fortement (**4**, **5**, **7**, **8**) tronqués. Même si l'existence de tous ces transcrits est avérée, seuls les transcrits sauvage (**1**) et (**6**) contiennent tous les éléments importants pour coder une protéine correctement localisée dans le réticulum endoplasmique (présence du signal de rétention RDEF), soluble et active (voir plus loin). Nous avons d'ailleurs détecté d'autres transcrits plus courts dans le pool d'ADNc des cellules satellites isolées à partir de muscles de souris C3H (**Annexe 1**).

```

100
1 .....MRYSKVLTLASFI SVCSYSAKSNETDPNGYIVFCPCMGFRGNQVDQFLGLVAFAKALDRTLVLPNFI EFKHPE....TKMIPFEFLFQVGT
MGA AAWARP...LSVSFLILLL...PLPGMFA GSWDPAGYLLYCPCMGFRGNQADHFLGSLAFAKLLNRTLAVPPWIEYQHHKPPFTNLHVSYQKYFKLEP
MGA AAWAPPHLLLRASFLILLL...PLRGRSAGSWDLAGYLLYCPCMGFRGNQADHFLGSLAFAKLLNRTLAVPPWIEYQHHKPPFTNLHVSYQKYFKLEP
MGA AAWAPSLPPRVSLILLL...PLPGLPVGS WDPAGYLLYCPCMGFRGNQADHFLGSLAFAKLLNRTLAVPPWIEYQHHKPPFTNLHVSYQKYFKLEP
...MQWLK....MKLRFVNLI LLLISSTCAQLGGDPNGYLYTCCPCMGFRGNQADHFLGSLAFAKALNRTLILPPWVEYRRGE...LRSRQVPFNTYFEVEP

drosophila_ofut1

301
ce_POFUT1 VAKYTRVVMQEFTKKIMPTHFVGTPRQAIYDKSA.....EPGCHSKEGNPFGPYWDQIDVSVFGDEYFGDIPGGFDLNMQGRKKWLEKFPSE
hs_POFUT1 LQAYHRVISLEDFMEKLAPTHWPPEKRVAYCFEVA.....AQRSPDKKTCPMKEGNPFGPFDWQFHVSFNKSELFTGI...SFSASYREQ...WSQRFSPK
mm_POFUT1 LQAYHRVVSLEDFMENLAPSHWPPEKRVAYCFEVA.....AQRSPDKKTCPMKEGNPFGPFDWQFHVSFNKSELFTGI...SFSASYKEQ...WTQRFPK
bt_POFUT LQAYHRVISLEDFMEKLAPTHWPPEKRVAYCFEVA----AQRSPDKKTCPMKEGNPFGPFDWQFHVSFNKSELFAGISFS----ASYKDQWIORFSPE
drosophila_ofut1 LKEYHRVITMADFMMWHLADDIWPESERSVFCYKERYSLQEKNDPKPNCCHAKDGNPFGPFDWTFHIDFVRSEFYAPL..HFDVHHSNEAAKWQTKYPAE

300
201
ce_POFUT1 EYPVLAFSSAPAFPSPKGVVSIQKYLRSRITTEQAKKFI SANLAK.PFVAVHLRNDADWVRVCEHI.DTTNRP LFASEQCLGEGHHLGT.LTKEICS
hs_POFUT1 EHPVLALPGAPAQFPVLEEHRPLQKYMVMSDEMVKTGEAQIHAHLVR.PYVGIHLRIGSDWKNACAMLKDGTAGSHFMASPCVGYRSRSTAAPLTMTMCL
mm_POFUT1 EHPVLALPGAPAQFPVLEEHRPLQKYMVMSDEMVRTGEALISAHLVR.PYVGIHLRIGSDWKNACAMLKDGTAGSHFMASPCVGYRSRSTATPLTMTMCL
bt_POFUT1 EHPVLALPGAPAQFPVLEEHRPLQKYMVMSDEMVRTGEAQIHAHLIR-PYVGIHLRIGSDWKNACAMLKDGTAGAHFMASPCVGYRSRHTTAPLTMTMCL
drosophila_ofut1 SYPVLAFTGAPASFPVQLENCKLQRYLQWSQRYREASKDFIREQLPRGAF LGIHLRNGIDWVRACEHVKDS...QHLFASPQCLGKNERGA.LYPELCM

301
301
ce_POFUT1 PSKQIILEQIVEKVGSI.....GAKSVFVASDKDHMIDEINEALKPYEIEAHRQEPDDMYTSLAIMGRADL FVGNVCVSTFSHIVKRERDHAGQSPRPS
hs_POFUT1 PDLKEIQRAVKLWVRSL.....DAQSVYVATDSESYVPELQQ.LFKGKVVVSLKPEVAQVDLYILGQADHFI GNCVSSFTAFVKRERDLQG...RPS
mm_POFUT1 PDLKEIQRAVTLWVRSAL.....NARSVYIATDSESYVSEIQQ.LFKDKVRSVSLKPEVAQIDLYILGQADHFI GNCVSSFTAFVKRERDLHG...RQS
bt_POFUT1 PDLKEIRRALKLWVTAL-----NAQSVYIATDSESYLPEIQQ-LFKGKVVVSLKPEVAQIDLYILGQADHFI GNCVSSFTAFVKRERDLHG---RPS
drosophila_ofut1 PSKEAII RQLKRTIKNVRQTQPDNEIKSVFVSDSNHMI GELNTALS RMGIVSHKLPEDDPYILDLA ILGQSNHFI GNCISSYSAFEKRERDVHG...FPS

401
420
ce_POFUT1 AFFGIRAVKREIDL.....
hs_POFUT1 SFFGMDRPPKLRDEF.....
mm_Pofut1 SFFGMDRPSQLRDEF.....
bt_POFUT1 SFFGMDRPPQLRDEF.....
drosophila_ofut1 YFWGFPKKEKDRKHTNVHEEL

```

Figure 44 : Alignement de quelques séquences protéiques de POFUT1.

Les séquences codant la protéine O-fucosyltransférase 1 (famille GT65) de *C.elegans* (Ce), *Homo sapiens* (Hs), *Mus musculus* (mm), *Bos taurus* (Bt) et de drosophile sont alignées en utilisant le site Multalin. Les peptides signaux (21 à 31 résidus) sont en orange, le signal de rétention en bleu foncé, les sites de fixation du GDP-fucose en vert clair (le 3^{ème} site est absent chez *C.elegans*), l'arginine catalytique en rouge et les sites de N-glycosylation en bleu clair (2 sites chez les mammifères, 1 site chez la drosophile et aucun site chez *C.elegans*).

I.1.3 La protéine POFUT1

Le gène sauvage chez la souris code une protéine de 393 résidus d'acides aminés, dont les 30 premiers correspondent au peptide signal et les 4 derniers à une séquence de rétention de type KDEL (RDEF). Après clivage de son peptide signal, la protéine mature résidente dans le réticulum endoplasmique rugueux (RER) ne comprend plus que 363 résidus, pour une masse moléculaire théorique de 41438,4 daltons. Cependant, cette masse théorique peut être affectée par la présence potentielle de deux *N*-glycannes (2 sites de *N*-glycosylation prédits pour POFUT1 murin en position 67 et 165 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)) (**Figure 43**). En ce qui concerne POFUT1 bovin, les deux sites de *N*-glycosylation sont occupés par des *N*-glycannes : le premier site N65 semble important pour le bon repliement de la protéine et sa solubilité et le deuxième site N163 pour son activité (Loriol, Audfray et al. 2007). L'activité de l'enzyme POFUT1 est aussi dépendante de la présence de trois sites de fixation du GDP-fucose (49-51, 243-245, 361-362), dont un site contient un résidu essentiel à l'activité catalytique de l'enzyme (R240 chez *C.elegans* correspondant à R245 chez *M.musculus*) (Lira-Navarrete, Valero-Gonzalez et al. 2011). Chez *C.elegans*, les deux sites de *N*-glycosylation sont absents de la séquence protéique de Pofut1 ainsi qu'un des trois de fixation du GDP-fucose. Chez la drosophile, seul le premier site de *N*-glycosylation est conservé (**Figure 44**).

Les différents transcrits alternatifs décrits précédemment codent des protéines plus courtes que la protéine POFUT1 sauvage. En considérant les régions délétées, seul le transcrit 006 codant une protéine de 353 résidus d'acides aminés conserve tous les éléments essentiels, nécessaires à la solubilité et à l'activité de l'enzyme. Le transcrit 002, auquel il manque la séquence correspondant à l'exon 7, code une protéine potentiellement fonctionnelle qui ne posséderait que 2 des 3 sites de fixation du GDP-fucose (**Figure 44**). Toutefois, même si ces protéines tronquées existent réellement, on ignore leur proportion par rapport à la protéine sauvage et si elles sont réellement actives *in vivo*.

II. Structure tridimensionnelle de POFUT1

La première structure cristalline de POFUT1 a été établie pour l'enzyme de *C.elegans* sous sa

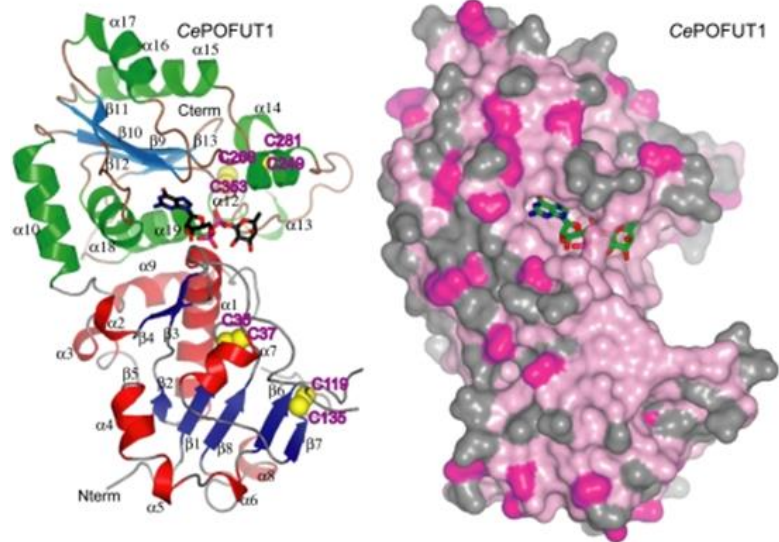
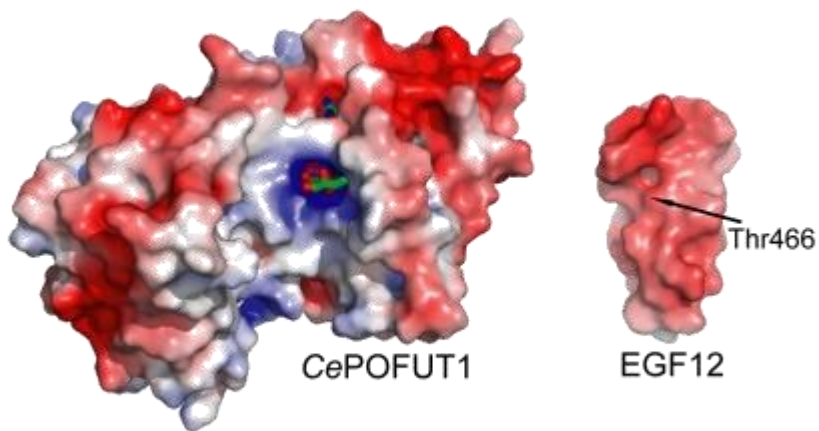


Figure 45 : Structure cristalline de CePOFUT1 en complexe avec le GDP-fucose.

La protéine POFUT1 est constituée de deux domaines de Rossman de type $\alpha/\beta/\alpha$ (hélices α en rouge ou vert et feuillets β en bleu), à l'interface desquels se trouve le site de fixation au GDP-fucose (en noir et rouge) qui est ceint par les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 19$ et le brin $\beta 9$. Les quatre ponts disulfures sont en jaune (2 ponts disulfure par domaine de Rossman). A droite, représentation de surface de CePOFUT1, colorée en fonction de la conservation de la séquence (en rose : 100 % d'identité, en gris : < 50 % d'identité). Le GDP-fucose (en bleu-vert-rouge) y est représenté logé dans une cavité (Lira-Navarrete, Valero-Gonzalez et al. 2011).

A



B

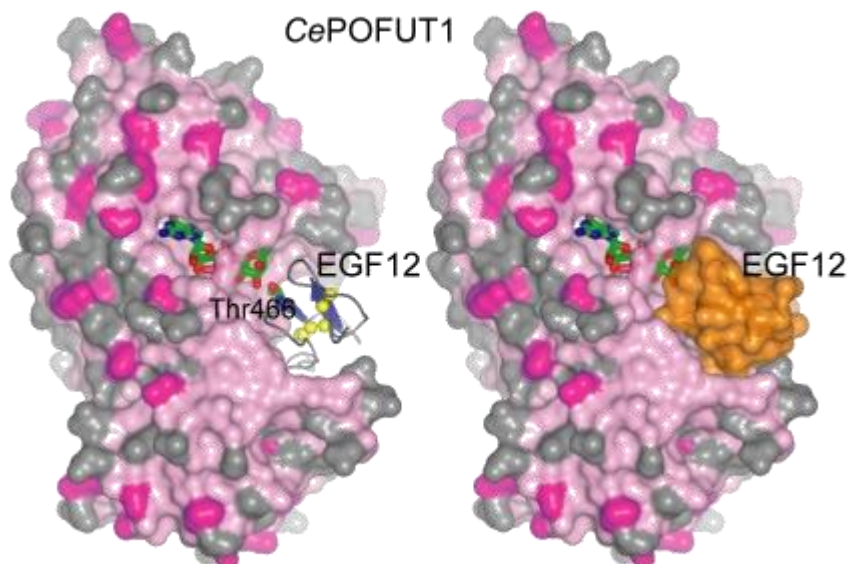


Figure 46 : Représentation des surfaces électrostatiques de CePOFUT1 et hEGF12.

(A) Les sites de liaison aux substrats donneur (GDP-fucose) et accepteur (domaine EGF-like) de CePOFUT1 sont globalement chargés positivement alors que la région autour de Thr466 de l'hEGF12 est chargée négativement (Cordle, Redfieldz et al. 2008), ce qui suggère une fixation de l'EGF par interactions électrostatiques. (B) Modèle d'arrimage moléculaire (docking) de hEGF12 au niveau de la cavité de liaison de CePOFUT1, où le GDP-fucose s'est préalablement fixé (Lira-Navarrete, Valero-Gonzalez et al. 2011).

forme apoenzyme ou en complexe avec le GDP-fucose (Lira-Navarrete, Valero-Gonzalez et al. 2011) (**Figure 45**). Elle montre un repliement de type GT-B, qui est un des deux types de repliement majoritaires des glycosyltransférases (Breton, Snajdrova et al. 2006) et qui consiste en l'union de deux domaines de type Rossmann $\alpha/\beta/\alpha$, à l'interface desquels se trouve le site catalytique. Contrairement aux glycosyltransférases de type GT-A, Pofut1 de *C.elegans*, de type GT-B, ne contient pas de motif DxD liant généralement un cation Mg^{2+} ou Mn^{2+} et nécessaire à son activité. En effet, l'enzyme Pofut1 de nématode ne dépend pas du manganèse pour son activité (Lira-Navarrete, Valero-Gonzalez et al. 2011).

C'est principalement dans le domaine C-terminal que l'on retrouve le domaine de liaison au GDP-fucose, constitué par le rapprochement spatial des 2 sites de fixation présents chez *C.elegans* (sites FNG et HLR) et localisés respectivement au sein de structures secondaires $\alpha 1$ et $\beta 9$. Le domaine N-terminal est variable et plus impliqué dans la liaison du substrat accepteur. Les études d'arrimage moléculaire (docking), combinées à l'analyse des potentiels électrostatiques de surface, permettent de modéliser la fixation par interactions électrostatiques de l'EGF12 humain au sein de la protéine Pofut1 de *C.elegans*, qui est préalablement complexée au GDP-fucose (**Figures 45 et 46**). Chez la drosophile, le R240, résidu très conservé d'un des domaines de fixation du GDP-fucose, joue un rôle clé dans la catalyse, puisqu'il **facilite le clivage du GDP-fucose avant le transfert du sucre** sur le substrat accepteur (inversion de configuration du carbone anomérique du GDP-fucose) et « libération » du GDP. Les études de mutagenèse dirigée montrent que le remplacement de R240 par une alanine (R240A) inhibe totalement la liaison du GDP-fucose alors que la mutation R240K (R et K sont deux acides aminés basiques) l'inhibe partiellement. Dans les deux cas, l'activité catalytique de Pofut1 est complètement arrêtée, ce qui met en évidence l'importance de ce résidu très conservé.

III. Fonctions biologiques de POFUT1

Des études génétiques ont démontré un rôle essentiel de POFUT1 dans différents processus développementaux puisque les souris KO pour *Pofut1* meurent au stade embryonnaire

E11.5) suite à de nombreux défauts de somitogenèse, neurogenèse, cardiogenèse et vasculogenèse (Shi and Stanley 2003). En l'état actuel des connaissances, la *O*-fucosylation, médiée par *Pofut1*, ne concernerait qu'un nombre relativement limité de protéines membranaires et sécrétées. Seules sont concernées les glycoprotéines possédant des séquences consensus de *O*-fucosylation de type $C^2X_4(S/T)C^3$ au sein de leurs répétitions EGF-like, qui de plus doivent être correctement conformées pour recevoir ce type de modification post-traductionnelle rare. Les rôles biologiques de *Pofut1* dépendront donc de ses protéines cibles et des fonctions qui leurs sont associées.

III.1 NOTCH et leurs ligands, des protéines cibles de choix

Etant donné la multitude de répétitions EGF-like présentes dans leurs domaines extracellulaires et souvent associées à la présence de sites potentiels de *O*-fucosylation, les récepteurs NOTCH et leurs ligands sont des cibles privilégiées de POFUT1. Non seulement POFUT1 *O*-fucosyle un certain nombre de répétitions EGF-like et en faisant ainsi elle joue un rôle dans la signalisation Notch en modulant les interactions récepteurs-ligands nécessaires à l'activation de la voie Notch (Stanley 2007). De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* rapportent le rôle fondamental de POFUT1 dans la modulation de cette voie de signalisation. Les études d'Okajima chez la drosophile (Okajima and Irvine 2002) démontrent le rôle central de *Ofut1* dans la régulation de l'activation de la voie Notch par ses ligands, notamment au cours du développement. En effet, la sous-expression de *Ofut1*, provoquée par l'emploi d'ARN interférents, entraîne une atténuation de la voie Notch et des défauts de développement similaires à ceux générés par l'inactivation de Notch. Le KO de *Pofut1* chez la souris entraîne également des problèmes de développement embryonnaire, par suite de l'extinction de la signalisation Notch (Shi and Stanley 2003).

En dehors de sa fonction *O*-fucosyltransférase, *Ofut1* jouerait un rôle de protéine chaperonne chez la drosophile (Okajima, Xu et al. 2005), favorisant l'expression de Notch à la surface cellulaire. Ce rôle chaperon est très controversé chez les mammifères. En effet, certaines études montrent que l'invalidation de *Pofut1* dans les cellules murines ES n'entraîne pas de variation de la quantité de récepteurs NOTCH exprimés à la surface

cellulaire mais par contre conduit bien à une diminution des interactions de NOTCH avec ses ligands (Stahl, Uemura et al. 2008). D'autres études montrent au contraire une accumulation de NOTCH1 dans le réticulum endoplasmique chez des embryons de souris invalidés pour le gène *Pofut1*, ce qui suggère un rôle non négligeable de POFUT1 dans le contrôle de la bonne conformation du récepteur et son adressage à la membrane (Okamura and Saga 2008). Nos résultats vont dans le sens d'une absence de fonction chaperonne de POFUT1 dans les cellules de mammifères (cellules C2C12 et myoblastes murins dérivés de cellules satellites) (Der Vartanian, Audfray et al. 2015; Al Jaam, Heu et al. 2016).

III.2 Les autres protéines cibles de POFUT1

Des séquences consensus de *O*-fucosylation du type $C^2X_{4-5}(S/T)C^3$, que l'on retrouve au sein de domaines EGF-like, sont présentes dans plus de 100 protéines chez les mammifères (Rampal, Luther et al. 2007). Parmi ces différentes protéines présumées cibles de POFUT1, se retrouvent les récepteurs NOTCH1 à 4, qui possèdent de très nombreux sites potentiels de *O*-fucosylation, plus que toute autre protéine selon les bases de données (Moloney, Shair et al. 2000; Rana and Haltiwanger 2011). En effet, les récepteurs NOTCH possèdent dans leurs domaines extracellulaires de très nombreuses répétitions EGF-like, dont plus de la moitié présente ce genre de séquences et dont certaines sont démontrées comme étant réellement *O*-fucosylées (**voir chapitre II**). C'est également le cas pour les ligands de NOTCH, à savoir DLL1, DLL3, DLL4, Jagged1 et Jagged2. En toute logique, certains facteurs de coagulation tels que les facteurs VII, IX et XII ressortent également dans la prédiction puisque leur *O*-fucosylation a déjà été démontrée expérimentalement (Bjoern, Foster et al. 1991; Harris, Ling et al. 1992; Nishimura, Takao et al. 1992). La *O*-fucosylation a été également démontrée pour d'autres protéines prédites par Rampal, telles que l'agrine qui joue un rôle dans la jonction neuromusculaire (Kim, Chandrasekharan et al. 2008) ou la protéine AMACO, qui est une protéine de la matrice extracellulaire dont le rôle n'est pas encore élucidé (Gebauer, Muller et al. 2008).

La séquence de l'EGF avec la séquence consensus de *O*-fucosylation a été déterminée en 1999 en utilisant les bases de données (Hofmann, Bucher et al. 1999). En utilisant le site de prédiction <http://motif.genome.jp/MOTIF2.html>, 323 protéines cibles ont été retrouvées,

parmi lesquelles on trouve 101 protéines chez les mammifères (Rampal, Luther et al. 2007). Récemment, la séquence consensus de *O*-fucosylation a été vérifiée et la nouvelle séquence C²X₄(S/T)C³ a été adoptée (Takeuchi and Haltiwanger 2010; Takeuchi and Haltiwanger 2014). L'analyse bioinformatique en utilisant la nouvelle séquence de *O*-fucosylation donne un nombre plus restreint de protéines (316) parmi lesquelles il y a 94 protéines cibles chez les mammifères et plus particulièrement 66 chez la souris (**Annexe 2**). A titre d'exemple, la protéine MEGF6 a été retrouvée dans l'analyse de Rampal comme elle possède l'ancienne séquence mais elle n'est pas retrouvée dans la dernière analyse.

Pour toutes ces protéines potentiellement *O*-fucosylables, le challenge maintenant est de démontrer qu'elles sont bien des cibles de POFUT1 et de donner des pistes sur les fonctions associées à cette modification post-traductionnelle.

IV. Modèles animaux

IV.1 Les souris KO pour *Pofut1*

L'importance de POFUT1a a été étudiée au cours du développement chez la souris. Les embryons invalidés pour le gène *Pofut1* (*Pofut1*^{-/-}) meurent à la moitié de la gestation (E10-E11.5), suite à de sévères défauts dans les processus de somitogenèse, vasculogenèse, cardiogenèse et neurogenèse (Shi and Stanley 2003). La somitogenèse de ces embryons *Pofut1*^{-/-} est fortement perturbée et désorganisée avec à des somites fusionnés et d'autres condensés de tailles et de formes variables, tels que ceux retrouvés également chez des embryons invalidés pour le gène codant *Rbp-jk* (Oka, Nakano et al. 1995). L'absence d'autres effecteurs de la voie Notch tels que les présénilines 1 et 2 entraîne par contre des défauts de somitogenèse plus sévères, sans somites condensés (Donoviel, Hadjantonakis et al. 1999) et une létalité précoce également. Les phénotypes de toutes ces souris KO sont assez comparables. Ils sont plus sévères que celui des souris KO pour un seul récepteur NOTCH tels que le récepteur NOTCH1 (Swiatek, Lindsell et al. 1994; Conlon, Reaume et al. 1995), où la somitogenèse est cependant retardée et désorganisée. La somitogenèse est également désorganisée avec fusions de somites et un développement embryonnaire retardé chez les embryons KO pour *Dll1* (Hrabe de Angelis, McIntyre et al. 1997), *Dll3*

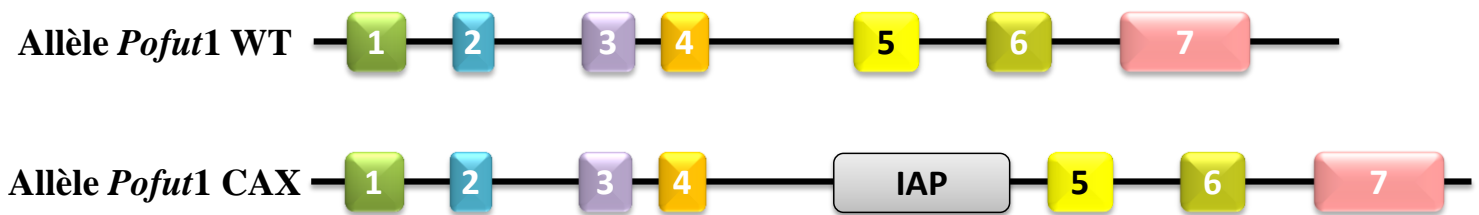


Figure 47 : La mutation cax.

L'allèle *Pofut1*^{cax} (compact axial body) résulte d'une insertion spontanée d'un élément IAP (>6 Kpb) au niveau de l'intron 4 du gène *Pofut1*. Ceci génère un allèle hypomorphe, qui réduit les niveaux d'expression de ce gène et par conséquent de la protéine correspondante (inspirée de (Schuster-Gossler, Harris et al. 2009)).

(Dunwoodie, Clements et al. 2002) et *Lfng* (Evrard, Lun et al. 1998; Zhang and Gridley 1998). Le fait que le KO de *Pofut1* soit plus sévère que celui d'un des récepteurs NOTCH ou d'un de ses ligands peut s'expliquer par le fait qu'il existe potentiellement des mécanismes de compensation entre les récepteurs ou entre les ligands alors que la sous-expression de *Pofut1* affecte potentiellement tous les récepteurs NOTCH et leurs ligands. De plus, l'invalidation de *Pofut1* peut affecter potentiellement d'autres protéines impliquées dans les différents processus affectés dans les modèles animaux cités plus haut. Le développement du système cardio-vasculaire d'embryons KO pour *Pofut1* est également très affecté avec notamment des problèmes de formation des valves cardiaques (Okamura and Saga 2008); comme c'est le cas des embryons *Rbp-jk*^{-/-} (Timmerman, Grego-Bessa et al. 2004).

IV.2 Les souris hypomorphes pour *Pofut1*

En 2009, une mutation spontanée affectant l'expression du gène *Pofut1* a été identifiée chez la souris (Schuster-Gossler, Harris et al. 2009). Il s'agit d'une insertion d'un rétrotransposon de type IAP (Intracisternal A Particle) au niveau de l'intron 4, qui génère un allèle hypomorphe pour *Pofut1* en réduisant les niveaux d'expression de ce gène et par conséquent la quantité de protéine correspondante (**Figure 47**). Cet allèle a été appelé *cax* (compact axial skeleton) parce qu'à l'état homozygote, il génère une forte compaction du squelette axial. Les souris homozygotes pour cet allèle (*Pofut1*^{*cax/cax*}) sont viables mais présentent de nombreuses malformations du squelette, qui résultent d'une perturbation lors du processus de somitogenèse (Schuster-Gossler, Harris et al. 2009) (**Figure 48**). En effet, les quantités réduites de *Pofut1* chez les embryons *Pofut1*^{*cax/cax*} affectent principalement et logiquement la segmentation antéro-postérieure des somites, en réduisant la signalisation Notch et par conséquent les niveaux d'expression de ses gènes cibles tels que les gènes *Hes1*, *Hey*, *Hel*, *Dll1*, *Lfng* et *Hes7*. La perturbation de l'expression cyclique normale de Lunatic fringe (*Lfng*) dans le PSM pourrait également contribuer à ces défauts de compartimentation des somites (Schuster-Gossler, Harris et al. 2009).

Sur fond génétique mixte C3H/HeJ, ces souris *Pofut1*^{*cax/cax*} présentent des phénotypes squelettiques d'intensité variable dans la longueur du corps et de la queue (queue normale, courte voire quasi-inexistante) mais aussi dans la structure de la colonne vertébrale (présence d'hémi-vertèbres ou de vertèbres asymétriques entraînant des déviations,

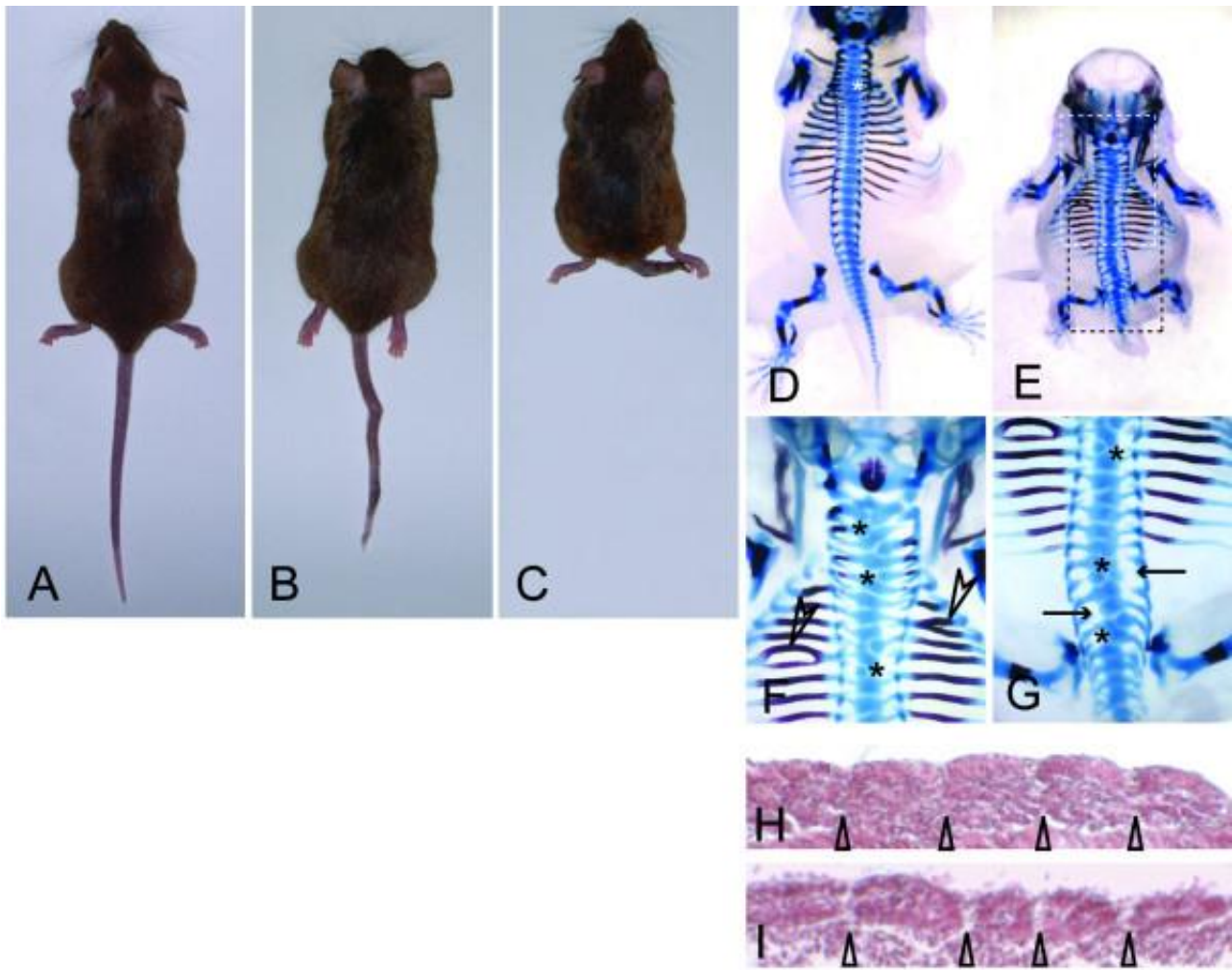


Figure 48 : Phénotypes squelettiques variables et défauts de somitogenèse chez les souris mutantes *Pofut1^{cax/cax}*.

(A-C) Phénotypes squelettiques d'intensité variable chez 3 souris mutantes. (D-G) Préparations squelettiques d'embryons à E15.5 montrant que, même avec un phénotype externe normale (D), les souris *Pofut1^{cax/cax}* peuvent présenter divers défauts squelettiques tels que des vertèbres divisées (astérisques D, F, G), des côtes fusionnées ou divisées (pointes de flèches en F), des pédicules vertébraux réduits ou absents (flèches G) et des troncatures axiales du squelette (E). Les rectangles en pointillés (blanc et noir en E) indiquent les régions agrandies en (F) et (G), respectivement. (H, I) Sections d'embryons mutantes à E9.5 montrant la formation de somites de tailles variables (indiquées par des flèches) (Schuster-Gossler, Harris et al. 2009).

présence de côtes divisées ou fusionnées) et la forme de la queue (ondulée, coudée, torsadée...) (**Figure 48**). Cependant, les mécanismes moléculaires qui conduisent à l'expression de ces phénotypes variables ne sont pas connus à ce jour, même si un phénomène d'ARN interférence lié à la présence de l'élément IAP dans le gène *Pofut1* est possible comme évoqué précédemment (Schuster-Gossler, Harris et al. 2009).

La différenciation myogénique est un processus complexe finement régulé au cours de la myogenèse embryonnaire et de la croissance musculaire post-natale. Au cours de ce processus, **plusieurs voies de signalisation sont impliquées, dont la voie de signalisation Notch** qui est modulée par les interactions des récepteurs avec leurs ligands Delta/Jagged. En permettant la *O*-fucosylation des répétitions EGF-like de NOTCH, la protéine *O*-fucosyltransférase 1 (POFUT1) module ces interactions, nécessaires à l'activation de la voie. **POFUT1 est donc essentielle à la régulation de la différenciation myogénique via Notch.**

Afin d'étudier le rôle précis de POFUT1 dans l'activation de la voie Notch au cours de la différenciation myogénique, le gène *Pofut1* a été sous-exprimé de manière stable dans la lignée myoblastique murine C2C12 (lignée C2C12 Po-) (Der Vartanian, Audfray et al. 2015). Cela consistait à suivre les cinétiques de différenciation ainsi que l'évolution des marqueurs myogéniques (MRFs) et de PAX7, réaliser des études phénotypiques (nombre, forme, contenu en noyaux des myotubes formés) et étudier le rétablissement de l'expression de POFUT1 dans les C2C12 Po-. J'ai participé à ce projet lors de mon master recherche ainsi qu'en début de thèse.

Mon travail de thèse s'est principalement focalisé sur l'étude des **effets de la sous expression du gène *Pofut1* sur la croissance musculaire post-natale des souris *Pofut1*^{cax/cax}** (Schuster-Gossler, Harris et al. 2009) et la capacité des myoblastes dérivés de leurs cellules satellites (MDCS) à initier un programme myogénique dans des conditions où la signalisation Notch est réduite.

Dans un premier temps, il s'agissait de réaliser une analyse morphométrique comparative entre les souris *Pofut1*^{cax/cax} et des souris sauvages C3H ainsi qu'une analyse immunohistologique ciblant chez ces souris des muscles squelettiques contenant des myofibrilles à contraction lente (le muscle soléaire ou *Soleus*), à contraction rapide (le muscle tibial ou *Tibialis*) ou un mélange de ces deux types de fibres (le muscle gastrocnémien ou *Gastrocnemius* et le muscle Quadriceps). Le but de ces analyses, réalisées chez des souris

âgées de 3, 5, 12 et 24 semaines, était d'étudier l'impact de la diminution d'expression du gène *Pofut1* sur la croissance musculaire postnatale, qui fait particulièrement intervenir les cellules satellites lors des trois premières semaines post-natales chez la souris (White, Bierinx et al. 2010).

Dans un deuxième temps, il s'agissait de préparer des cultures primaires de myoblastes dérivés de cellules satellites, isolées à partir de broyats des différents muscles squelettiques d'intérêt cités plus haut et de suivre leur programme myogénique ainsi que la régulation de l'activation de la voie Notch.



RESULTATS

Mon travail de thèse s'articule autour du rôle de POFUT1 dans l'activation de la voie de signalisation Notch au cours de la différenciation myogénique de différents modèles cellulaires et au cours de l'activation des cellules satellites lors de la croissance musculaire postnatale chez la souris.

Une étude *in vitro* basée sur l'analyse des lignées **myoblastiques murines C2C12 sous-exprimant le gène *Pofut1*** fait l'objet d'une première publication, à laquelle j'ai participé en Master et en thèse (**Publication N°1**). Mon travail de thèse porte principalement sur l'étude d'un modèle *in vivo*, à savoir les souris hypomorphes pour le gène *Pofut1* (souris *Pofut1*^{cax/cax}) à partir desquelles les muscles squelettiques et les cellules satellites associées (modèle *ex vivo*) ont été prélevés pour être analysés. Ce travail fait l'objet d'une publication, dont je suis le premier auteur (**Publication N°2**).

Publication N°1: Protein O-fucosyltransferase 1 expression impacts myogenic C2C12 cell commitment via Notch signaling pathway.

Der Vartanian A., Audfray A., **Al Jaam B.**, Janot M., Legardinier S., Maftah A. and Germot A. *Mol Cell Biol.* 2015 Jan;35(2):391-405. (Impact factor en 2015: 4,68)

Publication N°2: Reduced Notch signaling leads to postnatal skeletal muscle hypertrophy in *Pofut1*^{cax/cax} mice.

Al Jaam B., Heu K, Pennarubia F, Segelle A, Magnol L, Germot A, Legardinier S, Blanquet V and Maftah A. *Open Biol.* 2016 Sep;6(9). (Impact factor en 2015: 5,36).

Publication N°1

**Protein *O*-Fucosyltransferase 1 Expression Impacts
Myogenic C2C12 Cell Commitment via the Notch
Signaling Pathway.**

Der Vartanian Audrey, Audfray Aymeric, **Al Jaam Bilal**, Janot Mathilde,
Legardinier Sébastien, Maftah Abderrahman and Germot Agnès.

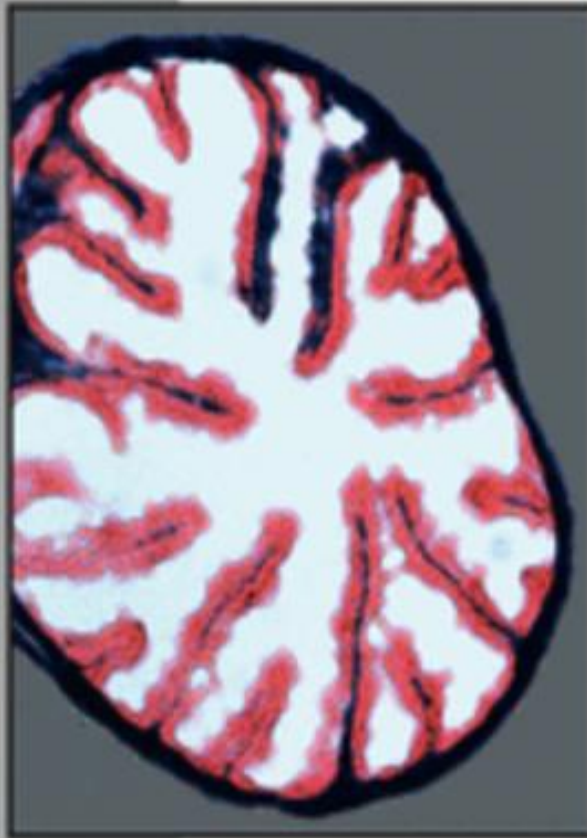
Molecular and Cellular Biology, January 2015, Volume 35, Number 2

La myogenèse squelettique est un processus complexe finement régulé, qui se met en place dès les premières semaines de développement embryonnaire. Des cellules progénitrices donnent naissance à des cellules mononucléées fusiformes appelées myoblastes. Ces myoblastes prolifèrent, fusionnent et se différencient en cellules allongées multinucléées appelées myotubes, à l'origine des fibres musculaires. Sous l'action de plusieurs acteurs, tels que les acteurs de différentes voies de signalisation dont la voie Notch et de facteurs de régulation myogénique (MRFs), ces fibres musculaires se développent et acquièrent leur pleine maturité.

Mon équipe d'accueil s'intéresse à la régulation opérée par la glycosylation sur la différenciation des cellules musculaires. Un des aspects étudiés est le rôle de la O-fucosylation sur l'activation de la signalisation Notch et sur la balance entre cellule indifférenciée et différenciée au cours du processus myogénique. Cette O-fucosylation est catalysée par la protéine O-fucosyltransférase 1 (POFUT1), qui greffe des résidus fucose sur quelques répétitions EGF-*like* des domaines extracellulaires des récepteurs NOTCH et de leurs ligands.

Une première approche a été de créer des lignées cellulaires C2C12 sous-exprimant de manière stable le gène *Pofut1* (lignée C2C12 Po-). L'avantage des lignées myoblastiques murines C2C12 réside principalement dans leur capacité à reproduire les étapes clés de la myogenèse, à savoir l'activation des cellules progénitrices, la prolifération des myoblastes, la différenciation en myotubes et le retour à l'état indifférencié (cellules de réserve). La lignée C2C12 Po- a donc permis l'étude du rôle de l'hypofucosylation sur l'activation de la voie Notch au cours du processus myogénique.

Nous avons montré que la sous-expression de *Pofut1* dans la lignée C2C12 Po- provoquait une diminution de la quantité de NOTCH intracellulaire (NICD) clivé ainsi qu'une diminution d'expression des gènes cibles de Notch, dont *Pax7*. Cette diminution d'activation de la signalisation Notch a eu pour conséquence de faciliter l'engagement précoce des myoblastes C2C12 Po- dans le processus de différenciation au détriment des cellules retournant à l'état indifférencié (déplétion en progéniteurs PAX7+/MYOD-). De plus, des défauts de fusion secondaire ont été observés sans que le mécanisme impliqué ne soit clairement élucidé.



Published Twice Monthly
September 2016, Volume 34, Number 18



AMERICAN
SOCIETY FOR
MICROBIOLOGY

MCB
Molecular and Cellular Biology

Protein O-Fucosyltransferase 1 Expression Impacts Myogenic C2C12 Cell Commitment via the Notch Signaling Pathway

Audrey Der Vartanian, Aymeric Audfray,* Bilal Al Jaam, Mathilde Janot,* Sébastien Legardinier, Abderrahman Maftah, Agnès Germot

INRA, UMR 1061, Unité de Génétique Moléculaire Animale, Université de Limoges, Faculté des Sciences et Techniques, Limoges, France

The Notch signaling pathway plays a crucial role in skeletal muscle regeneration in mammals by controlling the transition of satellite cells from quiescence to an activated state, their proliferation, and their commitment toward myotubes or self-renewal. O-fucosylation on Notch receptor epidermal growth factor (EGF)-like repeats is catalyzed by the protein O-fucosyltransferase 1 (Pofut1) and primarily controls Notch interaction with its ligands. To approach the role of O-fucosylation in myogenesis, we analyzed a murine myoblastic C2C12 cell line downregulated for *Pofut1* expression by short hairpin RNA (shRNA) inhibition during the time course of differentiation. Knockdown of *Pofut1* affected the signaling pathway activation by a reduction of the amount of cleaved Notch intracellular domain and a decrease in downstream Notch target gene expression. Depletion in Pax7⁺/MyoD⁻ cells and earlier myogenic program entrance were observed, leading to an increase in myotube quantity with a small number of nuclei, reflecting fusion defects. The rescue of *Pofut1* expression in knockdown cells restored Notch signaling activation and a normal course in C2C12 differentiation. Our results establish the critical role of Pofut1 on Notch pathway activation during myogenic differentiation.

In response to injury, adult skeletal muscle has a remarkable ability to regenerate through skeletal muscle adult stem cells called satellite cells. They participate in postnatal muscle growth and regeneration. When activated by stimuli such as injury or exercise, satellite cells enter the cell cycle and begin to proliferate (1). Most cells commit to a myoblast cell fate for fusion and fiber formation, while some participate in the self-renewal of satellite cells. After birth, cell commitment to a myogenic program is regulated by the expression of *Pax3* and *Pax7*, which control activation of the myogenic determination factor *MyoD* (2, 3) and allows *Myog* expression, necessary for the formation of multinucleated cells (4). Mice knocked out for *Pax7* completely lack satellite cells, and their skeletal muscle mass is severely impacted (5). In *MyoD*^{-/-} mice, muscle regeneration is also impaired due to a defect in the ability of satellite cells to initiate the process of differentiation (6). Deletion of *Pax7* in mouse myoblasts (MB) was shown to diminish the expression of *MyoD* by 25% but had no impact on *Myog* (7). Thus, the ratio of Pax7 to MyoD is critical in cell fate determination (8). Quiescent satellite cells were demonstrated to be Pax7⁺/MyoD⁻, whereas proliferative cells were Pax7⁺/MyoD⁺, and differentiated cells were Pax7⁻/MyoD⁺. *In vitro*, myogenic cell lines like murine C2C12 cells are able to reproduce different steps of muscle cell differentiation, similar to the reactivation of satellite cells (9). Distinct cell types can be followed during C2C12 differentiation: proliferating myoblasts, multinucleated cells called myotubes (MT) expressing muscle-specific structural proteins like myosin and troponin, and mononucleated cells, also known as reserve cells (RC). These encompass two distinct populations, where some are committed to self-renew the quiescent progenitors and others are intended for future fusion processes (10).

Among genes controlling the behavior and fate of stem cells, Notch signaling pathway members are essential for the proper progress of myogenesis (11, 12). The canonical Notch signaling pathway is initiated by the interaction between a member of the DSL (for Delta, Serrate, and Lag-2) ligand family and a member of the Notch transmembrane receptors (13). Four receptors (Notch1 to Notch4) and five ligands (Dll1, Dll3, Dll4, Jagged1, and Jag-

ged2) are known in mammals; however, the reason why a receptor interacts with a specific ligand and what precise biological functions they control are still unclear (11). Binding of ligands to Notch receptors leads to an enzymatic cleavage of Notch, which is released in the cytoplasm as the active form of the protein, also called NICD (Notch intracellular domain), to finally translocate into the nucleus (14). Activation of Notch target genes, such as the *Hes* and *Hey* family members of basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factors, inhibits myogenic differentiation (15). In C2C12, this inhibition results from two molecular mechanisms. In a CBF1/RBP-J κ -dependent mechanism, NICD switches CBF1/RBP-J κ from a transcriptional repressor to an activator inducing *Hes1* transcription and the subsequent decrease of *MyoD* (16). A CBF1-independent mechanism contributes to a more general cellular differentiation and does not antagonize *MyoD* activity (17–19). The ratio between cells intended to fuse and reserve cells was demonstrated to be controlled by the Notch signaling pathway, as well as the activation of reserve cells (10). Furthermore, NICD directly regulates *Pax7* expression through CBF1/RBP-J κ in satellite cells, and *MyoD*^{-/-} mouse myoblasts upregulate *Pax7* due to the activated Notch pathway (8). As a cross-inhibitory interaction between Pax7 and MyoD exists, every change in the relative

Received 8 October 2014 Accepted 26 October 2014

Accepted manuscript posted online 10 November 2014

Citation Der Vartanian A, Audfray A, Al Jaam B, Janot M, Legardinier S, Maftah A, Germot A. 2015. Protein O-fucosyltransferase 1 expression impacts myogenic C2C12 cell commitment via the Notch signaling pathway. *Mol Cell Biol* 35:391–405. doi:10.1128/MCB.00890-14.

Address correspondence to Agnès Germot, agnes.germot@unilim.fr.

* Present address: Aymeric Audfray, Centre de Recherche sur les Macromolécules Végétales, CNRS, Grenoble, France; Mathilde Janot, CHU Service de Biochimie, Biologie Moléculaire, Nutrition, Métabolisme, CHU Nancy, Vandœuvre-lès-Nancy, France.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/MCB.00890-14

amount of transcriptional factors, partly controlled by Notch activity, will affect cell fate determination (20). Numerous actors participate in the modulation of Notch pathway activation (11). For example, the expression of ligands and Notch receptors on the same cell can attenuate the signaling in a cell-autonomous manner. In C2C12 cells, the asymmetrical shedding of Dll1 ligands with more ADAM (a disintegrin and metalloprotease)-mediated cleavages in reserve cells (Pax7⁺) than in myotubes (Pax7⁻) participates in the cell determination (9).

The phenotype of *Pofut1*^{-/-} mouse embryos is more severe than the *Notch1*-null phenotype and resembles embryos lacking downstream components of Notch signaling, like CBF1/RBP- κ (21). Interactions between Notch receptors and ligands depend on the activity of the protein O-fucosyltransferase 1 (Pofut1) (22), which O-fucosylates the C²X₄(S/T)C³ (where C² and C³ are the second and third cysteines, respectively) consensus motif of some epidermal growth factor (EGF)-like domains (23). Both active Pofut1 and O-fucosylation of Notch are required for the canonical Notch signaling by Delta1 or Jagged1 (24). Mutation on the O-fucosylation site in mouse Notch1 EGF12 results in a hypomorphic allele affecting the Notch-ligand interaction (25). Notch signaling is also influenced by β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferases of the Fringe family (Lunatic, Manic, and Radical Fringe) (26, 27) and a β 1,4-galactosyltransferase (28), which elongate the O-linked fucose. The presence of a terminal sialic acid was shown on Notch1 O-fucosylglycan (29), but no information was reported in favor of its involvement in Notch signaling. A global transcriptomic approach based on glycogene analysis brought our attention to these enzymes in the context of the onset of myogenesis in C2C12 (30). The inverting glycosyltransferase Pofut1 was first characterized in mammalian CHO cells (31), and subsequent investigations demonstrated its presence in all principal metazoan genomes as a single-copy gene (32). Its expression is ubiquitous in the organism and confirmed to be present in skeletal muscles (22, 32). Unlike the Golgian fucosyltransferases involved in N-glycosylation, Pofut1 is an endoplasmic reticulum (ER)-resident glycoprotein (33). To identify the role of Pofut1 during myogenesis, a stable murine C2C12 cell line with knockdown of *Pofut1* (Po⁻) was created. Semi-quantitative real-time reverse transcription-PCR (RT-PCR) and Western blot analyses were performed to profile the expression of Notch signaling actors and some key myogenic players during differentiation of C2C12 cells. Phenotypic studies and coimmunostaining experiments were also completed. Our results provide evidence that Po⁻ cells, compared to wild-type C2C12 cells, present a disturbed myogenic program with an increased fusion index and earlier expression of myogenic regulatory factors (MRFs), resulting in depletion of progenitor cells. The peculiar *Pofut1* knockdown C2C12 phenotype is linked to an attenuation of the Notch signaling pathway. In disturbing the ratio between Pax7 and MyoD, it provokes an earlier differentiation with impaired progression into the myogenic process.

MATERIALS AND METHODS

C2C12 cell culture. The C2C12 cell line, established from the leg muscle of an adult C3H mouse (American Type Culture Collection [ATCC], Manassas, VA), was cultured in a growth medium (GM) with Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA) supplemented with 10% fetal calf serum (Eurobio, Courtaboeuf, France), 4 mM L-glutamine, 50 units/ml penicillin, and 50 μ g/ml streptomycin (at 37°C and 5% CO₂). Cells were plated at a density of 1.5 \times 10⁴ cells/cm². After 48 h, growth medium was removed, and differentiation was induced by the addition of differentiation medium (DM), which is DMEM supplemented with 2% horse serum, 4 mM L-glutamine, 50

units/ml penicillin, and 50 μ g/ml streptomycin. Medium was routinely changed every 24 h. For each sample, cells were harvested after trypsinization (0.125% trypsin, 0.125 mM EDTA) for 5 min at 37°C. Samples named myoblasts (MB) corresponded to C2C12 cells at 0 h, defined by replacement of GM with DM, and myoblasts in differentiation (MBd) corresponded to C2C12 cells from 12 h to 48 h in DM. Reserve cells (RC) were isolated using a short trypsinization (0.1% trypsin, 0.1 mM EDTA; 30 s) that specifically removed myotubes (MT) and left only RC adherent to the flask (35). The two cell types were collected at 72 h and 120 h after DM addition.

Generation of Pofut1 knockdown C2C12 cell line. The *Pofut1* knockdown was obtained using electroporation by stably transfecting C2C12 cells with a pSilencer 2.1-U6-hygromycin construct containing an insert encoding a small interfering RNA (siRNA) directed against the mouse *Pofut1* exon 3 (kind gift of P. Stanley, Albert Einstein College of Medicine, New York, NY). Selection for *Pofut1* short hairpin RNA (shRNA) C2C12 clones was performed using 500 μ g/ml hygromycin B (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). The *Pofut1* shRNA C2C12 clone 5 was chosen for further study and is here referred to as the Po⁻ cell line. A control C2C12 cell line (Ctrl shRNA) was obtained by electroporation of a pSilencer 2.1-U6-neomycin vector containing a negative-control siRNA template (Ambion, Life Technologies) into C2C12 cells. It was selected with a neomycin concentration of 1 mg/ml (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Electroporation-mediated transfections were performed on C2C12 proliferating myoblasts using a GenePulserX cell transfection system (Bio-Rad, Hercules, CA). Briefly, 3 \times 10⁶ cells were suspended in 1 ml of phosphate-buffered saline (PBS) containing 3 μ g of plasmid and then electroporated at 340 V for 13 ms. The electroporated cells were cultured in 100-mm petri dishes in GM and selected with the appropriate antibiotics.

Generation of Pofut1 knockdown C2C12 cell lines reexpressing Pofut1. The *Pofut1* knockdown cell lines reexpressing *Pofut1* were obtained by exogenous expression of the *Pofut1* mutated coding sequence (CDS) using pLJM1-EGFP (where EGFP is enhanced green fluorescent protein) lentiviral vector (Addgene, Inc., Cambridge, MA). Three knock-in lentivectors were generated by replacing EGFP with the mouse *Pofut1* (no mutation, 0M) or a *Pofut1* mutated CDS (with one or three mutations, indicated as 1M or 3M, respectively). The mutagenesis was performed by PCR to generate pLJM1-*Pofut1* expression vectors that contained one (1M) or three (3M) silent mutations and checked by sequencing. The mutations were introduced in exon 3 of the *Pofut1* gene at the 21-bp *Pofut1* siRNA target sequence. For virion production, packaging HEK293T cells were seeded at 1 \times 10⁶ into a 100-mm tissue culture dish in GM without antibiotics and incubated for 24 h (at 37°C and 5% CO₂). At 50% of cell confluence, cells were washed with 1 \times PBS, and 4 mM L-glutamine-supplemented DMEM was added to proceed to transfection. For each pLJM1-*Pofut1* construct, 2.6 μ g was cotransfected with 26 μ l of packaging vector using Mission lentiviral packaging mix (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) and 16 μ l of Lipofectamine reagent (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. Cells were incubated for 16 h, and then the medium was changed. After 24 h of virion production, the medium was removed, centrifuged for 5 min at 3,000 rpm, and filtered through a 0.45- μ m-pore-size filter. To generate stable *Pofut1*-reexpressing Po⁻ cell lines, 3 \times 10⁵ cells were seeded into six-well plates. These cells were infected 24 h later with viral particles using 8 μ g/ml of Polybrene. Po⁻ cell lines that stably inserted lentivectors were selected 48 h after infection with 2 μ g/ml puromycin over 5 days.

Phenotypic studies. Cells were fixed in PBS containing 4% paraformaldehyde (PFA) for 20 min and dried overnight in 70% ethanol. Mono- and multinucleated cells were counted after hematoxylin-eosin staining in three independent experiments. For each sample, six randomized visual fields at a magnification of \times 100 were studied using ImageJ, version 1.45s, software (36). The fusion index was calculated by dividing the number of nuclei in myotubes by the total number of nuclei. Myotubes were catego-

rized into five different groups according to the number of nuclei per myotube (<5, 5 to 10, 10 to 20, 20 to 40, and >40).

Semiquantitative real-time RT-PCR. Total RNA was extracted using an RNeasy minikit (Qiagen, Inc., Hilden, Germany). Integrity and quantity of total RNA were measured using an Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) and a NanoDrop 1000 instrument (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE), respectively. A high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Life Technologies) was used for the conversion of 10 µg of total RNA to single-stranded cDNA suitable for quantitative PCR applications. Gene expression was determined by semiquantitative real-time RT-PCR on an ABI Prism 7900 Sequence Detector System (SDS) using the TaqMan probe-based chemistry (Applied Biosystems). 6-Carboxyfluorescein (6-FAM) was used as a reporter. The amplification reactions were performed with 2 ng of cDNA according to the manufacturer's instructions. A TaqMan low-density array microfluidic card (Applied Biosystems) preloaded with 20 probes was used. Validation of probes and primer specificities were assessed by Applied Biosystems (data available upon request).

Data analysis. Gene expression data were collected using the SDS, version 2.2.2, software (Applied Biosystems). The comparative threshold cycle (C_T) method ($\Delta\Delta C_T$) (37) was used to quantify the relative abundance of each mRNA. This method uses a calibrator sample in order to enable comparison of the gene expression levels of different samples. When the proliferation stage was studied, the calibrator sample corresponded to cells just after plating, whereas in the differentiation stage, we used C2C12 cells just before the addition of DM (0 h) as the calibrator sample. Relative quantity (RQ) values reflect expression changes in the sample of interest compared to the calibrator sample, after normalization with 18S and *Gapdh* reference genes. They were calculated only for a threshold cycle (C_T) lower than 37 (data available upon request). Statistical analyses were performed by comparison of each differentiation time relative to 0 h of wild-type (WT) C2C12 cells, which was set as 1.

Western blot analysis. Proteins were extracted from C2C12 cells in radioimmunoprecipitation assay (RIPA) lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 0.5% sodium deoxycholate, 1% NP-40, 0.1% SDS, and protease inhibitor cocktail (Complete; Roche Diagnostics). The suspension was then centrifuged (12,000 × g for 10 min) at 4°C. Supernatant was recovered, and protein quantity was estimated using a bicinchoninic acid (BCA) protein assay (Sigma-Aldrich Corp.) with bovine serum albumin as a standard. Fifty or hundred micrograms of extracted proteins was separated under denaturing and reducing conditions on a 12% polyacrylamide gel and then transferred to a Hybond C-Extra Nitrocellulose membrane (GE Healthcare, Buckinghamshire, United Kingdom). Nonspecific antibody binding was prevented using blocking buffer for 1 h at room temperature with 5% bovine serum albumin in 0.1% Tween 20-Tris-buffered saline (TBST; 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.6) for cleaved NICD and desmin detection or with 5% nonfat dry milk in 0.1% TBST for the other antibodies. Incubation with the primary antibodies diluted in blocking buffer was performed overnight at 4°C, followed by three washes of 5 min each in 0.1% TBST. Blots were incubated with horseradish peroxidase (HRP)-coupled secondary antibody in 2.5% nonfat dry milk in 0.1% TBST for 1 h at room temperature. After three washes in 0.1% TBST, immunoblots were revealed by enhanced chemiluminescence using BM Chemiluminescence Western blotting substrate (peroxidase [POD]) (Roche Applied Science) and exposed to a film (Hyperfilm ECL; GE Healthcare). The following antibodies were used: cleaved Notch1 (Val1744) from Cell Signaling Technology (Danvers, MA), desmin (Y-20) from Santa Cruz Biotechnology, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) from R&D Systems (Minneapolis, MN), MyoD1 (clone 5.8A) and MyoG (clone F5D) from Dako Cytomation (Glostrup, Copenhagen, Denmark), myosin (skeletal, fast MY-32) from Sigma-Aldrich Corp., Pax7 from Developmental Studies Hybridoma Bank (University of Iowa, IA), and Pofut1 rabbit antiserum raised against the peptide CNLAPSHWPEKRVAY and purified by Agro-Bio (La Ferté St-Aubin, France). For quantification,

analysis of band intensities was carried out using ImageJ, version 1.45s, software. All band intensities were normalized to the corresponding *Gapdh* or pan-cadherin band intensity. Then, band intensities were compared to the WT C2C12 myoblast level at 0 h, which was set as 1, except for the experiment shown in Fig. 7 where Po⁻ cells were used as reference.

Biotinylation of cell surface proteins and Notch detection. The detection of the Notch receptor on the cell surface was inspired by the experimental process described by Rampal et al. (38). C2C12 cell lines were plated in 100 mm tissue culture dishes and collected the next day with a cell scraper. Cells were washed three times with PBS (pH 8.0) and counted on a Malassez slide. For each of the C2C12 cell lines, 5 × 10⁶ cells were incubated with 2 mM EZ-link sulfo-*N*-hydroxysuccinimide-biotin (sulfo-NHS-biotin) (Pierce Chemical Company, Rockford, IL) or with PBS (as a control) at room temperature for 30 min. The biotinylation reagent was then removed, and cells were washed with 100 mM glycine-PBS (pH 8.0) for 15 min to quench the biotinylation reaction. Cells were lysed in RIPA lysis buffer. Then, lysates were cleared by centrifugation (12,000 × g for 10 min) at 4°C and incubated overnight at 4°C with 50 µl of magnetic nanoparticles conjugated to streptavidin (MagCelect Streptavidin Ferrofluid; R&D Systems) previously equilibrated with RIPA buffer. The membrane proteins were isolated from the total protein fraction using a magnetic rack. Streptavidin-bound biotinylated proteins were captured by the magnet during 15 min at 4°C, leaving the nonbiotinylated proteins in the supernatant. The washed magnetic streptavidin beads were placed in Laemmli buffer, boiled for 5 min at 95°C, and briefly vortexed prior to separation of proteins on a gradient (4 to 12%) of Novex Tris-glycine precast gel electrophoresis gels (Invitrogen, Life Technologies). The correct isolation of biotinylated membrane proteins from the other nonbiotinylated proteins was checked by Western blotting using streptavidin-HRP and revealed with the 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) peroxidase substrate. Anti-Notch1 (H-131) raised against amino acids 20 to 150 within the extracellular domain of human Notch1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) was used to detect Notch1 at the C2C12 cell surface. Anti-pan-cadherin (Sigma-Aldrich Corp.) and anti-GAPDH (R&D Systems) antibodies were used to control the correct separation of membrane proteins.

Cell proliferation assay. C2C12 myoblasts were seeded at 2,000 cells per well in GM into 96-well plates. They were incubated for 12 h (at 37°C and 5% CO₂). Twenty microliters of MTS [3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl]-5-(3-carboxymethoxy phenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium salt] solution (Cell Titer 96 Aqueous Non-Radioactive cell proliferation assay; Promega Corp., Madison, WI) in a 200-µl final volume was added at 12, 24, 48, 72, or 120 h of the time course study. The plates were then incubated for 1 h, and the absorbance at 490 nm of formazan, a product from the bioreduced MTS, was measured using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) plate reader (FLUOstar Omega; BMG Labtech, Ortenberg, Germany).

Immunofluorescence studies. C2C12 cell lines were fixed with 4% PFA-PBS for 20 min and permeabilized with 0.1% Triton X-100-PBS for 30 min at 4°C. To minimize nonspecific reactions, cells were saturated for 1 h at room temperature using PBS with 20% serum from the same species in which the secondary antibody was raised and then washed three times with PBS. Immunolabeling was performed with the primary antibodies MyoD (C-20) from Santa Cruz Biotechnology, GRP94 from Abcam (Cambridge, United Kingdom), Pax7, or Pofut1 overnight at 4°C; cells were washed three times with 0.1% Tween 20-PBS and incubated for 1 h at room temperature with polyclonal Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies (Molecular Probes, Life Technologies, Eugene, OR). After three washes with 0.01% Tween 20-PBS, nuclei were labeled using 1 µg/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma-Aldrich Corp.). Cells were rinsed three final times before being mounted on slides with Mowiol 4-88 mounting medium and sealed with glass coverslips. For cellular detection of incorporated 6-alkynyl fucose (Invitrogen, Life Technologies), cell lines were seeded at 1.5 × 10⁴ cells in eight-well tissue culture chambers (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Germany) and incubated for 48 h in

untreated GM or medium containing 200 μM 6-alkynyl fucose. Cells were rinsed with $1\times$ PBS, fixed, and permeabilized. The Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC), or “click chemistry,” reaction was performed at room temperature for 1 h using azido-biotin and a Click-iT protein reaction buffer kit, according to the manufacturer’s instructions (Invitrogen, Life Technologies). Molecules modified by alkynyl fucose were detected by Alexa Fluor 594-streptavidin (Invitrogen, Life Technologies). All the coimmunostaining and colocalization studies were performed using confocal microscopy (LSM 510 META; Zeiss) with Zeiss LSM software, version 4.2.0.121. Photographs were taken using an epifluorescence microscope (Leica DMI4000B MM AF Imaging System) powered by MetaMorph (Universal Imaging Corp., Downingtown, PA). The numbers of Pax7⁺/MyoD⁻, Pax7⁺/MyoD⁺, and Pax7⁻/MyoD⁺ cells were counted and expressed as percentage of the total numbers of immunostained cells. Data from multiple fields were pooled to give a population mean (\pm standard error of the mean [SEM]) of triplicate independent experiments.

DAPT cell treatment. Wild-type C2C12 and Po⁻ cells were induced to differentiate for 3 days in DM in the presence of dimethyl sulfoxide (DMSO) and 0.5, 1, 2.5, 5, or 10 μM *N*-[*N*-(3,5-difluorophenacetyl)-*L*-alanyl]-(*S*)-phenylglycine *t*-butyl ester (DAPT) (Calbiochem, San Diego, CA). Afterwards, cells were stained by hematoxylin-eosin to determine their fusion index and were also used for protein extraction. A total of 100 μg of each extract was analyzed by Western blotting using the cleaved Notch1 (Val1744) antibody (Cell Signaling Technology).

Statistical analysis. All of the experiments were performed at least three times, and results are reported as the means \pm SEMs. Statistical comparisons were performed using two-tailed *t* tests implemented in Prism, version 5.03 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). A *P* value of 0.05 or less was considered statistically significant.

RESULTS

A stable C2C12 cell line knockdown for *Pofut1*. In the present work, we evaluated the role of protein *O*-fucosyltransferase 1, *Pofut1*, responsible of *O*-fucose addition, during the onset of myogenic differentiation. Seven stable *Pofut1* shRNA C2C12 clones were generated. Six of them showed significant regulation of *Pofut1* protein levels, decreasing from a factor of 1.9 to 6.2 (Fig. 1A). Moreover, they showed similar transcriptional profiles for genes involved in the Notch signaling pathway and in myogenic differentiation (data not shown). Among them, clone 5 displayed the strongest downregulation of *Pofut1*; this clone was named Po⁻ and was used in the subsequent work. At 0 h, Po⁻ showed reduced *Pofut1* mRNA expression of about 40% relative to the WT or control shRNA C2C12, and it still remained significantly lower during the first 120 h of the differentiation process (Fig. 1B). Interestingly, *Pofut1* was significantly more expressed in RC than in MT, independently of the considered cell lines (Fig. 1B). These expression profiles were confirmed at the protein level with a higher *Pofut1* amount in WT and control shRNA C2C12 cells than in Po⁻ cells from 0 to 48 h of myogenic differentiation (Fig. 1C). Surprisingly, *Pofut1* was poorly expressed in MT and did not show any significant difference in expression levels between cell lines, whereas Po⁻ myoblasts and reserve cells presented less than 50% of *Pofut1* expression relative to WT or control shRNA C2C12 myoblasts and reserve cells, respectively (Fig. 1C). The *Pofut1* differential expression linked to cell type could reveal a modulator role for *Pofut1* in the context of myoblast differentiation.

Activation of Notch signaling pathway during myogenic differentiation. To determine if the Notch signaling pathway was affected by *Pofut1* knockdown, the presence of the active form of Notch receptor was followed by Western blotting using a Val1744 antibody that reveals only cleaved NICD (39). In WT and control

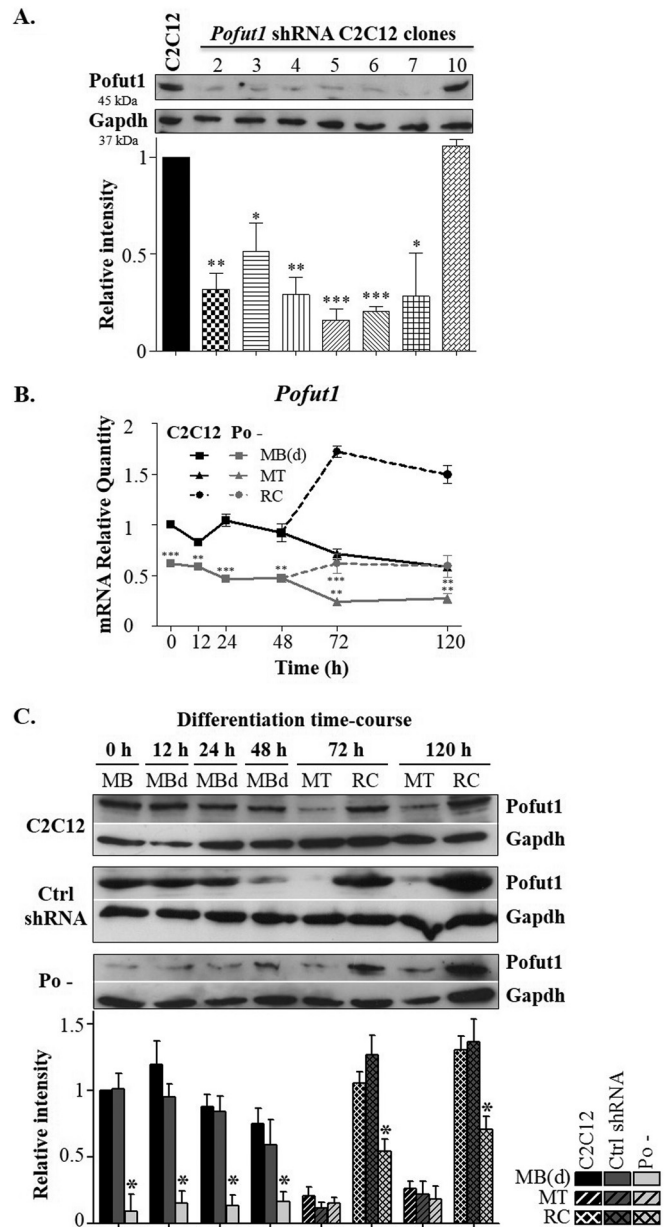


FIG 1 Characterization of the *Pofut1* knockdown C2C12 cell line. (A) *Pofut1* expression in MB of *Pofut1* shRNA C2C12 clones. Histograms showed *Pofut1* expression relative to *Gapdh* for each clone compared to that in WT C2C12 cells. (B) Relative quantities of *Pofut1* expression in WT C2C12 and Po⁻ cells. In both cell lines, fold changes are expressed relative to the value at 0 h of WT C2C12 cells. (C) Western blot analyses of *Pofut1* expression in WT C2C12, control shRNA, and Po⁻ cells. Histograms represent quantification of *Pofut1* band intensity relative to *Gapdh*. All ratios were calibrated relative to time zero of WT C2C12 cells. *, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01; ***, *P* < 0.001.

shRNA C2C12 cells, NICD was detected from 0 h to 48 h of the differentiation process, and it was more strongly expressed in RC than in MT, particularly at 120 h (Fig. 2A). This finding confirms the previous study by Sun et al. (9), where NICD was detected during the first 3 days of differentiation, with nearly restricted expression in RC at day 3. The NICD profile in Po⁻ cells was significantly lowered by 34 to 87% than in WT and control shRNA C2C12 cells depending on the differentiation time considered. As

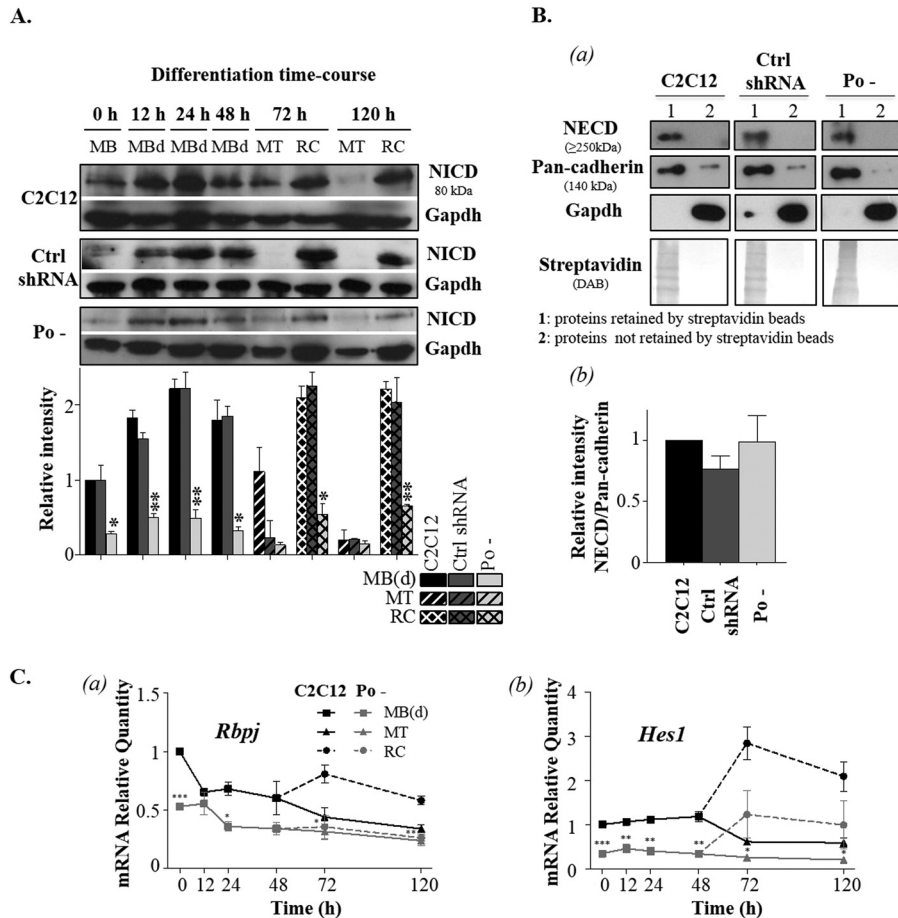


FIG 2 Notch signaling pathway activation and cell surface receptor expression. (A) Detection of cleaved Notch intracellular domain (NICD) by Western blotting, during myogenic differentiation, for WT C2C12, control shRNA, and Po⁻ cells. Histograms represent quantification of NICD as previously calculated. (B, a) Western blot detection of the Notch1 extracellular domain (NECD), pan-cadherin, and Gapdh expression, after a cell surface biotinylation process, on the streptavidin-retained fraction (lanes 1) and flowthrough fraction (lanes 2). Labeling with biotin and correct separation of protein fractions were checked using streptavidin-HRP and revealed by DAB. (b) Histograms representing quantification of Notch receptor at the surface of WT C2C12, control shRNA, and Po⁻ myoblasts calculated by NECD/pan-cadherin ratio. (C) Gene expression of *Rbpj* (a), encoding a nuclear partner of NICD, and *Hes1* (b), encoding a transcriptional repressor regulating myogenesis in WT C2C12 cells and Po⁻ cells. In both cell lines, fold changes are expressed relative to time zero for WT C2C12 cells. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

previously noted in the Pofut1 expression profile (Fig. 1C), NICD expression in RC is greater than in MT, with a decrease by at least half in Po⁻ RC compared to WT and control shRNA RC (Fig. 2A). Regardless of the cell lines, no significant difference in NICD levels was noticed in MT. In Po⁻ cells, down-expression of *Pofut1* could alter the proteolytic cleavage following a weaker interaction between Notch and ligands present on adjacent cells. But the smaller amount of cleaved Notch detected in Po⁻ cells could also be related to a lesser presence of Notch receptors at the cell surface. In order to test this eventuality, levels of Notch receptor at the cell surface were investigated in C2C12 cell lines using an anti-Notch1 extracellular domain (NECD) antibody on proteins extracted after cell surface protein biotinylation (Fig. 2B). Notch1 was detected only in the enriched fraction of membrane proteins for each C2C12 cell line (Fig. 2Ba). Probing for common membrane and cytosolic protein markers showed that membrane proteins such as cadherins and cytosolic proteins like Gapdh were highly enriched in the membrane and cytosolic fractions, respectively. No significant difference was observed in Notch cell surface

expression between Po⁻ and WT or control shRNA C2C12 cells (Fig. 2Bb).

Nevertheless, the presence of cleaved Notch does not prove that the Notch signaling pathway is fully activated since several intracellular partners can regulate NICD action toward the transcription of its target genes. Following potential cytoplasmic interactions, NICD forms a transcriptional coactivation complex in the nucleus (40). We analyzed the expression of three genes encoding essential proteins that compose this complex: *Rbpj* (the DNA binding transcription factor, nuclear activator of the pathway), *Maml1* (Mastermind-like 1 transcriptional coactivator), and *Ep300* (a histone acetyltransferase). *Maml1* and *Ep300* expression levels were different only between RC and MT for both WT C2C12 and Po⁻, with greater expression in RC (data available upon request). However, the expression of *Rbpj* decreased throughout the differentiation process (Fig. 2Ca). At 120 h in WT C2C12 cells, *Rbpj* expression had decreased by 66% and 42% for MT and RC, respectively. In Po⁻ cells, the phenomenon was accentuated with a decrease of 47% at the beginning of the time

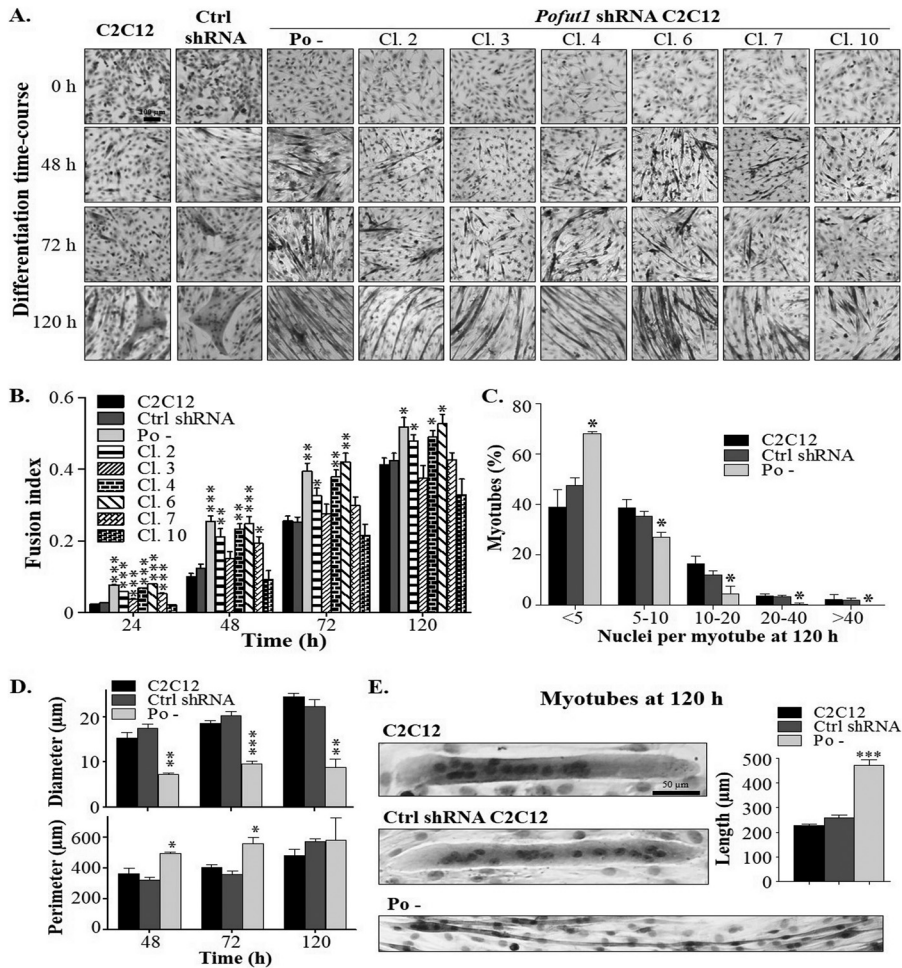


FIG 3 *Pofut1* knockdown in C2C12 cells promotes myogenic differentiation but alters myotube phenotype. (A) Photographs of WT C2C12, control shRNA, Po^- , and various *Pofut1* shRNA clones. (B) Fusion indexes of WT C2C12, control shRNA, Po^- , and other *Pofut1* shRNA clones. (C) Percentages of myotube populations categorized by the number of nuclei for WT C2C12, control shRNA, and Po^- cells at 120 h. (D) Phenotypic measurements of myotube diameter and perimeter at three times of the differentiation process. (E) Myotube photographs and lengths observed at 120 h. Cl, clone. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

course compared to the WT level and a significant reduction by 45% in RC at 120 h.

Final activation of Notch signaling can be measured by expression of some Hairy/Enhancer of split genes encoding transcriptional inhibitors (41). We analyzed the expression of *Hes1*, *Hes5*, *Hes7*, *Hey1*, *Hey2*, and *HeyL*, which are targets for NICD (42), and *Hes6*, which is upregulated during myogenic differentiation (30, 43). Expression of the *Hes5*, *Hes7*, and *Hey2* genes was not detected regardless of the time course of the C2C12 differentiation process. Although not necessary in this context, they cannot be ruled out as actors of early developmental processes like somitogenesis, as demonstrated for *Hes7* (44). Expression levels of *Hes1*, *Hes6*, *Hey1*, and *HeyL* were modified during WT and Po^- cell differentiation. Regardless of the C2C12 cell line considered, *Hes1*, *Hey1*, and *HeyL* were more expressed in RC (Fig. 2Cb) (data available upon request), coinciding with the presence of NICD and expression of *Rbpj*, *Maml1*, and *Ep300*. In Po^- cells, *Hes1* expression was significantly reduced (except in RC), compared to WT C2C12 cells (reduction between 53% and 71%). Although both *Hes1* and *Hey1* had inhibitory activities during myogenesis, directly targeting promoters of myogenic genes or interacting with

key myogenic factors, only *Hes1* seemed to directly interact with *MyoD* and sequester it (41, 45). *Hes6* expression was enhanced during the first 120 h of the differentiation process and was higher in MT than in RC but without a significant difference between levels in WT and Po^- cells (data available upon request).

We showed that cleaved NICD, components of the coactivation complex, and some transcription factors inhibiting myogenic differentiation were upregulated in RC versus MT. Downregulation of *Pofut1* significantly lowered the quantity of cleaved NICD and the expression levels of *Rbpj* and *Hes1* but without modification of the cell surface expression pattern of Notch1.

***Pofut1* reduction affects the timing of myogenic differentiation through Notch activation.** Although observed phenotypes and fusion indexes (Fig. 3A and B) of WT and control shRNA C2C12 cells did not show significant differences during the first 120 h of differentiation process, the downregulation of *Pofut1* in Po^- cells induced more elongated mononucleated cells at 0 h and clearly more multinucleated cells (MT) from 48 h. These observations were also noted for *Pofut1* shRNA clones 2, 4, and 6, where *Pofut1* expression was more than 60% diminished (Fig. 1A and 3A and B). For clones 3 and 7 where the *Pofut1* decrease was less

marked (Fig. 1A), the quantity of slender multinucleated cells was also less pronounced, and no significant difference in fusion indexes was seen after 48 h (Fig. 3A and B). Only clone 10 did not show any difference compared to the WT and control shRNA C2C12, in agreement with an absence of Pofut1 deregulation (Fig. 1A). Globally, it appeared that the differentiation process was advanced for all clones, except number 10. In Po⁻ cells, we found that the fusion process was already active around 24 h earlier than normal. Taken together, these results demonstrate that Pofut1 is a key actor in the timing of myogenic differentiation. To characterize the peculiar MT phenotype of *Pofut1* knockdown, the number of nuclei per multinucleated cell was counted in Po⁻, WT, and control shRNA C2C12 cell lines. No significant difference was observed during the first 72 h (data not shown). At 120 h, while WT and control shRNA C2C12 cells had a mean of 9 and 8 nuclei per MT, respectively, Po⁻ cells had a significantly lower number of nuclei, with an average of only 4 nuclei per MT. To take into account the heterogeneity in number of nuclei per MT, they were categorized into 5 groups (Fig. 3C). For each group, Po⁻ cells had significantly more MT with a small number of nuclei (68% versus 39% in WT C2C12) than MT with a number of nuclei greater than 5. For example, 16% of WT C2C12 MT had 10 to 20 nuclei, whereas this percentage was only of 5% in Po⁻ cells. No MT with more than 40 nuclei was observed in Po⁻ cells at 120 h. Therefore, when *Pofut1* is knocked down, myoblast fusion is affected during differentiation, with an earlier start but a significantly reduced capacity of cell fusion into multinucleated myotubes. To better characterize phenotypes of multinucleated cells in the three cell lines, their diameters and perimeters were measured (Fig. 3D). No significant difference was observed between WT and control shRNA C2C12 cells. In Po⁻ cells, the MT diameter was significantly smaller (7 μ m at 48 h and 9 μ m at 120 h) than that in WT C2C12 cells (15 μ m at 48 h and 25 μ m at 120 h). The MT perimeter was significantly increased in Po⁻ cells at 48 h and 72 h but not the total area (data not shown). From at least 48 h of differentiation, MT in Po⁻ cells adopted a particularly stretched shape with a narrower diameter than in WT and control shRNA C2C12 cells (Fig. 3D). At day 5, WT MT were 227 ± 7 μ m long, fusiform, thick, and elongated in several directions, whereas in Po⁻ cells they were 471 ± 23 μ m long and slender, with only a few γ shaped (Fig. 3E). So, in Po⁻ cells, the myoblast-myoblast fusion (primary step of fusion) was not particularly disturbed, with no significant difference in the number of nuclei per myotube during the first 72 h compared to WT C2C12, but the myoblast-myotube fusion (secondary step of fusion) was deeply affected with less myoblast fusion, which normally contributes to increase myotube diameter.

To rule out the possibility that alteration of the differentiation process is due to a change in cell proliferation prior to DM addition and thus to an accelerated entry into differentiation, an MTS assay was performed in GM until cells reached confluence. No significant difference in the absorbance at 490 nm was observed between the WT, control shRNA C2C12, and clones downregulated for *Pofut1* from 0 h to 120 h (data not shown). Consequently, no pronounced alteration was observed in the rhythm of divisions of the cell lines. So, the earliest appearance of MT in *Pofut1* knockdown cells (Fig. 3) was not due to a difference in the proliferation process leading to an earlier confluence and consequently to the start of the differentiation process.

As Notch signaling is involved in cell fate commitment, an alteration of the NICD cleavage process could be responsible for

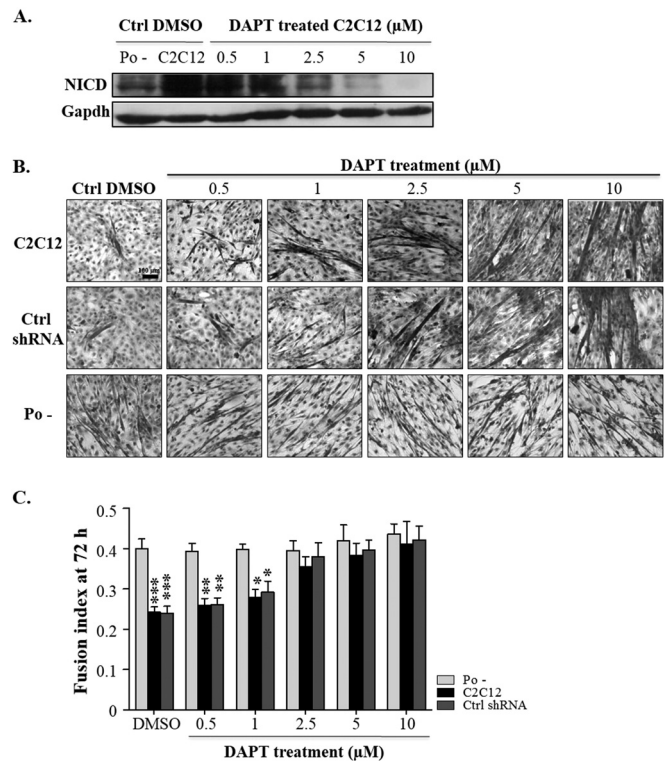


FIG 4 Earlier differentiation in *Pofut1* knockdown C2C12 cells relies on the Notch signaling pathway. (A) Cleaved NICD detected by Western blotting for untreated C2C12 and Po⁻ cells and C2C12 cells with different concentrations of DAPT. (B) Photographs of WT C2C12, control shRNA, and Po⁻ cells at 72 h of differentiation with DMSO or DAPT treatment at various concentrations. (C) Fusion indexes at 72 h. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

the earlier differentiation in *Pofut1* knockdown cells. To challenge this hypothesis, the γ -secretase inhibitor DAPT, which prevents proteolytic cleavage of NICD, was used during the first 72 h of WT, control shRNA, and Po⁻ C2C12 cell differentiation in a range of concentrations from 0.5 μ M to 10 μ M (Fig. 4). As previously shown by the data in Fig. 2, there was more of the active form of Notch receptor in WT C2C12 than in Po⁻ cells even when cells were treated with DMSO (Fig. 4A). Compared to untreated WT C2C12 cells, DAPT-treated C2C12 cells showed a gradual decrease in cleaved NICD from a concentration of 0.5 to 10 μ M (Fig. 4A). C2C12 cells treated with 2.5 μ M DAPT had a level of cleaved NICD close to that of the Po⁻ sample (Fig. 4A). From a DAPT concentration of 5 μ M, less NICD was present than in Po⁻ cells until it was virtually undetectable at 10 μ M DAPT (Fig. 4A). In WT and control shRNA C2C12 cells, DAPT treatment appeared to alter the entry into differentiation, whereas Po⁻ cells did not seem to be affected by the inhibition of γ -secretase at any DAPT concentration (Fig. 4B). From 0.5 to 10 μ M DAPT, WT and control shRNA C2C12 cell lines showed an increase in myotube formation compared to untreated cells. At 2.5 μ M DAPT, multinucleated cells were significantly increasing, to the level of the Po⁻ phenotype cells. These observations were confirmed with fusion index analysis of the three cell lines at 72 h of myogenic differentiation (Fig. 4C). C2C12 cells treated with 0.5 to 10 μ M DAPT showed fusion indexes higher than control DMSO-treated C2C12 cells, and no significant difference was observed with untreated con-

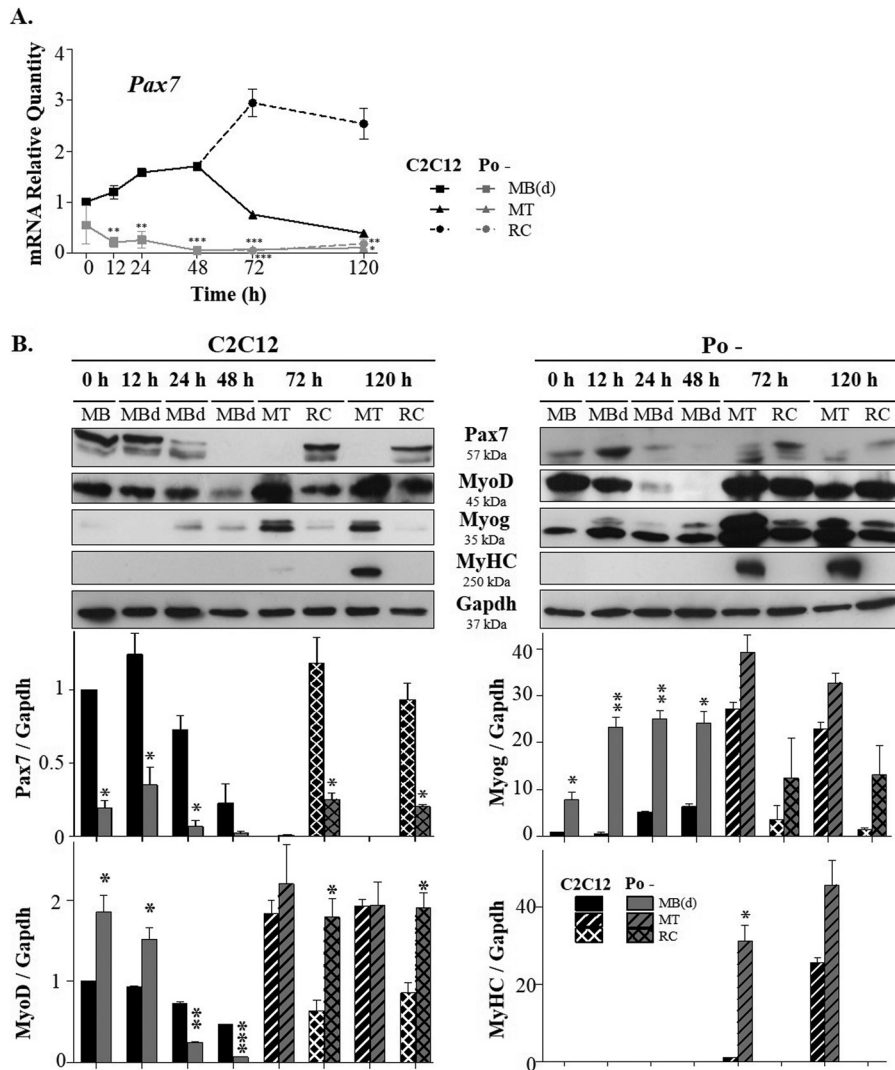


FIG 5 A premature myogenic differentiation program in *Pofut1* knockdown C2C12 cells. (A) Expression of *Pax7* in WT C2C12 and Po^{-} cells. (B) Western blot analyses of *Pax7*, *MyoD*, *Myog*, and *MyHC*. Band intensities were normalized with *Gapdh* and calibrated using the value at time zero of WT C2C12 cells, except for *MyHC*, where the time point 72 h was used for calibration. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

rol shRNA regardless of the DAPT concentration (Fig. 4C). Both of these cell lines presented a lower fusion index than Po^{-} cells (around 0.25 versus 0.4; $P < 0.001$) under the control DMSO condition, but the difference tended to become gradually less significant when the DAPT treatment rose from 0.5 μ M (around 0.28 versus 0.4; $P < 0.01$) with 1 μ M (around 0.30 versus 0.4; $P < 0.05$) to 10 μ M (around 0.41 versus 0.44; not significant) (Fig. 4C). This trend correlates with the significant reduction in NICD cleavage (Fig. 4A). Consequently, a decrease in NICD cleavage by γ -secretase leads to an earlier entry in the differentiation process, resulting in an increase in the fusion index. Reduction in *Pofut1* expression would not affect the proliferative capacity of myogenic progenitor cells but would impact determination of cells during the early phase of differentiation, acting on the processing of NICD.

***Pofut1* knockdown decreases *Pax7* and disrupts the expression of myogenic markers.** To assess the alteration of the differentiation program due to *Pofut1* knockdown, *Pax7* and myogenic markers were studied. Our semiquantitative RT-PCR and West-

ern blot experiments showed a clear downregulation of *Pax7* in MT compared to RC in WT C2C12 cells and a decrease during progression of differentiation (Fig. 5A and B) (data available upon request). A strong downregulation of *Pax7* was observed in Po^{-} cells (Fig. 5A) where its expression significantly decreased from 12 h. *Pax7* RQ was reduced in RC by a factor of 70.3 and 25.7 at 72 h and 120 h, respectively, compared to RC of WT C2C12 cells. These results are consistent with immunodetection using mouse anti-*Pax7* antibody (Fig. 5B).

As a mechanism of reciprocal inhibition between *Pax7* and the MRFs *MyoD* and *Myog* was previously demonstrated (20), we followed the expression of these two MRFs. In WT C2C12 cells, *MyoD* was expressed during the first 120 h, with a progressive downregulation within the first 48 h of the myoblast differentiation process. Strong expression of *MyoD* was detected in MT (Fig. 5B). In Po^{-} cells, the most noticeable features were the accelerated downregulation of *MyoD* occurring 24 h earlier and an increase of *MyoD* expression in RC, both compared to WT C2C12

cells. Myog detection by Western blotting showed a mutually exclusive pattern relative to Pax7 pattern in WT C2C12 cells (Fig. 5B). Pax7 was detected from 24 h and mostly in MT. For Po⁻ cells, if Myog was still more strongly detected in MT, its expression was more sustained and faintly detectable from 0 h. Finally, myosin heavy chain (MyHC), which was only faintly detected at 72 h in WT MT, was strongly revealed in Po⁻ MT (Fig. 5B). mRNA expression of myocyte enhancer factors (MEF), which can potentiate action of MRFs in myogenesis, was also followed. Although *Mef2b* was not detected, significant differences were noticed in MT versus RC for only *Mef2a*, *Mef2c*, and *Mef2d*, regardless of the cell line used (data available upon request).

Colocalization of Pax7 and MyoD was performed by cell immunofluorescence staining during the first 24 h of the differentiation process (Fig. 6A). At the start of differentiation, three cell populations were detected: Pax7⁺/MyoD⁻ (self-renewing cells), Pax7⁺/MyoD⁺ (proliferating cells) and Pax7⁻/MyoD⁺ (differentiating cells). In WT C2C12, their respective proportions were 74.4%, 24.1% and 1.5% (Fig. 6B). During the course of myogenic differentiation, MyoD will be expressed in a subpopulation of Pax7⁺/MyoD⁻ cells, and then Pax7 will be lost in a subpopulation of Pax7⁺/MyoD⁺ cells committed to future fusion process. In Po⁻ cells, the proportions of Pax7⁺/MyoD⁻, Pax7⁺/MyoD⁺, Pax7⁻/MyoD⁺ cell populations were 20.2%, 74% and 5.8%, at the start of the differentiation process (Fig. 6B). The pool of progenitor cells, Pax7⁺/MyoD⁻, was drastically depleted predominantly in favor of Pax7⁺/MyoD⁺ population. At 24 h, the Pax7⁻/MyoD⁺ population clearly prevailed (68%) over the Pax7⁺/MyoD⁺ population (31%). Therefore, in Po⁻ cells, the balance between Pax7, a marker of proliferating myoblasts and self-renewal of progenitors, and MyoD, a marker of myogenically determined cells, is modified from the beginning of the differentiation process in favor of the differentiation marker, potentially decreasing the pool of progenitor cells.

Rescue of the *Pofut1* knockdown phenotype with shRNA-resistant *Pofut1*. To confirm that the Po⁻ cell phenotype was due only to deregulation of *Pofut1* expression, Po⁻-derived clones were produced by reestablishing *Pofut1* expression using the coding region of murine *Pofut1*, mutated to be *Pofut1* shRNA resistant. Three constructs were generated using a lentiviral vector containing *Pofut1* CDS under a cytomegalovirus (CMV) promoter. The 21-bp of *Pofut1* shRNA target sequence was left intact (0M) or was mutated to introduce one (1M) or three (3M) silent mutations (Fig. 7A). Po⁻ cells were transfected with one of the three constructs, and three stable cell lines were established. In Po⁻ and 0M cells, *Pofut1* expression levels were similar (Fig. 7A), indicating the efficiency of *Pofut1* shRNA to knock down exogenous wild-type *Pofut1*. In contrast, in 1M and 3M cell lines, expression of *Pofut1* was resistant to silencing by *Pofut1* shRNA. In 1M cells, *Pofut1* protein expression was reestablished and comparable to the WT C2C12 level, whereas in 3M cells *Pofut1* was significantly expressed 3.8 times more than in Po⁻ cells and 1.5 times more than in WT cells. As we previously showed, *Pofut1* impacted the Notch signaling activation. Both Po⁻ and 0M cells showed comparable levels but less cleaved NICD than the WT or 1M C2C12 cells, indicating that Notch activation was not modified by introducing the lentivector containing shRNA-sensitive *Pofut1* CDS (Fig. 7A). In 3M cells, a higher quantity of cleaved NICD was detected that was around 3.4 times more than in Po⁻ and 0M cells and around 1.1 times more than under normal bio-

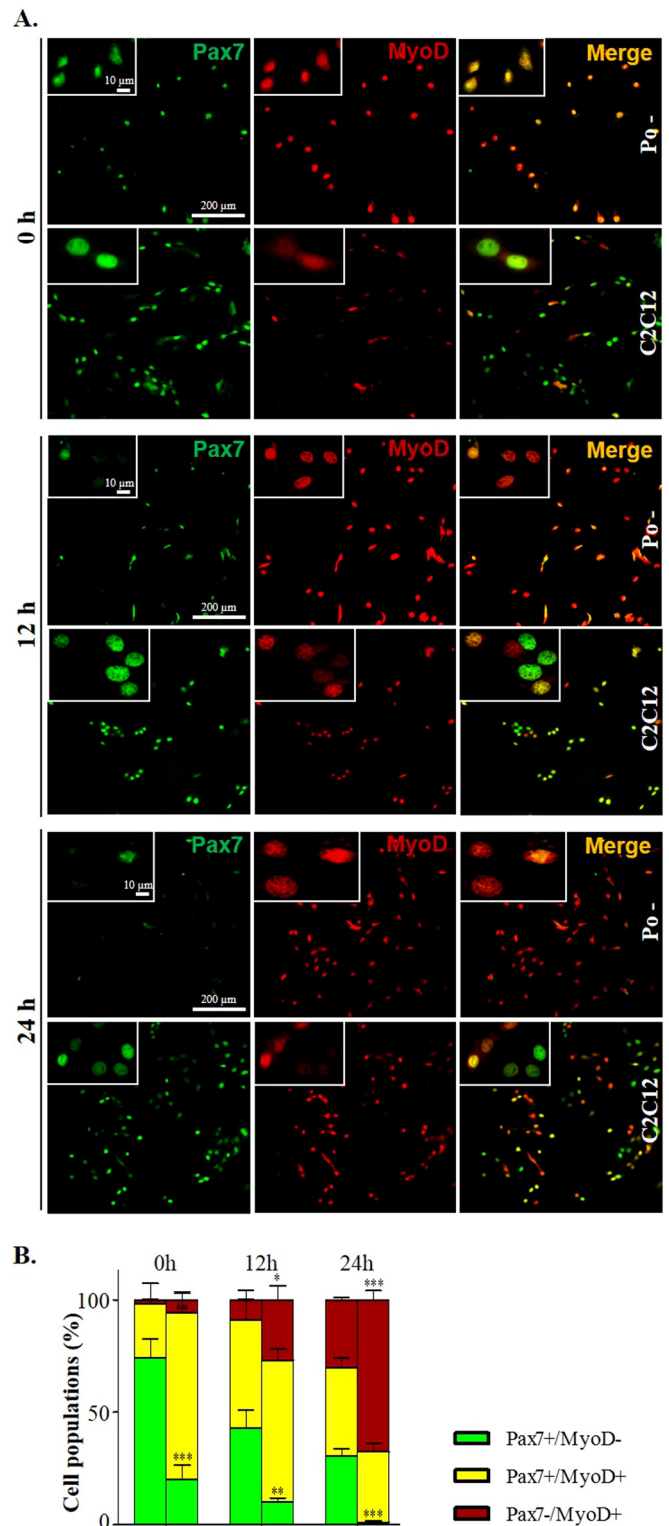


FIG 6 Early commitment toward differentiating cells in *Pofut1* knockdown C2C12 cells. (A) Coimmunostaining for Pax7 (green) and MyoD (red) of WT C2C12 and Po⁻ cells from 0 h to 24 h. (B) Percentages of Pax7⁺/MyoD⁻, Pax7⁺/MyoD⁺, and Pax7⁻/MyoD⁺ cell populations in WT C2C12 and Po⁻ cells during onset of the differentiation process.

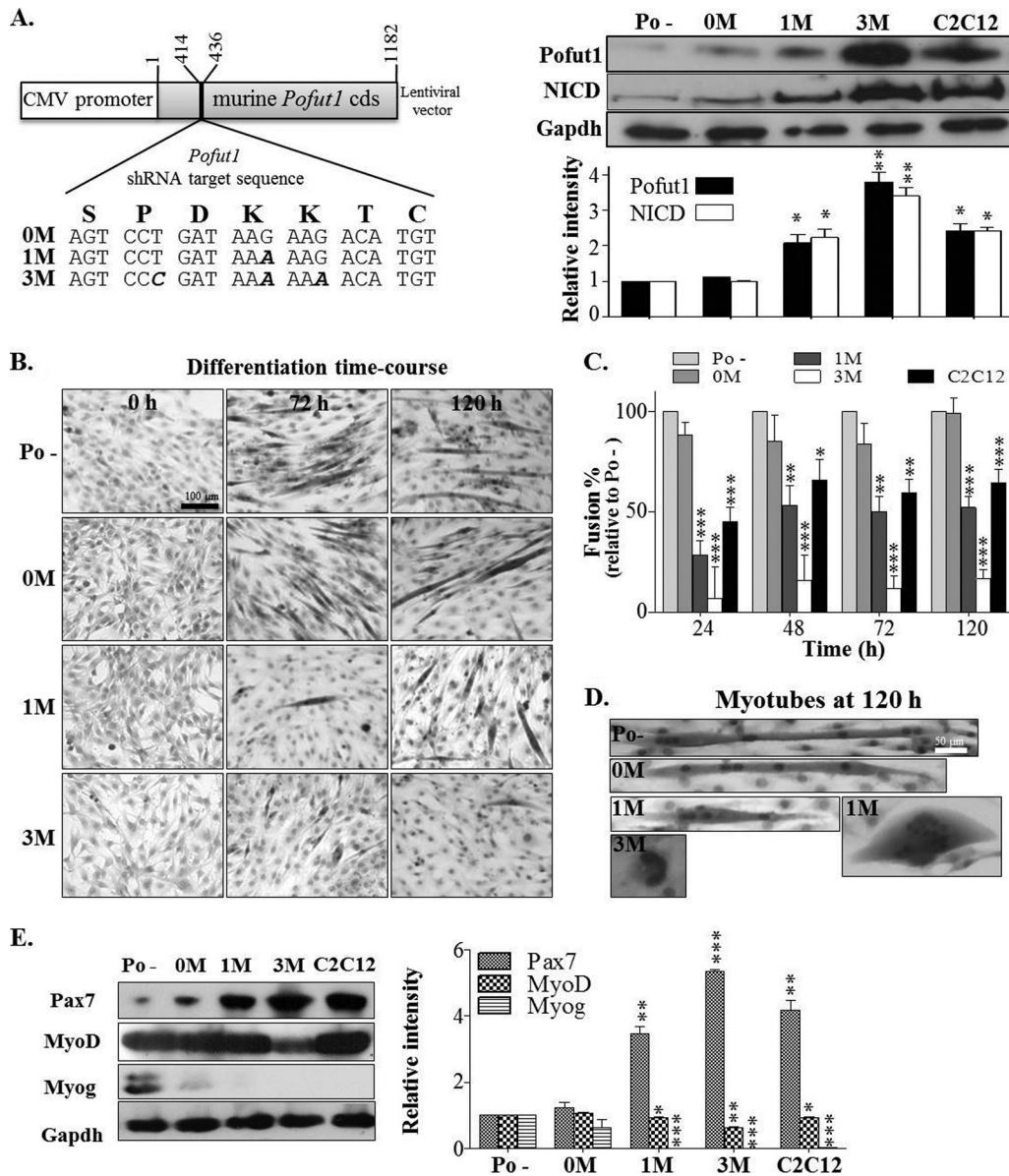


FIG 7 Rescue of the *Pofut1* knockdown C2C12 cell line. (A) Schematic representation of the pLJM1 lentiviral vector expressing the coding region of WT *Pofut1* (0M) or *Pofut1* containing one (1M) or three (3M) silent mutations. Mutations are indicated in italic and bold letters. *Pofut1*, NICD, and *Gapdh* were detected by Western blotting in Po^- , 0M, 1M, 3M, and WT C2C12 cells. Band intensities were calibrated relative to Po^- cells. (B) Photographs of Po^- and *Pofut1* rescue cell lines during differentiation. (C) Percentages of fusion for all cell lines relative to Po^- cells. (D) Focus on multinucleated cells characteristic of each cell line. (E) Western blot analyses of Pax7, MyoD, and Myog in myoblasts for all cell lines. Histograms represent quantification of Pax7, MyoD, and Myog levels in 0M, 1M, 3M, and WT C2C12 cells normalized to *Gapdh* and calibrated with Po^- . *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

logical conditions (WT C2C12 cells) (Fig. 7A). Therefore, expression of exogenous *Pofut1*, which is resistant to mRNA degradation induced by the *Pofut1* shRNA, enabled the increase of cleaved NICD.

During myogenic differentiation, Po^- and 0M cells showed comparable phenotypes, particularly with long and slender myotubes at 120 h (Fig. 7B). Cell fusion indexes in 0M relative to Po^- cells were not significantly different (Fig. 7C). At 24 h, the 1M cell line presented a reduction in cell fusion of 72% compared to Po^- cells and of 52% at 120 h, values which were not significantly different from those of WT C2C12 cells. The low fusion indexes of the 3M cell line, corresponding to a decrease of 93% and 84% in

comparison to Po^- cells at 24 h and 120 h, respectively, were significantly different from the WT C2C12 level. A major defect of the myogenic fusion process was found in 3M cells, where very few myotubes were observed at 120 h; most of them were small and rounded (Fig. 7D). In contrast to Po^- and 3M cells, 1M myotubes were similar in shape and nucleus content to WT C2C12 and 0M cells at 120 h.

The initial status of the myogenic program was evaluated in MB at 0 h for Po^- , 0M, 1M, 3M, and WT C2C12 cell lines by Western blotting detection of Pax7, MyoD, and Myog (Fig. 7E). The severe depletion of Pax7 observed in Po^- cells was also found in 0M cells. This marker of quiescent and proliferating cells was

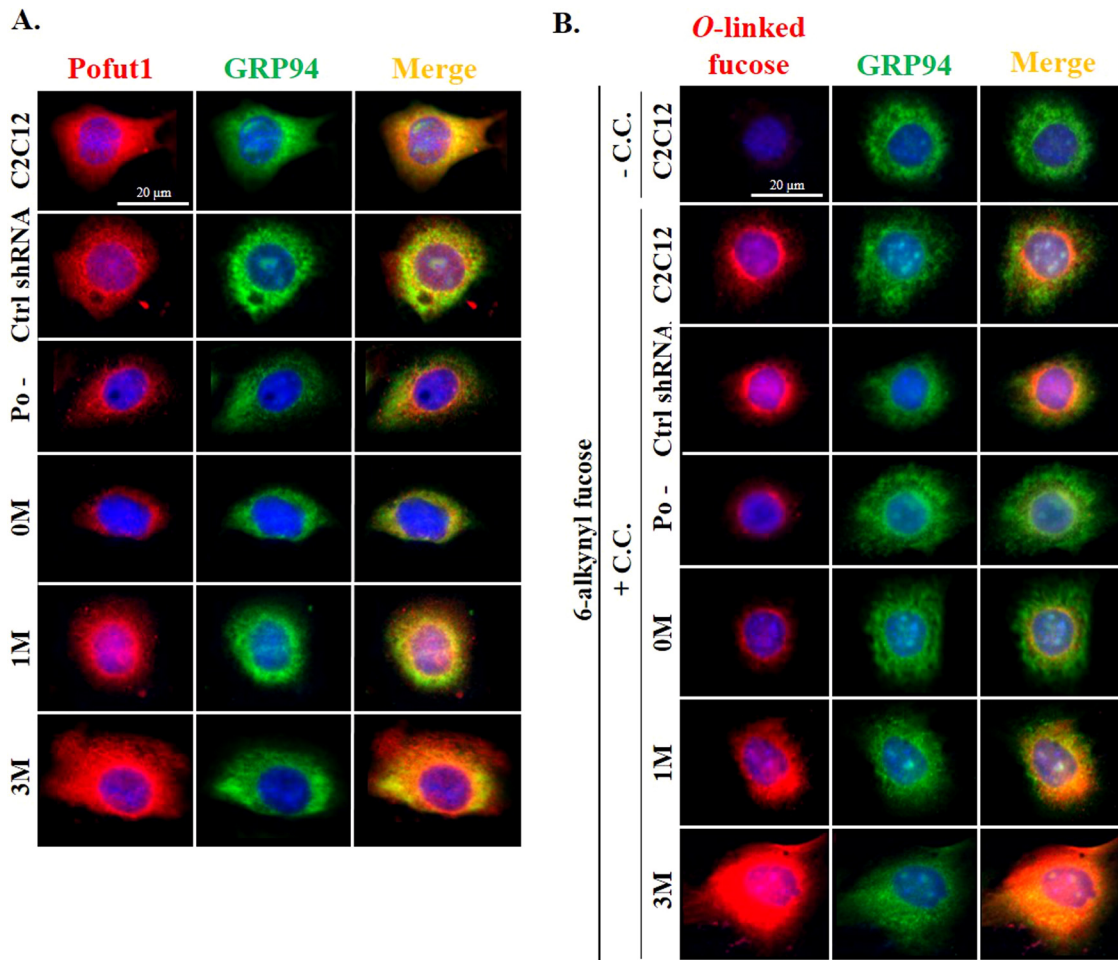


FIG 8 Fluorescence imaging of Pofut1 and fucosyl conjugates in C2C12 cell lines using copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. (A) Immunofluorescence labeling of Pofut1 (red), GRP94 endoplasmic reticulum protein (green), and nuclei (blue) in C2C12, control shRNA, Po⁻, and Pofut1 rescue cell lines. Yellow indicates colocalization between Pofut1 and GRP94. (B) Staining of O-fucosyl glycans after click chemistry reaction (+CC) using azido-biotin revealed by streptavidin (red), GRP94 (green), and nuclei (blue) in WT C2C12, control shRNA, Po⁻, and Pofut1 rescue cell lines. A negative control without the cycloaddition reaction (-CC) was also performed. Colocalization of alkynyl fucose labeling with GRP94 was visualized in yellow.

reexpressed in cell lines expressing an exogenous shRNA-resistant Pofut1 CDS. *Pax7* was reexpressed 3.5 and 5.4 times more in 1M and 3M myoblasts than in Po⁻ cells, respectively, and at a level similar to that of WT C2C12 cells. The myogenic determination marker MyoD was detected at equal levels in Po⁻ and 0M cells and was significantly less in 1M and WT C2C12 cells (Fig. 7E). In 3M MB, less MyoD was present (around 38% decrease relative to the level in Po⁻), which could explain their less differentiated phenotype. Myog was expressed in Po⁻ and 0M cells but not in 1M and 3M cells (Fig. 7E). However, although these expression profiles were sufficient to reestablish a cell fusion process comparable to WT C2C12 one for 1M, it was not the case for 3M (Fig. 7C).

The rescue of *Pofut1* knockdown in Po⁻ cells with exogenous shRNA-resistant *Pofut1* restored a normal fusion process and reactivation of the Notch signaling pathway. It showed that the early entrance of myoblasts into the differentiation program was due to Pofut1, probably through the O-fucosylation of Notch receptors.

Pofut1 localization and O-fucosylation profile in C2C12 cell lines. In WT, control shRNA, Po⁻, and *Pofut1* rescue cell lines, Pofut1 mainly colocalized with GRP94, an endoplasmic reticulum

chaperone, in agreement with the ER-resident status of Pofut1 (33) (Fig. 8A). Immunofluorescence staining showed that Pofut1 intensity in C2C12, control shRNA, and 1M cells was similar, and Pofut1 colocalized at around 62% with GRP94. Compared to these three cell lines, Po⁻ and 0M showed a diminished mean intensity of Pofut1 labeling and colocalized with GRP94 at around 91% with a peculiar restricted perinuclear distribution (Fig. 8A). Finally, 3M cells displayed higher intensity of Pofut1 labeling than WT, shRNA, or 1M cells. Pofut1 only partly colocalized with GRP94 (around 30%); some Pofut1 may be distributed outside the ER (Fig. 8A).

Microscopic visualization of fucosyl-conjugates in WT, Po⁻, control shRNA, and *Pofut1* rescue C2C12 cell lines was performed by a copper(I)-catalyzed cycloaddition of 6-alkynyl fucose with biotinylated azide and fluorescent streptavidin detection (Fig. 8B). As 6-alkynyl fucose incorporation was more efficiently performed in living cells onto EGF-like repeats and trombospondin repeats (TSRs) than in N-linked glycans (34, 46), its detection could give a good overview of Pofut1 enzymatic activity. Furthermore, costaining with GRP94 allowed us to discriminate O-fuco-

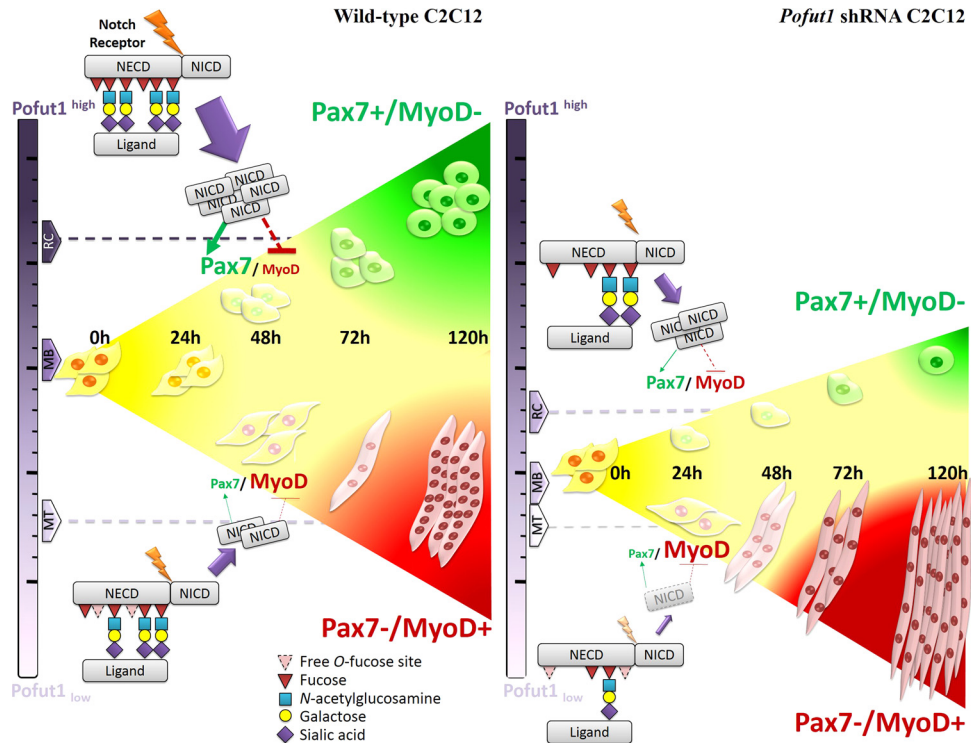


FIG 9 Proposed model of Pofut1 involvement in commitment of myogenically differentiated cells through activation of the Notch signaling pathway. (A) In wild-type C2C12 cells, myoblasts express Pofut1 at a basal level to correctly O-fucosylate the Notch extracellular domain. During differentiation, Pofut1 is differentially expressed with a high level in RC, leading to high activation of the signaling pathway responsible for proliferation and progenitor self-renewal. In parallel, a lower level of Pofut1 could affect NICD cleavage, resulting in cell fusion at the origin of MT. The cleaved NICD quantity impacts the Pax7/MyoD expression balance, resulting in a cell fate decision between RC and MT. (B) In the Pofut1 knockdown context, the lower Pofut1 basal level in myoblasts would alter the correct O-fucosylation of Notch receptor and prevent the correct cleavage of NICD. The limited signaling pathway activation prematurely disrupts the Pax7/MyoD expression balance, resulting in depletion of progenitors and earlier myoblast fusion, causing later myotube defects.

sylation occurring in the ER from fucosylation taking place in Golgi apparatus (for mucins and N-glycans) (Fig. 8B). Control without cycloaddition showed a very low background, indicating that the labeling was specific to alkynyl fucose detection. Wild-type C2C12, control shRNA, and 1M cells showed similar levels of detection of incorporated alkynyl fucose, and the labeling colocalized with GRP94 (Fig. 8B). In Po⁻ and 0M cells, incorporation of fucose was less important but still mainly colocalized with GRP94 in a perinuclear fashion as already noticed for Pofut1 staining (Fig. 8A). In cells overexpressing Pofut1, the 3M line, a significant increase of alkynyl fucose incorporation was found compared to the levels in the WT C2C12, control shRNA, and 1M cells. As also seen for Pofut1 repartition (Fig. 8A), a part of incorporated labeled fucose did not costain with GRP94 and seemed to reside outside the ER (Fig. 8B). In each of the cell lines, Pofut1 and incorporated fucose profiles clearly overlapped. To conclude, the only fucose incorporation in macromolecules occurring in the ER, the O-fucosylation, was diminished in Po⁻ and 0M cells, where Pofut1 was also decreased, indicating that the defects observed in the course of myogenic differentiation were mainly due to the alteration of this original posttranslational modification.

DISCUSSION

The early steps of myogenesis are controlled by expression of transcription factors acting on myoblast proliferation (i.e., Pax7) and

those playing roles during determination, fusion, and differentiation processes (i.e., MRFs). The Notch signaling pathway governs the expression of these transcription factors and allows proliferation of myoblasts and inhibition of their differentiation, replenishment of the satellite cell pool, and the sustaining of their quiescent state in the adult. In the context of myogenic differentiation of C2C12 cells, our present data show that Pofut1, an enzyme responsible for O-fucosylation of proteins, is crucial for Notch pathway activation, and, consequently, through the Pax7/MRFs ratio, it influences the major cell fate decisions in the cell line, i.e., myoblast, reserve cell, and myotube (Fig. 9).

The moderate downregulation of Pofut1 expression in our Pofut1 shRNA C2C12 clones (around 40% less than in WT C2C12 cells) underlines the important role of Pofut1 in this context. Indeed, Pofut1 function is never complemented by another enzyme nor by its paralogue, Pofut2 (47). Interestingly, the *cax* (for compact axial skeleton) mutation in mouse, which creates a Pofut1 hypomorphic allele due to an intracisternal A particle (IAP) insertion, more deeply affects Pofut1 expression without altering viability (48). However, somitogenesis is disorganized to a lesser extent than in Pofut1^{-/-} embryos (21), but no experiment was conducted on *cax* adult skeletal muscle properties. To activate the canonical Notch pathway, a correct O-fucosylation of receptors is needed (24), whereas ligand O-fucosylation seems dispensable, as demonstrated for mouse Dll1 (49). We show that the Pofut1 transcripts and proteins are expressed at higher levels in RC than MT

in WT C2C12 and Po^- cells. We could hypothesize that changes in Pofut1 expression will contribute to hypofucosylation of the Notch receptor or to the global absence of O-fucosylation on some Notch EGF-like repeats. These changes in glycosylation profile could affect NECD conformation and consequently Notch pathway activation.

Twenty potential O-fucosylation sites on EGF-like repeats are present on mouse Notch1, and 13 are known to be modified by O-fucose (50). Notch2 and Notch3 receptors have 21 and 15 potential O-fucosylation sites, respectively, and are probably predominantly O-fucosylated. Among Notch1 EGF-like repeats, EGF12 in the ligand binding region and EGF26 and EGF27 in the *Abruptex* region identified in fly have been reported to modulate the binding affinity of Notch for its ligands (51). The difference in *Pofut1* expression observed in myotubes compared to reserve cells would not only prevent O-fucosylation of some EGF-like domains but also change ligand binding affinities to Notch receptors. We could also envisage that a limited O-fucosylation would not be sufficient to change the structural conformation of Notch receptors to uncover the ligand-interacting area, in a way proposed by Pei and Baker (52). They assume that EGF-like repeats from the *Abruptex* region of fly Notch (EGF22 to EGF27), which contains 36 EGF-like repeats like to mouse Notch1, and 23 potential O-fucosylation sites, bind to those of the ligand-binding domain (EGF11 and EGF12) in the absence of an interacting ligand. The state of O-fucosylation may affect the local folding of EGF-like domains in NECD and the accessibility to ADAM proteases (53). Moreover, O-glucosylation, which also contributes to Notch glycosylation, had been proposed to maintain fly NECD in a conformation that is permissive for signaling (54). However, we demonstrate that correct expression of Pofut1, responsible of O-fucosylation of Notch receptors, is indispensable for correct cleavage of Notch.

Knockdown of *Pofut1* in C2C12 cells significantly decreases *Pax7* expression at the mRNA and protein levels during the 120-h time course of the differentiation process while accelerating downregulation of *MyoD* and upregulation of *Myog* compared to WT levels. The consequence is an earlier appearance of MT, around 24 h before their appearance in the WT. The Pax7/MyoD ratio has a key role in cell fate determination (1). A low Pax7/MyoD ratio commits cells to myogenic differentiation, a high ratio permits renewal of the pool of quiescent progenitor cells (satellite cells *in vivo*), and an intermediate ratio favors proliferation (20). The Pax7/MyoD ratio is under the dependence of Notch pathway activation. Indeed, overexpressed NICD upregulates *Pax7* at both the mRNA and protein levels, resulting in enhanced self-renewal of satellite cells (8). Inhibition of Notch signaling leads to a downregulation of *Pax7*, resulting in satellite cell depletion and improved terminal differentiation (55). NICD directly regulates *Pax7* expression through CBF1, whereas *MyoD* expression is mediated by Hes and Hey family proteins whose expressions are dependent on NICD/CBF1 control (56). In a *Pofut1*-limited expression context, a majority of cells are Pax7⁺/MyoD⁺ at the start of differentiation at a level three times greater than in WT C2C12 cells. It is at the expense of Pax7⁺/MyoD⁻ cells, i.e., progenitor cells. Indeed, if the low NICD level present in Po^- allows proliferation of Pax7⁺/MyoD⁺ cells, it is not sufficient to increase the *Pax7* expression necessary to self-renew the Pax7⁺/MyoD⁻ pool, especially because the NICD half-life is only about 3 h (57). Consequently, the myogenic differentiation route is fa-

vored by the loss of Pax7 and by Myog induction. As *Pax7* expression is negatively regulated by microRNAs (miRNAs) 1, 206, and 486, which are themselves controlled by MyoD expression in myoblast differentiation (58, 59), a quantification of these miRNAs should be conducted in our cell lines.

The earlier entrance in the differentiation process in Po^- cells results in elongated and slender myotubes. They are characterized by a small number of nuclei, indicating that the primary fusion of myoblasts, forming nascent myotubes, was not altered but that the secondary fusion, involving nuclear accretion and changes in size of the myotubes, was. Various extracellular, cell surface, and intracellular proteins, such as cadherins, integrins, ADAMs, nuclear factor of activated T cells (NFAT), and interleukin-4 (IL-4), influence the fusion of myoblasts (60, 61). Po^- myoblasts could present altered expression for these factors, which would subsequently impair the lateral fusion necessary to increase myotube diameter and formation of characteristic γ -shaped myotubes.

An additional role of Pofut1 as a chaperone in the folding, secretion, and endocytosis of Notch receptors was previously proposed (62, 63). Unlike analyses in flies, where Notch receptors are not correctly addressed to plasma membrane in the absence of Pofut1 (64, 65), the majority of Notch receptors in *Pofut1*-null mouse cells are transferred to the cell membrane, with some, however, sequestered in the ER (24, 66). We show that Pofut1 is probably not confined only to the ER in WT C2C12, an observation which is strengthened by the analysis of Henningsen and collaborators (67) of Pofut1's presence in the C2C12 secretome and its decrease as differentiation progresses. Although no difference in the quantity of Notch1 exposed at the cell surface was seen, immunolocalization in Po^- cells of Notch receptors and characterization of their interactions with ligands on neighboring cells will help us to understand if, in addition to O-fucosylation of Notch, Pofut1 had a definitive role in its chaperoning.

Finally, we cannot rule out the possibility that *Pofut1* knockdown affects targets other than Notch receptors in the context of myogenic differentiation as over 100 predicted targets of Pofut1 were identified *in silico* (71). However, only 15 proteins were biologically demonstrated to be modified by O-fucose, and only agrin, for which O-fucose is involved in acetylcholine receptor aggregation in neuromuscular development, was detected in C2C12 MT (68); but this could not explain our Po^- phenotype. Moreover, O-fucosylation is not the sole type of glycosylation known to occur on the Notch1 ECD. Although N-glycosylation (six potential sites) of Notch does not appear to have a peculiar role in Notch signaling pathway (23), it would be of interest to test the impact of O-glucosylation (69) and O-GlcNAcylation (70) deregulation in the context of myogenic differentiation.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a French Ministry of Higher Education and Research doctoral fellowship to A.D.V.

We thank Claire Carrion for immunofluorescence advice and excellent colocalization technical assistance, Mélanie Malhouroux for her help with complementation constructs, Nathalie Duprat for DAPT tests, and Rodney O'Connor for his careful assistance in the English drafting of the manuscript.

REFERENCES

1. Olguin HC, Pisconti A. 2012. Marking the tempo for myogenesis: Pax7 and the regulation of muscle stem cell fate decisions. *J Cell Mol Biol* 16:1013–1025. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01348.x>.

2. Buckingham M. 2007. Skeletal muscle progenitor cells and the role of Pax genes. *C R Biol* 330:530–533. <http://dx.doi.org/10.1016/j.crv.2007.03.015>.
3. Bismuth K, Relaix F. 2010. Genetic regulation of skeletal muscle development. *Exp Cell Res* 316:3081–3086. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.08.018>.
4. Lassar AB, Skapek SX, Novitsch B. 1994. Regulatory mechanisms that coordinate skeletal muscle differentiation and cell cycle withdrawal. *Curr Opin Cell Biol* 6:788–794. [http://dx.doi.org/10.1016/0955-0674\(94\)90046-9](http://dx.doi.org/10.1016/0955-0674(94)90046-9).
5. Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, Rudnicki MA. 2000. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* 102:777–786. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00066-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00066-0).
6. Megeny LA, Kablar B, Garrett K, Anderson JE, Rudnicki MA. 1996. MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. *Genes Dev* 10:1173–1183. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.10.11.1173>.
7. von Maltzahn J, Jones AE, Parks RJ, Rudnicki MA. 2013. Pax7 is critical for the normal function of satellite cells in adult skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:16474–16479. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1307680110>.
8. Wen Y, Bi P, Liu W, Asakura A, Keller C, Kuang S. 2012. Constitutive Notch activation upregulates Pax7 and promotes the self-renewal of skeletal muscle satellite cells. *Mol Cell Biol* 32:2300–2311. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.06753-11>.
9. Sun D, Li H, Zolkiewska A. 2008. The role of Delta-like 1 shedding in muscle cell self-renewal and differentiation. *J Cell Sci* 121:3815–3823. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.035493>.
10. Kitzmann M, Bonniou A, Duret C, Vernus B, Barro M, Laoudj-Chenivesse D, Verdi JM, Carnac G. 2006. Inhibition of Notch signaling induces myotube hypertrophy by recruiting a subpopulation of reserve cells. *J Cell Physiol* 208:538–548. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.20688>.
11. Guruharsha KG, Kankel MW, Artavanis-Tsakonas S. 2012. The Notch signalling system: recent insights into the complexity of a conserved pathway. *Nat Rev Genet* 13:654–666. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3272>.
12. Mourikis P, Tajbakhsh S. 2014. Distinct contextual roles for Notch signalling in skeletal muscle stem cells. *BMC Dev Biol* 14:2. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-213X-14-2>.
13. de Celis JF. 2013. Understanding the determinants of notch interactions with its ligands. *Sci Signal* 6:pe19. <http://dx.doi.org/10.1126/scisignal.2004079>.
14. Artavanis-Tsakonas S, Muskavitch MA. 2010. Notch: the past, the present, and the future. *Curr Top Dev Biol* 92:1–29. [http://dx.doi.org/10.1016/S0070-2153\(10\)92001-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0070-2153(10)92001-2).
15. Vasyutina E, Lenhard DC, Birchmeier C. 2007. Notch function in myogenesis. *Cell Cycle* 6:1451–1454. <http://dx.doi.org/10.4161/cc.6.12.4372>.
16. Kuroda K, Tani S, Tamura K, Minoguchi S, Kurooka H, Honjo T. 1999. Delta-induced Notch signaling mediated by RBP-J inhibits MyoD expression and myogenesis. *J Biol Chem* 274:7238–7244. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.11.7238>.
17. Shawber C, Nofziger D, Hsieh JJ, Lindsell C, Bogler O, Hayward D, Weinmaster G. 1996. Notch signaling inhibits muscle cell differentiation through a CBF1-independent pathway. *Development* 122:3765–3773.
18. Nofziger D, Miyamoto A, Lyons KM, Weinmaster G. 1999. Notch signaling imposes two distinct blocks in the differentiation of C2C12 myoblasts. *Development* 126:1689–1702.
19. Sanalkumar R, Dhanesh SB, James J. 2010. Non-canonical activation of Notch signaling/target genes in vertebrates. *Cell Mol Life Sci* 67:2957–2968. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-010-0391-x>.
20. Olguin HC, Yang Z, Tapscott SJ, Olwin BB. 2007. Reciprocal inhibition between Pax7 and muscle regulatory factors modulates myogenic cell fate determination. *J Cell Biol* 177:769–779. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200608122>.
21. Shi S, Stanley P. 2003. Protein O-fucosyltransferase 1 is an essential component of Notch signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:5234–5239. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0831126100>.
22. Wang Y, Shao L, Shi S, Harris RJ, Spellman MW, Stanley P, Haltiwanger RS. 2001. Modification of epidermal growth factor-like repeats with O-fucose. Molecular cloning and expression of a novel GDP-fucose protein O-fucosyltransferase. *J Biol Chem* 276:40338–40345. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M107849200>.
23. Takeuchi H, Haltiwanger RS. 2010. Role of glycosylation of Notch in development. *Semin Cell Dev Biol* 21:638–645. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2010.03.003>.
24. Stahl M, Uemura K, Ge C, Shi S, Tashima Y, Stanley P. 2008. Roles of Pofut1 and O-fucose in mammalian Notch signaling. *J Biol Chem* 283:13638–13651. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M802027200>.
25. Ge C, Stanley P. 2008. The O-fucose glycan in the ligand-binding domain of Notch1 regulates embryogenesis and T cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:1539–1544. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0702846105>.
26. Haltiwanger RS, Stanley P. 2002. Modulation of receptor signaling by glycosylation: fringe is an O-fucose-β1,3-N-acetylglucosaminyltransferase. *Biochim Biophys Acta* 1573:328–335. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4165\(02\)00400-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4165(02)00400-2).
27. Rampal R, Li AS, Moloney DJ, Georgiou SA, Luther KB, Nita-Lazar A, Haltiwanger RS. 2005. Lunatic fringe, manic fringe, and radical fringe recognize similar specificity determinants in O-fucosylated epidermal growth factor-like repeats. *J Biol Chem* 280:42454–42463. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M509552200>.
28. Chen J, Moloney DJ, Stanley P. 2001. Fringe modulation of Jagged1-induced Notch signaling requires the action of β4galactosyltransferase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13716–13721. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.241398098>.
29. Moloney DJ, Shair LH, Lu FM, Xia J, Locke R, Matta KL, Haltiwanger RS. 2000. Mammalian Notch1 is modified with two unusual forms of O-linked glycosylation found on epidermal growth factor-like modules. *J Biol Chem* 275:9604–9611. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.275.13.9604>.
30. Janot M, Audfray A, Lorient C, Germot A, Maftah A, Dupuy F. 2009. Glycogenome expression dynamics during mouse C2C12 myoblast differentiation suggests a sequential reorganization of membrane glycoconjugates. *BMC Genomics* 10:483. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-10-483>.
31. Wang Y, Spellman MW. 1998. Purification and characterization of a GDP-fucose:polypeptide fucosyltransferase from Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 273:8112–8118. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.273.14.8112>.
32. Lorient C, Dupuy F, Rampal R, Dlugosz MA, Haltiwanger RS, Maftah A, Germot A. 2006. Molecular evolution of protein O-fucosyltransferase genes and splice variants. *Glycobiology* 16:736–747. <http://dx.doi.org/10.1093/glycob/cwj124>.
33. Luo Y, Haltiwanger RS. 2005. O-fucosylation of notch occurs in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 280:11289–11294. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M414574200>.
34. Al-Shareffi E, Chaubard JL, Leonhard-Melief C, Wang SK, Wong CH, Haltiwanger RS. 2013. 6-alkynyl fucose is a bioorthogonal analog for O-fucosylation of epidermal growth factor-like repeats and thrombospondin type-1 repeats by protein O-fucosyltransferases 1 and 2. *Glycobiology* 23:188–198. <http://dx.doi.org/10.1093/glycob/cws140>.
35. Kitzmann M, Carnac G, Vandromme M, Primig M, Lamb NJ, Fernandez A. 1998. The muscle regulatory factors MyoD and Myf-5 undergo distinct cell cycle-specific expression in muscle cells. *J Cell Biol* 142:1447–1459. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.142.6.1447>.
36. Abramoff MD, Magalhaes PJ, Ram SJ. 2004. Image processing with ImageJ. *Biophotonics Int* 11:36–42.
37. Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods* 25:402–408. <http://dx.doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
38. Rampal R, Arboleda-Velasquez JF, Nita-Lazar A, Kosik KS, Haltiwanger RS. 2005. Highly conserved O-fucose sites have distinct effects on Notch1 function. *J Biol Chem* 280:32133–32140. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M506104200>.
39. Huppert SS, Ilagan MX, De Strooper B, Kopan R. 2005. Analysis of Notch function in presomitic mesoderm suggests a gamma-secretase-independent role for presenilins in somite differentiation. *Dev Cell* 8:677–688. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2005.02.019>.
40. Lai EC. 2002. Keeping a good pathway down: transcriptional repression of Notch pathway target genes by CSL proteins. *EMBO Rep* 3:840–845. <http://dx.doi.org/10.1093/embo-reports/kvf170>.
41. Iso T, Kedes L, Hamamori Y. 2003. HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J Cell Physiol* 194:237–255. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.10208>.
42. Katoh M, Katoh M. 2007. Integrative genomic analyses on HES/HEY family: Notch-independent HES1, HES3 transcription in undifferentiated ES cells, and Notch-dependent HES1, HES5, HEY1, HEY2, HEYL transcription in fetal tissues, adult tissues, or cancer. *Int J Oncol* 31:461–466. <http://dx.doi.org/10.3892/ijo.31.2.461>.
43. Carey KA, Farnfield MM, Tarquinio SD, Cameron-Smith D. 2007. Impaired expression of Notch signaling genes in aged human skeletal muscle. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 62:9–17. <http://dx.doi.org/10.1093/gerona/62.1.9>.
44. Bessho Y, Miyoshi G, Sakata R, Kageyama R. 2001. Hes7: a bHLH-type

- repressor gene regulated by Notch and expressed in the presomitic mesoderm. *Genes Cells* 6:175–185. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2443.2001.00409.x>.
45. Buas MF, Kabak S, Kadesch T. 2010. The Notch effector Hey1 associates with myogenic target genes to repress myogenesis. *J Biol Chem* 285:1249–1258. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.046441>.
 46. Okeley NM, Alley SC, Anderson ME, Boursalian TE, Burke PJ, Emmerston KM, Jeffrey SC, Klussman K, Law CL, Sussman D, Toki BE, Westendorf L, Zeng W, Zhang X, Benjamin DR, Senter PD. 2013. Development of orally active inhibitors of protein and cellular fucosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:5404–5409. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1222263110>.
 47. Luo Y, Koles K, Vorndam W, Haltiwanger RS, Panin VM. 2006. Protein O-fucosyltransferase 2 adds O-fucose to thrombospondin type 1 repeats. *J Biol Chem* 281:9393–9399. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M511975200>.
 48. Schuster-Gossler K, Harris B, Johnson KR, Serth J, Gossler A. 2009. Notch signalling in the paraxial mesoderm is most sensitive to reduced Pofut1 levels during early mouse development. *BMC Dev Biol* 9:6. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-213X-9-6>.
 49. Muller J, Rana NA, Serth K, Kakuda S, Haltiwanger RS, Gossler A. 2014. O-fucosylation of the notch ligand mDLL1 by POFUT1 is dispensable for ligand function. *PLoS One* 9:e88571. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0088571>.
 50. Rana NA, Haltiwanger RS. 2011. Fringe benefits: functional and structural impacts of O-glycosylation on the extracellular domain of Notch receptors. *Curr Opin Struct Biol* 21:583–589. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sbi.2011.08.008>.
 51. Xu A, Lei L, Irvine KD. 2005. Regions of Drosophila Notch that contribute to ligand binding and the modulatory influence of Fringe. *J Biol Chem* 280:30158–30165. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M505569200>.
 52. Pei Z, Baker NE. 2008. Competition between Delta and the Abruptex domain of Notch. *BMC Dev Biol* 8:4. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-213X-8-4>.
 53. Gordon WR, Vardar-Ulu D, Histen G, Sanchez-Irizarry C, Aster JC, Blacklow SC. 2007. Structural basis for autoinhibition of Notch. *Nat Struct Mol Biol* 14:295–300. <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb1227>.
 54. Leonardi J, Fernandez-Valdivia R, Li YD, Simcox AA, Jafar-Nejad H. 2011. Multiple O-glycosylation sites on Notch function as a buffer against temperature-dependent loss of signaling. *Development* 138:3569–3578. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.068361>.
 55. Conboy IM, Rando TA. 2002. The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis. *Dev Cell* 3:397–409. [http://dx.doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00254-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00254-X).
 56. Olguin HC, Olwin BB. 2004. Pax-7 up-regulation inhibits myogenesis and cell cycle progression in satellite cells: a potential mechanism for self-renewal. *Dev Biol* 275:375–388. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.08.015>.
 57. Buas MF, Kadesch T. 2010. Regulation of skeletal myogenesis by Notch. *Exp Cell Res* 316:3028–3033. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.05.002>.
 58. Chen JF, Tao Y, Li J, Deng Z, Yan Z, Xiao X, Wang DZ. 2010. microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7. *J Cell Biol* 190:867–879. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200911036>.
 59. Dey BK, Gagan J, Dutta A. 2011. miR-206 and -486 induce myoblast differentiation by downregulating Pax7. *Mol Cell Biol* 31:203–214. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.01009-10>.
 60. Horsley V, Jansen KM, Mills ST, Pavlath GK. 2003. IL-4 acts as a myoblast recruitment factor during mammalian muscle growth. *Cell* 113:483–494. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00319-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00319-2).
 61. Hindi SM, Tajrishi MM, Kumar A. 2013. Signaling mechanisms in mammalian myoblast fusion. *Sci Signal* 6:re2. <http://dx.doi.org/10.1126/scisignal.2003832>.
 62. Okajima T, Xu A, Lei L, Irvine KD. 2005. Chaperone activity of protein O-fucosyltransferase 1 promotes notch receptor folding. *Science* 307:1599–1603. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1108995>.
 63. Vodovar N, Schweisguth F. 2008. Functions of O-fucosyltransferase in Notch trafficking and signaling: towards the end of a controversy? *J Biol* 7:7. <http://dx.doi.org/10.1186/jbiol68>.
 64. Sasaki N, Sasamura T, Ishikawa HO, Kanai M, Ueda R, Saigo K, Matsuno K. 2007. Polarized exocytosis and transcytosis of Notch during its apical localization in *Drosophila* epithelial cells. *Genes Cells* 12:89–103. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2443.2007.01037.x>.
 65. Sasamura T, Ishikawa HO, Sasaki N, Higashi S, Kanai M, Nakao S, Ayukawa T, Aigaki T, Noda K, Miyoshi E, Taniguchi N, Matsuno K. 2007. The O-fucosyltransferase O-fut1 is an extracellular component that is essential for the constitutive endocytic trafficking of Notch in *Drosophila*. *Development* 134:1347–1356. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.02811>.
 66. Okamura Y, Saga Y. 2008. Pofut1 is required for the proper localization of the Notch receptor during mouse development. *Mech Dev* 125:663–673. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mod.2008.04.007>.
 67. Henningsen J, Rigbolt KT, Blagoev B, Pedersen BK, Kratchmarova I. 2010. Dynamics of the skeletal muscle secretome during myoblast differentiation. *Mol Cell Proteomics* 9:2482–2496. <http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M110.002113>.
 68. Kim ML, Chandrasekharan K, Glass M, Shi S, Stahl MC, Kaspar B, Stanley P, Martin PT. 2008. O-fucosylation of muscle agrin determines its ability to cluster acetylcholine receptors. *Mol Cell Neurosci* 39:452–464. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcn.2008.07.026>.
 69. Takeuchi H, Kantharia J, Sethi MK, Bakker H, Haltiwanger RS. 2012. Site-specific O-glycosylation of the epidermal growth factor-like (EGF) repeats of notch: efficiency of glycosylation is affected by proper folding and amino acid sequence of individual EGF repeats. *J Biol Chem* 287:33934–33944. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112.401315>.
 70. Sakaidani Y, Ichianagi N, Saito C, Nomura T, Ito M, Nishio Y, Nadano D, Matsuda T, Furukawa K, Okajima T. 2012. O-linked-N-acetylglucosamine modification of mammalian Notch receptors by an atypical O-GlcNAc transferase Eogt1. *Biochem Biophys Res Commun* 419:14–19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.01.098>.
 71. Rampal R, Luther KB, Haltiwanger RS. 2007. Notch signaling in normal and disease States: possible therapies related to glycosylation. *Curr Mol Med* 7:427–445. <http://dx.doi.org/10.2174/156652407780831593>.

Publication N°2

Reduced Notch signalling leads to postnatal skeletal muscle hypertrophy in *Pofut1*^{cax/cax} mice.

Al Jaam Bilal, Heu Katy, Pennarubia Florian, Segelle Alexandre, Magnol Laetitia, Germot Agnès, Legardinier Sébastien, Blanquet Véronique and Maftah Abderrahman.

Open Biology 2016 Sep;6(9). <http://dx.doi.org/10.1098/rsob.160211>

Dans l'étude précédente (**Publication N°1**), la lignée myoblastique murine C2C12 a permis une analyse fine et détaillée du processus de différenciation myogénique dans des conditions particulières, où le gène *Pofut1* est sous-exprimé de manière stable. Cela a permis notamment de souligner le rôle fondamental de POFUT1 dans l'activation de la voie Notch au cours de ce processus. Cependant, ce modèle cellulaire ne permet pas de rendre compte du rôle de cette enzyme de la glycosylation au cours de la myogenèse embryonnaire, fœtale et/ou adulte.

L'objectif principal de ma thèse était donc d'appréhender le rôle de POFUT1 dans le processus myogénique *in vivo*, en me focalisant sur le développement musculaire post-natal de la souris. Le KO de *Pofut1* étant létal en milieu de gestation (Shi and Stanley 2003), nous avons choisi d'étudier les souris *Pofut1*^{cax/cax}, hypomorphes pour le gène *Pofut1* suite à l'insertion spontanée d'un élément IAP dans l'intron 4 de ce gène. Ces souris sont viables et se caractérisent phénotypiquement par de multiples déformations squelettiques d'intensité variable, suite à une somitogenèse perturbée (Schuster-Gossler, Harris et al. 2009).

Nous avons entrepris la caractérisation phénotypique de ces souris *Pofut1*^{cax/cax} en analysant différents muscles squelettiques (*Quadriceps*, *Gastrocnemius*, *Tibialis*, *Soleus*) au cours du développement postnatal, peu de temps après le sevrage et à l'âge adulte. Différents paramètres ont été suivis (poids relatifs des muscles squelettiques, nature et taille des fibres, peuplement en cellules satellites). Nous avons montré par l'analyse de coupes immunohistologiques que ces souris présentaient dès le stade 5 semaines une hypertrophie musculaire postnatale marquée s'accompagnant d'une accrétion myonucléaire et d'une réduction du pool de cellules satellites, quel que soit le type musculaire considéré. Aucune hyperplasie n'a cependant été observée, renforçant l'idée que chez la souris l'augmentation de la masse musculaire après la naissance n'est pas la conséquence d'une augmentation du nombre de myofibres, dont le nombre est déjà établi autour de la période périnatale. Ces résultats ont été également obtenus chez des souris adultes âgées de 12 et 24 semaines.

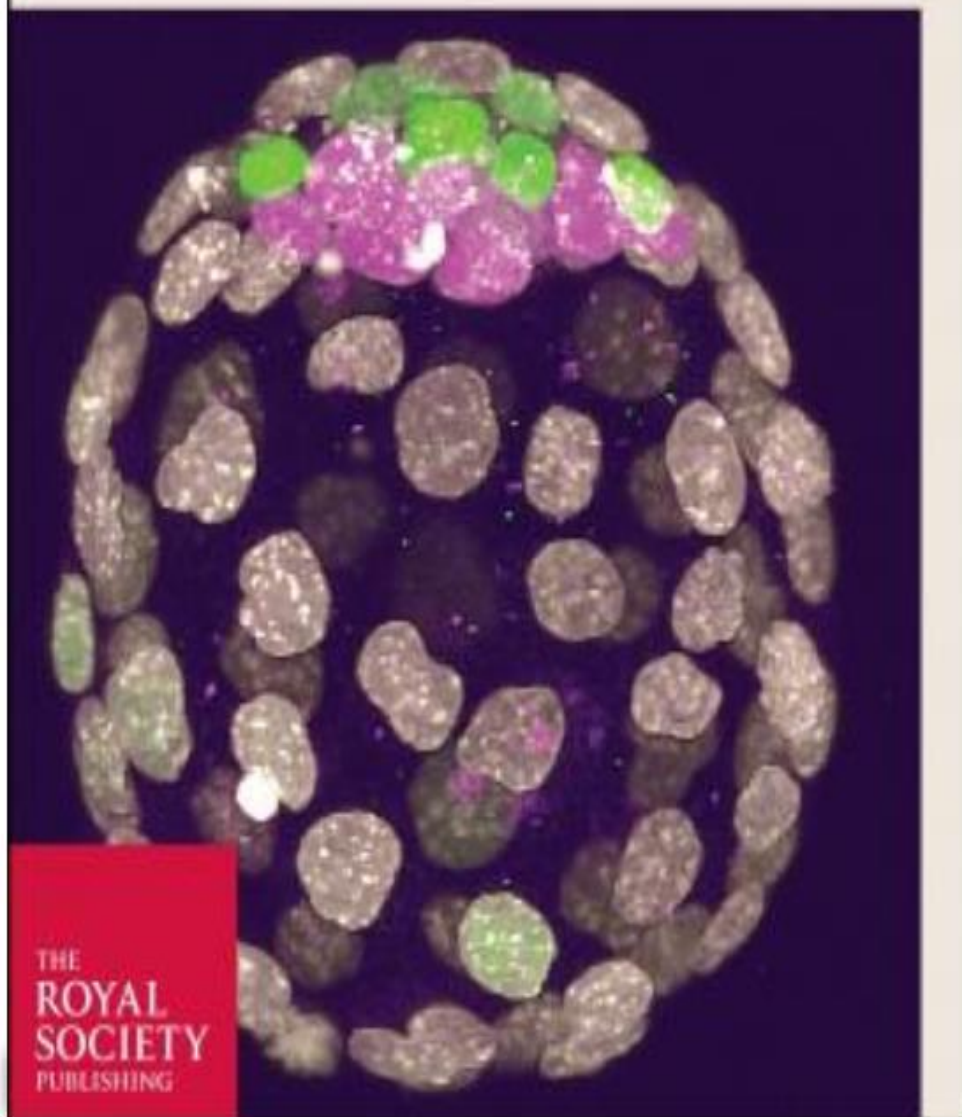
Pour expliquer ces observations *in vivo*, nous avons incriminé les cellules satellites, dont l'activation est particulièrement importante entre la naissance et la fin de la 3^{ème} semaine de

croissance musculaire postnatale (White, Bierinx et al. 2010). L'analyse de myoblastes dérivant de cellules satellites (MDCS) extraits de souris *Pofut1*^{cax/cax} a apporté de précieuses informations, pouvant être corrélées à l'hypertrophie musculaire postnatale et à la réduction du pool de cellules satellites observées chez les souris *Pofut1*^{cax/cax}.

Des résultats similaires à ceux obtenus avec la lignée C2C12 Po- (**Publication N°1**) ont été obtenus lors de l'analyse des MDCS *Pofut1*^{cax/cax}, validant ainsi ce modèle *ex vivo*. En effet, la sous-expression de *Pofut1* provoque une signalisation Notch réduite (diminution des interactions récepteurs-ligands et de la quantité de NICD clivé) entraînant une diminution d'expression des gènes cibles de Notch dont *Pax7* et une diminution du pool de cellules progénitrices indifférenciées (PAX7+/MYOD-) au profit de cellules engagées dans la différenciation (PAX7-/MYOD+). Il en résulte une différenciation myogénique précoce.

Ces résultats pourraient expliquer l'hypertrophie musculaire postnatale précoce observée, par un engagement de plus de cellules satellites dans la différenciation entraînant ainsi plus de fusion et une diminution du nombre de cellules satellites.

OPEN BIOLOGY





Cite this article: Al Jaam B, Heu K, Pennarubia F, Segelle A, Magnol L, Germot A, Legardinier S, Blanquet V, Maftah A. 2016 Reduced Notch signalling leads to postnatal skeletal muscle hypertrophy in *Pofut1*^{cax/cax} mice. *Open Biol.* **6**: 160211. <http://dx.doi.org/10.1098/rsob.160211>

Received: 16 July 2016

Accepted: 24 August 2016

Subject Area:

cellular biology/biochemistry/molecular biology/biotechnology

Keywords:

POFUT1, Notch, satellite cells, skeletal muscles, hypertrophy

Author for correspondence:

Sébastien Legardinier

e-mail: sebastien.legardinier@unilim.fr

[†]B.A.J. and K.H. are considered co-first authors and contributed equally to this work.

[‡]Present address: Laboratoire de parasitologie et mycologie, Centre Hospitalier de Cayenne, Guyane.

[§]S.L., V.B. and A.M. are considered co-last authors and contributed equally to this work.

Electronic supplementary material is available online at [doi:10.6084/m9.figshare.c.3461754](https://doi.org/10.6084/m9.figshare.c.3461754).

Reduced Notch signalling leads to postnatal skeletal muscle hypertrophy in *Pofut1*^{cax/cax} mice

Bilal Al Jaam[†], Katy Heu^{†,‡}, Florian Pennarubia, Alexandre Segelle, Laetitia Magnol, Agnès Germot, Sébastien Legardinier[§], Véronique Blanquet[§] and Abderrahman Maftah[§]

Univ. Limoges, INRA, UMR 1061, UGMA, 87060 Limoges, France

SL, 0000-0001-5923-5689

Postnatal skeletal muscle growth results from the activation of satellite cells and/or an increase in protein synthesis. The Notch signalling pathway maintains satellite cells in a quiescent state, and once activated, sustains their proliferation and commitment towards differentiation. In mammals, POFUT1-mediated O-fucosylation regulates the interactions between NOTCH receptors and ligands of the DELTA/JAGGED family, thus initiating the activation of canonical Notch signalling. Here, we analysed the consequences of downregulated expression of the *Pofut1* gene on postnatal muscle growth in mutant *Pofut1*^{cax/cax} (*cax*, compact axial skeleton) mice and differentiation of their satellite cell-derived myoblasts (SCDMs). *Pofut1*^{cax/cax} mice exhibited muscle hypertrophy, no hyperplasia and a decrease in satellite cell numbers compared with wild-type C3H mice. In agreement with these observations, *Pofut1*^{cax/cax} SCDMs differentiated earlier concomitant with reduced *Pax7* expression and decrease in PAX7⁺/MYOD⁻ progenitor cells. *In vitro* binding assays showed a reduced interaction of DELTA-LIKE 1 ligand (DLL1) with NOTCH receptors expressed at the cell surface of SCDMs, leading to a decreased Notch signalling as seen by the quantification of cleaved NICD and Notch target genes. These results demonstrated that POFUT1-mediated O-fucosylation of NOTCH receptors regulates myogenic cell differentiation and affects postnatal muscle growth in mice.

1. Introduction

Skeletal muscles are composed of post-mitotic multinucleated myofibres and satellite cells, which are mononucleated cells located at the periphery of myofibres between the plasma membrane and basal lamina [1]. Satellite cells are precursor stem cells, which are involved in after-birth muscle growth and muscle regeneration after injuries, either by exercise or by disease [2]. These cells are maintained in a quiescent state in normal adult muscles, and upon activation their asymmetric division leads to formation of two cell types: differentiated myogenic cells involved in myofibre formation or repair and self-renewing cells able to replenish the stem pool [3–5]. Postnatal muscle growth can be achieved by either an increase in the number of myofibres (hyperplasia), an increase in their size (hypertrophy), or a combination of both as in rats [6]. In mice, postnatal muscle growth mainly occurs by myofibre hypertrophy and not hyperplasia, with a steady increase in the number of myonuclei per myofibre from birth to three weeks after birth (P21) [7,8]. This myonuclear accretion in myofibres has been shown to be the result of cell fusion between satellite cell-derived myoblasts (SCDMs) and pre-existing myofibres, thus increasing their width and length [9,10]. From P21 to adulthood and thereafter, muscle growth by hypertrophy does not occur by a satellite cell-dependent myogenic fusion [11], but mainly by increased protein synthesis,

which provokes an enlargement of myofibres without formation of new myonuclei [8]. Satellite cells are thus the main source of new myonuclei in growing myofibres [12], before their quiescence around P21 [8]. They remain in this state thereafter in normal mature muscle [13], except during regeneration in which satellite cells are re-activated [2].

The IGF/Akt/mTOR and myostatin/Smad pathways are the two major signalling pathways, which control muscle mass increase by hypertrophy during postnatal life after P21, promoting protein synthesis and limiting protein degradation [11]. The genes of the Notch signalling pathway, which are involved in the control of the stem cell's fate and behaviour, are essential for the myogenic progress [14,15]. However, little is known about the role of Notch signalling in perinatal/juvenile muscle growth because *Notch1*^{-/-} mice mutants [16,17] or embryos lacking components required for Notch signalling such as its main transcriptional repressor RBP-Jk [18] die at midgestation or around birth with severe defects in somitogenesis, vasculogenesis, cardiogenesis and/or neurogenesis [19]. Because global inactivation of Notch signalling leads to drastic and advanced effects on somitogenesis, only conditional mutagenesis of some Notch regulators provides information on the involvement of Notch signalling in myogenesis after midgestation. Indeed, conditional mutations of *Rbp-jk* [20] and the gene encoding the NOTCH-ligand DLL1 [21] lead to mutant mice exhibiting severe muscle hypotrophy during embryonic development, owing to uncontrolled differentiation of progenitor cells generating a rapid and significant depletion of the progenitor cell pool.

Canonical Notch signalling is initiated by interaction of the extracellular domain of ligands (DLL-1,-3,-4 and JAGGED-1 and -2) with their counterparts on one of the four receptors (NOTCH1-4), leading to sequential proteolytic cleavages by ADAM proteases and the γ -SECRETASE complex of the NOTCH receptor. Once cleaved, the latter releases its NOTCH intracellular domain (NICD), which translocates to the nucleus where it interacts with RBP-Jk by displacing co-repressors [22]. This allows the recruitment of coactivators such as MASTERMIND-LIKE-1 (MAML1) [23] to induce transcriptional activation of specific target genes, including *Hes* and *Hey* family genes [24,25]. By activating the expression of target genes such as *Hes1*, Notch inhibits differentiation by repressing the expression of *MyoD* [26], which belongs to the family of myogenic regulating factors (MRFs) including MYF5, MYOGENIN (or MYOG) and MRF4 (or MYF6) [27]. During postnatal muscle growth and muscle regeneration, activated satellite cells coexpress *Pax7* and *MyoD* [28]. While most of them proliferate, myoblasts from activated satellite cells downregulate *Pax7* leading to their differentiation in myocytes, whose fusion gives rise to myogenin-expressing multinucleated myotubes [29]. Some of those proliferating myoblasts (*PAX7*⁺/*MYOD*⁺) revert to a quiescent state by repressing *MyoD* expression [30]. Thus, the expression of *Pax7* maintains proliferation and prevents a precocious differentiation, without promoting quiescence [28]. Overexpressed NICD upregulates *Pax7* through a RBP-Jk-dependent binding to its promoter, resulting in enhanced self-renewal of satellite cells, whereas inhibition of Notch signalling leads to a downregulation of *Pax7*, resulting in satellite cell depletion and improved terminal differentiation [30]. Indeed, the loss of *Pax7* expression leads to a complete absence of satellite cells in postnatal skeletal muscles [31].

NOTCH receptors and ligands are glycoproteins, whose extracellular domains are subjected to several glycosylations such as *O*-fucosylation mediated by protein *O*-fucosyltransferase 1 (POFUT1). POFUT1 is a resident *N*-glycosylated glycosyltransferase of the endoplasmic reticulum [32,33], which adds fucose on S or T within the consensus site C²X₄(S/T)C³ (where C² and C³ are the second and third cysteines, respectively) of epidermal growth factor (EGF)-like repeats present in numerous proteins [34], including NOTCH receptors and ligands. The POFUT1-mediated *O*-fucosylation of extracellular domains of NOTCH receptors controls the receptor–ligand interactions which are critical for activation of Notch signalling [35]. Among the 36 EGF-like repeats of murine NOTCH1 receptor, EGF repeat 12, for example, was necessary and sufficient for ligand binding [36] and mutation of its *O*-fucosylation site affected Notch-ligand interactions [37]. In contrast to NOTCH receptors, *O*-fucosylation of DELTA/JAGGED ligands is poorly documented and recent studies report that *O*-fucosylation of murine DLL1 is not required for ligand–receptor interactions [38]. POFUT1-mediated *O*-fucosylation of receptors is therefore essential for canonical Notch signalling by DLL1 or JAGGED1 [39]. Notch signalling is also modulated by elongation of *O*-linked fucoses on some EGF-like repeats with *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) and then with galactose residues, owing to the action of a β 1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase of the Fringe family [40] and a β 1,4-galactosyltransferase [41,42], respectively. The resulting trisaccharide *O*-fucosylglycan (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3fucose) can be terminated with α 2-3 or α 2-6 linked sialic acids, whose involvement in Notch signalling has not been yet reported [43].

In a recent *in vitro* study, we showed that *Pofut1* knock-down reduces Notch signalling and affects differentiation of the mouse myoblast cell line C2C12. The expression patterns of *PAX7* and *MYOD* are modified under these conditions and induce earlier cell differentiation [44]. *In vivo*, knock-out of *Pofut1* is lethal: mice embryos die at E9.5 with a phenotype similar to that of mice in which NOTCH receptor signalling is inactivated [19]. In 2009, a spontaneous mutation in *Pofut1* gene called *Pofut1*^{cax} was described in a mouse strain [45]. *Pofut1*^{cax/cax} mice have an insertion of an intracisternal A particle (IAP) in the fourth intron of the *Pofut1* gene, leading to a hypomorphic allele and a decrease in gene expression without any change in protein structure and activity. Homozygous *Pofut1*^{cax/cax} mice display defects in the axial skeleton consistent with the known patterning functions of Notch in somitogenesis. Nevertheless, no detailed phenotyping was performed on skeletal muscles of *Pofut1*^{cax/cax} mice.

In this study, we report the consequences of the *Pofut1* hypomorphic mutation on postnatal growth of skeletal muscles in *Pofut1*^{cax/cax} mice. Immunostaining studies on isolated *Pofut1*^{cax/cax} skeletal muscles showed a slight but significant muscular hypertrophy with myonuclear accretion compared with wild-type controls. In addition, the number of *PAX7*⁺ satellite cells was significantly reduced in *Pofut1*^{cax/cax} mice. Analyses of *ex vivo* *Pofut1*^{cax/cax} SCDMs revealed a depletion of *PAX7*⁺/*MYOD*⁻ progenitor cells, a decrease in *Pax7* expression and disruption of the myogenic programme, leading to earlier *Pofut1*^{cax/cax} SCDM differentiation. These observations could explain the accrued muscle mass occurring in the first weeks of postnatal life in *Pofut1*^{cax/cax} mice, as a result of increased fusion of SCDMs with pre-existing myofibres.

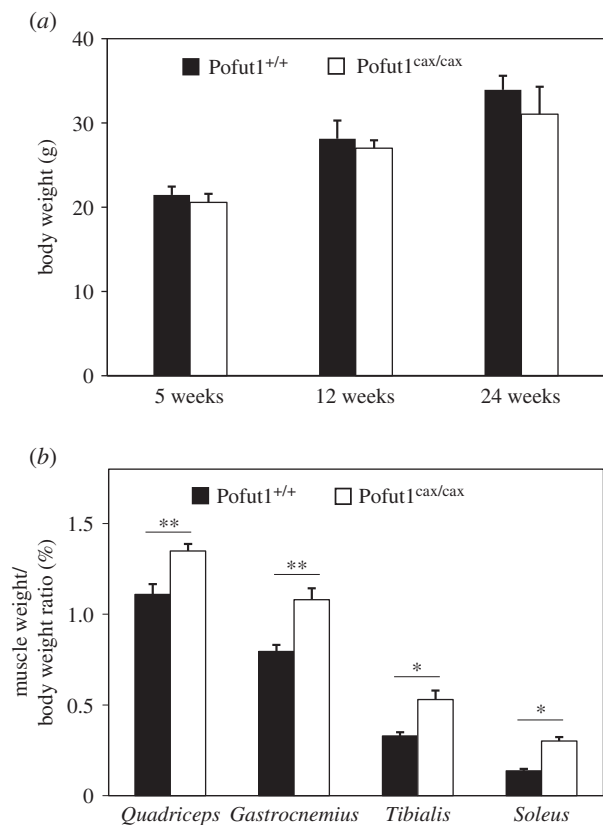


Figure 1. Body weight and muscle/body weight ratios in mice. (a) Body weights (g) in Pofut1^{+/+} and Pofut1^{cax/cax} mice ($n = 6$) at three different ages (5, 12, 24 weeks). (b) Muscle weight/body weight ratios as a percentage for four different muscles of five week old mice ($n = 6$). Means \pm s.e.m. are shown (two-tailed t -test, with a significance level of * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

2. Results

2.1. Pofut1^{cax} mutation induces postnatal muscle hypertrophy and decrease in the satellite cell pool

As previously described [45], Pofut1^{cax/cax} mice showed either a normal phenotype or shortened bodies with kinky or absent tails. About 40% of Pofut1^{cax/cax} mice had shortened kinky tails ($n = 19$) with a length of $6.16 \text{ cm} \pm 0.68$ versus $8.50 \text{ cm} \pm 0.20$ in Pofut1^{+/+} mice but showed unchanged body size compared with their wild-type littermates (data not shown). Additional morphometric analyses did not reveal a statistically significant difference ($n = 6$ per genotype and per age) in body weight regardless of the age (5, 12, 24 weeks) of Pofut1^{cax/cax} mice compared with Pofut1^{+/+} mice (figure 1a).

To determine whether the hypomorphic mutation of Pofut1^{cax/cax} mice affected postnatal muscle growth, skeletal muscles with fast-twitch (*Tibialis*) or slow-twitch (*Soleus*) or mixed (*Gastrocnemius* and *Quadriceps*) myofibres were weighed and analysed by immunohistochemistry in Pofut1^{cax/cax} mice and compared with those from wild-type mice after weaning at five weeks (figures 1b and 2) and long after sexual maturity at 12 and 24 weeks (electronic supplementary material, table S1). The analysis of muscle weight/body weight (M/B) ratios for these four skeletal muscles from five week old mice revealed higher values in Pofut1^{cax/cax} mice than in Pofut1^{+/+} mice (figure 1b). Similar results were found with 12 and 24 week old mice (electronic supplementary material, table S1). These results showed that higher M/B ratios in Pofut1^{cax/cax} mice seem to be unrelated to the type of muscle metabolism and could be due

to myofibre hypertrophy, hyperplasia or both. To test these hypotheses, immunohistochemical analyses were carried out to evaluate myofibre mean area and number using cross sections. Immunostaining using anti-laminin antibody (figure 2a) showed significant increased myofibre mean area (figure 2b) in Pofut1^{cax/cax} mice compared with Pofut1^{+/+} mice but no hyperplasia (figure 2c), because the myofibre number per field, although with a lower mean, was not significantly different regardless of muscle type and mouse age (electronic supplementary material, table S1). To determine whether myofibre hypertrophy was only due to increased protein synthesis and/or myonuclear accretion, the number of DAPI-labelled nuclei (figure 2a) was evaluated. More nuclei per cross-sectional myofibre were found in each of the four muscles from Pofut1^{cax/cax} mice (figure 2d), suggesting greater myonuclear accretion in muscles from Pofut1^{cax/cax} mice.

The pool of satellite cells at the periphery of myofibres was evaluated using anti-Pax7 immunostaining (figure 2a) and the number of satellite cells per cross-sectional myofibre for the four selected muscles was determined (figure 2e and electronic supplementary material, table S1). Regardless of muscle type and mouse age, the number of satellite cells per cross-sectional myofibre was significantly lower in Pofut1^{cax/cax} mice than in wild-type controls. The decrease in satellite cells ranged from 35% to 66% if considering the four muscles from five week old Pofut1^{cax/cax} mice compared with those from wild-type mice (figure 2e and electronic supplementary material, table S1), whereas it was more pronounced (from 33% to 87%) in muscles of 12 and 24 week old mice (electronic supplementary material, table S1).

2.2. Pofut1^{cax/cax} satellite cell-derived myoblasts display reduced expression of Pofut1 and Pax7

As the number of Pax7⁺ satellite cells was significantly reduced in Pofut1^{cax/cax} mice compared with the wild-type controls, primary cultures of SCDMs were analysed from skeletal muscles to highlight molecular mechanisms involved in satellite cell depletion.

Primary cultures of SCDMs from Pofut1^{cax/cax} and Pofut1^{+/+} mice were prepared from a pool of four skeletal muscles of hind legs (*Quadriceps*, *Gastrocnemius*, *Tibialis*, *Soleus*), mixed on the basis of a similar reduction by 80–90% of Pofut1 mRNA quantities in each of the four selected muscles, as shown in figure 3a. As expected, western blot analyses showed a reduction of POFUT1 quantity, thus, validating the *ex vivo* model. This decrease in protein expression was approximately 40% in Pofut1^{cax/cax} SCDMs, when compared with Pofut1^{+/+} SCDMs (figure 3b).

Then, expression of PAX7, which plays a key role in activation and quiescence of satellite cells *in vivo*, was evaluated by western blot. A significant 45% reduction in protein expression was obtained for PAX7 in Pofut1^{cax/cax} SCDMs, similarly to POFUT1 (figure 3b). These results might suggest that PAX7⁺ satellite cells, less numerous in muscles of Pofut1^{cax/cax} mice, express reduced PAX7 protein levels; this could be consequent to decreased expression of POFUT1.

2.3. Pofut1^{cax/cax} satellite cell-derived myoblasts differentiate earlier than wild-type cells

Before analysing *in vitro* differentiation, we determined purity of the myoblast cell population in SCDM preparations by

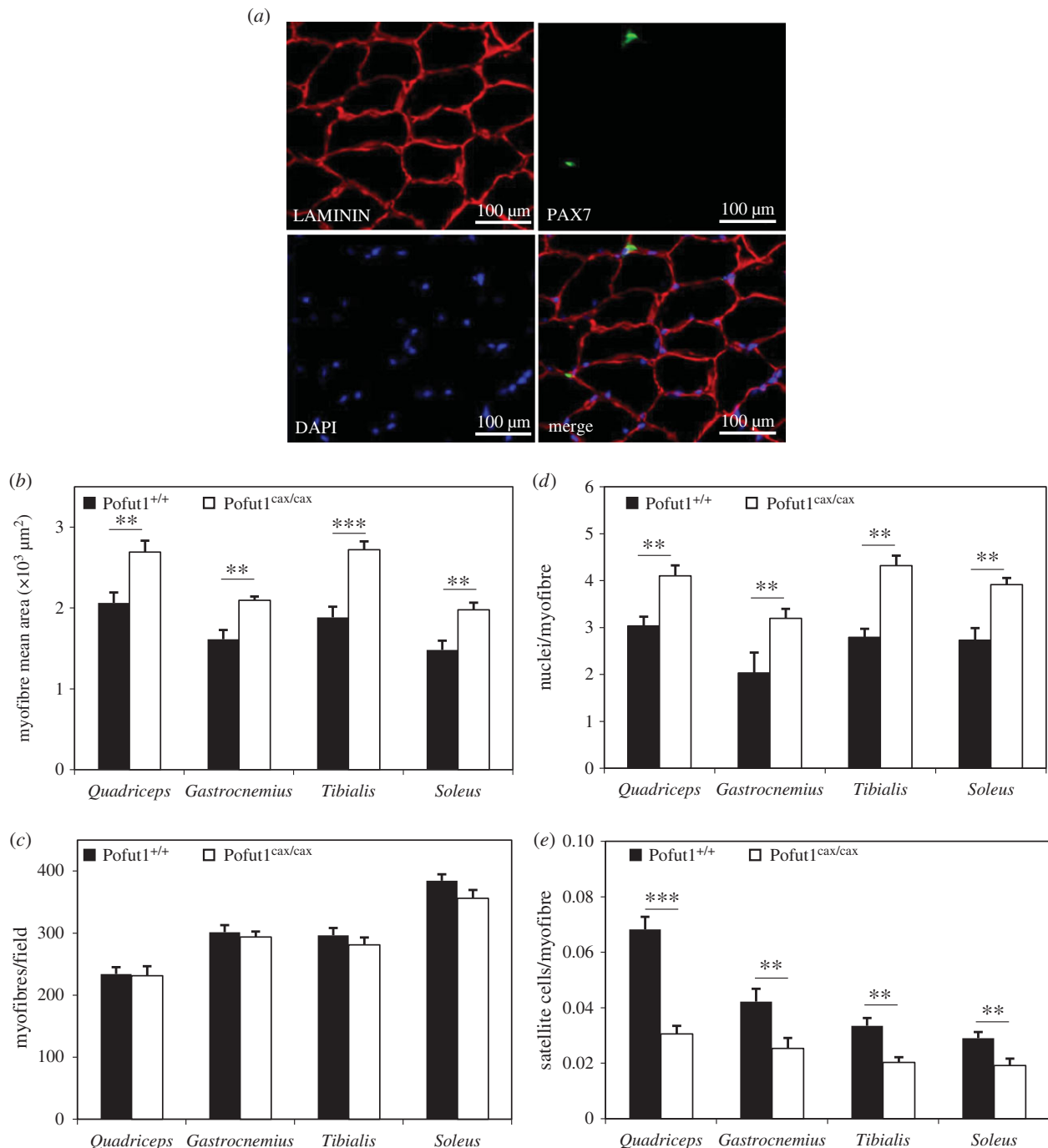


Figure 2. Characterization of immunostained cross sections of skeletal muscles from five week old mice. (a) Representative field of *Quadriceps* cryosection from five week old *Pofut1*^{+/+} mice. LAMININ (red), DAPI (blue) and PAX7 (green) immunostaining showed basal lamina of myofibres, nuclei and satellite cells respectively. (b) Myofibre mean areas, (c) number of myofibres per field, (d) nuclei per myofibre and (e) satellite cells per myofibre were determined for skeletal muscles with mixed (*Quadriceps*, *Gastrocnemius*), fast-twitch (*Tibialis*) or slow-twitch (*Soleus*) myofibres. Means \pm s.e.m. ($n = 6$) are shown (two-tailed t -test, with a significance level of $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$).

calculating percentage of DESMIN-expressing cells relative to total cells (DAPI⁺). Results showed that primary cultures of *Pofut1*^{+/+} and *Pofut1*^{cax/cax} SCDMs contained more than 95% of myoblasts expressing DESMIN (figure 4a), which is considered as a muscle-specific protein.

As attested by MTS assay (figure 4b), the decreased expression of *Pofut1* did not significantly modify proliferation of *Pofut1*^{cax/cax} SCDMs from T0 (where cells were seeded at a low density in growth medium (GM) to 96 h. Indeed, the production of formazan (absorbance at 490 nm) by viable cells is nearly identical for both SCDMs at each time point.

Prior to inducing differentiation by switching the culture medium (differentiation medium (DM) instead of GM),

Pofut1^{+/+} and *Pofut1*^{cax/cax} SCDMs exhibiting comparable purity and proliferation rates were thus seeded at the same cell density. To characterize the differentiation process of both SCDMs, fusion indexes and expression patterns of *Cdkn1a* (cyclin-dependent kinase inhibitor 1a, also called *p21*), *Pofut1*, *Pax7* and three myogenic marker genes (*Myf5*, *MyoD*, *Myog*) were determined during 240 h of differentiation. Finally, the impact of decreased *Pofut1* was evaluated by counting the three different cell populations as follows: PAX7⁺/MYOD⁻ (self-renewing cells), PAX7⁺/MYOD⁺ (proliferating cells) and PAX7⁻/MYOD⁺ (differentiating cells).

Following immunostaining of SCDM nuclei and myosin heavy chain (MyHC), the fusion index was calculated by

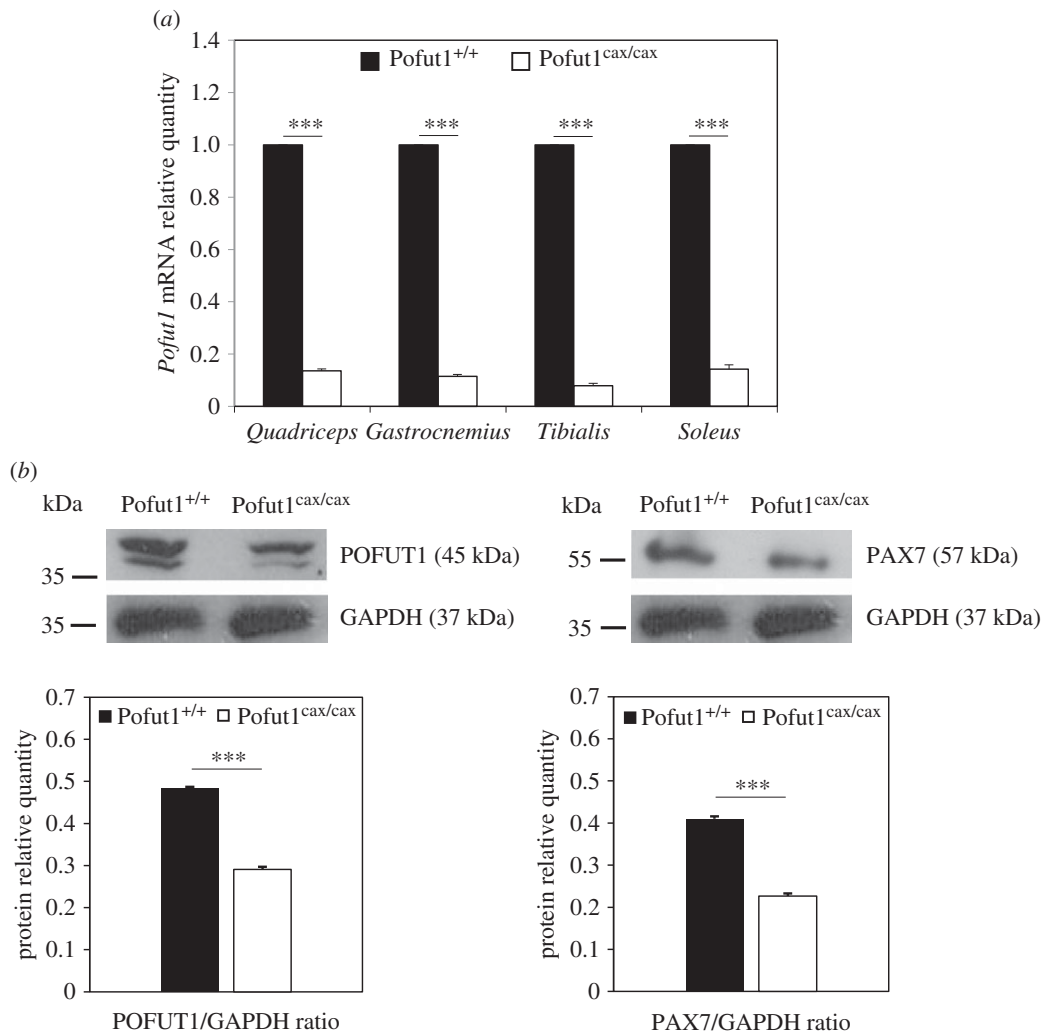


Figure 3. Quantification of *Pofut1* and *Pax7* transcripts and proteins in muscles and SCDMs. (a) *Pofut1* mRNA relative quantities in four skeletal muscles from five week old *Pofut1^{cax/cax}* mice compared with those of *Pofut1^{+/+}* controls set to 1. Quantities of *Pofut1* mRNA were normalized to *18S RNA* and *Gapdh* mRNA quantities. (b) Detection of POFUT1, PAX7 and GAPDH by western blotting on total extracted proteins of proliferating *Pofut1^{+/+}* and *Pofut1^{cax/cax}* SCDMs. Histograms represent POFUT1/GAPDH and PAX7/GAPDH ratios. Means \pm s.e.m. ($n = 3$) are shown (two-tailed *t*-test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

determining the percentage of nuclei in myotubes compared with the total number of nuclei during 240 h of differentiation (figure 4c). When seeded at about 50% confluence and placed in DM (T0), *Pofut1^{cax/cax}* SCDM differentiated significantly faster than *Pofut1^{+/+}* cells with an advance of about 48 h. At 240 h of differentiation, 13% of cell fusion was reached in *Pofut1^{cax/cax}* SCDMs versus only 9% in wild-type cells. This indicates that the earliest appearance of myotubes in *Pofut1^{cax/cax}* SCDMs was not due to a difference in proliferation (as demonstrated in figure 4b) but more likely to a disruption in the myogenic programme.

To understand the origin of this premature differentiation, expressions of *Cdkn1a*, *Pofut1* and *Pax7* as well as of MRFs was followed by qPCR during differentiation for both SCDMs (figure 5). First, differentiation was followed by expression of *Cdkn1a*, a marker for cell cycle arrest. A non-significant variation in the expression of this marker was observed during the first 48 h of differentiation in both SCDMs relative to T0, suggesting that most cells continued to proliferate in spite of induced differentiation. However, its expression was significantly higher at 96 h compared with T0, which might signal a cell cycle exit. This phase (0–96 h), represented in grey in all graphs, was considered as a step where most wild-type cells continued to proliferate.

The second phase (96–240 h) where high expression levels of *Cdkn1a*, especially in *Pofut1^{cax/cax}* SCDMs, were monitored was considered as the main differentiation stage. Globally, expression of *Pofut1*, *Pax7* and MRFs (*Myf5*, *MyoD*, *Myog*) was reduced in *Pofut1^{cax/cax}* SCDMs, compared with the wild-type cells. Expression profiles evolved in the same manner during the differentiation process for cells of the two genotypes, with increases and decreases occurring at the same points of the time course.

In *Pofut1^{+/+}* SCDM and compared with T0, the expression of *Pofut1*, *Pax7* and *MyoD* was significantly increased at 48 h, whereas that of *Cdkn1a* did not change, in agreement with maintenance of a proliferative state in most cells. The expression of *Pofut1* globally decreased up to the end of differentiation. Interestingly, *Pax7* expression was significantly higher at 96 h compared with T0, whereas that of *MyoD* strongly decreased over time and became not statistically different from T0. From 144 to 192 h, *Cdkn1a* expression increased, as a result of prior induction by *MyoD*, which was optimal at 144 h [46]. Variation of these markers (*Pax7*, *MyoD*, *Cdkn1a*) was in favour of a cell cycle exit and commitment of a majority of these cells into differentiation at 96 h. However, as shown by the low fusion index (only 1.5% fusion at 96 h), differentiation was slowed down by the

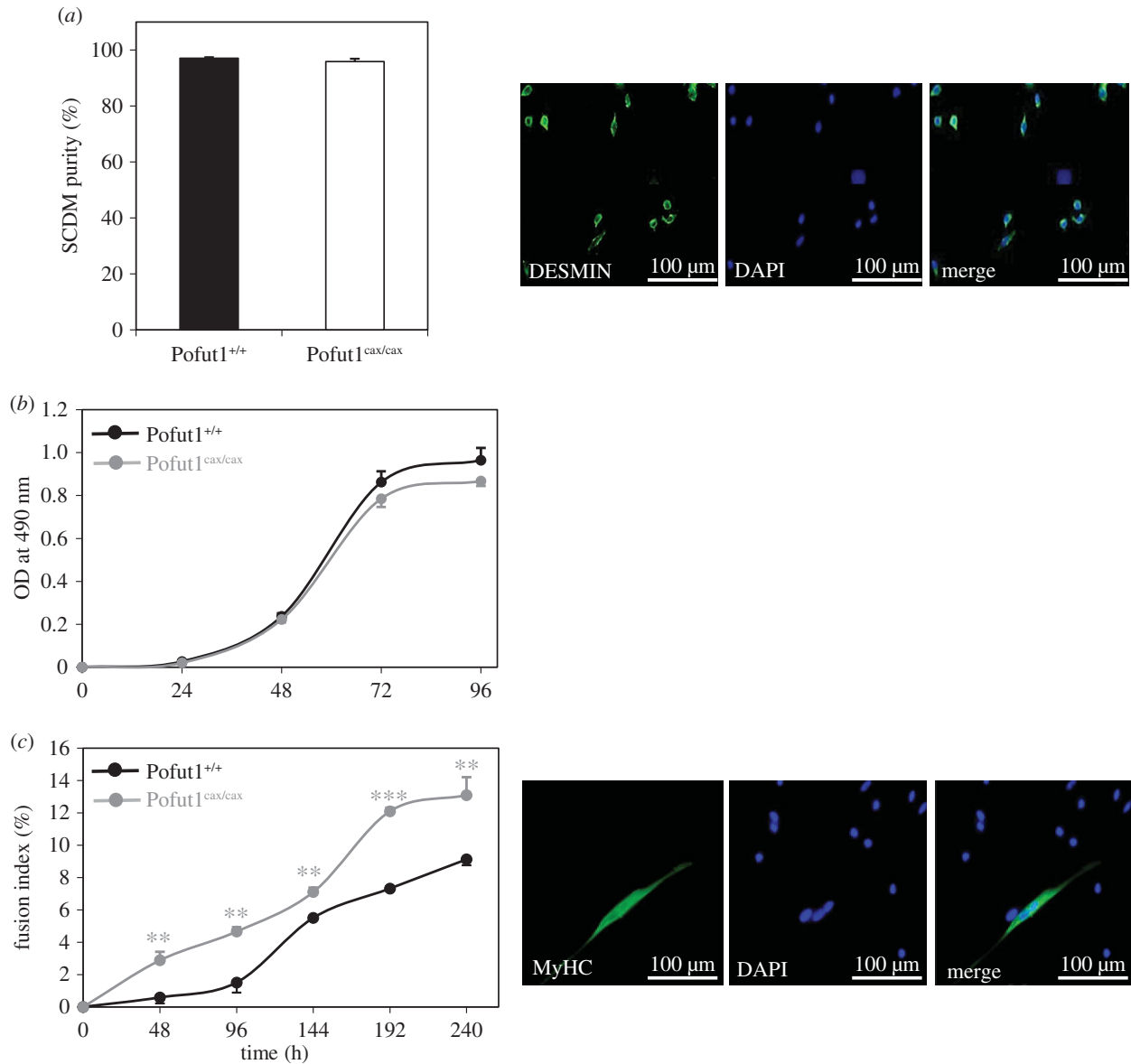


Figure 4. Characterization of purity, proliferation and differentiation of SCDMs. (a) Co-immunostaining for DESMIN (green) and DAPI (blue) distinguishes myoblasts from non-muscular cells in primary cultures of Pofut1^{+/+} and Pofut1^{cax/cax} SCDMs. Histogram represents percentage of Desmin⁺ cells related to total DAPI⁺ cells for both SCDM preparations. (b) SCDM cell proliferation was determined using an MTS assay, which relies on absorbance of formazan at 490 nm, a product of bioreduced MTS. Test was performed on both SCDMs every 24 h until 96 h after seeding cells at a low density. (c) Commitment to differentiation was first evaluated by calculating fusion indexes of Pofut1^{+/+} and Pofut1^{cax/cax} SCDMs. Fusion indexes were determined by immunostaining of nuclei with DAPI (blue) and myotubes with MyHC (green) and were calculated from the percentage of nuclei within MyHC⁺ myotubes compared with total nuclei. Statistical analyses were performed by comparing both SCDMs at each differentiation time (48–240 h). (a–c) Data were obtained from three independent experiments in triplicate and error bars indicate standard errors of the mean (two-tailed *t*-test, with a significance level of **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001).

strong expression of *Myf5*. After 96 h, *Myf5* and *Pax7* expression decreased, whereas that of *MyoD* increased up to a maximum at 144 h. Most cells then expressed *Myog* between 144 and 240 h, consistent with fusion of most cells.

In Pofut1^{cax/cax} SCDMs, most cells expressed a significantly higher level of *MyoD* at 48 h as well as at 96 h compared with T0, whereas *Pax7* was weakly expressed at those two time points. While *Pax7* and *Myf5* expression was not significantly high at 96 h, *MyoD* expression was maintained up to 144 h resulting in earlier induction of *Myog*. This is in agreement with a premature commitment to differentiation, as shown by the fusion index.

The transition from proliferative to differentiated state is thus under the control of a *Pax7* and *MyoD* expression equilibrium. In order to further study this transition, SCDMs were seeded at confluence and differentiation was induced 4 h

later. We then monitored by immunostaining the expression of PAX7 and MYOD in SCDMs during 96 h of differentiation and counted the three cell populations as follows: PAX7⁺/MYOD⁻, PAX7⁺/MYOD⁺ and PAX7⁻/MYOD⁺ cells (figure 6a). During differentiation, the amount of PAX7⁺/MYOD⁻ progenitor cells decreased for the two genotypes in favour of PAX7⁻/MYOD⁺ differentiating cells (figure 6b), reflecting commitment of SCDMs to differentiation. Remarkably, the amount of PAX7⁺/MYOD⁻ progenitor cells was drastically decreased by 53%, 56% and 83% in Pofut1^{cax/cax} compared with Pofut1^{+/+} SCDMs at 0 h, 48 h and 96 h, respectively. In parallel, the proportion of PAX7⁻/MYOD⁺ differentiating cells increased.

To conclude, all these results showed an early commitment to differentiation by Pofut1^{cax/cax} SCDMs. Decreased expression of *Pofut1* resulted in a lower *Pax7* expression

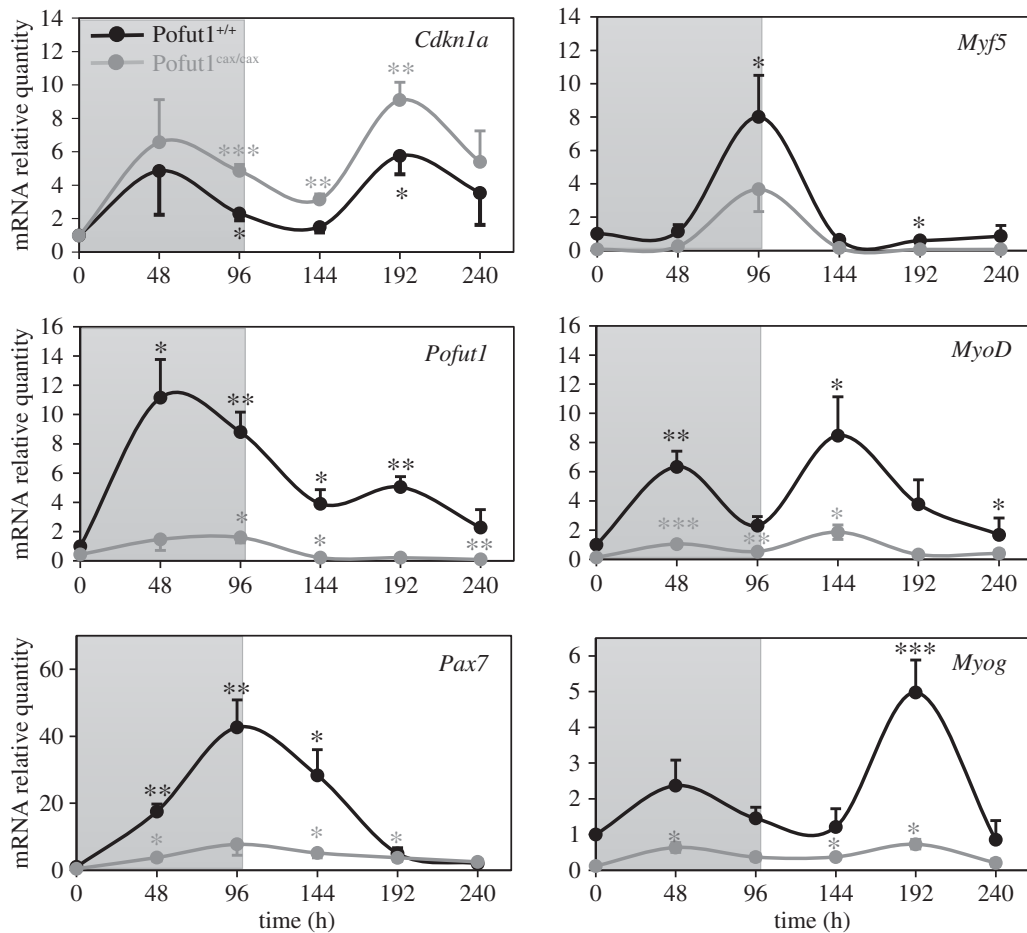


Figure 5. Gene expression for *Cdkn1a*, *Pofut1*, *Pax7* and MRFs during SCDM differentiation. mRNA relative quantities of *Cdkn1a*, *Pofut1*, *Pax7* and myogenic MRF genes (*Myf5*, *MyoD* and *Myog*) in *Pofut1*^{+/+} and *Pofut1*^{cax/cax} SCDMs. Area in grey represents the pre-differentiation state. For each cell type, statistical analyses were performed by comparison of each differentiation time point relative to T0. Quantities of target mRNA were normalized to *18S RNA* and *Gapdh* mRNA and then calibrated with T0 using the $\Delta\Delta\text{Ct}$ method. Data were obtained from three independent experiments in triplicate and error bars indicate standard errors of the mean (two-tailed *t*-test, with a significance level of **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001).

associated with depletion of PAX7⁺/MYOD⁻ progenitor cells and a lower expression of MRFs in spite of similar expression profiles compared with *Pofut1*^{+/+} SCDMs.

2.4. *Pofut1*^{cax/cax} satellite cell-derived myoblasts exhibit reduced Notch–ligand interactions leading to lowered Notch signalling

The Notch signalling pathway members, which control the behaviour and fate of stem cells, are essential for the proper progress of myogenesis [14,15]. POFUT1-mediated *O*-fucosylation of extracellular domains of NOTCH receptors controls receptor–ligand interactions, which are critical for the activation of Notch signalling [35]. In addition, the FRINGE-mediated elongation or not of *O*-linked fucose with GlcNAc residues defines the type of ligands from the DELTA/JAGGED family that can interact with NOTCH receptors [47]. To determine the consequences of decreased *Pofut1* expression in *Pofut1*^{cax/cax} SCDMs on Notch binding to its ligands, recombinant fusion proteins for two Notch ligands were produced, as previously done for *Drosophila* DELTA [48]. The extracellular domains of murine DLL1 and JAGGED1 including eight and 16 EGF-like repeats respectively were fused to human placental alkaline phosphatase (AP; figure 7a). Using an anti-AP antibody, recombinant Ctrl-AP, Dll1-AP and Jag1-AP from

concentrated supernatants of transfected COS-7 cells were detected at about 60, 120 and 175 kDa, respectively (figure 7b). These apparent molecular weights were higher than expected on the basis of amino acid sequences (54.6, 109.9 and 166.8 kDa, respectively). These results suggested the presence of post-translational modifications such as *N*- and *O*-glycosylations, as predicted by *in silico* analyses and known for the ligands [43].

Proliferating *Pofut1*^{+/+} and *Pofut1*^{cax/cax} SCDMs were incubated simultaneously for 1 h 30 with the same quantities of recombinant proteins (Ctrl-AP, Dll1-AP or Jag1-AP) at three different doses, corresponding to an absorbance at 405 nm of 40, 80 or 160. Proteins were previously concentrated by ultrafiltration from supernatants of transfected COS7 cells and quantified on the basis of AP activity. The specific binding of these proteins to NOTCH receptors on SCDMs was determined using an AP assay by subtracting Ctrl-AP activity (background). For both SCDMs, Dll1-AP binds specifically to cells and its binding increased in a dose-dependent manner, while binding of Jag1-AP was very low ($A^{405\text{nm}} < 0.08$), regardless of the dose of stimulating ligand (figure 8). Moreover, the specific binding of Dll1-AP was significantly decreased in *Pofut1*^{cax/cax} SCDMs, varying between –32% and –37% according to the dose. Because binding of Jag1-AP on 200 000 cells was very low and did not significantly increase according to the dose of ligand, it could not be considered as specific. For this reason, only binding of Dll1-AP was followed

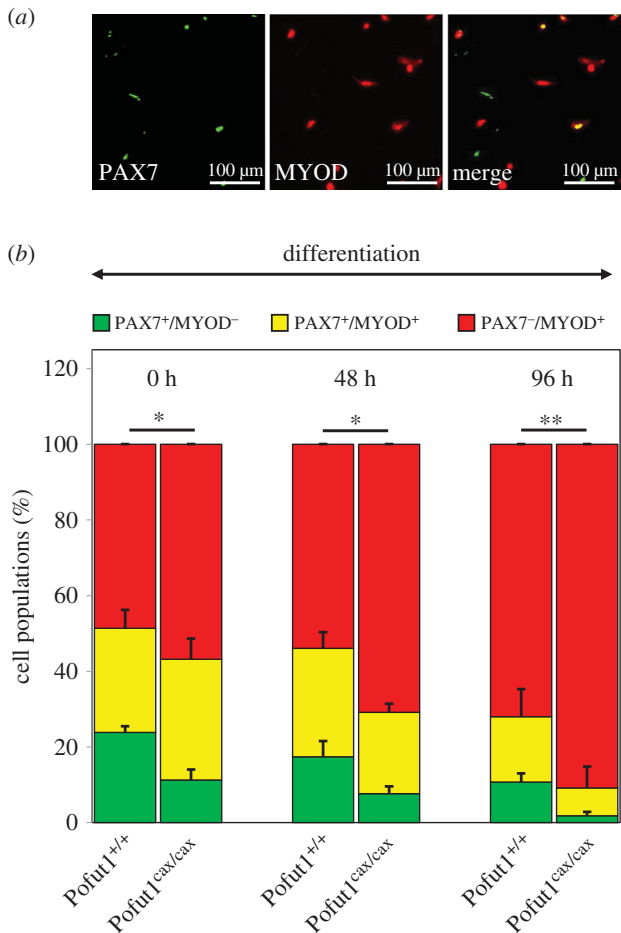


Figure 6. Immunostaining for PAX7 and MYOD during SCDM differentiation. (a) Co-immunostaining for PAX7 (green) and MYOD (red) in Pofut1^{+/+} SCDMs. (b) Pofut1^{+/+} and Pofut1^{cax/cax} SCDMs were seeded at confluence 4 h before induction of differentiation and then immunostained to distinguish three cell populations: self-renewing cells (PAX7⁺/MYOD⁻), proliferating cells (PAX7⁺/MYOD⁺) and differentiating cells (PAX7⁻/MYOD⁺). Percentages of each population were calculated at three times during differentiation (0, 48, 96 h) and mean \pm s.e.m. ($n = 3$) are shown. The significance of the t -test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$), indicated above histograms for each time, was the same for each analysed cell population.

during 144 h of SCDM differentiation (figure 9). To avoid centrifugation during multiple washing steps that could prevent optimal binding of recombinant proteins, confluent adherent SCDMs were seeded in multi-well plates and incubated with the same dose of recombinant proteins (Dll1-AP, Ctrl-AP) diluted in HBAH at the same concentrations on the basis of their AP activity. A significant reduction in specific Dll1-AP binding was clearly observed in both SCDMs during the time course; this result is likely to be related to the reduction in *Pofut1* expression during differentiation (figure 5).

Because decreased ligand–receptor interactions in Pofut1^{cax/cax} proliferating SCDMs (figure 8) could be due to lower amounts of NOTCH receptors at the cell surface and/or to reduced POFUT1-mediated *O*-fucosylation of NOTCH receptors, the quantity of NOTCH1 receptors present at the cell surface of SCDM was determined. The amount of biotinylated extracellular domain of NOTCH1 receptor (N1ECD) retained by avidin agarose was reported relative to the amount of PAN CADHERIN (figure 10). First, we showed that the antibody raised against PAN-CADHERIN (recognition of all cadherin members) detected

specific bands at about 140 kDa in the pool of proteins eluted from avidin agarose (figure 10a, lanes 3) only when proteins (input) were previously biotinylated (figure 10a, lanes 1). The cytosolic GAPDH protein was mainly detected for the input and not retained protein samples (figure 10a, lanes 1 and 2). Only a small amount of GAPDH was found in the eluted sample (figure 10a, lanes 3), showing that biotinylated proteins, retained by avidin–agarose, were mostly membrane proteins expressed at the cell surface.

After SCDM cell surface biotinylation and capture of biotinylated proteins by avidin agarose, N1ECD and PAN-CADHERIN were specifically detected by western blot (figure 10b, lanes 1–3) in all the samples (input, unretained proteins and proteins eluted from avidin agarose). N1ECD/PAN-CADHERIN ratios were similar in Pofut1^{+/+} and Pofut1^{cax/cax} SCDMs, demonstrating that the decrease in ligand–receptor interactions in Pofut1^{cax/cax} SCDM is in fact the consequence of lower *O*-fucosylation of NOTCH receptors.

To study the effects of decreased *Pofut1* expression on Notch signalling, relatively cleaved NICD quantities in total protein extracts from Pofut1^{+/+} and Pofut1^{cax/cax} SCDMs were compared by western blot (figure 11a) because they reflect NOTCH cleavage after ligand binding to NOTCH receptors. Results showed a significantly lower cleaved NICD/GAPDH ratio of approximately 50% in Pofut1^{cax/cax} SCDMs compared with wild-type cells, consistent with reduced interaction of NOTCH receptors with Dll1-AP.

Furthermore, we analysed the expression of three members of the Hes/Hey family (*Hes1*, *Hey1*, *Heyl*), which are recognized as target genes of Notch and regulated by NICD [49] and *Hes6*, which does not appear to be regulated by the Notch pathway [50]. Expression levels of *Hes1*, *Hey1* and *Heyl* were significantly reduced (50–75%) in Pofut1^{cax/cax} SCDMs, whereas *Hes6* expression was slightly less (figure 11b). Together, these results reflect the reduction in Notch signalling, induced by decreased *Pofut1* expression in Pofut1^{cax/cax} SCDMs.

3. Discussion

Pofut1-null mouse embryos exhibit severe retarded growth and die at midgestation (\approx E10) with major defects in many developmental processes such as somitogenesis and neurogenesis, owing to a global inactivation of Notch signalling [19]. Pofut1^{cax/cax} mice are characterized by decreased expression of *Pofut1* mRNA and protein, resulting in reduced Notch signalling [45]. These mice with hypomorphic *Pofut1* alleles are viable and fertile but exhibit skeletal defects of variable intensity, affecting the length and shape of the body and tail, subsequent to defects in somitogenesis. Our present data show for the first time that the downregulated expression of *Pofut1* also affects postnatal muscle growth in mice leading to a moderate muscular hypertrophy of skeletal muscles with myonuclear accretion and a significant decrease in the satellite cell pool. We did not observe any hyperplasia in muscles from Pofut1^{cax/cax} mice, regardless of mouse age. This result is in agreement with previous studies showing that postnatal muscle growth in mice occurs by hypertrophy and not hyperplasia [7], because the myofibre number is already established around birth in many muscles [51].

All satellite cells of skeletal muscles which express *Pax7* derived from PAX3⁺/PAX7⁺ muscle progenitor cells of central

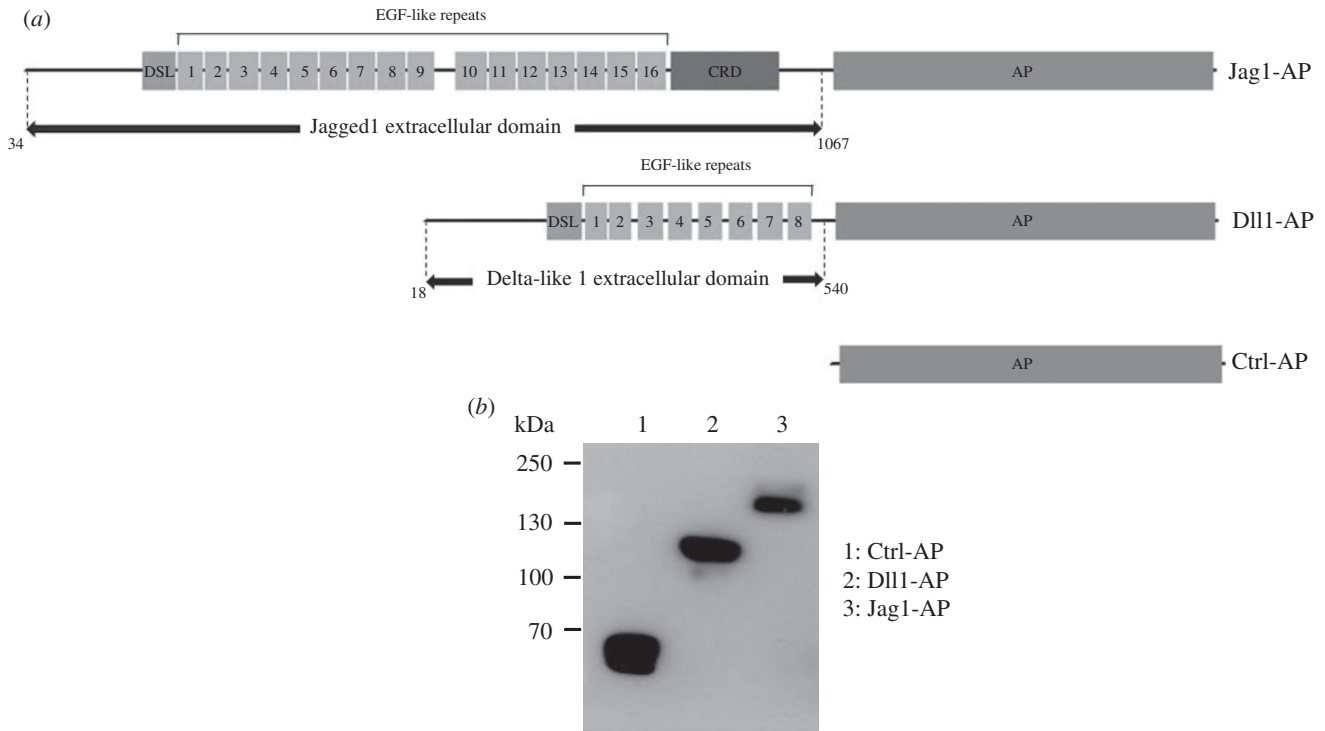


Figure 7. Production of recombinant proteins. (a) Extracellular domain of murine JAGGED1 (Jag1) and DELTA-LIKE1 (Dll1) were fused to alkaline phosphatase (AP) to obtain recombinant fusion proteins (Jag1-AP and Dll1-AP), which were secreted in culture medium of transfected COS-7 cells, as was the recombinant control protein (Ctrl-AP). EGF-like repeats, Delta-Serrate-Lag domain (DSL) and cysteine-rich domain (CRD) are shown. (b) Western blot analysis of recombinant concentrated Ctrl-AP and fusion proteins produced in COS-7 cells, detected with anti-AP antibody.

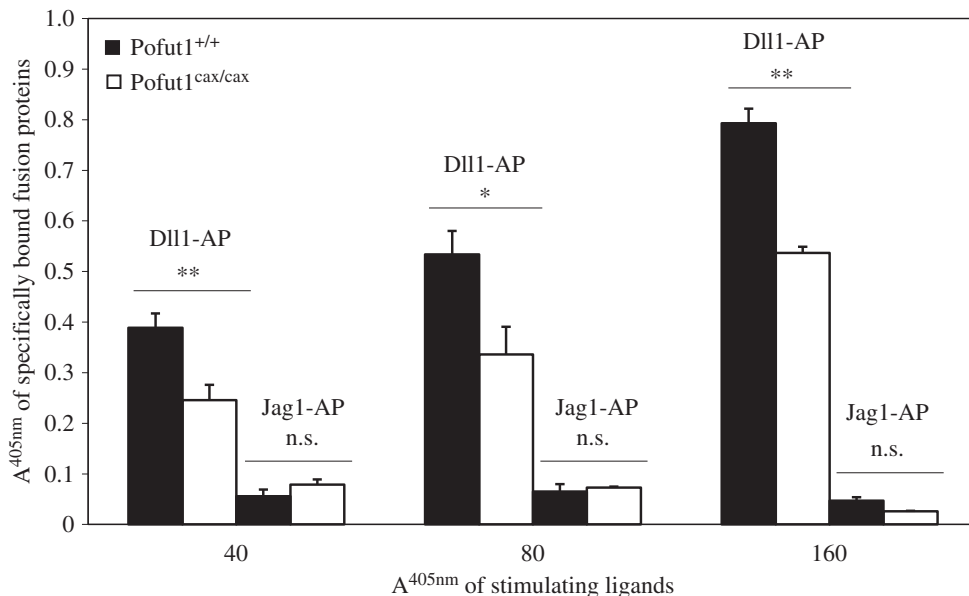


Figure 8. Binding assays of recombinant fusion proteins at the cell surface of proliferating SCDMs. Specific binding of Dll1-AP and Jag1-AP at cell surfaces of proliferating Pofut1^{+/+} and Pofut1^{cax/cax} suspension cells of SCDMs. AP assays based on absorbance at 405 nm (A^{405nm}) of pNPP substrate were performed on cell lysates after incubation of SCDM suspensions with three increasing doses of concentrated recombinant proteins (Dll1-AP, Jag1-AP or Ctrl-AP), tested as stimulating ligands and quantified on the basis of their AP activity. Absorbance values of Ctrl-AP were subtracted. Mean absorbance values \pm s.e.m. ($n = 3$) were compared between both types of SCDMs for each fusion protein (two-tailed t -test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, n.s., not significant).

dermomyotome [52]. They adopt their satellite position just before birth (E16.5–18.5) [53,54]. Once this first pool of satellite cells is constituted, their number per myofibre steadily decreases from P6 to reach the adult level at P21, whereas the number of myonuclei steadily increases during the same period in murine *extensor digitorum longus* muscles [8], which contains slow-twitch myofibres such as the *Soleus* muscle used in our study. After P21 in mouse, the number of satellite

cells and myonuclei is relatively stable in the physiological state and muscle growth occurs essentially by protein anabolism resulting in a myofibre volume increase without satellite cell activation and addition of new myonuclei. After weaning, in five week old mice (P35), we showed that all skeletal muscles from Pofut1^{cax/cax} mice displayed myofibre hypertrophy with myonuclear accretion but less satellite cells compared with wild-type mice. Consequently, we hypothesize that the

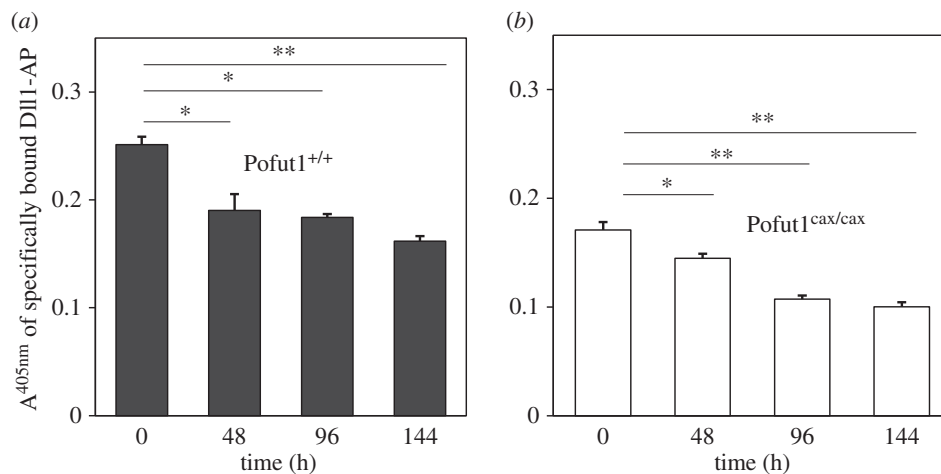


Figure 9. Quantification of specific binding of Dll1-AP at cell surface of SCDMs during differentiation. The specific binding of Dll1-AP at cell surfaces of Pofut1^{+/+} (a) and Pofut1^{cax/cax} (b) was determined every 48 h until 144 h of differentiation, using adherent SCDMs seeded at confluence. AP assays based on absorbance at 405 nm (A^{405nm}) of pNPP substrate were performed on cell lysates after incubation of SCDMs with unconcentrated proteins (Dll1-AP or Ctrl-AP), quantified on the basis of their AP activity. Absorbance values of Ctrl-AP were subtracted to determine binding specificity of Dll1-AP. Mean absorbance values \pm s.e.m. ($n = 3$) were compared with those at T0 for each cell type (two-tailed t -test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

number of satellite cells decreased faster in muscles of Pofut1^{cax/cax} mice between P6 and P21, at the same time as a more rapid increase in the number of post-mitotic myonuclei as a result of more myoblast fusion related to hypertrophy. However, we cannot rule out that a reduced number of PAX7⁺ satellite cells is already present at birth in Pofut1^{cax/cax} mice compared with Pofut1^{+/+} controls.

In Pofut1^{+/+} and Pofut1^{cax/cax} mice, myofibre mean areas of most skeletal muscles continued to significantly increase between 5 and 12 weeks of age in the same proportions. It then became stable between 12 and 24 weeks except for *Quadriceps*. These results suggest that IGF/Akt/mTOR and myostatin/Smad pathways that govern the postnatal muscle growth by increased protein synthesis from P21 to adulthood were not significantly affected by reduced Notch signalling in Pofut1^{cax/cax} mice. However, Notch signalling may affect the IGF/Akt/mTOR pathway, by regulating the transcription of the gene encoding the phosphatase PTEN, which prevents activation of Akt (also named protein kinase B) by dephosphorylating PIP3 [55]. Indeed, Notch signalling leads to an activation of target genes *Hes1* and *c-Myc*, which act as transcriptional repressors of *Pten* expression [56]. Conversely, RBP-Jk-dependent Notch signalling induces *Pten* upregulation [55,57,58]. It is therefore difficult to predict how downregulation of *Pofut1* which leads to reduced Notch signalling might impact IGF/Akt/mTOR pathway through regulation of the *Pten* expression. However, it was previously shown that inhibition of Notch signalling by DAPT treatment induces myotube hypertrophy, through myostatin decrease that promotes activation of the Akt pathway [59].

Notch signalling regulates myogenic differentiation and satellite cell fate [15]. Primary cultures of SCDMs were settled from skeletal muscles of Pofut1^{cax/cax} mice to better understand the origin of postnatal muscular hypertrophy. First, we showed comparable purities and proliferation rates of SCDM preparations and validated the decreased expression of *Pofut1* in Pofut1^{cax/cax} SCDMs, compared with wild-type SCDMs. We also showed an earlier commitment to differentiation of Pofut1^{cax/cax} SCDMs, subsequent to a global decrease in Notch signalling provoked by reduced amounts of POEUT1. Indeed, reduced POEUT1 expression

was directly correlated with reduced binding of the Dll1-AP fusion protein to NOTCH receptors at the cell surface of Pofut1^{cax/cax} SCDMs, leading to a lesser amount of cleaved NICD and reduced expression of several Notch target genes from the *Hes/Hey* family and *Pax7* [30]. Our results strongly suggest that reduction of these ligand–receptor interactions was only due to decreased POEUT1-mediated *O*-fucosylation of NOTCH receptors, because the relative quantity (RQ) of NOTCH receptors expressed at the cell surface was unaffected in Pofut1^{cax/cax} SCDMs, as also previously observed in mouse C2C12 myogenic cell knockdown for *Pofut1* [44]. This might strengthen the hypothesis that POEUT1 does not have a chaperone role for mammalian NOTCH receptors, in contrast to what had been previously described in *Drosophila* [60]. However, only NOTCH1 receptors were quantified at the cell surface out of the four mammalian ones.

Among 20 predictive *O*-fucosylation sites within the mouse NOTCH1 extracellular domain composed of 36 EGF-like repeats [35], more than 50% of sites are known to be really modified by *O*-linked fucoses [61]. Recently, the majority of predicted *O*-fucosylation sites were shown to be occupied on *Drosophila* Notch by fucose residues, whose degree of elongation by Fringe was variable [62]. Thus, even though NOTCH receptors would have less *O*-fucosylated EGF-like repeats in Pofut1^{cax/cax} SCDMs than in wild-type cells, we cannot rule out that some EGF-like, such as the highly conserved EGF-like repeat 12 [36], are *O*-fucosylated in priority and even elongated by Fringe owing to their involvement in modulation of Notch receptor–ligand interactions.

We showed that both proliferating SCDMs specifically bound Dll1-AP to their cell surfaces in a dose-dependent manner, whereas the very low binding of Jag1-AP was not considered as relevant. This might be related to a high activity of glycosyltransferases of the Fringe family, which allow GlcNAc extension of *O*-linked fucose residues on NOTCH EGF repeats and thus promote binding to Delta and alter binding to Jagged, as previously shown [63]. In addition, we showed a gradual decrease in Dll1-AP binding during differentiation in both SCDMs, which could be explained by a gradual reduced expression of *Pofut1* throughout this process.

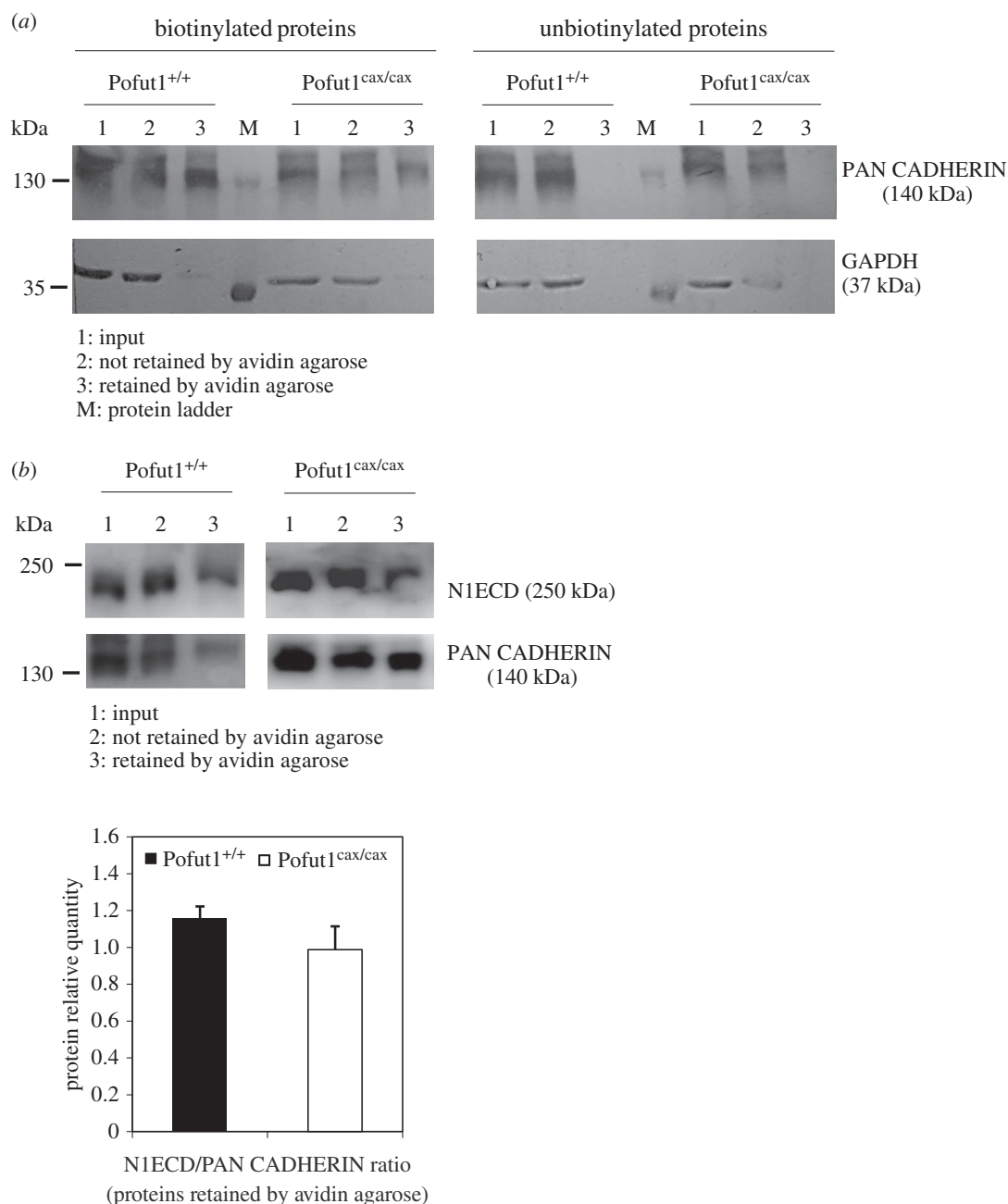


Figure 10. Quantification of NOTCH1 receptors at the cell surface of SCDMs. (a) Western blot using an antibody directed against members of the cadherin family (PAN-CADHERIN), which are membrane proteins and not considered as target proteins of POFUT1. PAN-CADHERIN and GAPDH were monitored during purification of cell surface membrane proteins on avidin agarose after biotinylation or not of scraped SCDMs. Purified fractions containing initial extracted proteins (input, lanes 1), unretained proteins (lanes 2) or proteins eluted from avidin agarose (lanes 3) were analysed for their content of PAN-CADHERIN and GAPDH. (b) After cell surface biotinylation of proliferating Pofut1^{+/+} and Pofut1^{cax/cax} SCDMs and purification of biotinylated surface proteins using avidin agarose, all fractions described above were analysed by western blot using antibodies against NOTCH1 extracellular domain (N1ECD) and PAN-CADHERIN. Histograms represents the N1ECD/PAN-CADHERIN ratio, determined after quantification of these two proteins in lanes 3. Means \pm s.e.m. ($n = 3$) are shown (two-tailed t -test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

As in Pofut1 knockdown C2C12 cell line (called Po⁻) [44], we showed earlier differentiation of Pofut1^{cax/cax} SCDMs owing to reduced Notch signalling and a significant lowering in PAX7⁺/MYOD⁻ progenitor cells in favour of more PAX7⁻/MYOD⁺ cells committed to differentiation. Thus, *in vitro* and *ex vivo* cell models represented by the C2C12 Po⁻ cell line and Pofut1^{cax/cax} SCDMs, respectively, gave similar results, highlighting the essential role of POFUT1 in myogenic differentiation through Notch signalling regulation.

While NOTCH receptors and their canonical ligands are already known targets of POFUT1, other proteins could be directly or indirectly affected by the decreased expression of Pofut1 gene in Pofut1^{cax/cax} mice. Indeed, approximately

100 proteins are predicted to be O-fucosylated [34], some of which might be involved in one of the main signalling pathways responsible for postnatal muscle growth. Except by mass spectrometry, it is difficult to demonstrate that a natural protein is actually O-fucosylated as no antibody or specific lectin recognizing O-linked fucose residues is available and no enzyme is known to specifically cleave O-fucose. Thus, it is experimentally difficult to know which sites are precisely O-fucosylated on NOTCH receptors expressed at the cell surface of SCDMs and how decreased expression of Pofut1 could affect O-fucosylation of these sites.

Finally, it would be of interest to test the impact of a more drastic downregulation of Pofut1 on postnatal muscle growth

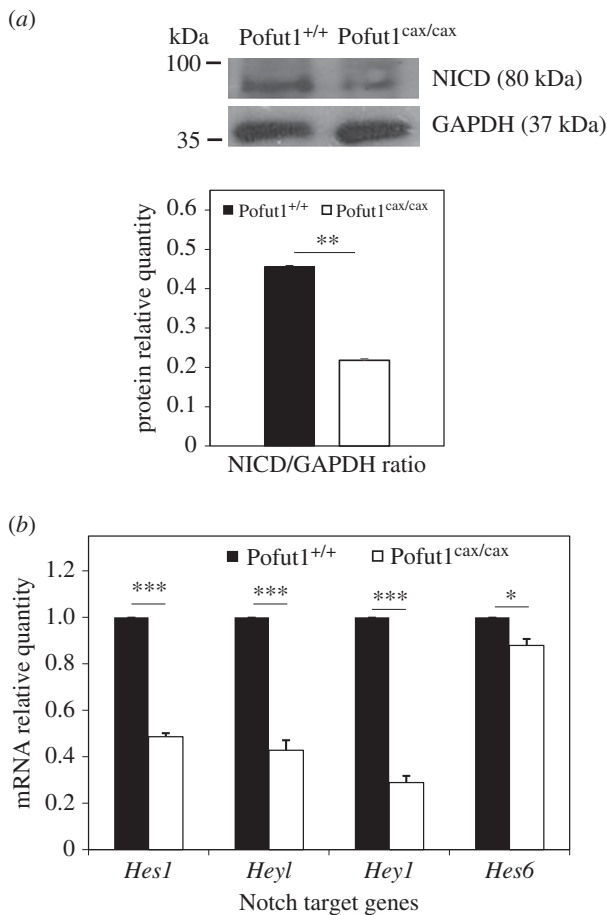


Figure 11. Notch signalling pathway activation. (a) Detection of cleaved NOTCH intracellular domain (NICD) and GAPDH by western blotting on total extracted proteins of proliferating Pofut1^{+/+} and Pofut1^{cax/cax} SCDMs. Histograms represent Notch signalling activation (calculated by cleaved NICD/GAPDH ratio). (b) Gene expression levels of Notch target genes (*Hes1*, *Heyl*, *Heyl*) and *Hes6* during proliferation. Target mRNAs were normalized to *18S RNA* and *Gapdh* mRNA. Means \pm s.e.m. ($n = 3$) are shown (two-tailed *t*-test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

of heteroallelic Pofut1^{null/cax} mice and to analyse the functional consequences of muscular hypertrophy on muscle strength and locomotor activity in these murine models.

4. Material and methods

4.1. Animals

Pofut1^{cax} is a spontaneous mutation on a C3H background, which results from the insertion of an IAP retrotransposon into the fourth intron of the *pofut1* gene [45]. Mice were maintained under this background by intercrossing Pofut1^{+/cax} animals. Pofut1^{+/+} and Pofut1^{cax/cax} mice were genotyped from genomic DNA by PCR as previously described [45]. All mice were bred and housed in the animal facility of Limoges University under controlled specific pathogen free conditions (21°C, 12 h light/12 h dark cycle, environmental enrichment) with free access to standard mouse chow and tap water.

4.2. Isolation of satellite cell-derived myoblasts

Primary cultures of myoblasts were obtained from mice of five weeks of age. SCDMs were isolated from skeletal

muscles of hind legs after enzymatic digestion by pronase, as previously described [64]. Cells were plated at a density of 15 000 cells cm⁻² on Matrigel[®]-coated Petri dishes (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) in Ham's F10 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) supplemented with 20% horse serum, 100 units ml⁻¹ penicillin and 100 μ g ml⁻¹ streptomycin. Cells were maintained for 48 h at 37°C and 5% CO₂ then washed with Ham's F10 before being placed in the GM, i.e. Ham's F10 supplemented with 5 ng ml⁻¹ basic fibroblast growth factor (bFGF, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), 20% heat-inactivated horse serum, 100 units ml⁻¹ penicillin and 100 μ g ml⁻¹ streptomycin. The myoblast population was enriched by eliminating fast-adherent fibroblasts using serial 30 min preplating procedures. To induce differentiation, SCDMs were incubated at 40–50% confluence in a DM consisting of Ham's F10 containing 10% heat-inactivated horse serum, 100 units ml⁻¹ penicillin and 100 μ g ml⁻¹ streptomycin. For estimation of MYOD and/or PAX7 expressing cell populations and for binding assays during the time course of differentiation, SCDMs were seeded at confluence and differentiation was induced four hours later. SCDM purity was determined by the proportion of cells expressing DESMIN (an intermediate filament protein located in proliferating skeletal myoblasts) compared with total cell number (DAPI+ cells).

4.3. Proliferation

SCDMs were seeded at 5000 cells per well in GM into 96-well plates and 20 μ l of MTS (Cell Titre 96 Aqueous Non-Radioactive cell proliferation assay; Promega Corp., Madison, WI) in a 200 μ l final volume were added at 0, 24, 48, 72 and 96 h. The plates were then incubated for 1 h at 37°C and absorbance of formazan, a product from the bioreduced MTS, was measured at 490 nm using an ELISA plate reader (FLUOstar Omega; BMGLabtech, Ortenberg, Germany). Six replicates were analysed at each time point and absorbance values of background (GM) were subtracted.

4.4. Cell culture and transient transfections of COS-7 cells

COS-7 cells (ATCC-CRL 1651) were maintained at 37°C in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 100 units ml⁻¹ penicillin and 100 μ g ml⁻¹ streptomycin. COS-7 cells were seeded in 100 mm tissue culture dishes and transfected at 75% confluence using 18 μ l of XtremeGene9 transfection reagent (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) with 6 μ g of each construct in serum-free DMEM supplemented with 1% penicillin/streptomycin. Supernatants were recovered by centrifugation at 96 h after transfection.

4.5. Ligand constructs

Dll1-AP and Jag1-AP were constructed by cloning the sequences encoding amino acids 1–540 of mouse DELTA-LIKE PROTEIN 1 (NP_031891.2) and amino acids 1–1067 of mouse JAGGED1 (NP_038850.1), respectively, in frame with human placental AP from pAPtag-2 (GenHunter Corp., Nashville, TN). Total cDNA from mouse tissues was used as a template for PCR to generate modified cDNA ends with

*Hind*III site in 5' and *Bgl*II or *Bam*HI site in 3'. After subcloning into pGEM-Teasy (Promega Corp.) and enzymatic digestion with appropriate restriction enzymes, purified fragments were directly cloned into pAPtag-2 using *Hind*III and *Bgl*II cloning sites to obtain the constructs referred to as pAPtag2-Dll1 and pAPtag2-Jag1. According to a previously described cloning technique [65], the pAPtag-2 was modified with prehybridized oligonucleotides encoding a signal peptide promoting secretion of recombinant Ctrl-AP. Eight prehybridized oligonucleotides encoding the same Ig κ -chain leader sequence as found in commercial pSecTag/FRT/V5-His-TOPO (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) were cloned between *Hind*III and *Bgl*II cloning sites downstream from the cytomegalovirus promoter in pAPtag-2. The plasmidic constructs were sequenced and were used to transiently transfect COS-7 cells.

4.6. RNA extraction, reverse transcription and gene expression analysis

Total RNA was extracted from SCDMs and hind limb skeletal muscles of five week old Pofut1^{+/+} and Pofut1^{cax/cax} mice using RNeasy mini kit (Qiagen, Inc., Hilden, Germany). Quality and quantity of total RNA were measured using an Agilent 2100 bioanalyzer (Santa Clara, CA) and a Nanodrop 1000 spectrophotometer (Wilmington, DE), respectively. The high capacity cDNA reverse transcription kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) was used to convert 2 μ g of total RNA into single-stranded cDNA. Semi-quantitative PCR was performed from 2 ng total cDNA in an ABI Prism 7900 Sequence Detector System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) using 40 cycles at 95°C for 15 s followed by 60°C for 1 min. Taqman[®] primers and probe sets used in this study were as follows: 18S (Hs99999901_s1), Gapdh (Mm99999915_g1), Cdkn1a (Mm00432448_m1), Pofut1 (Mm00475567_m1), Pax7 (Mm03053796_s1), MyoD1 (Mm00440387_m1), Myog (Mm00446194_m1), Myf5 (Mm00435125_m1), Hes1 (Mm00468601_m1), Hey1 (Mm00516555_m1), Hey1 (Mm00468865_m1) and Hes6 (Mm00517097_g1). As described previously [44], the $\Delta\Delta$ Ct method was used to quantify the relative abundance of each mRNA. RQ values, calculated only for a threshold cycle (Ct) lower than 37, reflected expression changes in the sample of interest compared with the calibrator sample, after normalization with 18S and Gapdh reference genes. Statistical analyses were performed by comparison of each differentiation time (from 48 to 240 h) relative to T0 for wild-type cells, which was set as 1. Expression of Pofut1 in different skeletal muscles (*Quadriceps*, *Gastrocnemius*, *Tibialis* and *Soleus*) from Pofut1^{cax/cax} mice was also studied, using wild-type muscles as a calibrator.

4.7. Protein extraction and western blot

Proteins were isolated from SCDMs with RIPA extraction buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.5% sodium deoxycholate, 1% NP-40, 0.1% SDS, pH 8) containing a protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science). Protein lysates were then centrifuged at 12 000g for 10 min at 4°C and soluble proteins from supernatants were quantified using a bicinchoninic acid protein assay (Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO) with bovine serum albumin (BSA) as a standard. Equal amounts of extracted proteins (30–100 μ g) were separated under denaturing and reducing conditions on SDS-

polyacrylamide gels (6–12%) and then transferred to a Hybond C-extra nitrocellulose membrane (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Then, membranes were blocked using 5% non-fat dried milk (w/v) in TBST (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20, pH 7.4) for 1 h at room temperature, followed by incubation overnight at 4°C with specific primary antibodies diluted in 2.5% non-fat dried milk (w/v) in TBST. The following primary antibodies were used for immunoblotting: 1:500 dilution of anti-Pofut1 purified antibody used in a previous study [44], 1:50 dilution of anti-Pax7 antibody (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, IA), 1:2000 dilution of anti-GAPDH (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN), 1:300 dilution of anti-cleaved NOTCH1 (Val1744; Cell Signaling Technology, Danvers, MA). After three washes in TBST, membranes were incubated for 1 h at room temperature with 1:1000 dilution of secondary HRP conjugate antibodies (Dako, Glostrup, Denmark) in 2.5% non-fat dried milk (w/v) in TBST. After three more washes in TBST, immunoblots were developed using BM Chemiluminescence western blotting substrate (peroxidase, POD; Roche Applied Science) and exposed (Hyperfilm ECL, GE Healthcare). For relative quantification, analysis of band intensities was carried out using IMAGEJ software (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

4.8. Production, quantification and characterization of recombinant proteins

Recombinant proteins (Ctrl-AP, Dll1-AP and Jag1-AP) from harvested supernatants of transfected COS-7 cells were directly used for binding assays or concentrated 25- to 30-fold by ultrafiltration in binding buffer HBAH (Hanks' balanced salt solution, 0.5 mg ml⁻¹ BSA, 0.1% sodium azide, 20 mM Hepes, pH 7). To estimate protein quantities, we quantified the enzymatic activity of AP by measuring the absorbance of para-nitrophenylphosphate, whose dephosphorylation led to a coloured product, according to recommendations of GenHunter (GenHunter Corp., Nashville, TN). The integrity of concentrated fusion protein and Ctrl-AP was checked by western blot using a 1:1000 dilution of anti-AP antibody (GenHunter Corp.). For AP assay, 120 μ l pure or diluted protein samples were added to 120 μ l of 2X AP reagent (2 M diethanolamine, 1 mM MgCl₂, 1 mg ml⁻¹ BSA, 24 mM *p*-nitrophenylphosphate, pH 9.8). After mixing and incubation at 37°C for 10 min, the reaction was stopped by addition of 240 μ l 0.5 N NaOH. The reaction was done in duplicate, and the absorbance was read at 405 nm.

4.9. Biotinylation of cell surface proteins and Notch detection

Pofut1^{+/+} and Pofut1^{cax/cax} SCDMs were plated in 100 mm tissue culture dishes, collected 2 days later with a cell scraper and washed three times with PBS (pH 8). For each of the cell lines, 7 \times 10⁶ cells were incubated in 600 μ l PBS (as a control) or PBS containing 1.66 mM EZ-link sulfo-*N*-hydroxysuccinimide-biotin (sulfo-NHS-biotin; Pierce Chemical Company, Rockford, IL) at 4°C for 45 min. The biotinylation reagent was then removed by centrifugation, and cells were washed three times with 1 ml of 100 mM glycine-PBS (pH 8) for 5 min to quench the biotinylation reaction. After cell lysis for 45 min at 4°C in 50 μ l RIPA buffer, supernatants were

recovered by centrifugation (12 000g for 10 min) at 4°C, and 400 µg soluble total proteins (input) were incubated overnight at 4°C with 50 µl avidin agarose (Pierce Chemical Company) previously equilibrated with RIPA buffer. Unretained proteins were recovered by centrifugation at 200g for 5 min, and avidin agarose was washed three times with diluted RIPA buffer for 20 min at 4°C. Retained biotinylated proteins were eluted from the Pierce avidin agarose by boiling for 5 min in the presence of 40 µl SDS-PAGE sample Laemmli buffer under reducing conditions. Amounts of loaded proteins were 25 µg for samples corresponding to input and unretained proteins. For eluted proteins, 15 µl supernatant from boiled avidin agarose was loaded. All samples were subjected to SDS-PAGE using 6% or 12% running gels and then transferred to Immobilon-P[®] PVDF membranes (Bio-Rad, CA). After membrane blocking as previously described, a 1:500 dilution of an anti-NOTCH1 antibody (H-131) raised against amino acids 20–150 within the extracellular domain of human NOTCH1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) was used to detect NOTCH1 at the SCDM cell surface. A 1:500 dilution of anti-pan-cadherin (Sigma-Aldrich Corp.) antibody was used to control the correct separation of membrane proteins. Anti-GAPDH (1:2000) was used to control that cytosolic proteins such as GAPDH were not biotinylated unlike membrane proteins at the cell surface.

4.10. Binding assays

Binding assays were performed either with adherent cells seeded at confluence in 12-well plates or with suspension cells placed in microcentrifuge tubes, as previously described [66]. About 500 000 adherent cells per well from Pofut1^{+/+} and Pofut1^{cax/cax} SCDMs were washed once with 2.5 ml HBAH and incubated at room temperature for 90 min with 500 µl crude supernatants from transfected COS-7 cells containing either Dll1-AP, Jag1-AP or Ctrl-AP at the same concentrations. The quantities of Dll1-AP, Jag1-AP and Ctrl-AP were normalized based on their AP activity. After gentle shaking every 30 min, cells were washed for 5 min six times with 2.5 ml HBAH. Cells were then lysed in two steps with a total volume of 200 µl TT buffer (10 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100, pH 8), and lysates were centrifuged at 16 000g for 5 min. After heat inactivation of cell lysates in a 65°C water bath for 10 min and then incubation on ice for 15 min, we performed AP assay as described above to evaluate specific binding of the fusion proteins, considering Ctrl-AP as a negative control.

Owing to low amount of protein for Jag1-AP in medium from transfected COS7 cells compared with that for Dll1-AP and undetectable binding of Jag1-AP to adherent cells with crude supernatants, we performed binding assays with concentrated proteins from supernatants. Suspension cells were thus used instead of adherent cells to avoid important cell detachment that we had observed when using concentrated supernatants. The same protocol as above was performed with 200 000 suspension cells, previously washed with HBAH and incubated in the presence of 100 µl of concentrated supernatants for Ctrl-AP, Dll1-AP and Jag1-AP assayed at the same concentrations ($40 < A^{405nm} < 160$), based on the AP assay. Washes were performed six times for 5 min with 500 µl HBAH at a low speed spin for 1 min at 2000g in a microcentrifuge. Cells were then lysed in 75 µl

TT buffer and centrifuged at 16 000g for 5 min prior to heat inactivation and AP assay.

4.11. Immunofluorescent staining of tissue sections and cells

Dissected skeletal muscles (*Quadriceps*, *Gastrocnemius*, *Tibialis* and *Soleus*) from six Pofut1^{+/+} and Pofut1^{cax/cax} mice at three different ages (5, 12 and 24 weeks) were frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane and stored at -80°C before being sectioned. Cryosections (10 µm) were thawed at room temperature and air-dried. Cryosections and SCDMs in primary cultures from Pofut1^{+/+} and Pofut1^{cax/cax} mice were fixed for at least 15 min with 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS and washed three times in PBS. Only cells were permeabilized for 30 min at 4°C with a buffer pH 7.4 containing 20 mM HEPES, 300 mM sucrose, 50 mM NaCl, 3 mM MgCl₂ and 0.5% Triton X-100. Both cryosections and cells were blocked for 1 h at room temperature in two blocking buffers (BBs): BB1 (10% goat serum, 1% BSA and 0.1% Triton X-100 in PBS) and BB2 (5% fetal calf serum, 2% BSA and 0.2% Triton X-100 in PBS). Then, they were washed with 0.2% BSA in PBS and incubated with primary antibodies diluted in PBS with 1% BSA for 1 h at 37°C. After three washes with PBS, 0.2% BSA, 0.1% Tween-20, slides were incubated for 15 min at 37°C with fluorescent conjugated secondary antibodies diluted 1:1000 in PBS 1% BSA as follows: Alexa Fluor[®] 488 goat anti-mouse IgG (H+L) (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) for anti-MyHC (1:2000; Sigma-Aldrich Corp.) and anti-PAX7 (1:500; Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, IA), Alexa Fluor[®] 488 rabbit anti-goat IgG (H+L) (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) for anti-DESMIN (1:100; Santa Cruz Biotechnology) or Alexa Fluor[®] 546 F(ab')₂ fragment of goat anti-rabbit IgG (H+L) (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) for anti-LAMININ (1:500; Sigma-Aldrich Corp.) and anti-MyoD (1:1000; Santa Cruz Biotechnology). Staining was completed with three PBS washes and incubation for 5 min at room temperature in 1 µg ml⁻¹ DAPI solution to label cell nuclei. Cells and cryosections were rinsed five times with PBS, mounted with Mowiol 4–88 mounting medium and sealed with glass coverslips.

For cryosections, data were analysed from 12 randomly chosen fields in each of 12 cryosections per muscle for each animal (six mice per genotype and per age) by using an epifluorescence microscope (Leica DMI4000B MM AF Imaging System) powered by MetaMorph (Universal Imaging Corp., Downingtown, PA) equipped with a 40× objective. Triple immunostaining (LAMININ/DAPI/PAX7) revealed the myofibre surface area (LAMININ⁺), all myonuclei (DAPI⁺) and specifically satellite cells (PAX7⁺) located peripherally. Mean fluorescence intensity of captured images was analysed by IMAGEJ. We converted each image into a binary one, then collected the pixel values (one pixel on IMAGEJ = 0.47 µm² on Metamorph) and calculated the total area of each field in µm². By manual counting, we determined the total number of myofibres, myonuclei and satellite cells on cross-sectional field. The mean myofibre area was obtained by dividing the total area of the field (µm²) by total number of myofibres. Then, the number of nuclei per myofibre was calculated as well as the number of Pax7⁺ satellite cells per myofibre, as recently published cryosection analyses [67].

For fusion indexes of SCDMs, data were analysed from 12 randomly chosen fields per well in duplicate for three

independent experiments ($n = 3$). Images for fusion indexes were obtained by the same method as described above. Fusion index was calculated by dividing the number of myonuclei (DAPI+) contained in MyHC-expressing myotubes by the total number of myonuclei. To count the different cell populations expressing PAX7 and/or MYOD in Pofut1^{+/+} and Pofut1^{cax/cax} SCDMs, data were analysed from 12 randomly chosen fields per well in triplicate ($n = 3$).

4.12. Statistical analysis

All experiments were performed in biological triplicates and results are reported as the means \pm s.e.m. Statistical comparisons were performed using two-tailed *t*-tests implemented in PRISM, v. 5.03 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). A *p*-value of 0.05 or less was considered statistically significant.

Ethics. All of the experimental procedures were carried out in accordance with the recommendation in the guidelines of the European

Communities Council (Directive 2010/63/UE). Experiments were approved by the Committee of Ethics on Animal Experiments of the authors' institution, 'Comité Régional d'Éthique de l'Expérimentation Animale' of the Limousin region (no. 13-2014-13).

Authors' contributions. S.L., V.B. and A.M. conceived and designed the experiments. B.A.J., K.H., F.P., A.S. and S.L. performed the experiments. B.A.J. and S.L. drafted the manuscript. L.M., A.G., V.B. and A.M. critically revised the manuscript. All the authors have corrected and approved the manuscript for publication.

Competing interests. We declare we have no competing interests.

Funding. This work was supported by Lebanese Association for Scientific Research (LASER) to Bilal Al Jaam and was co-financed by the European Union (FEDER) and by the Limousin Regional Council.

Acknowledgements. We gratefully acknowledge Prof. Dr Achim Gossler for providing us with Pofut1^{cax/cax} mice. We also thank Karine Pasquier, from the animal facility (SCA), for her technical help with animals and Dr Jeanne Cook-Moreau for her careful work on the English editing of the manuscript. The Pax7 antibody developed by Atsushi Kawakami was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the NICHD and maintained by The University of Iowa, Department of Biology, Iowa City, IA 52242.

References

- Mauro A. 1961 Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9**, 493–495. (doi:10.1083/jcb.9.2.493)
- Charge SB, Rudnicki MA. 2004 Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol. Rev.* **84**, 209–238. (doi:10.1152/physrev.00019.2003)
- Kuang S, Kuroda K, Le Grand F, Rudnicki MA. 2007 Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell* **129**, 999–1010. (doi:10.1016/j.cell.2007.03.044)
- Cheung TH, Rando TA. 2013 Molecular regulation of stem cell quiescence. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 329–340. (doi:10.1038/nrm3591)
- Almeida CF, Fernandes SA, Ribeiro Junior AF, Keith Okamoto O, Vainzof M. 2016 Muscle satellite cells: exploring the basic biology to rule them. *Stem Cells Int.* **2016**, 1078686. (doi:10.1155/2016/1078686)
- Chiakulas JJ, Pauly JE. 1965 A study of postnatal growth of skeletal muscle in the rat. *Anat. Rec.* **152**, 55–61. (doi:10.1002/ar.1091520107)
- Timson BF. 1982 The effect of varying postnatal growth rate on skeletal muscle fiber number in the mouse. *Growth* **46**, 36–45.
- White RB, Bierinx AS, Gnocchi VF, Zammit PS. 2010 Dynamics of muscle fibre growth during postnatal mouse development. *BMC Dev. Biol.* **10**, 21. (doi:10.1186/1471-213X-10-21)
- Yin H, Price F, Rudnicki MA. 2013 Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol. Rev.* **93**, 23–67. (doi:10.1152/physrev.00043.2011)
- Ciciliot S, Schiaffino S. 2010 Regeneration of mammalian skeletal muscle. Basic mechanisms and clinical implications. *Curr. Pharm. Des.* **16**, 906–914. (doi:10.2174/138161210790883453)
- Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, Blaauw B, Sandri M. 2013 Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J.* **280**, 4294–4314. (doi:10.1111/febs.12253)
- Moss FP, Leblond CP. 1971 Satellite cells as the source of nuclei in muscles of growing rats. *Anat. Rec.* **170**, 421–435. (doi:10.1002/ar.1091700405)
- Schultz E, Gibson MC, Champion T. 1978 Satellite cells are mitotically quiescent in mature mouse muscle: an EM and radioautographic study. *J. Exp. Zool.* **206**, 451–456. (doi:10.1002/jez.1402060314)
- Guruharsha KG, Kankel MW, Artavanis-Tsakonas S. 2012 The Notch signalling system: recent insights into the complexity of a conserved pathway. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 654–666. (doi:10.1038/nrg3272)
- Mourikis P, Tajbakhsh S. 2014 Distinct contextual roles for Notch signalling in skeletal muscle stem cells. *BMC Dev. Biol.* **14**, 2. (doi:10.1186/1471-213X-14-2)
- Conlon RA, Reaume AG, Rossant J. 1995 Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites. *Development* **121**, 1533–1545.
- Swiatek PJ, Lindsell CE, del Amo FF, Weinmaster G, Gridley T. 1994 Notch1 is essential for postimplantation development in mice. *Genes Dev.* **8**, 707–719. (doi:10.1101/gad.8.6.707)
- Oka C *et al.* 1995 Disruption of the mouse RBP-J kappa gene results in early embryonic death. *Development* **121**, 3291–3301.
- Shi S, Stanley P. 2003 Protein O-fucosyltransferase 1 is an essential component of Notch signaling pathways. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100**, 5234–5239. (doi:10.1073/pnas.0831126100)
- Vasyutina E, Lenhard DC, Wende H, Erdmann B, Epstein JA, Birchmeier C. 2007 RBP-J (Rbbsuh) is essential to maintain muscle progenitor cells and to generate satellite cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **104**, 4443–4448. (doi:10.1073/pnas.0610647104)
- Schuster-Gossler K, Cordes R, Gossler A. 2007 Premature myogenic differentiation and depletion of progenitor cells cause severe muscle hypotrophy in Delta1 mutants. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **104**, 537–542. (doi:10.1073/pnas.0608281104)
- Mumm JS, Kopan R. 2000 Notch signaling: from the outside in. *Dev. Biol.* **228**, 151–165. (doi:10.1006/dbio.2000.9960)
- Wu L, Sun T, Kobayashi K, Gao P, Griffin JD. 2002 Identification of a family of Mastermind-like transcriptional coactivators for mammalian Notch receptors. *Mol. Cell Biol.* **22**, 7688–7700. (doi:10.1128/MCB.22.21.7688-7700.2002)
- Kopan R, Ilagan MX. 2009 The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* **137**, 216–233. (doi:10.1016/j.cell.2009.03.045)
- Kadesch T. 2004 Notch signaling: the demise of elegant simplicity. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **14**, 506–512. (doi:10.1016/j.gde.2004.07.007)
- Kuroda K, Tani S, Tamura K, Minoguchi S, Kurooka H, Honjo T. 1999 Delta-induced Notch signaling mediated by RBP-J inhibits MyoD expression and myogenesis. *J. Biol. Chem.* **274**, 7238–7244. (doi:10.1074/jbc.274.11.7238)
- Aurade F, Pinset C, Chafey P, Gros F, Montarras D. 1994 Myf5, MyoD, myogenin and MRF4 myogenic derivatives of the embryonic mesenchymal cell line C3H10T1/2 exhibit the same adult muscle phenotype. *Differentiation* **55**, 185–192. (doi:10.1046/j.1432-0436.1994.5530185.x)
- Zammit PS, Relaix F, Nagata Y, Ruiz AP, Collins CA, Partridge TA, Beauchamp JR. 2006 Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells. *J. Cell Sci.* **119**, 1824–1832. (doi:10.1242/jcs.02908)
- Andres V, Walsh K. 1996 Myogenin expression, cell cycle withdrawal, and phenotypic differentiation are temporally separable events that precede cell fusion upon myogenesis. *J. Cell Biol.* **132**, 657–666. (doi:10.1083/jcb.132.4.657)

30. Wen Y, Bi P, Liu W, Asakura A, Keller C, Kuang S. 2012 Constitutive Notch activation upregulates Pax7 and promotes the self-renewal of skeletal muscle satellite cells. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 2300–2311. (doi:10.1128/MCB.06753-11)
31. Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, Rudnicki MA. 2000 Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* **102**, 777–786. (doi:10.1016/S0092-8674(00)00666-0)
32. Wang Y, Shao L, Shi S, Harris RJ, Spellman MW, Stanley P, Haltiwanger RS. 2001 Modification of epidermal growth factor-like repeats with O-fucose. Molecular cloning and expression of a novel GDP-fucose protein O-fucosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **276**, 40 338–40 345. (doi:10.1074/jbc.M107849200)
33. Loril C, Audfray A, Dupuy F, Germot A, Maftah A. 2007 The two N-glycans present on bovine Pofut1 are differently involved in its solubility and activity. *FEBS J.* **274**, 1202–1211. (doi:10.1111/j.1742-4658.2007.05663.x)
34. Rampal R, Luther KB, Haltiwanger RS. 2007 Notch signaling in normal and disease states: possible therapies related to glycosylation. *Curr. Mol. Med.* **7**, 427–445. (doi:10.2174/156652407780831593)
35. Stanley P. 2007 Regulation of Notch signaling by glycosylation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **17**, 530–535. (doi:10.1016/j.sbi.2007.09.007)
36. Rampal R, Arboleda-Velasquez JF, Nita-Lazar A, Kosik KS, Haltiwanger RS. 2005 Highly conserved O-fucose sites have distinct effects on Notch1 function. *J. Biol. Chem.* **280**, 32 133–32 140. (doi:10.1074/jbc.M506104200)
37. Ge C, Stanley P. 2008 The O-fucose glycan in the ligand-binding domain of Notch1 regulates embryogenesis and T cell development. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **105**, 1539–1544. (doi:10.1073/pnas.0702846105)
38. Muller J, Rana NA, Serth K, Kakuda S, Haltiwanger RS, Gossler A. 2014 O-Fucosylation of the Notch ligand mDLL1 by POFUT1 is dispensable for ligand function. *PLoS ONE* **9**, e88571. (doi:10.1371/journal.pone.0088571)
39. Stahl M, Uemura K, Ge C, Shi S, Tashima Y, Stanley P. 2008 Roles of Pofut1 and O-fucose in mammalian Notch signaling. *J. Biol. Chem.* **283**, 13 638–13 651. (doi:10.1074/jbc.M802027200)
40. Haltiwanger RS, Stanley P. 2002 Modulation of receptor signaling by glycosylation: fringe is an O-fucose-beta1,3-N-acetylglucosaminyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta* **1573**, 328–335. (doi:10.1016/S0304-4165(02)00400-2)
41. Chen J, Moloney DJ, Stanley P. 2001 Fringe modulation of Jagged1-induced Notch signaling requires the action of beta 4galactosyltransferase-1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**, 13 716–13 721. (doi:10.1073/pnas.241398098)
42. Hou X, Tashima Y, Stanley P. 2012 Galactose differentially modulates Lunatic and Manic Fringe effects on Delta1-induced NOTCH signaling. *J. Biol. Chem.* **287**, 474–483. (doi:10.1074/jbc.M111.317578)
43. Takeuchi H, Haltiwanger RS. 2014 Significance of glycosylation in Notch signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **453**, 235–242. (doi:10.1016/j.bbrc.2014.05.115)
44. Der Vartanian A, Audfray A, Al Jaam B, Janot M, Legardinier S, Maftah A, Germot A. 2015 Protein O-fucosyltransferase 1 expression impacts myogenic C2C12 cell commitment via the Notch signaling pathway. *Mol. Cell Biol.* **35**, 391–405. (doi:10.1128/MCB.00890-14)
45. Schuster-Gossler K, Harris B, Johnson KR, Serth J, Gossler A. 2009 Notch signalling in the paraxial mesoderm is most sensitive to reduced Pofut1 levels during early mouse development. *BMC Dev. Biol.* **9**, 6. (doi:10.1186/1471-213X-9-6)
46. Halevy O, Novitsch BG, Spicer DB, Skapek SX, Rhee J, Hannon GJ, Beach D, Lassar AB. 1995 Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD. *Science* **267**, 1018–1021. (doi:10.1126/science.7863327)
47. Yang LT, Nichols JT, Yao C, Manilay JO, Robey EA, Weinmaster G. 2005 Fringe glycosyltransferases differentially modulate Notch1 proteolysis induced by Delta1 and Jagged1. *Mol. Biol. Cell* **16**, 927–942. (doi:10.1091/mbc.E04-07-0614)
48. Bruckner K, Perez L, Clausen H, Cohen S. 2000 Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch–Delta interactions. *Nature* **406**, 411–415. (doi:10.1038/35019075)
49. Katoh M. 2007 Integrative genomic analyses on HES/HEY family: Notch-independent HES1, HES3 transcription in undifferentiated ES cells, and Notch-dependent HES1, HES5, HEY1, HEY2, HEYL transcription in fetal tissues, adult tissues, or cancer. *Int. J. Oncol.* **31**, 461–466. (doi:10.3892/ijo.31.2.461)
50. Fior R, Henrique D. 2005 A novel hes5/hes6 circuitry of negative regulation controls Notch activity during neurogenesis. *Dev. Biol.* **281**, 318–333. (doi:10.1016/j.ydbio.2005.03.017)
51. Ontell M, Feng KC, Klueber K, Dunn RF, Taylor F. 1984 Myosatellite cells, growth, and regeneration in murine dystrophic muscle: a quantitative study. *Anat. Rec.* **208**, 159–174. (doi:10.1002/ar.1092080203)
52. Relaix F, Rocancourt D, Mansouri A, Buckingham M. 2005 A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature* **435**, 948–953. (doi:10.1038/nature03594)
53. Lepper C, Fan CM. 2010 Inducible lineage tracing of Pax7-descendant cells reveals embryonic origin of adult satellite cells. *Genesis* **48**, 424–436. (doi:10.1002/dvg.20630)
54. Kassar-Duchossoy L, Giaccone E, Gayraud-Morel B, Jory A, Gomes D, Tajbakhsh S. 2005 Pax3/Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development. *Genes Dev.* **19**, 1426–1431. (doi:10.1101/gad.345505)
55. Bermudez Brito M, Goulielmaki E, Papakonstanti EA. 2015 Focus on PTEN regulation. *Front. Oncol.* **5**, 166. (doi:10.3389/fonc.2015.00166)
56. Palomero T *et al.* 2007 Mutational loss of PTEN induces resistance to NOTCH1 inhibition in T-cell leukemia. *Nat. Med.* **13**, 1203–1210. (doi:10.1038/nm1636)
57. Chappell WH, Green TD, Spengeman JD, McCubrey JA, Akula SM, Bertrand FE. 2005 Increased protein expression of the PTEN tumor suppressor in the presence of constitutively active Notch-1. *Cell Cycle* **4**, 1389–1395. (doi:10.4161/cc.4.10.2028)
58. Whelan JT, Forbes SL, Bertrand FE. 2007 CBF-1 (RBP-J kappa) binds to the PTEN promoter and regulates PTEN gene expression. *Cell Cycle* **6**, 80–84. (doi:10.4161/cc.6.1.3648)
59. Rodriguez J, Vernus B, Chelh I, Cassar-Malek I, Gabillard JC, Hadj Sassi A, Seiliez I, Picard B, Bonnieu A. 2014 Myostatin and the skeletal muscle atrophy and hypertrophy signaling pathways. *Cell Mol. Life Sci.* **71**, 4361–4371. (doi:10.1007/s00018-014-1689-x)
60. Okajima T, Xu A, Lei L, Irvine KD. 2005 Chaperone activity of protein O-fucosyltransferase 1 promotes Notch receptor folding. *Science* **307**, 1599–1603. (doi:10.1126/science.1108995)
61. Rana NA, Haltiwanger RS. 2011 Fringe benefits: functional and structural impacts of O-glycosylation on the extracellular domain of Notch receptors. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **21**, 583–589. (doi:10.1016/j.sbi.2011.08.008)
62. Harvey BM, Rana NA, Moss H, Leonardi J, Jafar-Nejad H, Haltiwanger RS. 2016 Mapping sites of O-glycosylation and fringe elongation on *Drosophila* Notch. *J. Biol. Chem.* **291**, 16348. (doi:10.1074/jbc.M116.732537)
63. Haltiwanger RS, Lowe JB. 2004 Role of glycosylation in development. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 491–537. (doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303.074043)
64. Brun C, Perie L, Baraie F, Vernus B, Bonnieu A, Blanquet V. 2014 Absence of hyperplasia in Gasp-1 overexpressing mice is dependent on myostatin up-regulation. *Cell Physiol. Biochem.* **34**, 1241–1259. (doi:10.1159/000366335)
65. Legardinier S, Klett D, Poirier JC, Combarnous Y, Cahoreau C. 2005 Mammalian-like nonsialyl complex-type N-glycosylation of equine gonadotropins in Mimic insect cells. *Glycobiology* **15**, 776–790. (doi:10.1093/glycob/cwi060)
66. Flanagan JG, Cheng HJ. 2000 Alkaline phosphatase fusion proteins for molecular characterization and cloning of receptors and their ligands. *Methods Enzymol.* **327**, 198–210. (doi:10.1016/S0076-6879(00)27277-7)
67. Fry CS *et al.* 2015 Inducible depletion of satellite cells in adult, sedentary mice impairs muscle regenerative capacity without affecting sarcopenia. *Nat. Med.* **21**, 76–80. (doi:10.1038/nm.3710)

SUPPLEMENTARY DATA

		<i>Quadriceps</i>	<i>Gastrocnemius</i>	<i>Tibialis</i>	<i>Soleus</i>	
Muscle weight/Body weight ratios (%)	+/+	1.11 ± 0.06	0.79 ± 0.03	0.33 ± 0.02	0.14 ± 0.01	5 weeks
	cax/cax	1.35 ± 0.03**	1.08 ± 0.06**	0.53 ± 0.04*	0.30 ± 0.02*	
	+/+	1.06 ± 0.04	1.10 ± 0.04	0.29 ± 0.01	0.15 ± 0.01	12 weeks
	cax/cax	1.31 ± 0.06 **	1.48 ± 0.04 **	0.43 ± 0.03 *	0.29 ± 0.01 *	
	+/+	0.98 ± 0.07	0.75 ± 0.03	0.26 ± 0.01	0.15 ± 0.00	24 weeks
	cax/cax	1.30 ± 0.03 **	1.01 ± 0.03 **	0.43 ± 0.03 *	0.27 ± 0.01 *	
Myofibre mean area (x10 ³ µm ²)	+/+	2.06 ± 0.12	1.61 ± 0.11	1.88 ± 0.13	1.48 ± 0.11	5 weeks
	cax/cax	2.69 ± 0.14**	2.09 ± 0.04**	2.72 ± 0.10 ***	1.98 ± 0.08**	
	+/+	2.56 ± 0.08	2.57 ± 0.09	2.03 ± 0.08	1.77 ± 0.03	12 weeks
	cax/cax	3.34 ± 0.09 **	3.19 ± 0.04 **	2.83 ± 0.02 ***	2.95 ± 0.06 ***	
	+/+	2.86 ± 0.08	2.48 ± 0.06	2.01 ± 0.06	1.81 ± 0.11	24 weeks
	cax/cax	3.80 ± 0.15 **	3.11 ± 0.10 **	2.84 ± 0.17 *	2.55 ± 0.11 **	
Nuclei/Myofibre	+/+	3.03 ± 0.19	2.03 ± 0.43	2.79 ± 0.18	2.73 ± 0.25	5 weeks
	cax/cax	4.10 ± 0.22**	3.20 ± 0.20**	4.32 ± 0.21**	3.91 ± 0.14**	
	+/+	2.72 ± 0.06	2.98 ± 0.10	3.51 ± 0.18	2.69 ± 0.09	12 weeks
	cax/cax	3.90 ± 0.25 **	4.55 ± 0.04 **	4.88 ± 0.12 **	5.26 ± 0.26 ***	
	+/+	2.52 ± 0.06	1.08 ± 0.15	2.30 ± 0.06	3.04 ± 0.20	24 weeks
	cax/cax	3.67 ± 0.10 **	1.96 ± 0.16 **	3.41 ± 0.06 **	4.34 ± 0.11 **	
Myofibres/Field	+/+	234.14 ± 10.97	301.50 ± 11.25	296.56 ± 11.64	384.55 ± 10.16	5 weeks
	cax/cax	231.48 ± 15.27	293.83 ± 8.86	281.25 ± 11.59	356.05 ± 13.48	
	+/+	174.46 ± 7.39	191.86 ± 7.57	205.63 ± 17.45	233.07 ± 24.29	12 weeks
	cax/cax	177.06 ± 7.24	206.89 ± 20.22	212.37 ± 4.90	243.49 ± 21.93	
	+/+	167.64 ± 10.86	211.93 ± 8.46	195.03 ± 2.55	229.75 ± 14.46	24 weeks
	cax/cax	158.23 ± 6.70	218.06 ± 20.71	209.21 ± 9.46	223.29 ± 09.21	
Satellite Cells/Myofibre	+/+	0.068 ± 0.004	0.042 ± 0.004	0.033 ± 0.002	0.029 ± 0.002	5 weeks
	cax/cax	0.031 ± 0.002***	0.025 ± 0.003**	0.020 ± 0.001**	0.019 ± 0.002 **	
	+/+	0.054 ± 0.008	0.068 ± 0.002	0.046 ± 0.002	0.021 ± 0.002	12 weeks
	cax/cax	0.016 ± 0.002 ***	0.009 ± 0.001 ***	0.009 ± 0.005 **	0.005 ± 0.001 **	
	+/+	0.063 ± 0.02	0.034 ± 0.01	0.052 ± 0.002	0.031 ± 0.01	24 weeks
	cax/cax	0.015 ± 0.004 *	0.023 ± 0.009	0.023 ± 0.001 ***	0.004 ± 0.002 *	

Table S1. Characteristics of skeletal muscles from 5, 12 and 24 week old Pofut1^{+/+} and Pofut1^{cax/cax} mice. In addition to muscle weight/body weight ratios, myofibre mean area, number of nuclei per myofibre, number of myofibres per field and number of satellite cells per myofibre were determined for skeletal muscles with fast-twitch (*Tibialis*), slow-twitch (*Soleus*) or mixed (*Quadriceps*, *Gastrocnemius*) myofibres. Mean ± SEM are shown (t-test two-tailed, with a significance level of *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001).



DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Discussion générale et perspectives

La mutation *cax* (ou *Pofut1^{cax}*) entraîne une diminution de l'expression du gène *Pofut1*.

Les embryons KO pour *Pofut1*, à l'image des KO des effecteurs de la voie de signalisation Notch comme le répresseur transcriptionnel *Rbp-Jk*, présentent des défauts importants dans plusieurs processus développementaux tels que la somitogenèse, la cardiogenèse, la vasculogenèse et la neurogenèse (Shi and Stanley 2003), qui aboutissent à une létalité précoce en milieu de gestation. Ceci souligne bien l'importance et le caractère ubiquitaire de POFUT1, dont certaines glycoprotéines cibles telles que le récepteur NOTCH jouent un rôle essentiel au moment de l'embryogenèse. Les embryons de souris, homozygotes pour la mutation hypomorphe *Pofut1^{cax}*, arrivent à terme mais présentent souvent un raccourcissement du squelette axial et de nombreuses déformations squelettiques (Schuster-Gossler, Harris et al. 2009). Ceci implique que le niveau d'expression de *Pofut1* chez ces souris *Pofut1^{cax/cax}* est suffisant pour éviter la létalité mais insuffisant pour assurer une somitogenèse normale. Les défauts de somitogenèse, en relation avec la réduction de la signalisation Notch dépendante de POFUT1, se traduisent majoritairement par des déformations de la colonne vertébrale (paires de vertèbres asymétriques ou hémivertèbres) et de la queue (courte, tordue) et dans une moindre mesure par la présence de côtes divisées ou fusionnées.

La mutation *Pofut1^{cax}* consiste en l'insertion d'un élément rétrotransposable de type IAP dans l'intron 4 du gène *Pofut1*. Elle constitue un allèle hypomorphe puisque la quantité de transcrit sauvage conduisant à une protéine fonctionnelle diminue. La structure et donc la fonction de la protéine POFUT1 est ainsi préservée mais sa quantité est réduite. Le gène *Pofut1* est formé de 7 exons et son transcrit primaire est épissé constitutivement chez les souris C3H sauvages en un transcrit sauvage majoritaire de 1182 bases, qui code une protéine mature de 393 résidus d'acides aminés (**Annexe 1**). Cependant, d'autres transcrits plus courts (au nombre de 6 voire 7 possibles) peuvent être détectés à la suite d'un épissage alternatif chez les souris sauvages. Nous avons confirmé les résultats obtenus lors de la thèse de Katy Heu, à savoir que la présence de l'élément IAP génère un nouvel épissage

alternatif, conduisant à l'apparition d'un transcrit de 876 bases (appelé TAcax1), qui n'a jamais été détecté chez les souris sauvages (**Annexe 1**). Nous avons détecté ce nouveau transcrit aussi bien dans le pool d'ARN totaux préparés à partir des muscles squelettiques des souris *Pofut1*^{cax/cax} que dans celui provenant des cultures primaires de MDCS *Pofut1*^{cax/cax}. Le transcrit TAcax1 ne comporte pas les exons 4 et 5 et code une protéine tronquée *a priori* non fonctionnelle puisqu'il lui manquerait le résidu Arg245 du site catalytique (Lira-Navarrete, Valero-Gonzalez et al. 2011) et le *N*-glycane porté par le résidu Asn165, nécessaire à l'activité de POFUT1 (Loriol, Audfray et al. 2007). Il faut noter, que dans la thèse de Katy Heu, un deuxième transcrit appelé TAcax2 de 693 bases, auquel il manque les exons 3 à 5, a été identifié chez les souris *Pofut1*^{cax/cax} mais nous l'avons détecté également chez les souris sauvages (**Annexe 1**).

La diminution de la quantité de protéine POFUT1 fonctionnelle chez les souris *Pofut1*^{cax/cax} est donc liée à l'existence d'un épissage alternatif, qui défavorise l'épissage constitutif et entraîne une diminution de la quantité de transcrit sauvage par rapport à la quantité de transcrits alternatifs.

La diminution d'expression de POFUT1 entraîne une diminution de la *O*-fucosylation des récepteurs NOTCH, conduisant ainsi à une moindre activation de la voie de signalisation Notch.

Les niveaux d'expression du gène *Pofut1* et donc de la protéine correspondante agissent sur le nombre de sites *O*-fucosylés des parties extracellulaires des récepteurs NOTCH et potentiellement de leurs ligands. Cependant, plusieurs études montrent que les interactions récepteur-ligand, nécessaires à l'activation de la voie canonique de Notch, sont modulées par la *O*-fucosylation des répétitions EGF-like du domaine extracellulaire (NECD) des récepteurs NOTCH (Stahl, Uemura et al. 2008) et non de leurs ligands (Muller, Rana et al. 2014). Dans nos études, nous avons prouvé que la sous-expression de *Pofut1* induisait une moindre interaction des récepteurs NOTCH avec le ligand DLL1, donnant lieu à une diminution de l'activation de Notch, comme le révèlent la quantité de NICD clivé et les niveaux d'expression de gènes cibles de Notch tels que *Hes1*, *Hey1* et *Hey1*. Que ce soit dans les cellules C2C12 sous-exprimant de manière stable le gène *Pofut1* (C2C12 Po-) (Der Vartanian, Audfray et al. 2015) ou les myoblastes dérivés de cellules satellites (MDCS) isolés

à partir de muscles squelettiques des souris *cax* (*Pofut1*^{*cax/cax*} MDCS) (Al Jaam, Heu et al. 2016), le rôle chaperon de POFUT1 n'est pas avéré puisque nous avons montré que la quantité de récepteurs NOTCH1 exprimés à la surface de ces cellules n'est pas modifiée. Ces résultats contrastent avec ce qui a été observé chez la drosophile (Sasamura, Ishikawa et al. 2007) et nous permettent d'affirmer que la diminution d'activation de la signalisation Notch observée dans nos modèles cellulaires est bien due à une diminution globale de la *O*-fucosylation des récepteurs NOTCH exprimés à la surface des cellules réceptrices. Le rôle chaperon de POFUT1 ne semblerait donc pas applicable à l'espèce murine. Les déterminants moléculaires de l'activité chaperon de l'enzyme de drosophile, comparativement à la souris, restent inconnus à ce jour.

Même s'il est pertinent de penser que la quantité de sites *O*-fucosylés est effectivement diminuée dans le cas où POFUT1 vient à manquer, nous ne l'avons néanmoins pas démontré directement pour les récepteurs NOTCH. Néanmoins, après un marquage métabolique avec du fucose alcyne et couplage de biotine azido par « chimie click » (Best 2009), une faible incorporation de fucose *O*-lié au niveau des glycoprotéines des cellules C2C12 Po- a pu être démontrée, ce qui est en corrélation avec la diminution des niveaux d'expression de *Pofut1*. Nous ignorons quels sites *O*-fucosylés peuvent être le plus affectés par la diminution de la quantité de POFUT1 mais il semble techniquement difficile de le montrer du fait de la quantité relativement limitée de récepteurs endogènes. En effet, ces quantités faibles de récepteurs NOTCH ainsi que la nature membranaire de ces protéines de très grande taille (> 250 kDa) représentent des obstacles majeurs à leur purification et donc à leur analyse par spectrométrie de masse. De plus, il n'existe à ce jour ni anticorps, ni lectine spécifique capable de reconnaître les résidus fucoses *O*-liés présents sur les récepteurs NOTCH et leurs ligands. Dans le même ordre d'idées, aucune enzyme capable de cliver spécifiquement le fucose *O*-lié n'est décrite. Enfin une difficulté supplémentaire est apportée par la présence, au sein de NOTCH, de plusieurs domaines EGF-like *O*-fucosylables avec une proximité structurale qui ne permet pas de les distinguer. C'est pourquoi la majorité des études portant sur la *O*-fucosylation des récepteurs NOTCH et de leurs ligands repose sur la production et la purification de protéines recombinantes (des domaines EGF isolés), avant leur analyse par spectrométrie de masse et/ou chromatographie (Xu, Haines et al. 2007; Matsuura, Ito et al. 2008). Cette stratégie souffre cependant d'une faiblesse en ce sens que

la O-fucosylation de domaines EGF isolés pourrait ne pas être représentative de la O-fucosylation opérée sur un récepteur complet.

La diminution de l'expression de *Pofut1* entraîne une différenciation myogénique précoce et une déplétion en progéniteurs Pax7+/MyoD-.

La lignée C2C12 est une lignée myoblastique murine capable de proliférer et de se différencier en cellules multi-nucléées appelées myotubes. Les myoblastes en culture primaire, dérivés de cellules satellites (MDCS) activées lors de leur isolement à partir des muscles squelettiques, subissent les mêmes étapes de prolifération myoblastique, d'alignement myocytaire et de fusion. Si l'on compare ces deux modèles cellulaires, les cellules C2C12 sont des lignées murines dérivant d'un seul clone tandis que les MDSC sont des cultures de myoblastes dérivant de cellules satellites hétérogènes puisqu'elles proviennent de pools de muscles squelettiques comme c'est le cas dans notre étude. De plus, les deux types de cellules se distinguent par leur morphologie, leur taille, leur capacité d'adhésion, et leurs vitesses de prolifération et de différenciation. Par ailleurs, des expériences au sein de notre équipe ont montré que les dérégulations d'expression génique qui accompagnent la différenciation en myotubes de ces deux types de cellules sont en partie différentes (Grassot, Da Silva et al. 2014). Par conséquent, il est tout à fait attendu que les réponses obtenues avec ces deux types de myoblastes ne soient pas complètement superposables.

La sous-expression de *Pofut1* au niveau des transcrits chez les C2C12 Po- (Der Vartanian, Audfray et al. 2015) et les MDSC *Pofut1*^{cax/cax} (Al Jaam, Heu et al. 2016) est respectivement de 40 et 60%. La quantité de protéine POFUT1 est diminuée de manière similaire. Il est important de noter que la diminution de l'expression du gène à l'échelle transcriptionnelle demeure aux alentours de 50% dans ces deux modèles cellulaires, bien que les processus à l'origine de cette diminution soient différents (différents shRNA pour les C2C12 Po- ou insertion d'élément IAP pour les MDCS). Il est possible qu'une extinction plus sévère soit irréalisable car létale tout comme l'est le KO chez la souris. Pourtant, la dérégulation de l'expression du gène *Pofut1* dans ces deux modèles cellulaires dirige un programme myogénique semblable malgré un profil de cinétique différent. La sous-expression de *Pofut1*

conduit globalement aux mêmes effets, à savoir une moindre activation de la signalisation Notch entraînant une diminution d'expression de *Pax7* et une déplétion en cellules progénitrices PAX7+/MYOD-, au profit des cellules PAX7-/MYOD+, engagées dans la différenciation. Il en résulte une différenciation précoce, avancée de 24h chez les C2C12 Po- et de 48h chez les MDSC Pofut1^{cax/cax}. Par contre, des analyses morphologiques comparatives précises ont été réalisées seulement dans le modèle C2C12. Les mesures ont porté sur la longueur des myotubes, leur diamètre, leur périmètre et leur contenu en noyaux (Der Vartanian, Audfray et al. 2015). Les myotubes formés dans les C2C12 Po- sont majoritairement fins et allongés par rapport à ceux observés dans les cellules C2C12 contrôles, avec un contenu relativement faible en noyaux. Ces résultats, qui suggèrent des défauts de fusion secondaire, n'ont pas pu être vérifiés statistiquement dans les MDSC, notamment en raison d'un très faible indice de fusion dans les MDSC par rapport aux cellules C2C12.

Les souris Pofut1^{cax/cax} présentent des défauts squelettiques d'intensité variable.

Parmi les défauts squelettiques présentés par les souris Pofut1^{cax/cax}, on retrouve des caractères phénotypiques fortement ou plus modestement affectés. Il s'agit très souvent d'un corps compact, d'une colonne vertébrale déviée et d'une queue tordue (coudée, torsadée) et courte (voire absente), tels que cela a été décrit précédemment (Schuster-Gossler, Harris et al. 2009). Ces défauts squelettiques résultent notamment de l'absence et/ou fusion de vertèbres et de la présence de paires de vertèbres asymétriques en taille voire d'hémivertèbres. Nos préparations squelettiques montrent que même les souris Pofut1^{cax/cax} d'apparence normale, peuvent posséder certaines malformations telles que des côtes fusionnées ou divisées. Toutes ces observations mettent bien en évidence un phénotype squelettique d'intensité variable, qui se met en place lors de la somitogenèse. L'origine de cette intensité variable du phénotype est liée à la nature même de la mutation Pofut1^{cax}, puisqu'il s'agit d'une insertion d'un élément rétrotransposable de type IAP dans l'intron 4 du gène *Pofut1*. Les éléments IAP contiennent des séquences promotrices LTR (long terminal repeat sequence), avec des séquences de fixation à plusieurs facteurs de transcription (Falzon and Kuff 1988). Ces éléments s'intègrent dans le génome en position

anti-sens (Qin, Wang et al. 2010) et donc peuvent générer des transcrits chimères (ce qui est le cas chez les souris *Pofut1*^{cax/cax}, thèse de Katy Heu), qui seraient capables dans certains cas de s'hybrider de manière complémentaire aux transcrits sauvages et d'entraîner leur dégradation suite à un mécanisme d'interférence. Ce phénomène d'interférence potentiel, qui n'a jamais été démontré chez les souris *Pofut1*^{cax/cax}, pourrait accentuer la diminution des niveaux d'expression des transcrits sauvages de *Pofut1* (Schuster-Gossler, Harris et al. 2009), avec plus ou moins d'intensité en fonction de la régulation épigénétique des promoteurs LTR telle que la méthylation de l'ADN (Walsh, Chaillet et al. 1998). Il serait donc très intéressant de voir si ce mécanisme existe bien chez les souris *Pofut1*^{cax/cax} et si tel est le cas, s'il est directement corrélé à la sévérité des phénotypes observés ? Une première approche serait de grouper les souris *Pofut1*^{cax/cax} en fonction de la sévérité du phénotype squelettique et voir si une corrélation existe bien entre la quantité de transcrits *Pofut1* sauvage détectés et la sévérité des phénotypes.

Les souris *Pofut1*^{cax/cax} présentent une hypertrophie musculaire post-natale accompagnée d'une accréation myonucléaire et d'une diminution du pool de cellules satellites.

Dans ce travail de thèse, nous avons choisi d'étudier les conséquences de la mutation *Pofut1*^{cax} sur le développement des muscles squelettiques à partir de la 5^{ème} semaine post-natale. La raison pour laquelle nous avons choisi de démarrer l'étude à ce stade (peu de temps après le sevrage) réside dans le fait que des études préliminaires effectuées sur les muscles squelettiques *Tibialis* et *Gastrocnemius* chez les souris *Pofut1*^{cax/cax} de 3 semaines ne faisaient pas encore apparaître l'hypertrophie musculaire (thèse de Katy Heu).

Plusieurs études ont montré que l'augmentation de la masse musculaire chez la souris, entre la naissance et le 21^{ème} jour de croissance postnatale, s'effectuait majoritairement par hypertrophie avec accréation myonucléaire et par accroissement en longueur des fibres musculaires (Timson 1982; White, Bierinx et al. 2010). Dans ce cas, aucune hyperplasie n'est observée et l'hypertrophie constatée est expliquée par l'activation massive de cellules satellites (Timson 1982; White, Bierinx et al. 2010). C'est donc dans cette période de forte activation des cellules satellites que l'impact de la sous-expression du gène *Pofut1* est plus visible. L'hypofucosylation induit une atténuation de la signalisation Notch et modifie

l'équilibre quantitatif entre les cellules satellites activées qui se différencient et celles qui retournent à l'état de quiescence.

Autres cibles de POFUT1 en dehors des récepteurs NOTCH et de leurs ligands ?

En dehors du fait que ce travail de thèse n'évalue l'impact de la mutation *Pofut1*^{cax} que sur la croissance musculaire post-natale via la diminution d'activation de la voie Notch, on ne peut exclure que des cibles protéiques autres que les récepteurs NOTCH et leurs ligands puissent être également modifiées dans leur *O*-fucosylation chez les souris *Pofut1*^{cax/cax} et donc potentiellement dans leur activité biologique. Il existe en effet chez les mammifères plus d'une centaine de protéines cibles de POFUT1 prédites *in silico* (Rampal, Luther et al. 2007) mais la réalité de leur *O*-fucosylation et les conséquences qui en résultent ne sont démontrées que pour une minorité d'entre elles. De la même manière, nous avons refait la prédiction en ne ciblant que la souris et en utilisant une séquence de *O*-fucosylation plus discriminante (**Annexe 2**). Seulement 66 protéines ressortent de cette nouvelle prédiction, parmi lesquelles on retrouve par exemple les facteurs de coagulation VII, IX et XII, dont la réalité d'occupation des sites de *O*-fucosylation a déjà été démontrée pour l'espèce humaine (Bjoern, Foster et al. 1991; Harris, Ling et al. 1992; Nishimura, Takao et al. 1992). Le rôle de cette *O*-fucosylation n'est cependant pas toujours élucidé mais des hypothèses sont émises. Il se pourrait, par exemple, que la diminution de la *O*-fucosylation du facteur VII puisse affecter l'interaction avec le facteur tissulaire (appelé aussi facteur III), qui est un récepteur impliqué dans l'activation du facteur X de la coagulation (Kao, Lee et al. 1999).

Des tentatives de comparaison de profils *O*-glycanniques des glycoprotéines sériques par spectrométrie de masse avaient été réalisées sur des échantillons sanguins de souris *Pofut1*^{cax/cax} et sauvages (thèse de Katy Heu). Malheureusement, la grande abondance des protéines sériques telles que l'albumine et les globulines par rapport aux facteurs de coagulation ainsi que l'abondance de la *O*-glycosylation de type mucine par rapport à la *O*-fucosylation, n'ont pas permis de montrer de différences de *O*-fucosylation entre les souris mutées et sauvages. Une des perspectives serait donc de dépléter les échantillons sanguins en albumine et de concentrer les facteurs de coagulation, avant de procéder à l'analyse de leur *O*-glycosylation par spectrométrie de masse. Une autre alternative serait

d'utiliser chez l'embryon de souris un fucose modifié (alcyne ou azido) pour marquer les glycoprotéines fucosylées et en l'occurrence *O*-fucosylées à l'échelle de l'organisme entier, à l'image de ce qui est réalisé chez le poisson zèbre (Dehnert, Beahm et al. 2011). Les glycoprotéines sériques telles que les facteurs de coagulation pourraient être ensuite plus facilement détectées et analysées du fait de la présence potentielle de *O*-fucoses ou de *O*-fucosylglycanes marqués chimiquement.

Autres fonctions affectées par la mutation *Pofut1*^{cax} ?

La mutation *Pofut1*^{cax} à l'état homozygote conduit à l'expression de phénotypes variables chez la souris, quant aux différentes déformations squelettiques qu'elle engendre. En cohérence avec les thématiques abordées au laboratoire, nous avons choisi de nous focaliser sur les conséquences de cette mutation sur le développement musculaire post-natal bien que cette mutation entraîne probablement d'autres perturbations que des défauts musculo-squelettiques. En effet, des études réalisées précédemment au laboratoire (thèse de Katy Heu) montrent que la diminution de l'expression du gène *Pofut1* est observée à des degrés plus ou moins forts dans plusieurs organes, avec une sous-expression particulièrement forte dans le cerveau. La voie de signalisation de Notch, qui est réduite chez les souris *Pofut1*^{cax/cax} hypomorphes pour le gène *Pofut1*, pourrait donc affecter le fonctionnement neuronal. En effet, plusieurs études montrent que la signalisation Notch joue un rôle dans différentes fonctions du cerveau mature, telles que la neurogenèse adulte, la régulation des progéniteurs neuronaux, la plasticité synaptique et les mécanismes d'apprentissage et de mémoire (Alberi, Hoey et al. 2013). Plus précisément, une étude récente montre l'implication de Notch dans le fonctionnement du cerveau adulte et notamment dans le maintien de la population de neurones en utilisant un modèle de souris invalidées par KO conditionnel d'ADAM10 (Zhuang, Wei et al. 2015), la protéase majoritairement impliquée dans le clivage, ligand-dépendant, des récepteurs NOTCH (Bozkulak and Weinmaster 2009). Ces souris présentent au niveau du cortex et de l'hippocampe une différenciation neuronale précoce, liée à la diminution d'activation de la voie Notch, ainsi que des troubles de la mémoire et de la fonction d'apprentissage. Il serait donc intéressant de voir comment ces différentes fonctions neuronales peuvent être affectées chez les souris *Pofut1*^{cax/cax}. Le développement cardiaque chez les embryons

Pofut1^{-/-} (KO conditionnel) est très affecté quant à la formation des valves cardiaques. Ces observations sont semblables à celles obtenues chez les embryons RBP-JK^{-/-} (Timmerman, Grego-Bessa et al. 2004), qui enregistrent également un arrêt précoce du développement embryonnaire (Okamura and Saga 2008).

Convaincus que la sous-expression de *Pofut1* affecte non seulement la fonction de NOTCH mais probablement aussi celle d'autres protéines cibles impliquées dans le développement musculo-squelettique et potentiellement dans d'autres fonctions, les souris Pofut1^{cax/cax} et leurs contrôles sauvage ont été envoyés à la clinique de la souris en Allemagne (www.mouseclinic.de/) pour subir différents cribles phénotypiques (global et spécifique). Différentes fonctions sont analysées lors de ces différents cribles, telles que les fonctions neurologiques associées ou non aux fonctions locomotrices (forces d'agrippement, rotarod, tests auditifs...).

Hypertrophie musculaire et force musculaire ?

Une question qui reste actuellement en suspens est de savoir si l'hypertrophie modérée des muscles squelettiques des souris Pofut1^{cax/cax} en période postnatale s'accompagne ou non d'une augmentation de la force musculaire. Si tel est le cas, est ce que cette augmentation de la force musculaire permet à ces souris d'avoir une activité locomotrice normale malgré les nombreux problèmes squelettiques d'intensité variable auxquels elles sont sujettes ?

L'hypertrophie par accréation myonucléaire, telle que celle observée chez nos souris, permet de maintenir relativement constant le domaine myonucléaire, c'est à dire le volume cytoplasmique contrôlé par chaque noyau au niveau transcriptionnel et protéique (Petrella, Kim et al. 2006). Ainsi, les fonctions de contractions musculaires sont normalement assurées. Ce n'est pas le cas lorsque l'hypertrophie se fait sans ajout de nouveaux noyaux : dans ce cas, le domaine myonucléaire s'accroît jusqu'à devenir trop important pour être supporté par un seul noyau. Il atteint alors une valeur limite au-delà de laquelle la fibre musculaire est incapable d'augmenter en taille sans incorporer de nouveaux noyaux (Petrella, Kim et al. 2006). Si de nouveaux noyaux ne sont pas ajoutés par activation de cellules satellites, les performances du muscle s'en trouvent alors affectées. On peut donc supposer que si le domaine myonucléaire reste relativement constant chez les souris Pofut1^{cax/cax} et assure un bon renouvellement protéique, l'augmentation de la masse musculaire chez ces souris

pourrait s'accompagner d'une plus grande force musculaire. Seuls des mesures précises de forces d'agrippement ou sur muscles isolés peuvent répondre à ces questions.

L'analyse fonctionnelle des souris *Pofut1*^{cax/cax} est actuellement en cours mais il serait également intéressant de voir si une diminution plus drastique de l'expression de *Pofut1*, comme cela est le cas chez les souris hétéroalléliques *Pofut1*^{tm1Pst/cax} (Schuster-Gossler, Harris et al. 2009), accentue ou non l'hypertrophie musculaire postnatale. Ces souris, qui possèdent un seul allèle *cax* et un allèle nul (*tm1Pst*), sont viables et présentent des défauts squelettiques plus sévères que les souris *Pofut1*^{cax/cax} mais aucune information n'est disponible sur les fonctions musculaires et l'activité locomotrice de ces souris.

Qu'en est-il de la régénération musculaire ?

Il serait intéressant d'explorer les capacités de régénération musculaire des souris *Pofut1*^{cax/cax} après lésion mécanique et/ou injections de toxines. La régénération de muscle squelettique est une fonction très importante pour assurer la pérennité et le bon fonctionnement des muscles. Ce processus est normalement déclenché suite à une lésion ou une blessure, qui met en place l'activation des cellules satellites en myoblastes prolifératifs. Après leur prolifération et leur sortie du cycle cellulaire, ils se différencient et deviennent aptes à fusionner avec les fibres endommagées pour régénérer le muscle (Charge and Rudnicki 2004; Dumont, Bentzinger et al. 2015). Les souris *Pofut1*^{cax/cax} présentent une différenciation plus rapide des cellules satellites activées et il semble que la fusion myoblastique soit privilégiée par rapport au retour à l'état quiescent, ce qui entraîne ainsi une hypertrophie avec accréation myonucléaire et une diminution du pool de cellules satellites. Il faudrait donc envisager d'étudier les capacités de régénération musculaire de ces souris après induction d'une lésion musculaire pour tirer des conclusions plus précises : est-ce que les capacités accrues des cellules satellites activées à se différencier et à fusionner avec des fibres musculaires pré-existantes seraient également responsables d'une meilleure capacité régénératrice au niveau des muscles ou est-ce que la déplétion des progéniteurs PAX7+/MYOD-, observée précocement chez les MDCS *Pofut1*^{cax/cax}, pourrait affecter le processus régénératif ?

La régénération musculaire des souris Pofut1^{cax/cax} serait grandement éclairée par une étude fine des mécanismes d'activation des cellules satellites, d'initiation du programme myogénique et de retour à l'état de quiescence par l'analyse de fibres isolées (Pasut, Jones et al. 2013) de muscles de souris Pofut1^{cax/cax}. L'isolement des fibres est une technique très délicate à mettre en œuvre mais qui présente de très nombreux avantages par rapport à l'analyse de pools de MDCS provenant de différents broyats musculaires. Cette technique permet notamment de conserver les cellules satellites dans leur niche sous la lame basale et surtout de les maintenir quiescentes en jouant sur l'apport en sérum des milieux de culture (Pasut, Jones et al. 2013). Ainsi, il est possible d'induire l'activation de ces cellules satellites et de suivre leur extrusion de la fibre avant qu'elles ne ré-initient le programme myogénique. Différents marquages immunocytochimiques permettraient alors de bien caractériser la suite de ces événements. L'autre avantage des fibres isolées est qu'elles permettent l'analyse d'une très faible quantité de cellules satellites à la fois, ce qui limiterait nettement l'hétérogénéité cellulaire inhérente à l'isolement des MDCS à partir de broyats de pools de muscles squelettiques (Al Jaam, Heu et al. 2016).



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A.

- Abmayr, S. M. and G. K. Pavlath (2012). "Myoblast fusion: lessons from flies and mice." Development **139**(4): 641-656.
- Abu-Elmagd, M., L. Robson, et al. (2010). "Wnt/Lef1 signaling acts via Pitx2 to regulate somite myogenesis." Dev Biol **337**(2): 211-219.
- Acar, M., H. Jafar-Nejad, et al. (2008). "Rumi is a CAP10 domain glycosyltransferase that modifies Notch and is required for Notch signaling." Cell **132**(2): 247-258.
- Adams, G. R., V. J. Caiozzo, et al. (2002). "Cellular and molecular responses to increased skeletal muscle loading after irradiation." Am J Physiol Cell Physiol **283**(4): C1182-1195.
- Ahimou, F., L. P. Mok, et al. (2004). "The adhesion force of Notch with Delta and the rate of Notch signaling." J Cell Biol **167**(6): 1217-1229.
- Al Jaam, B., K. Heu, et al. (2016). "Reduced Notch signalling leads to postnatal skeletal muscle hypertrophy in Pofut1^{cax/cax} mice." Open Biol **6**(9).
- Alberi, L., S. E. Hoey, et al. (2013). "Notch signaling in the brain: in good and bad times." Ageing Res Rev **12**(3): 801-814.
- Alfaro, J. F., C. X. Gong, et al. (2012). "Tandem mass spectrometry identifies many mouse brain O-GlcNAcylated proteins including EGF domain-specific O-GlcNAc transferase targets." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(19): 7280-7285.
- Amsen, D., A. Antov, et al. (2007). "Direct regulation of Gata3 expression determines the T helper differentiation potential of Notch." Immunity **27**(1): 89-99.
- Amthor, H., G. Nicholas, et al. (2004). "Follistatin complexes Myostatin and antagonises Myostatin-mediated inhibition of myogenesis." Dev Biol **270**(1): 19-30.
- Amthor, H., A. Otto, et al. (2009). "Muscle hypertrophy driven by myostatin blockade does not require stem/precursor-cell activity." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(18): 7479-7484.
- Andres, V. and K. Walsh (1996). "Myogenin expression, cell cycle withdrawal, and phenotypic differentiation are temporally separable events that precede cell fusion upon myogenesis." J Cell Biol **132**(4): 657-666.
- Artavanis-Tsakonas, S. (1988). "The molecular biology of the Notch locus and the fine tuning of differentiation in Drosophila." Trends Genet **4**(4): 95-100.
- Artavanis-Tsakonas, S., M. D. Rand, et al. (1999). "Notch signaling: cell fate control and signal integration in development." Science **284**(5415): 770-776.
- Asciutti, S., G. Akiri, et al. (2011). "Diverse mechanisms of Wnt activation and effects of pathway inhibition on proliferation of human gastric carcinoma cells." Oncogene **30**(8): 956-966.
- Ashmore, C. R. and L. Doerr (1971). "Comparative aspects of muscle fiber types in different species." Exp Neurol **31**(3): 408-418.
- Aulehla, A., C. Wehrle, et al. (2003). "Wnt3a plays a major role in the segmentation clock controlling somitogenesis." Dev Cell **4**(3): 395-406.

B.

- Bae, S., Y. Bessho, et al. (2000). "The bHLH gene Hes6, an inhibitor of Hes1, promotes neuronal differentiation." Development **127**(13): 2933-2943.
- Bajaj, P., B. Reddy, Jr., et al. (2011). "Patterning the differentiation of C2C12 skeletal myoblasts." Integr Biol (Camb) **3**(9): 897-909.
- Barton-Davis, E. R., D. I. Shoturma, et al. (1999). "Contribution of satellite cells to IGF-I induced hypertrophy of skeletal muscle." Acta Physiol Scand **167**(4): 301-305.

- Basmanav, F. B., A. M. Oprisoreanu, et al. (2014). "Mutations in POGlut1, encoding protein O-glycosyltransferase 1, cause autosomal-dominant Dowling-Degos disease." *Am J Hum Genet* **94**(1): 135-143.
- Batonnet-Pichon, S., L. J. Tintignac, et al. (2006). "MyoD undergoes a distinct G2/M-specific regulation in muscle cells." *Exp Cell Res* **312**(20): 3999-4010.
- Becam, I., U. M. Fiuza, et al. (2010). "A role of receptor Notch in ligand cis-inhibition in Drosophila." *Curr Biol* **20**(6): 554-560.
- Benham, A. M. (2012). "Protein secretion and the endoplasmic reticulum." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**(8): a012872.
- Bentzinger, C. F., Y. X. Wang, et al. (2012). "Building muscle: molecular regulation of myogenesis." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**(2).
- Berkes, C. A. and S. J. Tapscott (2005). "MyoD and the transcriptional control of myogenesis." *Semin Cell Dev Biol* **16**(4-5): 585-595.
- Bermudez Brito, M., E. Goulielmaki, et al. (2015). "Focus on PTEN Regulation." *Front Oncol* **5**: 166.
- Bessho, Y., H. Hirata, et al. (2003). "Periodic repression by the bHLH factor Hes7 is an essential mechanism for the somite segmentation clock." *Genes Dev* **17**(12): 1451-1456.
- Bessho, Y., G. Miyoshi, et al. (2001). "Hes7: a bHLH-type repressor gene regulated by Notch and expressed in the presomitic mesoderm." *Genes Cells* **6**(2): 175-185.
- Bessho, Y., R. Sakata, et al. (2001). "Dynamic expression and essential functions of Hes7 in somite segmentation." *Genes Dev* **15**(20): 2642-2647.
- Best, M. D. (2009). "Click chemistry and bioorthogonal reactions: unprecedented selectivity in the labeling of biological molecules." *Biochemistry* **48**(28): 6571-6584.
- Birchmeier, C., W. Birchmeier, et al. (2003). "Met, metastasis, motility and more." *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(12): 915-925.
- Birchmeier, C. and H. Brohmann (2000). "Genes that control the development of migrating muscle precursor cells." *Curr Opin Cell Biol* **12**(6): 725-730.
- Biressi, S. and T. A. Rando (2010). "Heterogeneity in the muscle satellite cell population." *Semin Cell Dev Biol* **21**(8): 845-854.
- Bjoern, S., D. C. Foster, et al. (1991). "Human plasma and recombinant factor VII. Characterization of O-glycosylations at serine residues 52 and 60 and effects of site-directed mutagenesis of serine 52 to alanine." *J Biol Chem* **266**(17): 11051-11057.
- Bjornson, C. R., T. H. Cheung, et al. (2012). "Notch signaling is necessary to maintain quiescence in adult muscle stem cells." *Stem Cells* **30**(2): 232-242.
- Blaauw, B., M. Canato, et al. (2009). "Inducible activation of Akt increases skeletal muscle mass and force without satellite cell activation." *FASEB J* **23**(11): 3896-3905.
- Black, B. L. and E. N. Olson (1998). "Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins." *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**: 167-196.
- Blobel, C. P. (2005). "ADAMs: key components in EGFR signalling and development." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(1): 32-43.
- Bodine, S. C., T. N. Stitt, 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**(11): 1014-1019.
- Boskovski, M. T., S. Yuan, et al. (2013). "The heterotaxy gene GALNT11 glycosylates Notch to orchestrate cilia type and laterality." *Nature* **504**(7480): 456-459.
- Bowers, L. W., E. L. Rossi, et al. (2015). "The Role of the Insulin/IGF System in Cancer: Lessons Learned from Clinical Trials and the Energy Balance-Cancer Link." *Front Endocrinol (Lausanne)* **6**: 77.
- Bozkulak, E. C. and G. Weinmaster (2009). "Selective use of ADAM10 and ADAM17 in activation of Notch1 signaling." *Mol Cell Biol* **29**(21): 5679-5695.
- Brack, A. S., H. Bildsoe, et al. (2005). "Evidence that satellite cell decrement contributes to preferential decline in nuclear number from large fibres during murine age-related muscle atrophy." *J Cell Sci* **118**(Pt 20): 4813-4821.

- Brack, A. S., I. M. Conboy, et al. (2008). "A temporal switch from notch to Wnt signaling in muscle stem cells is necessary for normal adult myogenesis." *Cell Stem Cell* **2**(1): 50-59.
- Brack, A. S. and T. A. Rando (2012). "Tissue-specific stem cells: lessons from the skeletal muscle satellite cell." *Cell Stem Cell* **10**(5): 504-514.
- Braun, T., G. Buschhausen-Denker, et al. (1989). "A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts." *EMBO J* **8**(3): 701-709.
- Braun, T., M. A. Rudnicki, et al. (1992). "Targeted inactivation of the muscle regulatory gene Myf-5 results in abnormal rib development and perinatal death." *Cell* **71**(3): 369-382.
- Bray, S. J., S. Takada, et al. (2008). "The atypical mammalian ligand Delta-like homologue 1 (Dlk1) can regulate Notch signalling in Drosophila." *BMC Dev Biol* **8**: 11.
- Breitbart, R. E., C. S. Liang, et al. (1993). "A fourth human MEF2 transcription factor, hMEF2D, is an early marker of the myogenic lineage." *Development* **118**(4): 1095-1106.
- Breton, C., L. Snajdrova, et al. (2006). "Structures and mechanisms of glycosyltransferases." *Glycobiology* **16**(2): 29R-37R.
- Brooke, M. H. and K. K. Kaiser (1970). "Muscle fiber types: how many and what kind?" *Arch Neurol* **23**(4): 369-379.
- Brou, C. and F. Logeat (2006). "[Endocytosis and Notch signalling]." *Med Sci (Paris)* **22**(8-9): 685-688.
- Brou, C., F. Logeat, et al. (2000). "A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE." *Mol Cell* **5**(2): 207-216.
- Bruckner, K., L. Perez, et al. (2000). "Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch-Delta interactions." *Nature* **406**(6794): 411-415.
- Brun, C., O. Monestier, et al. (2012). "Murine GASP-1 N-glycosylation is not essential for its activity on C2C12 myogenic cells but alters its secretion." *Cell Physiol Biochem* **30**(3): 791-804.
- Brun, C., L. Perie, et al. (2014). "Absence of hyperplasia in Gasp-1 overexpressing mice is dependent on myostatin up-regulation." *Cell Physiol Biochem* **34**(4): 1241-1259.
- Brzoska, E., V. Bello, et al. (2006). "Integrin alpha3 subunit participates in myoblast adhesion and fusion in vitro." *Differentiation* **74**(2-3): 105-118.
- Buas, M. F. and T. Kadesch (2010). "Regulation of skeletal myogenesis by Notch." *Exp Cell Res* **316**(18): 3028-3033.
- Buckingham, M. (2006). "Myogenic progenitor cells and skeletal myogenesis in vertebrates." *Curr Opin Genet Dev* **16**(5): 525-532.
- Buckingham, M., L. Bajard, et al. (2003). "The formation of skeletal muscle: from somite to limb." *J Anat* **202**(1): 59-68.
- Buckingham, M. and D. Montarras (2008). "Skeletal muscle stem cells." *Curr Opin Genet Dev* **18**(4): 330-336.
- Buckingham, M. and F. Relaix (2007). "The role of Pax genes in the development of tissues and organs: Pax3 and Pax7 regulate muscle progenitor cell functions." *Annu Rev Cell Dev Biol* **23**: 645-673.
- Buckingham, M. and P. W. Rigby (2014). "Gene regulatory networks and transcriptional mechanisms that control myogenesis." *Dev Cell* **28**(3): 225-238.
- Bush, G., G. diSibio, et al. (2001). "Ligand-induced signaling in the absence of furin processing of Notch1." *Dev Biol* **229**(2): 494-502.

C.

- Cabane, C., A. S. Coldefy, et al. (2004). "The p38 pathway regulates Akt both at the protein and transcriptional activation levels during myogenesis." *Cell Signal* **16**(12): 1405-1415.
- Cave, J. W. (2011). "Selective repression of Notch pathway target gene transcription." *Dev Biol* **360**(1): 123-131.
- Charge, S. B. and M. A. Rudnicki (2004). "Cellular and molecular regulation of muscle regeneration." *Physiol Rev* **84**(1): 209-238.
- Charrasse, S., F. Comunale, et al. (2006). "RhoA GTPase regulates M-cadherin activity and myoblast fusion." *Mol Biol Cell* **17**(2): 749-759.

- Chillakuri, C. R., D. Sheppard, et al. (2012). "Notch receptor-ligand binding and activation: insights from molecular studies." Semin Cell Dev Biol **23**(4): 421-428.
- Chitnis, A. (2006). "Why is delta endocytosis required for effective activation of notch?" Dev Dyn **235**(4): 886-894.
- Christ, B. and C. P. Ordahl (1995). "Early stages of chick somite development." Anat Embryol (Berl) **191**(5): 381-396.
- Ciciliot, S. and S. Schiaffino (2010). "Regeneration of mammalian skeletal muscle. Basic mechanisms and clinical implications." Curr Pharm Des **16**(8): 906-914.
- Cifuentes-Diaz, C., M. Nicolet, et al. (1995). "M-cadherin localization in developing adult and regenerating mouse skeletal muscle: possible involvement in secondary myogenesis." Mech Dev **50**(1): 85-97.
- Clegg, C. H., T. A. Linkhart, et al. (1987). "Growth factor control of skeletal muscle differentiation: commitment to terminal differentiation occurs in G1 phase and is repressed by fibroblast growth factor." J Cell Biol **105**(2): 949-956.
- Cohen, B., A. Bashirullah, et al. (1997). "Fringe boundaries coincide with Notch-dependent patterning centres in mammals and alter Notch-dependent development in Drosophila." Nat Genet **16**(3): 283-288.
- Cohen, I., E. Silberstein, et al. (2014). "Autosomal recessive Adams-Oliver syndrome caused by homozygous mutation in EOGT, encoding an EGF domain-specific O-GlcNAc transferase." Eur J Hum Genet **22**(3): 374-378.
- Coleman, M. E., F. DeMayo, et al. (1995). "Myogenic vector expression of insulin-like growth factor I stimulates muscle cell differentiation and myofiber hypertrophy in transgenic mice." J Biol Chem **270**(20): 12109-12116.
- Collins, C. A. (2006). "Satellite cell self-renewal." Curr Opin Pharmacol **6**(3): 301-306.
- Collins, C. A., I. Olsen, et al. (2005). "Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche." Cell **122**(2): 289-301.
- Conlon, R. A., A. G. Reaume, et al. (1995). "Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites." Development **121**(5): 1533-1545.
- Constantin, B., C. Cognard, et al. (1996). "Myoblast fusion requires cytosolic calcium elevation but not activation of voltage-dependent calcium channels." Cell Calcium **19**(5): 365-374.
- Cooke, J. and E. C. Zeeman (1976). "A clock and wavefront model for control of the number of repeated structures during animal morphogenesis." J Theor Biol **58**(2): 455-476.
- Cordle, J., S. Johnson, et al. (2008). "A conserved face of the Jagged/Serrate DSL domain is involved in Notch trans-activation and cis-inhibition." Nat Struct Mol Biol **15**(8): 849-857.
- Cordle, J., C. Redfieldz, et al. (2008). "Localization of the delta-like-1-binding site in human Notch-1 and its modulation by calcium affinity." J Biol Chem **283**(17): 11785-11793.

D.

- D'Souza, B., L. Meloty-Kapella, et al. (2010). "Canonical and non-canonical Notch ligands." Curr Top Dev Biol **92**: 73-129.
- Dale, J. K., M. Maroto, et al. (2003). "Periodic notch inhibition by lunatic fringe underlies the chick segmentation clock." Nature **421**(6920): 275-278.
- Daston, G., E. Lamar, et al. (1996). "Pax-3 is necessary for migration but not differentiation of limb muscle precursors in the mouse." Development **122**(3): 1017-1027.
- Davis, R. L., H. Weintraub, et al. (1987). "Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts." Cell **51**(6): 987-1000.
- de Celis, J. F., R. Barrio, et al. (1993). "Genetic and molecular characterization of a Notch mutation in its Delta- and Serrate-binding domain in Drosophila." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(9): 4037-4041.
- de Celis, J. F. and S. Bray (1997). "Feed-back mechanisms affecting Notch activation at the dorsoventral boundary in the Drosophila wing." Development **124**(17): 3241-3251.

- de Celis, J. F. and S. J. Bray (2000). "The Abruptex domain of Notch regulates negative interactions between Notch, its ligands and Fringe." *Development* **127**(6): 1291-1302.
- de Celis, J. F. and A. Garcia-Bellido (1994). "Modifications of the notch function by Abruptex mutations in *Drosophila melanogaster*." *Genetics* **136**(1): 183-194.
- De Strooper, B., W. Annaert, et al. (1999). "A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain." *Nature* **398**(6727): 518-522.
- De Strooper, B., T. Iwatsubo, et al. (2012). "Presenilins and gamma-secretase: structure, function, and role in Alzheimer Disease." *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**(1): a006304.
- Deftos, M. L. and M. J. Bevan (2000). "Notch signaling in T cell development." *Curr Opin Immunol* **12**(2): 166-172.
- Dehnert, K. W., B. J. Beahm, et al. (2011). "Metabolic labeling of fucosylated glycans in developing zebrafish." *ACS Chem Biol* **6**(6): 547-552.
- Dequeant, M. L., E. Glynn, et al. (2006). "A complex oscillating network of signaling genes underlies the mouse segmentation clock." *Science* **314**(5805): 1595-1598.
- Dequeant, M. L. and O. Pourquie (2008). "Segmental patterning of the vertebrate embryonic axis." *Nat Rev Genet* **9**(5): 370-382.
- Der Vartanian, A., A. Audfray, et al. (2015). "Protein O-fucosyltransferase 1 expression impacts myogenic C2C12 cell commitment via the Notch signaling pathway." *Mol Cell Biol* **35**(2): 391-405.
- Deries, M., A. B. Goncalves, et al. (2012). "Extracellular matrix remodeling accompanies axial muscle development and morphogenesis in the mouse." *Dev Dyn* **241**(2): 350-364.
- Diederich, R. J., K. Matsuno, et al. (1994). "Cytosolic interaction between deltex and Notch ankyrin repeats implicates deltex in the Notch signaling pathway." *Development* **120**(3): 473-481.
- Dodou, E., S. M. Xu, et al. (2003). "mef2c is activated directly by myogenic basic helix-loop-helix proteins during skeletal muscle development in vivo." *Mech Dev* **120**(9): 1021-1032.
- Donoviel, D. B., A. K. Hadjantonakis, et al. (1999). "Mice lacking both presenilin genes exhibit early embryonic patterning defects." *Genes Dev* **13**(21): 2801-2810.
- Dressler, G. R. (2009). "Advances in early kidney specification, development and patterning." *Development* **136**(23): 3863-3874.
- Dumont, N. A., C. F. Bentzinger, et al. (2015). "Satellite Cells and Skeletal Muscle Regeneration." *Compr Physiol* **5**(3): 1027-1059.
- Dumont, N. A., Y. X. Wang, et al. (2015). "Intrinsic and extrinsic mechanisms regulating satellite cell function." *Development* **142**(9): 1572-1581.
- Dunty, W. C., Jr., K. K. Biris, et al. (2008). "Wnt3a/beta-catenin signaling controls posterior body development by coordinating mesoderm formation and segmentation." *Development* **135**(1): 85-94.
- Dunwoodie, S. L., M. Clements, et al. (2002). "Axial skeletal defects caused by mutation in the spondylocostal dysplasia/pudgy gene *Dll3* are associated with disruption of the segmentation clock within the presomitic mesoderm." *Development* **129**(7): 1795-1806.
- Duxson, M. J., Y. Usson, et al. (1989). "The origin of secondary myotubes in mammalian skeletal muscles: ultrastructural studies." *Development* **107**(4): 743-750.

E.

- Edmondson, D. G. and E. N. Olson (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**(5): 628-640.
- Egan, S. E., B. St-Pierre, et al. (1998). "Notch receptors, partners and regulators: from conserved domains to powerful functions." *Curr Top Microbiol Immunol* **228**: 273-324.
- El Fahime, E., Y. Torrente, et al. (2000). "In vivo migration of transplanted myoblasts requires matrix metalloproteinase activity." *Exp Cell Res* **258**(2): 279-287.
- Evrard, Y. A., Y. Lun, et al. (1998). "Lunatic fringe is an essential mediator of somite segmentation and patterning." *Nature* **394**(6691): 377-381.

F.

- Falzon, M. and E. L. Kuff (1988). "Multiple protein-binding sites in an intracisternal A particle long terminal repeat." *J Virol* **62**(11): 4070-4077.
- Fang, T. C., Y. Yashiro-Ohtani, et al. (2007). "Notch directly regulates Gata3 expression during T helper 2 cell differentiation." *Immunity* **27**(1): 100-110.
- Fehon, R. G., P. J. Kooh, et al. (1990). "Molecular interactions between the protein products of the neurogenic loci Notch and Delta, two EGF-homologous genes in *Drosophila*." *Cell* **61**(3): 523-534.
- Fernandez-Valdivia, R., H. Takeuchi, et al. (2011). "Regulation of mammalian Notch signaling and embryonic development by the protein *O*-glucosyltransferase Rumi." *Development* **138**(10): 1925-1934.
- Firth, S. M. and R. C. Baxter (2002). "Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins." *Endocr Rev* **23**(6): 824-854.
- Fiuza, U. M. and A. M. Arias (2007). "Cell and molecular biology of Notch." *J Endocrinol* **194**(3): 459-474.
- Fleming, R. J. (1998). "Structural conservation of Notch receptors and ligands." *Semin Cell Dev Biol* **9**(6): 599-607.
- Fortini, M. E. (2009). "Notch signaling: the core pathway and its posttranslational regulation." *Dev Cell* **16**(5): 633-647.
- Frasca, F., G. Pandini, et al. (2008). "The role of insulin receptors and IGF-I receptors in cancer and other diseases." *Arch Physiol Biochem* **114**(1): 23-37.
- Freeze, H. H. and R. S. Haltiwanger (2009). Other Classes of ER/Golgi-derived Glycans. *Essentials of Glycobiology*. A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko et al. Cold Spring Harbor (NY).
- Fry, C. S., J. D. Lee, et al. (2014). "Regulation of the muscle fiber microenvironment by activated satellite cells during hypertrophy." *FASEB J* **28**(4): 1654-1665.
- Fryer, C. J., J. B. White, et al. (2004). "Mastermind recruits CycC:CDK8 to phosphorylate the Notch ICD and coordinate activation with turnover." *Mol Cell* **16**(4): 509-520.
- Fujimuro, T., T. Matsui, et al. (2014). "Hes7 3'UTR is required for somite segmentation function." *Sci Rep* **4**: 6462.
- Fukada, S., M. Yamaguchi, et al. (2011). "Hes1 and Hes3 are essential to generate undifferentiated quiescent satellite cells and to maintain satellite cell numbers." *Development* **138**(21): 4609-4619.

G.

- Ge, C. and P. Stanley (2008). "The *O*-fucose glycan in the ligand-binding domain of Notch1 regulates embryogenesis and T cell development." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(5): 1539-1544.
- Gebauer, J. M., S. Muller, et al. (2008). "*O*-glucosylation and *O*-fucosylation occur together in close proximity on the first epidermal growth factor repeat of AMACO (VWA2 protein)." *J Biol Chem* **283**(26): 17846-17854.
- Gerhart, J., J. Elder, et al. (2006). "MyoD-positive epiblast cells regulate skeletal muscle differentiation in the embryo." *J Cell Biol* **175**(2): 283-292.
- Gibson, M. C. and E. Schultz (1983). "Age-related differences in absolute numbers of skeletal muscle satellite cells." *Muscle Nerve* **6**(8): 574-580.
- Glinka, A., W. Wu, et al. (1998). "Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction." *Nature* **391**(6665): 357-362.
- Gonzalez de Peredo, A., D. Klein, et al. (2002). "C-mannosylation and *O*-fucosylation of thrombospondin type 1 repeats." *Mol Cell Proteomics* **1**(1): 11-18.
- Gordon, W. R., D. Vardar-Ulu, et al. (2007). "Structural basis for autoinhibition of Notch." *Nat Struct Mol Biol* **14**(4): 295-300.
- Gordon, W. R., D. Vardar-Ulu, et al. (2009). "Effects of S1 cleavage on the structure, surface export, and signaling activity of human Notch1 and Notch2." *PLoS One* **4**(8): e6613.

- Gospodarowicz, D., J. Weseman, et al. (1976). "Effect of fibroblast growth factor on the division and fusion of bovine myoblasts." *J Cell Biol* **70**(2 pt 1): 395-405.
- Grassot, V., A. Da Silva, et al. (2014). "Highlights of glycosylation and adhesion related genes involved in myogenesis." *BMC Genomics* **15**: 621.
- Greenwald, I. (1994). "Structure/function studies of lin-12/Notch proteins." *Curr Opin Genet Dev* **4**(4): 556-562.
- Greenwald, I. (1998). "LIN-12/Notch signaling: lessons from worms and flies." *Genes Dev* **12**(12): 1751-1762.
- Grefte, S., A. M. Kuijpers-Jagtman, et al. (2007). "Skeletal muscle development and regeneration." *Stem Cells Dev* **16**(5): 857-868.
- Griffin, C. A., L. H. Apponi, et al. (2010). "Chemokine expression and control of muscle cell migration during myogenesis." *J Cell Sci* **123**(Pt 18): 3052-3060.

H.

- Haase, K. and A. E. Pelling (2015). "Investigating cell mechanics with atomic force microscopy." *J R Soc Interface* **12**(104): 20140970.
- Haines, N. and K. D. Irvine (2003). "Glycosylation regulates Notch signalling." *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(10): 786-797.
- Halevy, O., B. G. Novitch, et al. (1995). "Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD." *Science* **267**(5200): 1018-1021.
- Hambleton, S., N. V. Valeyev, et al. (2004). "Structural and functional properties of the human notch-1 ligand binding region." *Structure* **12**(12): 2173-2183.
- Harris, R. J., C. K. Leonard, et al. (1991). "Tissue plasminogen activator has an *O*-linked fucose attached to threonine-61 in the epidermal growth factor domain." *Biochemistry* **30**(9): 2311-2314.
- Harris, R. J., V. T. Ling, et al. (1992). "*O*-linked fucose is present in the first epidermal growth factor domain of factor XII but not protein C." *J Biol Chem* **267**(8): 5102-5107.
- Harris, R. J. and M. W. Spellman (1993). "*O*-linked fucose and other post-translational modifications unique to EGF modules." *Glycobiology* **3**(3): 219-224.
- Harrison, S. M., D. Houzelstein, et al. (2000). "Sp5, a new member of the Sp1 family, is dynamically expressed during development and genetically interacts with Brachyury." *Dev Biol* **227**(2): 358-372.
- Hart, G. W., R. S. Haltiwanger, et al. (1989). "Nucleoplasmic and cytoplasmic glycoproteins." *Ciba Found Symp* **145**: 102-112, discussion 112-108.
- Hart, G. W., M. P. Housley, et al. (2007). "Cycling of *O*-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins." *Nature* **446**(7139): 1017-1022.
- Hartmann, D., B. de Strooper, et al. (2002). "The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts." *Hum Mol Genet* **11**(21): 2615-2624.
- Hase, S., S. Kawabata, et al. (1988). "A new trisaccharide sugar chain linked to a serine residue in bovine blood coagulation factors VII and IX." *J Biochem* **104**(6): 867-868.
- Hassed, S. J., G. B. Wiley, et al. (2012). "RBPJ mutations identified in two families affected by Adams-Oliver syndrome." *Am J Hum Genet* **91**(2): 391-395.
- Hasty, P., A. Bradley, et al. (1993). "Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene." *Nature* **364**(6437): 501-506.
- Hatakeyama, J., Y. Bessho, et al. (2004). "Hes genes regulate size, shape and histogenesis of the nervous system by control of the timing of neural stem cell differentiation." *Development* **131**(22): 5539-5550.
- He, T. C., A. B. Sparks, et al. (1998). "Identification of c-MYC as a target of the APC pathway." *Science* **281**(5382): 1509-1512.
- Herreman, A., D. Hartmann, et al. (1999). "Presenilin 2 deficiency causes a mild pulmonary phenotype and no changes in amyloid precursor protein processing but enhances the

- embryonic lethal phenotype of presenilin 1 deficiency." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(21): 11872-11877.
- Hicks, C., S. H. Johnston, et al. (2000). "Fringe differentially modulates Jagged1 and Delta1 signalling through Notch1 and Notch2." Nat Cell Biol **2**(8): 515-520.
- Hill, J. J., Y. Qiu, et al. (2003). "Regulation of myostatin in vivo by growth and differentiation factor-associated serum protein-1: a novel protein with protease inhibitor and follistatin domains." Mol Endocrinol **17**(6): 1144-1154.
- Hinck, A. P. (2012). "Structural studies of the TGF-betas and their receptors - insights into evolution of the TGF-beta superfamily." FEBS Lett **586**(14): 1860-1870.
- Hindi, S. M., M. M. Tajrishi, et al. (2013). "Signaling mechanisms in mammalian myoblast fusion." Sci Signal **6**(272): re2.
- Hirata, H., Y. Bessho, et al. (2004). "Instability of Hes7 protein is crucial for the somite segmentation clock." Nat Genet **36**(7): 750-754.
- Hirata, H., H. Hibasami, et al. (2001). "Nerve growth factor signaling of p75 induces differentiation and ceramide-mediated apoptosis in Schwann cells cultured from degenerating nerves." Glia **36**(3): 245-258.
- Hirsinger, E., P. Malapert, et al. (2001). "Notch signalling acts in postmitotic avian myogenic cells to control MyoD activation." Development **128**(1): 107-116.
- Hiruma-Shimizu, K., K. Hosoguchi, et al. (2010). "Chemical synthesis, folding, and structural insights into O-fucosylated epidermal growth factor-like repeat 12 of mouse Notch-1 receptor." J Am Chem Soc **132**(42): 14857-14865.
- Hitachi, K. and K. Tsuchida (2013). "Role of microRNAs in skeletal muscle hypertrophy." Front Physiol **4**: 408.
- Hoffmann, B. R., Y. Liu, et al. (2012). "Modification of EGF-like module 1 of thrombospondin-1, an animal extracellular protein, by O-linked N-acetylglucosamine." PLoS One **7**(3): e32762.
- Hofmann, K., P. Bucher, et al. (1999). "The PROSITE database, its status in 1999." Nucleic Acids Res **27**(1): 215-219.
- Hofmann, M., K. Schuster-Gossler, et al. (2004). "WNT signaling, in synergy with T/TBX6, controls Notch signaling by regulating Dll1 expression in the presomitic mesoderm of mouse embryos." Genes Dev **18**(22): 2712-2717.
- Hollnagel, A., C. Grund, et al. (2002). "The cell adhesion molecule M-cadherin is not essential for muscle development and regeneration." Mol Cell Biol **22**(13): 4760-4770.
- Horsley, V., B. B. Friday, et al. (2001). "Regulation of the growth of multinucleated muscle cells by an NFATC2-dependent pathway." J Cell Biol **153**(2): 329-338.
- Horsley, V., K. M. Jansen, et al. (2003). "IL-4 acts as a myoblast recruitment factor during mammalian muscle growth." Cell **113**(4): 483-494.
- Horsley, V. and G. K. Pavlath (2002). "NFAT: ubiquitous regulator of cell differentiation and adaptation." J Cell Biol **156**(5): 771-774.
- Hrabe de Angelis, M., J. McIntyre, 2nd, et al. (1997). "Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue Dll1." Nature **386**(6626): 717-721.
- Huang, Z., X. Chen, et al. (2011). "Myostatin: a novel insight into its role in metabolism, signal pathways, and expression regulation." Cell Signal **23**(9): 1441-1446.
- Hubbard, E. J., G. Wu, et al. (1997). "sel-10, a negative regulator of lin-12 activity in *Caenorhabditis elegans*, encodes a member of the CDC4 family of proteins." Genes Dev **11**(23): 3182-3193.
- Huppert, S. S., M. X. Ilagan, et al. (2005). "Analysis of Notch function in presomitic mesoderm suggests a gamma-secretase-independent role for presenilins in somite differentiation." Dev Cell **8**(5): 677-688.

I.

- Irvine, K. D. (2008). "A notch sweeter." Cell **132**(2): 177-179.

- Ishibashi, M., S. L. Ang, et al. (1995). "Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to up-regulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis, and severe neural tube defects." *Genes Dev* **9**(24): 3136-3148.
- Ishikawa, A., S. Kitajima, et al. (2004). "Mouse Nkd1, a Wnt antagonist, exhibits oscillatory gene expression in the PSM under the control of Notch signaling." *Mech Dev* **121**(12): 1443-1453.
- Ishitani, T., K. Matsumoto, et al. (2005). "Nrarp functions to modulate neural-crest-cell differentiation by regulating LEF1 protein stability." *Nat Cell Biol* **7**(11): 1106-1112.
- Iso, T., V. Sartorelli, et al. (2001). "HERP, a new primary target of Notch regulated by ligand binding." *Mol Cell Biol* **21**(17): 6071-6079.
- Iwanaga, S., H. Nishimura, et al. (1990). "A new trisaccharide sugar chain linked to a serine residue in the first EGF-like domain of clotting factors VII and IX and protein Z." *Adv Exp Med Biol* **281**: 121-131.

J.

- Ji, L., J. Lim, et al. (2008). "Fluctuations of intracellular forces during cell protrusion." *Nat Cell Biol* **10**(12): 1393-1400.
- Jin, X., J. G. Kim, et al. (2007). "Opposite roles of MRF4 and MyoD in cell proliferation and myogenic differentiation." *Biochem Biophys Res Commun* **364**(3): 476-482.
- Johansen, K. M., R. G. Fehon, et al. (1989). "The notch gene product is a glycoprotein expressed on the cell surface of both epidermal and neuronal precursor cells during Drosophila development." *J Cell Biol* **109**(5): 2427-2440.
- Johnston, S. H., C. Rauskolb, et al. (1997). "A family of mammalian Fringe genes implicated in boundary determination and the Notch pathway." *Development* **124**(11): 2245-2254.
- Joulia-Ekaza, D. and G. Cabello (2007). "The myostatin gene: physiology and pharmacological relevance." *Curr Opin Pharmacol* **7**(3): 310-315.
- Joulia, D., H. Bernardi, et al. (2003). "Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin." *Exp Cell Res* **286**(2): 263-275.
- Jouve, C., I. Palmeirim, et al. (2000). "Notch signalling is required for cyclic expression of the hairy-like gene HES1 in the presomitic mesoderm." *Development* **127**(7): 1421-1429.

K.

- Kablar, B., A. Asakura, et al. (1998). "MyoD and Myf-5 define the specification of musculature of distinct embryonic origin." *Biochem Cell Biol* **76**(6): 1079-1091.
- Kageyama, R. and T. Ohtsuka (1999). "The Notch-Hes pathway in mammalian neural development." *Cell Res* **9**(3): 179-188.
- Kageyama, R., T. Ohtsuka, et al. (2007). "The Hes gene family: repressors and oscillators that orchestrate embryogenesis." *Development* **134**(7): 1243-1251.
- Kao, Y. H., G. F. Lee, et al. (1999). "The effect of O-fucosylation on the first EGF-like domain from human blood coagulation factor VII." *Biochemistry* **38**(22): 7097-7110.
- Kardami, E., D. Spector, et al. (1985). "Myogenic growth factor present in skeletal muscle is purified by heparin-affinity chromatography." *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(23): 8044-8047.
- Kassar-Duchossoy, L., B. Gayraud-Morel, et al. (2004). "Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:Myod double-mutant mice." *Nature* **431**(7007): 466-471.
- Kassar-Duchossoy, L., E. Giacone, et al. (2005). "Pax3/Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development." *Genes Dev* **19**(12): 1426-1431.
- Kato, H., Y. Taniguchi, et al. (1997). "Involvement of RBP-J in biological functions of mouse Notch1 and its derivatives." *Development* **124**(20): 4133-4141.
- Kato, T. M., A. Kawaguchi, et al. (2010). "Lunatic fringe potentiates Notch signaling in the developing brain." *Mol Cell Neurosci* **45**(1): 12-25.
- Katoh, M. (2008). "WNT signaling in stem cell biology and regenerative medicine." *Curr Drug Targets* **9**(7): 565-570.

- Kawano, Y. and R. Kypta (2003). "Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway." J Cell Sci **116**(Pt 13): 2627-2634.
- Kentzer, E. J., A. Buko, et al. (1990). "Carbohydrate composition and presence of a fucose-protein linkage in recombinant human pro-urokinase." Biochem Biophys Res Commun **171**(1): 401-406.
- Kim, M. L., K. Chandrasekharan, et al. (2008). "O-fucosylation of muscle agrin determines its ability to cluster acetylcholine receptors." Mol Cell Neurosci **39**(3): 452-464.
- Kirk, S., J. Oldham, et al. (2000). "Myostatin regulation during skeletal muscle regeneration." J Cell Physiol **184**(3): 356-363.
- Kishi, N., Z. Tang, et al. (2001). "Murine homologs of deltex define a novel gene family involved in vertebrate Notch signaling and neurogenesis." Int J Dev Neurosci **19**(1): 21-35.
- Kitzmann, M. and A. Fernandez (2001). "Crosstalk between cell cycle regulators and the myogenic factor MyoD in skeletal myoblasts." Cell Mol Life Sci **58**(4): 571-579.
- Klug, K. M. and M. A. Muskavitch (1999). "Ligand-receptor interactions and trans-endocytosis of Delta, Serrate and Notch: members of the Notch signalling pathway in Drosophila." J Cell Sci **112** (Pt 19): 3289-3297.
- Komatsu, H., M. Y. Chao, et al. (2008). "OSM-11 facilitates LIN-12 Notch signaling during Caenorhabditis elegans vulval development." PLoS Biol **6**(8): e196.
- Kondoh, K., K. Sunadome, et al. (2007). "Notch signaling suppresses p38 MAPK activity via induction of MKP-1 in myogenesis." J Biol Chem **282**(5): 3058-3065.
- Kopan, R. (2012). "Notch signaling." Cold Spring Harb Perspect Biol **4**(10).
- Kopan, R. and M. X. Ilagan (2009). "The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism." Cell **137**(2): 216-233.
- Kopan, R., J. S. Nye, et al. (1994). "The intracellular domain of mouse Notch: a constitutively activated repressor of myogenesis directed at the basic helix-loop-helix region of MyoD." Development **120**(9): 2385-2396.
- Kovall, R. A. and S. C. Blacklow (2010). "Mechanistic insights into Notch receptor signaling from structural and biochemical studies." Curr Top Dev Biol **92**: 31-71.
- Krauss, R. S., F. Cole, et al. (2005). "Close encounters: regulation of vertebrate skeletal myogenesis by cell-cell contact." J Cell Sci **118**(Pt 11): 2355-2362.
- Krebs, L. T., M. L. Deftos, et al. (2001). "The Nrarp gene encodes an ankyrin-repeat protein that is transcriptionally regulated by the notch signaling pathway." Dev Biol **238**(1): 110-119.
- Kreppel, L. K., M. A. Blomberg, et al. (1997). "Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a unique O-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats." J Biol Chem **272**(14): 9308-9315.
- Kuang, S., S. B. Charge, et al. (2006). "Distinct roles for Pax7 and Pax3 in adult regenerative myogenesis." J Cell Biol **172**(1): 103-113.
- Kuang, S., K. Kuroda, et al. (2007). "Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle." Cell **129**(5): 999-1010.
- Kuang, S. and M. A. Rudnicki (2008). "The emerging biology of satellite cells and their therapeutic potential." Trends Mol Med **14**(2): 82-91.
- Kuroda, K., S. Tani, et al. (1999). "Delta-induced Notch signaling mediated by RBP-J inhibits MyoD expression and myogenesis." J Biol Chem **274**(11): 7238-7244.

L.

- Lafuste, P., C. Sonnet, et al. (2005). "ADAM12 and alpha9beta1 integrin are instrumental in human myogenic cell differentiation." Mol Biol Cell **16**(2): 861-870.
- Lagha, M., J. D. Kormish, et al. (2008). "Pax3 regulation of FGF signaling affects the progression of embryonic progenitor cells into the myogenic program." Genes Dev **22**(13): 1828-1837.
- Lamar, E., G. Deblandre, et al. (2001). "Nrarp is a novel intracellular component of the Notch signaling pathway." Genes Dev **15**(15): 1885-1899.

- Langley, B., M. Thomas, et al. (2002). "Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression." *J Biol Chem* **277**(51): 49831-49840.
- LaVoie, M. J. and D. J. Selkoe (2003). "The Notch ligands, Jagged and Delta, are sequentially processed by alpha-secretase and presenilin/gamma-secretase and release signaling fragments." *J Biol Chem* **278**(36): 34427-34437.
- Lee, S. J. (2004). "Regulation of muscle mass by myostatin." *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**: 61-86.
- Lee, S. J. and A. C. McPherron (2001). "Regulation of myostatin activity and muscle growth." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(16): 9306-9311.
- Lee, T. V., M. K. Sethi, et al. (2013). "Negative regulation of notch signaling by xylose." *PLoS Genet* **9**(6): e1003547.
- Leeson, S. and J. D. Summers (1984). "Influence of nutritional modification on skeletal size of Leghorn and broiler breeder pullets." *Poult Sci* **63**(6): 1222-1228.
- Leevers, S. J., D. Weinkove, et al. (1996). "The Drosophila phosphoinositide 3-kinase Dp110 promotes cell growth." *EMBO J* **15**(23): 6584-6594.
- Lei, L., A. Xu, et al. (2003). "An *O*-fucose site in the ligand binding domain inhibits Notch activation." *Development* **130**(26): 6411-6421.
- Leimeister, C., K. Dale, et al. (2000). "Oscillating expression of c-Hey2 in the presomitic mesoderm suggests that the segmentation clock may use combinatorial signaling through multiple interacting bHLH factors." *Dev Biol* **227**(1): 91-103.
- Lepper, C. and C. M. Fan (2010). "Inducible lineage tracing of Pax7-descendant cells reveals embryonic origin of adult satellite cells." *Genesis* **48**(7): 424-436.
- Li, P., T. Akimoto, et al. (2006). "Resident stem cells are not required for exercise-induced fiber-type switching and angiogenesis but are necessary for activity-dependent muscle growth." *Am J Physiol Cell Physiol* **290**(6): C1461-1468.
- Lin, J., H. B. Arnold, et al. (2002). "Myostatin knockout in mice increases myogenesis and decreases adipogenesis." *Biochem Biophys Res Commun* **291**(3): 701-706.
- Linkhart, T. A., C. H. Clegg, et al. (1981). "Myogenic differentiation in permanent clonal mouse myoblast cell lines: regulation by macromolecular growth factors in the culture medium." *Dev Biol* **86**(1): 19-30.
- Linkhart, T. A., C. H. Clegg, et al. (1980). "Control of mouse myoblast commitment to terminal differentiation by mitogens." *J Supramol Struct* **14**(4): 483-498.
- Lira-Navarrete, E., J. Valero-Gonzalez, et al. (2011). "Structural insights into the mechanism of protein *O*-fucosylation." *PLoS One* **6**(9): e25365.
- Logan, C. Y. and R. Nusse (2004). "The Wnt signaling pathway in development and disease." *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**: 781-810.
- Logeat, F., C. Bessia, et al. (1998). "The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(14): 8108-8112.
- Loriol, C., A. Audfray, et al. (2007). "The two N-glycans present on bovine Pofut1 are differently involved in its solubility and activity." *FEBS J* **274**(5): 1202-1211.
- Loriol, C., F. Dupuy, et al. (2006). "Molecular evolution of protein *O*-fucosyltransferase genes and splice variants." *Glycobiology* **16**(8): 736-747.
- Lu, J., T. A. McKinsey, et al. (2000). "Regulation of skeletal myogenesis by association of the MEF2 transcription factor with class II histone deacetylases." *Mol Cell* **6**(2): 233-244.
- Lubman, O. Y., M. X. Ilagan, et al. (2007). "Quantitative dissection of the Notch:CSL interaction: insights into the Notch-mediated transcriptional switch." *J Mol Biol* **365**(3): 577-589.
- Lubman, O. Y., S. V. Korolev, et al. (2004). "Anchoring notch genetics and biochemistry; structural analysis of the ankyrin domain sheds light on existing data." *Mol Cell* **13**(5): 619-626.
- Luo, Y. and R. S. Haltiwanger (2005). "*O*-fucosylation of notch occurs in the endoplasmic reticulum." *J Biol Chem* **280**(12): 11289-11294.
- Luo, Y., K. Koles, et al. (2006). "Protein *O*-fucosyltransferase 2 adds *O*-fucose to thrombospondin type 1 repeats." *J Biol Chem* **281**(14): 9393-9399.

- Luo, Y., A. Nita-Lazar, et al. (2006). "Two distinct pathways for *O*-fucosylation of epidermal growth factor-like or thrombospondin type 1 repeats." *J Biol Chem* **281**(14): 9385-9392.
- Luty, W. H., D. Rodeberg, et al. (2007). "Antiparallel segregation of notch components in the immunological synapse directs reciprocal signaling in allogeneic Th:DC conjugates." *J Immunol* **179**(2): 819-829.
- Lyons, G. E., M. Ontell, et al. (1990). "The expression of myosin genes in developing skeletal muscle in the mouse embryo." *J Cell Biol* **111**(4): 1465-1476.

M.

- MacDonald, B. T., M. Adamska, et al. (2004). "Hypomorphic expression of Dkk1 in the doubleridge mouse: dose dependence and compensatory interactions with Lrp6." *Development* **131**(11): 2543-2552.
- MacDonald, B. T., K. Tamai, et al. (2009). "Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases." *Dev Cell* **17**(1): 9-26.
- Manceau, M., J. Gros, et al. (2008). "Myostatin promotes the terminal differentiation of embryonic muscle progenitors." *Genes Dev* **22**(5): 668-681.
- Mankoo, B. S., N. S. Collins, et al. (1999). "Mox2 is a component of the genetic hierarchy controlling limb muscle development." *Nature* **400**(6739): 69-73.
- Masamizu, Y., T. Ohtsuka, et al. (2006). "Real-time imaging of the somite segmentation clock: revelation of unstable oscillators in the individual presomitic mesoderm cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(5): 1313-1318.
- Massari, M. E. and C. Murre (2000). "Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms." *Mol Cell Biol* **20**(2): 429-440.
- Matsuno, K., R. J. Diederich, et al. (1995). "Deltex acts as a positive regulator of Notch signaling through interactions with the Notch ankyrin repeats." *Development* **121**(8): 2633-2644.
- Matsuura, A., M. Ito, et al. (2008). "O-linked N-acetylglucosamine is present on the extracellular domain of notch receptors." *J Biol Chem* **283**(51): 35486-35495.
- Mauro, A. (1961). "Satellite cell of skeletal muscle fibers." *J Biophys Biochem Cytol* **9**: 493-495.
- Mayeuf, A. and F. Relaix (2011). "[Notch pathway: from development to regeneration of skeletal muscle]." *Med Sci (Paris)* **27**(5): 521-526.
- McCarthy, J. J. and K. A. Esser (2007). "Counterpoint: Satellite cell addition is not obligatory for skeletal muscle hypertrophy." *J Appl Physiol* (1985) **103**(3): 1100-1102; discussion 1102-1103.
- McCarthy, J. J., J. Mula, et al. (2011). "Effective fiber hypertrophy in satellite cell-depleted skeletal muscle." *Development* **138**(17): 3657-3666.
- McPherron, A. C., A. M. Lawler, et al. (1997). "Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member." *Nature* **387**(6628): 83-90.
- Meadows, E., J. H. Cho, et al. (2008). "Myogenin regulates a distinct genetic program in adult muscle stem cells." *Dev Biol* **322**(2): 406-414.
- Micchelli, C. A., E. J. Rulifson, et al. (1997). "The function and regulation of cut expression on the wing margin of *Drosophila*: Notch, Wingless and a dominant negative role for Delta and Serrate." *Development* **124**(8): 1485-1495.
- Miele, L. and B. Osborne (1999). "Arbiter of differentiation and death: Notch signaling meets apoptosis." *J Cell Physiol* **181**(3): 393-409.
- Miller, J. R. (2002). "The Wnts." *Genome Biol* **3**(1): REVIEWS3001.
- Mizuhara, E., T. Nakatani, et al. (2005). "MAGI1 recruits Dll1 to cadherin-based adherens junctions and stabilizes it on the cell surface." *J Biol Chem* **280**(28): 26499-26507.
- Mohr, O. L. (1919). "Character Changes Caused by Mutation of an Entire Region of a Chromosome in *Drosophila*." *Genetics* **4**(3): 275-282.
- Molkentin, J. D., A. B. Firulli, et al. (1996). "MEF2B is a potent transactivator expressed in early myogenic lineages." *Mol Cell Biol* **16**(7): 3814-3824.
- Moloney, D. J., V. M. Panin, et al. (2000). "Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch." *Nature* **406**(6794): 369-375.

- Moloney, D. J., L. H. Shair, et al. (2000). "Mammalian Notch1 is modified with two unusual forms of *O*-linked glycosylation found on epidermal growth factor-like modules." J Biol Chem **275**(13): 9604-9611.
- Monestier, O., C. Brun, et al. (2012). "Ubiquitous Gasp1 overexpression in mice leads mainly to a hypermuscular phenotype." BMC Genomics **13**: 541.
- Montagne, J., M. J. Stewart, et al. (1999). "Drosophila S6 kinase: a regulator of cell size." Science **285**(5436): 2126-2129.
- Morimoto, M., Y. Takahashi, et al. (2005). "The Mesp2 transcription factor establishes segmental borders by suppressing Notch activity." Nature **435**(7040): 354-359.
- Moss, F. P. and C. P. Leblond (1971). "Satellite cells as the source of nuclei in muscles of growing rats." Anat Rec **170**(4): 421-435.
- Mouly, V. and J. Beauchamp (2003). "[What is a satellite muscle cell?]." Med Sci (Paris) **19**(6-7): 696.
- Mourikis, P., S. Gopalakrishnan, et al. (2012). "Cell-autonomous Notch activity maintains the temporal specification potential of skeletal muscle stem cells." Development **139**(24): 4536-4548.
- Mukai, A., T. Kurisaki, et al. (2009). "Dynamic clustering and dispersion of lipid rafts contribute to fusion competence of myogenic cells." Exp Cell Res **315**(17): 3052-3063.
- Muller, J., N. A. Rana, et al. (2014). "*O*-fucosylation of the notch ligand mDLL1 by POFUT1 is dispensable for ligand function." PLoS One **9**(2): e88571.
- Muller, R., A. Jenny, et al. (2013). "The EGF repeat-specific *O*-GlcNAc-transferase Eogt interacts with notch signaling and pyrimidine metabolism pathways in Drosophila." PLoS One **8**(5): e62835.
- Mumm, J. S., E. H. Schroeter, et al. (2000). "A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1." Mol Cell **5**(2): 197-206.
- Munro, S. and M. Freeman (2000). "The notch signalling regulator fringe acts in the Golgi apparatus and requires the glycosyltransferase signature motif DXD." Curr Biol **10**(14): 813-820.
- Murphy, G. (2008). "The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment." Nat Rev Cancer **8**(12): 929-941.
- Musaro, A., K. McCullagh, et al. (2001). "Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle." Nat Genet **27**(2): 195-200.
- Musumeci, G., P. Castrogiovanni, et al. (2015). "Somitogenesis: From somite to skeletal muscle." Acta Histochem **117**(4-5): 313-328.

N.

- Nabeshima, Y., K. Hanaoka, et al. (1993). "Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect." Nature **364**(6437): 532-535.
- Naidu, P. S., D. C. Ludolph, et al. (1995). "Myogenin and MEF2 function synergistically to activate the MRF4 promoter during myogenesis." Mol Cell Biol **15**(5): 2707-2718.
- Nimmo, M. A. and D. H. Snow (1983). "Skeletal muscle fibre composition in new Zealand white rabbits, wild rabbits and wild rabbits bred in captivity: effect of heredity." Comp Biochem Physiol A Comp Physiol **74**(4): 955-959.
- Nishimura, H., S. Kawabata, et al. (1989). "Identification of a disaccharide (Xyl-Glc) and a trisaccharide (Xyl₂-Glc) *O*-glycosidically linked to a serine residue in the first epidermal growth factor-like domain of human factors VII and IX and protein Z and bovine protein Z." J Biol Chem **264**(34): 20320-20325.
- Nishimura, H., T. Takao, et al. (1992). "Human factor IX has a tetrasaccharide *O*-glycosidically linked to serine 61 through the fucose residue." J Biol Chem **267**(25): 17520-17525.
- Nishimura, H., S. Yamashita, et al. (1992). "Evidence for the existence of *O*-linked sugar chains consisting of glucose and xylose in bovine thrombospondin." J Biochem **111**(4): 460-464.
- Nishimura, M., F. Isaka, et al. (1998). "Structure, chromosomal locus, and promoter of mouse Hes2 gene, a homologue of Drosophila hairy and Enhancer of split." Genomics **49**(1): 69-75.

- Niwa, Y., Y. Masamizu, et al. (2007). "The initiation and propagation of Hes7 oscillation are cooperatively regulated by Fgf and notch signaling in the somite segmentation clock." Dev Cell **13**(2): 298-304.
- Noll, M. (1993). "Evolution and role of Pax genes." Curr Opin Genet Dev **3**(4): 595-605.
- Nowak, S. J., P. C. Nahirney, et al. (2009). "Nap1-mediated actin remodeling is essential for mammalian myoblast fusion." J Cell Sci **122**(Pt 18): 3282-3293.
- Nusse, R. (2012). "Wnt signaling." Cold Spring Harb Perspect Biol **4**(5).
- Oates, A. C., L. G. Morelli, et al. (2012). "Patterning embryos with oscillations: structure, function and dynamics of the vertebrate segmentation clock." Development **139**(4): 625-639.

O.

- Oginuma, M., Y. Takahashi, et al. (2010). "The oscillation of Notch activation, but not its boundary, is required for somite border formation and rostral-caudal patterning within a somite." Development **137**(9): 1515-1522.
- Ohtsuka, T., M. Ishibashi, et al. (1999). "Hes1 and Hes5 as notch effectors in mammalian neuronal differentiation." EMBO J **18**(8): 2196-2207.
- Oka, C., T. Nakano, et al. (1995). "Disruption of the mouse RBP-J kappa gene results in early embryonic death." Development **121**(10): 3291-3301.
- Okajima, T. and K. D. Irvine (2002). "Regulation of notch signaling by O-linked fucose." Cell **111**(6): 893-904.
- Okajima, T., A. Xu, et al. (2005). "Chaperone activity of protein O-fucosyltransferase 1 promotes notch receptor folding." Science **307**(5715): 1599-1603.
- Okamura, Y. and Y. Saga (2008). "Pofut1 is required for the proper localization of the Notch receptor during mouse development." Mech Dev **125**(8): 663-673.
- Okochi, M., H. Steiner, et al. (2002). "Presenilins mediate a dual intramembranous gamma-secretase cleavage of Notch-1." EMBO J **21**(20): 5408-5416.
- Olguin, H. C. and B. B. Olwin (2004). "Pax-7 up-regulation inhibits myogenesis and cell cycle progression in satellite cells: a potential mechanism for self-renewal." Dev Biol **275**(2): 375-388.
- Olguin, H. C., Z. Yang, et al. (2007). "Reciprocal inhibition between Pax7 and muscle regulatory factors modulates myogenic cell fate determination." J Cell Biol **177**(5): 769-779.
- Ontell, M. and K. Kozeka (1984). "The organogenesis of murine striated muscle: a cytoarchitectural study." Am J Anat **171**(2): 133-148.
- Oswald, F., S. Liptay, et al. (1998). "NF-kappaB2 is a putative target gene of activated Notch-1 via RBP-Jkappa." Mol Cell Biol **18**(4): 2077-2088.
- Oustanina, S., G. Hause, et al. (2004). "Pax7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells but not their specification." EMBO J **23**(16): 3430-3439.

P.

- Pallafacchina, G., B. Blaauw, et al. (2013). "Role of satellite cells in muscle growth and maintenance of muscle mass." Nutr Metab Cardiovasc Dis **23** Suppl 1: S12-18.
- Palmeirim, I., D. Henrique, et al. (1997). "Avian hairy gene expression identifies a molecular clock linked to vertebrate segmentation and somitogenesis." Cell **91**(5): 639-648.
- Panin, V. M., V. Papayannopoulos, et al. (1997). "Fringe modulates Notch-ligand interactions." Nature **387**(6636): 908-912.
- Panin, V. M., L. Shao, et al. (2002). "Notch ligands are substrates for protein O-fucosyltransferase-1 and Fringe." J Biol Chem **277**(33): 29945-29952.
- Parker, M. H., P. Seale, et al. (2003). "Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis." Nat Rev Genet **4**(7): 497-507.
- Pasut, A., A. E. Jones, et al. (2013). "Isolation and culture of individual myofibers and their satellite cells from adult skeletal muscle." J Vis Exp(73): e50074.

- Patapoutian, A., J. K. Yoon, et al. (1995). "Disruption of the mouse MRF4 gene identifies multiple waves of myogenesis in the myotome." Development **121**(10): 3347-3358.
- Patel, S. G., P. E. Funk, et al. (1999). "Regulation of avian fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR-1) gene expression during skeletal muscle differentiation." Gene **237**(1): 265-276.
- Peschon, J. J., J. L. Slack, et al. (1998). "An essential role for ectodomain shedding in mammalian development." Science **282**(5392): 1281-1284.
- Peter, J. B., R. J. Barnard, et al. (1972). "Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits." Biochemistry **11**(14): 2627-2633.
- Petrella, J. K., J. S. Kim, et al. (2006). "Efficacy of myonuclear addition may explain differential myofiber growth among resistance-trained young and older men and women." Am J Physiol Endocrinol Metab **291**(5): E937-946.
- Piccolino, M. (1999). "Marcello Malpighi and the difficult birth of modern life sciences." Endeavour **23**(4): 175-179.
- Pirot, P., L. A. van Grunsven, et al. (2004). "Direct regulation of the Nrarp gene promoter by the Notch signaling pathway." Biochem Biophys Res Commun **322**(2): 526-534.
- Pless, D. D. and W. J. Lennarz (1977). "Enzymatic conversion of proteins to glycoproteins." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(1): 134-138.
- Popovic, M., J. Bella, et al. (2011). "The interaction of Jagged-1 cytoplasmic tail with afadin PDZ domain is local, folding-independent, and tuned by phosphorylation." J Mol Recognit **24**(2): 245-253.
- Powell, J. A. (1973). "Development of normal and genetically dystrophic mouse muscle in tissue culture. I. Prefusion and fusion activities of muscle cells: phase contrast and time lapse study." Exp Cell Res **80**(2): 251-264.
- Pownall, M. E., M. K. Gustafsson, et al. (2002). "Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos." Annu Rev Cell Dev Biol **18**: 747-783.

Q.

- Qaisar, R., G. Renaud, et al. (2012). "Is functional hypertrophy and specific force coupled with the addition of myonuclei at the single muscle fiber level?" FASEB J **26**(3): 1077-1085.
- Qin, C., Z. Wang, et al. (2010). "Intracisternal A particle genes: Distribution in the mouse genome, active subtypes, and potential roles as species-specific mediators of susceptibility to cancer." Mol Carcinog **49**(1): 54-67.
- Quach, N. L., S. Biressi, et al. (2009). "Focal adhesion kinase signaling regulates the expression of caveolin 3 and beta1 integrin, genes essential for normal myoblast fusion." Mol Biol Cell **20**(14): 3422-3435.

R.

- Ramkumar, N., B. M. Harvey, et al. (2015). "Protein *O*-Glucosyltransferase 1 (POGLUT1) Promotes Mouse Gastrulation through Modification of the Apical Polarity Protein CRUMBS2." PLoS Genet **11**(10): e1005551.
- Rampal, R., J. F. Arboleda-Velasquez, et al. (2005). "Highly conserved *O*-fucose sites have distinct effects on Notch1 function." J Biol Chem **280**(37): 32133-32140.
- Rampal, R., A. S. Li, et al. (2005). "Lunatic fringe, manic fringe, and radical fringe recognize similar specificity determinants in *O*-fucosylated epidermal growth factor-like repeats." J Biol Chem **280**(51): 42454-42463.
- Rampal, R., K. B. Luther, et al. (2007). "Notch signaling in normal and disease States: possible therapies related to glycosylation." Curr Mol Med **7**(4): 427-445.
- Rana, N. A. and R. S. Haltiwanger (2011). "Fringe benefits: functional and structural impacts of *O*-glycosylation on the extracellular domain of Notch receptors." Curr Opin Struct Biol **21**(5): 583-589.
- Rana, N. A., A. Nita-Lazar, et al. (2011). "*O*-glucose trisaccharide is present at high but variable stoichiometry at multiple sites on mouse Notch1." J Biol Chem **286**(36): 31623-31637.

- Rand, M. D., L. M. Grimm, et al. (2000). "Calcium depletion dissociates and activates heterodimeric notch receptors." *Mol Cell Biol* **20**(5): 1825-1835.
- Rand, M. D., A. Lindblom, et al. (1997). "Calcium binding to tandem repeats of EGF-like modules. Expression and characterization of the EGF-like modules of human Notch-1 implicated in receptor-ligand interactions." *Protein Sci* **6**(10): 2059-2071.
- Ranganathan, P., K. L. Weaver, et al. (2011). "Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time." *Nat Rev Cancer* **11**(5): 338-351.
- Rangarajan, A., C. Talora, et al. (2001). "Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation." *EMBO J* **20**(13): 3427-3436.
- Rawls, A., J. H. Morris, et al. (1995). "Myogenin's functions do not overlap with those of MyoD or Myf-5 during mouse embryogenesis." *Dev Biol* **172**(1): 37-50.
- Rebay, I., R. J. Fleming, et al. (1991). "Specific EGF repeats of Notch mediate interactions with Delta and Serrate: implications for Notch as a multifunctional receptor." *Cell* **67**(4): 687-699.
- Rehfeldt, C. (2007). "In response to Point:Counterpoint: "Satellite cell addition is/is not obligatory for skeletal muscle hypertrophy"." *J Appl Physiol (1985)* **103**(3): 1104.
- Rehfeldt, C. and I. Fiedler (1984). "[Postnatal development of muscle fibers in growing skeletal muscles of laboratory mice]." *Arch Exp Veterinarmed* **38**(2): 178-192.
- Relaix, F., D. Montarras, et al. (2006). "Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells." *J Cell Biol* **172**(1): 91-102.
- Relaix, F., D. Rocancourt, et al. (2005). "A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells." *Nature* **435**(7044): 948-953.
- Rhodes, S. J. and S. F. Konieczny (1989). "Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family." *Genes Dev* **3**(12B): 2050-2061.
- Richmond, D. L. and A. C. Oates (2012). "The segmentation clock: inherited trait or universal design principle?" *Curr Opin Genet Dev* **22**(6): 600-606.
- Rommel, C., S. C. Bodine, et al. (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**(11): 1009-1013.
- Ronchini, C. and A. J. Capobianco (2001). "Induction of cyclin D1 transcription and CDK2 activity by Notch(ic): implication for cell cycle disruption in transformation by Notch(ic)." *Mol Cell Biol* **21**(17): 5925-5934.
- Ropka-Molik, K., R. Eckert, et al. (2011). "The expression pattern of myogenic regulatory factors MyoD, Myf6 and Pax7 in postnatal porcine skeletal muscles." *Gene Expr Patterns* **11**(1-2): 79-83.
- Rosenblatt, J. D., D. Yong, et al. (1994). "Satellite cell activity is required for hypertrophy of overloaded adult rat muscle." *Muscle Nerve* **17**(6): 608-613.
- Rowe, R. W. and G. Goldspink (1969). "Muscle fibre growth in five different muscles in both sexes of mice." *J Anat* **104**(Pt 3): 519-530.
- Rudnicki, M. A., T. Braun, et al. (1992). "Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development." *Cell* **71**(3): 383-390.
- Rudnicki, M. A. and R. Jaenisch (1995). "The MyoD family of transcription factors and skeletal myogenesis." *Bioessays* **17**(3): 203-209.
- Rudnicki, M. A., F. Le Grand, et al. (2008). "The molecular regulation of muscle stem cell function." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **73**: 323-331.
- Rudnicki, M. A., P. N. Schnegelsberg, et al. (1993). "MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle." *Cell* **75**(7): 1351-1359.

S.

- Sakaidani, Y., N. Ichianagi, et al. (2012). "O-linked-N-acetylglucosamine modification of mammalian Notch receptors by an atypical O-GlcNAc transferase Eogt1." *Biochem Biophys Res Commun* **419**(1): 14-19.

- Sakaidani, Y., T. Nomura, et al. (2011). "O-linked-N-acetylglucosamine on extracellular protein domains mediates epithelial cell-matrix interactions." *Nat Commun* **2**: 583.
- Sanchez-Irizarry, C., A. C. Carpenter, et al. (2004). "Notch subunit heterodimerization and prevention of ligand-independent proteolytic activation depend, respectively, on a novel domain and the LNR repeats." *Mol Cell Biol* **24**(21): 9265-9273.
- Sandri, M. (2008). "Signaling in muscle atrophy and hypertrophy." *Physiology (Bethesda)* **23**: 160-170.
- Sandri, M., C. Sandri, et al. (2004). "Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy." *Cell* **117**(3): 399-412.
- Sasamura, T., H. O. Ishikawa, et al. (2007). "The O-fucosyltransferase O-fut1 is an extracellular component that is essential for the constitutive endocytic trafficking of Notch in Drosophila." *Development* **134**(7): 1347-1356.
- Scata, K. A., D. W. Bernard, et al. (1999). "FGF receptor availability regulates skeletal myogenesis." *Exp Cell Res* **250**(1): 10-21.
- Schiaffino, S., S. P. Bormioli, et al. (1976). "The fate of newly formed satellite cells during compensatory muscle hypertrophy." *Virchows Arch B Cell Pathol* **21**(2): 113-118.
- Schiaffino, S., K. A. Dyar, et al. (2013). "Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy." *FEBS J* **280**(17): 4294-4314.
- Schiaffino, S. and C. Mammucari (2011). "Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models." *Skelet Muscle* **1**(1): 4.
- Schiaffino, S. and C. Reggiani (1996). "Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance." *Physiol Rev* **76**(2): 371-423.
- Schienda, J., K. A. Engleka, et al. (2006). "Somitic origin of limb muscle satellite and side population cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(4): 945-950.
- Schiffer, S. G., S. Foley, et al. (2001). "Fucosylation of Cripto is required for its ability to facilitate nodal signaling." *J Biol Chem* **276**(41): 37769-37778.
- Schroeter, E. H., J. A. Kisslinger, et al. (1998). "Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain." *Nature* **393**(6683): 382-386.
- Schultz, E., M. C. Gibson, et al. (1978). "Satellite cells are mitotically quiescent in mature mouse muscle: an EM and radioautographic study." *J Exp Zool* **206**(3): 451-456.
- Schuster-Gossler, K., B. Harris, et al. (2009). "Notch signalling in the paraxial mesoderm is most sensitive to reduced Pofut1 levels during early mouse development." *BMC Dev Biol* **9**: 6.
- Schwander, M., M. Leu, et al. (2003). "Beta1 integrins regulate myoblast fusion and sarcomere assembly." *Dev Cell* **4**(5): 673-685.
- Seale, P., L. A. Sabourin, et al. (2000). "Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells." *Cell* **102**(6): 777-786.
- Seed, J., B. B. Olwin, et al. (1988). "Fibroblast growth factor levels in the whole embryo and limb bud during chick development." *Dev Biol* **128**(1): 50-57.
- Serth, K., K. Schuster-Gossler, et al. (2003). "Transcriptional oscillation of lunatic fringe is essential for somitogenesis." *Genes Dev* **17**(7): 912-925.
- Sestan, N., S. Artavanis-Tsakonas, et al. (1999). "Contact-dependent inhibition of cortical neurite growth mediated by notch signaling." *Science* **286**(5440): 741-746.
- Shao, L., Y. Luo, et al. (2002). "O-glycosylation of EGF repeats: identification and initial characterization of a UDP-glucose: protein O-glycosyltransferase." *Glycobiology* **12**(11): 763-770.
- Shao, L., D. J. Moloney, et al. (2003). "Fringe modifies O-fucose on mouse Notch1 at epidermal growth factor-like repeats within the ligand-binding site and the Abruptex region." *J Biol Chem* **278**(10): 7775-7782.
- Sharma, A., A. Rangarajan, et al. (2013). "Antibodies against the extracellular domain of human Notch1 receptor reveal the critical role of epidermal-growth-factor-like repeats 25-26 in ligand binding and receptor activation." *Biochem J* **449**(2): 519-530.
- Shawber, C., D. Nofziger, et al. (1996). "Notch signaling inhibits muscle cell differentiation through a CBF1-independent pathway." *Development* **122**(12): 3765-3773.

- Shi, S. and P. Stanley (2003). "Protein *O*-fucosyltransferase 1 is an essential component of Notch signaling pathways." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(9): 5234-5239.
- Shimizu, K., S. Chiba, et al. (1999). "Mouse jagged1 physically interacts with notch2 and other notch receptors. Assessment by quantitative methods." J Biol Chem **274**(46): 32961-32969.
- Shimizu, K., S. Chiba, et al. (2001). "Manic fringe and lunatic fringe modify different sites of the Notch2 extracellular region, resulting in different signaling modulation." J Biol Chem **276**(28): 25753-25758.
- Sprinzak, D., A. Lakhanpal, et al. (2010). "Cis-interactions between Notch and Delta generate mutually exclusive signalling states." Nature **465**(7294): 86-90.
- Sriuranpong, V., M. W. Borges, et al. (2002). "Notch signaling induces rapid degradation of achaete-scute homolog 1." Mol Cell Biol **22**(9): 3129-3139.
- Stahl, M., K. Uemura, et al. (2008). "Roles of Pofut1 and *O*-fucose in mammalian Notch signaling." J Biol Chem **283**(20): 13638-13651.
- Stanley, P. (2007). "Regulation of Notch signaling by glycosylation." Curr Opin Struct Biol **17**(5): 530-535.
- Stanley, P. and T. Okajima (2010). "Roles of glycosylation in Notch signaling." Curr Top Dev Biol **92**: 131-164.
- Stanley, P., H. Schachter, et al. (2009). N-Glycans. Essentials of Glycobiology. A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko et al. Cold Spring Harbor (NY).
- Stauber, M., C. Sachidanandan, et al. (2009). "Differential axial requirements for lunatic fringe and Hes7 transcription during mouse somitogenesis." PLoS One **4**(11): e7996.
- Struhl, G. and A. Adachi (1998). "Nuclear access and action of notch in vivo." Cell **93**(4): 649-660.
- Struhl, G. and I. Greenwald (1999). "Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in *Drosophila*." Nature **398**(6727): 522-525.
- Summerbell, D., C. Halai, et al. (2002). "Expression of the myogenic regulatory factor Mrf4 precedes or is contemporaneous with that of Myf5 in the somitic bud." Mech Dev **117**(1-2): 331-335.
- Swatland, H. J. (1975). "Myofibre number and myofibrillar development in neonatal pigs." Zentralbl Veterinarmed A **22**(9): 756-763.
- Swiatek, P. J., C. E. Lindsell, et al. (1994). "Notch1 is essential for postimplantation development in mice." Genes Dev **8**(6): 707-719.

T.

- Tagami, S., M. Okochi, et al. (2008). "Regulation of Notch signaling by dynamic changes in the precision of S3 cleavage of Notch-1." Mol Cell Biol **28**(1): 165-176.
- Tajbakhsh, S. and M. E. Buckingham (1994). "Mouse limb muscle is determined in the absence of the earliest myogenic factor myf-5." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(2): 747-751.
- Takahashi, A., Y. Kureishi, et al. (2002). "Myogenic Akt signaling regulates blood vessel recruitment during myofiber growth." Mol Cell Biol **22**(13): 4803-4814.
- Takeuchi, H., R. C. Fernandez-Valdivia, et al. (2011). "Rumi functions as both a protein *O*-glucosyltransferase and a protein *O*-xylosyltransferase." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(40): 16600-16605.
- Takeuchi, H. and R. S. Haltiwanger (2010). "Role of glycosylation of Notch in development." Semin Cell Dev Biol **21**(6): 638-645.
- Takeuchi, H. and R. S. Haltiwanger (2014). "Significance of glycosylation in Notch signaling." Biochem Biophys Res Commun **453**(2): 235-242.
- Takeyama, K., R. C. Aguiar, et al. (2003). "The BAL-binding protein BBAP and related Deltex family members exhibit ubiquitin-protein isopeptide ligase activity." J Biol Chem **278**(24): 21930-21937.
- Taylor, P., H. Takeuchi, et al. (2014). "Fringe-mediated extension of *O*-linked fucose in the ligand-binding region of Notch1 increases binding to mammalian Notch ligands." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(20): 7290-7295.

- Thomas, M., B. Langley, et al. (2000). "Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation." *J Biol Chem* **275**(51): 40235-40243.
- Timmerman, L. A., J. Grego-Bessa, et al. (2004). "Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation." *Genes Dev* **18**(1): 99-115.
- Timson, B. F. (1982). "The effect of varying postnatal growth rate on skeletal muscle fiber number in the mouse." *Growth* **46**(1): 36-45.
- Tintignac, L. A., M. P. Leibovitch, et al. (2000). "Cyclin E-cdk2 phosphorylation promotes late G1-phase degradation of MyoD in muscle cells." *Exp Cell Res* **259**(1): 300-307.
- Trendelenburg, A. U., A. Meyer, et al. (2009). "Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size." *Am J Physiol Cell Physiol* **296**(6): C1258-1270.
- Trumpp, A., Y. Refaeli, et al. (2001). "c-Myc regulates mammalian body size by controlling cell number but not cell size." *Nature* **414**(6865): 768-773.

V.

- Vardar, D., C. L. North, et al. (2003). "Nuclear magnetic resonance structure of a prototype Lin12-Notch repeat module from human Notch1." *Biochemistry* **42**(23): 7061-7067.
- Vasyutina, E., D. C. Lenhard, et al. (2007). "RBP-J (Rbpsiuh) is essential to maintain muscle progenitor cells and to generate satellite cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(11): 4443-4448.
- Veigel, C. and C. F. Schmidt (2011). "Moving into the cell: single-molecule studies of molecular motors in complex environments." *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**(3): 163-176.
- Velica, P. and C. M. Bunce (2011). "A quick, simple and unbiased method to quantify C2C12 myogenic differentiation." *Muscle Nerve* **44**(3): 366-370.
- Vigneri, P. G., E. Tirro, et al. (2015). "The Insulin/IGF System in Colorectal Cancer Development and Resistance to Therapy." *Front Oncol* **5**: 230.
- Vivanco, I. and C. L. Sawyers (2002). "The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer." *Nat Rev Cancer* **2**(7): 489-501.
- von Maltzahn, J., N. C. Chang, et al. (2012). "Wnt signaling in myogenesis." *Trends Cell Biol* **22**(11): 602-609.

W.

- Wakabayashi, T. and B. De Strooper (2008). "Presenilins: members of the gamma-secretase quartets, but part-time soloists too." *Physiology (Bethesda)* **23**: 194-204.
- Walsh, C. P., J. R. Chaillet, et al. (1998). "Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation." *Nat Genet* **20**(2): 116-117.
- Wang, X. H. and W. E. Mitch (2014). "Mechanisms of muscle wasting in chronic kidney disease." *Nat Rev Nephrol* **10**(9): 504-516.
- Wang, Y., G. F. Lee, et al. (1996). "Identification of a GDP-L-fucose:polypeptide fucosyltransferase and enzymatic addition of O-linked fucose to EGF domains." *Glycobiology* **6**(8): 837-842.
- Wang, Y., L. Shao, et al. (2001). "Modification of epidermal growth factor-like repeats with O-fucose. Molecular cloning and expression of a novel GDP-fucose protein O-fucosyltransferase." *J Biol Chem* **276**(43): 40338-40345.
- Wang, Y. and M. W. Spellman (1998). "Purification and characterization of a GDP-fucose:polypeptide fucosyltransferase from Chinese hamster ovary cells." *J Biol Chem* **273**(14): 8112-8118.
- Wang, Y. X. and M. A. Rudnicki (2012). "Satellite cells, the engines of muscle repair." *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**(2): 127-133.
- Weidinger, G., C. J. Thorpe, et al. (2005). "The Sp1-related transcription factors sp5 and sp5-like act downstream of Wnt/beta-catenin signaling in mesoderm and neuroectoderm patterning." *Curr Biol* **15**(6): 489-500.
- Weng, A. P., J. M. Millholland, et al. (2006). "c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma." *Genes Dev* **20**(15): 2096-2109.

- Wharton, K. A., K. M. Johansen, et al. (1985). "Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats." Cell **43**(3 Pt 2): 567-581.
- Whelan, S. A. and G. W. Hart (2006). "Identification of *O*-GlcNAc sites on proteins." Methods Enzymol **415**: 113-133.
- White, R. B., A. S. Bierinx, et al. (2010). "Dynamics of muscle fibre growth during postnatal mouse development." BMC Dev Biol **10**: 21.
- Whitworth, G. E., W. F. Zandberg, et al. (2010). "Mammalian Notch is modified by D-Xyl-alpha1-3-D-Xyl-alpha1-3-D-Glc-beta1-O-Ser: implementation of a method to study *O*-glucosylation." Glycobiology **20**(3): 287-299.
- Williams, B. A. and C. P. Ordahl (1994). "Pax-3 expression in segmental mesoderm marks early stages in myogenic cell specification." Development **120**(4): 785-796.
- Wilson, J. J. and R. A. Kovall (2006). "Crystal structure of the CSL-Notch-Mastermind ternary complex bound to DNA." Cell **124**(5): 985-996.
- Wouters, M. A., I. Rigoutsos, et al. (2005). "Evolution of distinct EGF domains with specific functions." Protein Sci **14**(4): 1091-1103.
- Wu, H., A. Peisley, et al. (2007). "NFAT signaling and the invention of vertebrates." Trends Cell Biol **17**(6): 251-260.
- Wu, Y., C. Cain-Hom, et al. (2010). "Therapeutic antibody targeting of individual Notch receptors." Nature **464**(7291): 1052-1057.

X.

- Xia, W. and M. S. Wolfe (2003). "Intramembrane proteolysis by presenilin and presenilin-like proteases." J Cell Sci **116**(Pt 14): 2839-2844.
- Xu, A., N. Haines, et al. (2007). "In vitro reconstitution of the modulation of Drosophila Notch-ligand binding by Fringe." J Biol Chem **282**(48): 35153-35162.
- Xu, A., L. Lei, et al. (2005). "Regions of Drosophila Notch that contribute to ligand binding and the modulatory influence of Fringe." J Biol Chem **280**(34): 30158-30165.
- Xu, X., S. H. Choi, et al. (2015). "Insights into Autoregulation of Notch3 from Structural and Functional Studies of Its Negative Regulatory Region." Structure **23**(7): 1227-1235.

Y.

- Yang, W., Y. Zhang, et al. (2007). "Myostatin induces cyclin D1 degradation to cause cell cycle arrest through a phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/GSK-3 beta pathway and is antagonized by insulin-like growth factor 1." J Biol Chem **282**(6): 3799-3808.
- Yoon, J. K., E. N. Olson, et al. (1997). "Different MRF4 knockout alleles differentially disrupt Myf-5 expression: cis-regulatory interactions at the MRF4/Myf-5 locus." Dev Biol **188**(2): 349-362.

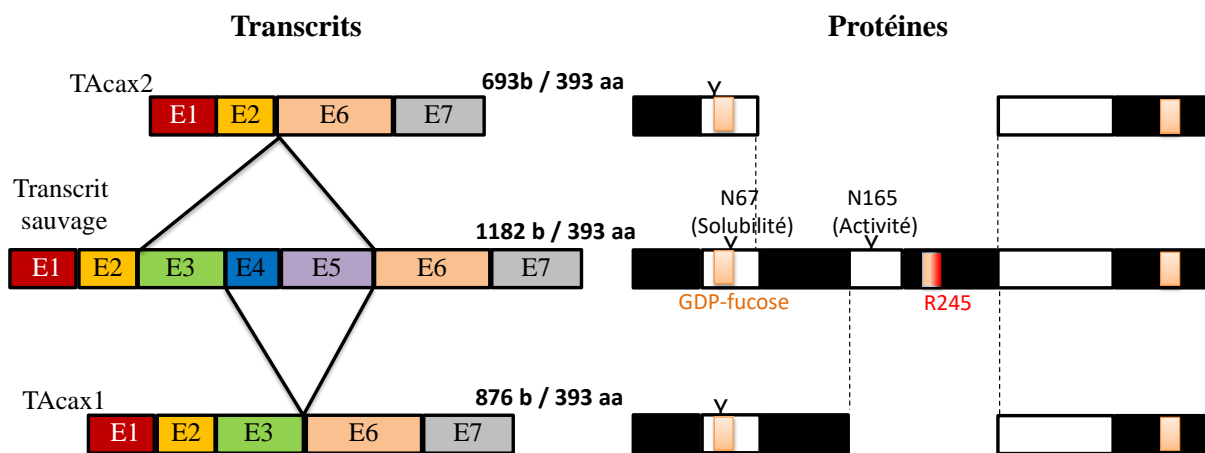
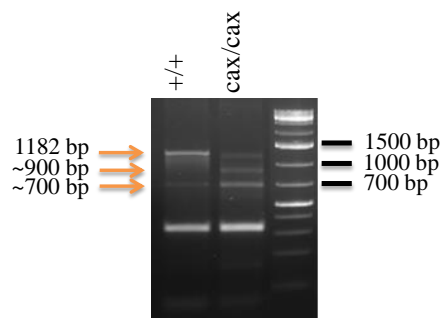
Z.

- Zammit, P. S., F. Relaix, et al. (2006). "Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells." J Cell Sci **119**(Pt 9): 1824-1832.
- Zeschnick, M., D. Kozian, et al. (1995). "Involvement of M-cadherin in terminal differentiation of skeletal muscle cells." J Cell Sci **108** (Pt 9): 2973-2981.
- Zhang, H., J. P. Stallock, et al. (2000). "Regulation of cellular growth by the Drosophila target of rapamycin dTOR." Genes Dev **14**(21): 2712-2724.
- Zhang, M. and I. S. McLennan (1995). "During secondary myotube formation, primary myotubes preferentially absorb new nuclei at their ends." Dev Dyn **204**(2): 168-177.
- Zhang, N. and T. Gridley (1998). "Defects in somite formation in lunatic fringe-deficient mice." Nature **394**(6691): 374-377.
- Zhang, W., R. R. Behringer, et al. (1995). "Inactivation of the myogenic bHLH gene MRF4 results in up-regulation of myogenin and rib anomalies." Genes Dev **9**(11): 1388-1399.
- Zhang, Y. E. (2009). "Non-Smad pathways in TGF-beta signaling." Cell Res **19**(1): 128-139.

- Zhuang, J., Q. Wei, et al. (2015). "Effects of ADAM10 deletion on Notch-1 signaling pathway and neuronal maintenance in adult mouse brain." Gene **555**(2): 150-158.
- Zweifel, M. E., D. J. Leahy, et al. (2005). "Structure and Notch receptor binding of the tandem WWE domain of Deltex." Structure **13**(11): 1599-1611.



ANNEXES



Annexe 1 : Nouveaux transcrits détectés.

Dans le pool des ADNc totaux issus des MDCS Pofut1^{+/+} et Pofut1^{cax/cax}, deux nouveaux variants d'épissages, non décrits dans les bases de données, ont été détectés par PCR avec des amorces d'extrémités (ATG et Stop) et séquencés. Les transcrits de 693 bases et de 876 bases ne contiennent pas la séquence correspondant respectivement aux exons 3 à 5 et aux exons 4 et 5. Ces deux transcrits, dont seul le transcrit à 876 bases est spécifique aux MDCS Pofut1^{cax/cax}, ne codent *a priori* pas de protéine fonctionnelle au regard des éléments manquants.

	Gène	Protéine	Code d'accès Uniprot	Nb EGF-like O-fucosylables/ Nb EGF-like totaux
1	AGRE1	Adhesion G protein-coupled receptor E1	Q61549	3/7
2	AGRIN	Agrin	A2ASQ1	2/4
3	ARAID	All-trans retinoic acid-induced differentiation	Q6PGD0	1/1
4	CELR2	Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 2	Q9R0M0	2/7
5	CELR3	Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3	Q91ZI0	1/8
6	CRUM1	Protein crumbs homolog 1	Q8VHS2	8/19
7	CRUM2	Protein crumbs homolog 2	Q80YA8	8/15
8	CSPG2	Versican core protein	Q62059	2/2
9	CUBN	Cubilin	Q9JLB4	4/7
10	DLK1	Protein delta homolog 1	Q09163	2/6
11	DLK2	Protein delta homolog 2	Q8K1E3	1/6
12	DLL1	Delta-like protein 1	Q61483	4/8
13	DLL3	Delta-like protein 3	O88516	2/6
14	DLL4	Delta-like protein 4	Q9JI71	5/8
15	DNER	Delta and Notch-like epidermal growth factor-related receptor	Q8JZM4	6/10
16	EDIL3	EGF-like repeat and discoidin I-like domain-containing protein 3	O35474	1/3
17	EGFL7	Epidermal growth factor-like protein 7	Q9QXT5	1/2
18	EGFLA	Pikachurin	Q4VBE4	2/3
19	FA7	Coagulation factor VII	P70375	1/2
20	FA12	Coagulation factor XII	Q80YC5	2/2
21	FAT3	Protocadherin Fat 3	Q8BNA6	3/4

22	FAT4	Protocadherin Fat 4	Q2PZL6	5/6
23	FBLN1	Fibulin-1	Q08879	3/9
24	FBLN2	Fibulin-2	P37889	3/11
25	FBN1	Fibrillin-1	Q61554	1/47
26	FBN2	Fibrillin-2	Q61555	2/47
27	Heg1	Protein HEG homolog 1	E9Q7X6	1/2
28	HGFA	Hepatocyte growth factor activator	Q9R098	2/2
29	JAG1	Protein jagged-1	Q9QXX0	11/16
30	JAG2	Protein jagged-2	Q9QYE5	9/16
31	LRP1	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	Q91ZX7	5/22
32	LRP2	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 2	A2ARV4	1/17
33	LTBP2	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 2	O08999	1/20
34	MEG10	Multiple epidermal growth factor-like domains protein 10	Q6DIB5	5/15
35	MEG11	Multiple epidermal growth factor-like domains protein 11	Q80T91	8/15
36	MEGF6	Multiple epidermal growth factor-like domains protein 6	Q80V70	11/21
37	MEGF8	Multiple epidermal growth factor-like domains protein 8	P60882	2/5
38	MFGM	Lactadherin	P21956	1/2
39	MUC13	Mucin-13	P19467	1/3
40	NCAN	Neurocan core protein	P55066	2/2
41	NELL1	Protein kinase C-binding protein NELL1	Q2VWQ2	1/5
42	NOTCH1	Neurogenic locus notch homolog protein 1	Q01705	20/36
43	NOTCH2	Neurogenic locus notch homolog protein 2	O35516	20/35
44	NOTCH3	Neurogenic locus notch homolog protein 3	Q61982	15/34
45	NOTCH4	Neurogenic locus notch homolog protein 4	P31695	18/29

46	PAMR1	Inactive serine protease PAMR1	Q8BU25	1/1
47	PEAR1	Platelet endothelial aggregation receptor 1	Q8VIK5	2/9
48	PGCB	Brevican core protein	Q61361	1/1
49	PROZ	Vitamin K-dependent protein Z	Q9CQW3	1/2
50	RELN	Reelin	Q60841	2/8
51	SLIT1	Slit homolog 1 protein	Q80TR4	2/9
52	SLIT2	Slit homolog 2 protein	Q9R1B9	3/9
53	SLIT3	Slit homolog 3 protein	Q9WVB4	3/9
54	SNED1	Sushi, nidogen and EGF-like domain-containing protein 1	Q70E20	10/15
55	STAB2	Stabilin-2	Q8R4U0	6/17
56	SVEP1	Polydom protein	A2AVA0	5/9
57	TEN1	Teneurin-1	Q9WTS4	1/8
58	TEN2	Teneurin-2	Q9WTS5	2/8
59	TEN3	Teneurin-3	Q9WTS6	1/8
60	TEN4	Teneurin-4	Q3UHK6	2/8
61	TPA	Tissue-type plasminogen activator	P11214	1/1
62	TSP3	Thrombospondin-3	Q05895	1/3
63	UROM	Uromodulin	Q91X17	2/3
64	VASN	Vasorin	Q9CZT5	1/1
65	VWA2	AMACO	Q70UZ7	2/2
66	WIF1	Wnt inhibitory factor 1	Q9WUA1	2/5

Annexe 2 : Protéines murines comportant des séquences potentielles de O-fucosylation de type C²X₄(S/T)C³ au sein de leurs répétitions EGF-like. La prédiction a été réalisée selon la méthode décrite dans Rampal et al., 2007. Le code d'accès Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) est indiqué ainsi que le nombre d'EGF-like potentiellement O-fucosylables pour chaque protéine.

Résumé

La **croissance musculaire postnatale** chez la souris s'effectue principalement par une **hypertrophie** et un allongement des fibres musculaires. L'augmentation de l'aire des fibres est contrôlée par plusieurs voies de signalisation telle que **la voie Notch**, qui est impliquée dans l'activation des **cellules satellites** (CS) en début de croissance musculaire postnatale chez la souris. La **O-fucosylation**, médiée par la protéine **O-fucosyltransférase 1 (POFUT1)**, des répétitions EGF-like de la partie extracellulaire des récepteurs **NOTCH** joue un rôle déterminant dans la modulation des interactions récepteur-ligand (R-L), nécessaires à l'activation de la voie Notch. Les souris **Pofut1^{cax/cax}** sont hypomorphes pour le gène *Pofut1* et nos résultats montrent, en plus de malformations squelettiques, une hypertrophie musculaire post-natale, pas d'hyperplasie et une réduction du pool de CS. Pour comprendre l'origine de cette hypertrophie, des cultures primaires de myoblastes dérivés de CS (**MDCS**) de muscles squelettiques ont été réalisées dans des conditions de prolifération ou de différenciation. Les MDCS *Pofut1^{cax/cax}* présentent une activité réduite de la signalisation Notch, due à une moins bonne interaction R-L provoquée par une **O-fucosylation amoindrie** des répétitions EGF-like. Il en résulte une diminution de l'expression de **Pax7**, marqueur de l'état indifférencié, et une dérégulation de l'expression des facteurs régulateurs de la myogenèse (**Myod**, **Myf5** et **Myogénine**). La conséquence ultime est la réduction de la proportion en progéniteurs Pax7+/MyoD- au profit de cellules Pax7-/MyoD+ engagées dans la différenciation. Ces observations sont en accord avec la **différenciation précoce** des MDCS *Pofut1^{cax/cax}*. Nos résultats indiquent que cette hypertrophie musculaire post-natale chez les souris *Pofut1^{cax/cax}* est due à une propension plus importante des CS activées à se différencier et à fusionner avec des fibres pré-existantes plutôt que retourner à l'état de quiescence.

Mots clés : Muscle, Hypertrophie, Cellules satellites, Notch, Pofut1.

Abstract

Postnatal muscle growth in mice mainly occurs by **hypertrophy** and by an increase of myofibres length. This increase in myofibres area is controlled by multiple signaling pathways such as **Notch signaling**, which is involved in activation of **satellite cells** (SC) at the beginning of postnatal muscle growth in mice. The **O-fucosylation** of EGF-like repeats within the extracellular domain of **NOTCH** receptors, mediated by protein **O-fucosyltransferase 1 (POFUT1)**, plays a key role in the modulation of receptor-ligand interactions (R-L), necessary for activation of Notch signaling. **Pofut1^{cax/cax}** mice are hypomorphic for the *Pofut1* gene. In addition to skeletal defects, our results show postnatal muscular hypertrophy, no hyperplasia and a reduced pool of SC. To understand the origin of this hypertrophy, primary cultures of myoblasts derived from SC (**SCDM**) from skeletal muscles were studied in proliferating and differentiating conditions. *Pofut1^{cax/cax}* SCDM showed a reduced Notch signaling due to a less efficient R-L interactions provoked by a low **O-fucosylation** of EGF-like repeats. This results in decreased expression of **Pax7**, a marker of undifferentiated state, and a change in the expression of myogenic regulatory factors (**Myod**, **Myf5** and **Myogenin**). Subsequently, the proportion of Pax7+/MyoD- progenitors decreased while the proportion of Pax7-/MyoD+ cells committed in differentiation increased. These findings corroborate **early differentiation** of *Pofut1^{cax/cax}* SCDM. Our results indicate that this postnatal muscle hypertrophy in *Pofut1^{cax/cax}* mice is due to the fact that activated satellite cells are more prone to differentiate and fuse with pre-existing myofibres that returning to quiescence.

Keywords : Muscle, Hypertrophy, Satellite cells, Notch, Pofut1