



Contrôle des voies de signalisation Wnt par R-spondin1 au cours de la régénération du muscle squelettique adulte

Floriane Lacour

► To cite this version:

Floriane Lacour. Contrôle des voies de signalisation Wnt par R-spondin1 au cours de la régénération du muscle squelettique adulte. Biologie cellulaire. Université Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. NNT : 2016USPCB035 . tel-01589664

HAL Id: tel-01589664

<https://theses.hal.science/tel-01589664>

Submitted on 18 Sep 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.

THESE

En vue de l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES

Discipline : Biologie Cellulaire
Ecole Doctorale : Bio Sorbonne Paris Cité

Présentée et soutenue publiquement par

FLORIANE LACOUR

Le 24 juin 2016

**CONTROLE DES VOIES DE SIGNALISATION WNT
PAR R-SPONDIN1 AU COURS DE LA REGENERATION
DU MUSCLE SQUELETTIQUE ADULTE**

Directeur de thèse : Fabien LE GRAND

Jury

Dr Delphine DUPREZ	Rapporteur
Dr Bénédicte CHAZAUD	Rapporteur
Dr Sabine COLNOT	Examineur
Dr Andreas SCHEDL	Examineur
Dr Slimane AIT-SI-ALI	Examineur

THESE

En vue de l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES

Discipline : Biologie Cellulaire
Ecole Doctorale : Bio Sorbonne Paris Cité

Présentée et soutenue publiquement par

FLORIANE LACOUR

Le 24 juin 2016

**CONTROLE DES VOIES DE SIGNALISATION WNT
PAR R-SPONDIN1 AU COURS DE LA REGENERATION
DU MUSCLE SQUELETTIQUE ADULTE**

Directeur de thèse : Fabien LE GRAND

Jury

Dr Delphine DUPREZ	Rapporteur
Dr Bénédicte CHAZAUD	Rapporteur
Dr Sabine COLNOT	Examineur
Dr Andreas SCHEDL	Examineur
Dr Slimane AIT-SI-ALI	Examineur

REMERCIEMENTS

Tout d'abord je voudrais remercier les membres de mon jury pour l'évaluation de mes travaux et leur disponibilité pour la soutenance de ma thèse. Je remercie particulièrement Delphine Duprez et Bénédicte Chazaud qui ont acceptées d'être rapporteurs de mon manuscrit et qui m'ont apportées de précieux commentaires et suggestions.

Bien sûr, j'ai une pensée particulière pour mon directeur de thèse, Fabien Le Grand, qui m'a accueilli dans sa petite équipe il y a 3 ans et demi. Ces années de Doctorat m'ont beaucoup fait évoluer professionnellement et personnellement. Je te remercie pour tout ce que tu m'as appris et pour avoir toujours répondu à mes questions scientifiques (je persiste à dire que tu es une encyclopédie vivante). Le travail a (parfois) été dur et je crois que nous avons battu le record de nouvelles hypothèses mais je suis ravie de présenter des résultats cohérents qui récompensent assez bien notre implication dans le projet. J'espère que tu vivras d'autres belles découvertes scientifiques telles que celle-ci dans le futur.

Je voulais également remercier Anne-Amandine Chassot pour sa disponibilité, sa gentillesse et son aide pour les expériences avec R-spondin1. Nos échanges ont été d'une grande richesse scientifique. Je tiens à remercier Marie-Claude Sincennes, Ketan Patel et Robert Mitchell pour avoir contribué à mon projet avec enthousiasme, malgré les centaines de kilomètres qui nous séparent.

Je remercie également Mr Delpech, directeur de l'Ecole Doctorale, et Marie-Ange Ventura pour leur écoute, leur soutien et leurs conseils précieux. Je remercie le DIM Biothérapies qui m'a permis d'effectuer mon Doctorat dans l'équipe de Fabien grâce à son programme de financement.

Je voulais remercier les membres de l'équipe de Pascal Maire qui m'ont également accueilli pendant les premières années de mon Doctorat. Cela a été un réel plaisir de travailler à vos côtés, de participer aux débats scientifiques, de discuter des derniers potins, de partager une mascotte au chocolat ... Merci à Pascal, Nassia, Maud, Stéphanie, Nathalie, Josiane, Ulduz, Gaëlle, Aikaterini, Christophe, Philippe, et à tous les autres et tous ceux qui sont partis. Je remercie également ceux qui ne sont pas dans l'équipe de Pascal Maire : Jocelyne (pour tous tes conseils sur les Western Blot et les photos de petits chatons), Jacques (notamment pour les débats que nous avons eu sur l'hygiène de la salle de culture), tous les membres des plateformes (Genom'ic, Imagerie ou Animalerie) pour leur aide et leur gentillesse.

D'une façon plus générale, je remercie toutes les personnes avec qui j'ai pu travailler, débattre des meilleures expériences à faire ou de la vie scientifique...

Enfin, j'aimerais remercier Alice, ma grande sœur de labo. Merci ma chère (comme tu dis) pour ton soutien. Nos conversations scientifiques... et non scientifiques me manquent. Scientifiquement, tu resteras pour moi la meilleure ! Merci de m'avoir transmis tes connaissances, ta rigueur de travail et fait partager ton esprit critique. Je te remercie également pour ton aide précieuse et d'avoir toujours répondu présente quand j'avais des questions ou besoin d'un avis. Pour tout cela, un grand merci à toi Alice ! D'un point de vu plus personnel, mes abdos aussi te remercient pour les quelques mois passés ensemble au cours de gym !

Je remercie également mes « amis de Cochin » comme je les appelle souvent. Merci à Rozenn, Nadia, Antoine et Sandrine pour les soirées et les restos qu'on a fait ensemble. Je pense que je me souviendrais longtemps de certaines soirées... Et je vous remercie pour m'avoir souvent écouté et soutenu.

Bien sûr, je ne peux pas écrire une page de remerciement sans penser à ma meilleure amie : Julie. Je me demande souvent ce que j'aurais fait si on ne s'était pas rencontré lors de notre première année de Faculté. Tous les jours je te raconte ce que je fais : les expériences qui fonctionnent, les cellules qui meurent, les réunions d'Institut où je ne comprends rien ... Je sais que la plupart du temps tu ne comprends pas tout à ce que je dis, mais ton soutien a été hyper important tout au long de ses années. Alors pour toi, tu as un grand merci !

Pour finir, je tiens à remercier ma famille. Sans vous, je ne serais pas ici aujourd'hui, c'est une certitude. Vous m'avez toujours soutenu, remonté le moral et écouté. Rien n'a été plus précieux que votre soutien pendant les années de mon Doctorat. Je sais que ces années ont parfois été difficiles pour vous. Je pense que je vous ai directement transmis mes doutes, mon stress ... ou ma joie. Merci Papa et Maman, pour toujours avoir pris soin de moi à la maison et m'avoir remonté le moral lorsque j'en avais besoin. Vos conseils ont toujours été d'une grande aide pour moi (et je les ai souvent écoutés même si je n'en avais pas l'air). Merci aussi à Carine, Thomas et Juliette qui me font toujours rire quand je les vois. Vous êtes mon « bol d'air ». Merci à vous tous pour la relecture de mon manuscrit (effectué en un temps record). Enfin, merci d'être là, et de croire en moi chaque jour.

Un grand merci à tous !

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
I. Physiologie Musculaire	1
I. 1) Le muscle squelettique	2
I. 2) Les cellules souches musculaires	9
I. 3) La myogenèse.....	21
II. Les voies Wnt.....	29
II. 1) Les intervenants de la signalisation Wnt.....	29
II. 2) Les voies non-canoniques	35
II. 3) La voie canonique	40
II. 4) Une compétition entre les voies Wnt ?	48
II. 5) Les voies Wnt dans le muscle squelettique.....	50
II. 6) Les voies Wnt dans l'organisme adulte	55
II. 7) Maladies et thérapies.....	59
III. Les protéines R-spondins	63
III. 1) Les ligands R-spondins et leurs récepteurs Lgr	63
III. 2) R-spondin et les voies Wnt	67
III. 3) Les protéines R-spondins dans la myogenèse.....	72
III. 4) L'expression des R-spondins dans l'embryogénèse et les tissus adultes	74
IV. Objectifs du projet de Thèse	82
MATERIELS ET METHODES.....	85
I. Préparation du tissu animal	85
I. 1) Souris mutantes <i>Rspo1</i>	85
I. 2) Régénération musculaire	85
I. 3) Préparation des coupes de muscles	86
I. 4) Extraction des myoblastes primaires.....	87
II. Culture cellulaire.....	88
II. 1) Coating	88

II. 2) Milieux de culture et concentration cellulaire	88
II. 3) Traitement des cellules	89
II. 4) Scratch assay	91
II. 5) Vidéo-microscopie	91
III. Histologie.....	92
III. 1) Immunofluorescence	92
III. 2) Coloration Hematoxyline/Eosine	95
IV. Biologie moléculaire et biochimie.....	96
IV. 1) Extraction d'ADN	96
IV. 2) Génotypage.....	96
IV. 3) Extraction d'ARN.....	98
IV. 4) Transcription Réverse.....	99
IV. 5) qPCR.....	100
IV. 6) Extraction des protéines	102
IV. 7) Dosage des protéines	103
IV. 8) Western Blot.....	104
V. Méthodes d'Analyses	106
V. 1) Analyse du transcriptome par puce Affymetrix.....	106
V. 2) Programmes informatiques et logiciels	106
V. 3) Plateformes	106
V. 4) Microscopes.....	107
RESULTATS.....	109
I. Phénotype des souris hétérozytes Rspo1^{+/-}	109
I. 1) L'hétérozygotie n'altère pas l'homéostasie du muscle sain	109
I. 2) L'hétérozygotie n'affecte pas le processus de régénération musculaire.....	111
II. Implication de R-spondin1 dans le muscle squelettique	113
II. 1) La protéine R-spondin1 ne contrôle pas l'homéostasie du tissu musculaire sain.....	113
II. 2) Rspo1 induit la différenciation des cellules satellites lors des étapes précoces de régénération musculaire.....	115
II. 3) R-spondin1 régule la fusion des précurseurs myogéniques	117
II. 4) La protéine R-spondin1 inhibe le processus de fusion cellulaire	

à un stade tardif de régénération musculaire	119
III. Rôle de R-spondin1 dans les cellules primaires	123
III. 1) R-spondin1 n'affecte pas la morphologie des cellules primaires	123
III. 2) La protéine R-spondin1 ne contrôle pas l'auto-renouvellement des myoblastes	123
III. 3) R-spondin1 favorise l'engagement des cellules dans le lignage myogénique	125
III. 4) R-spondin1 régule la migration des cellules différenciées	127
III. 5) La protéine R-spondin1 contrôle la fusion des précurseurs myogéniques	129
IV. Contrôle des voies Wnt par R-spondin1	131
IV. 1) R-spondin1 régule la différenciation cellulaire par la potentialisation de la voie Wnt/ β -caténine	131
IV. 2) R-spondin1 contrôle la migration et la fusion cellulaire par l'inhibition de la voie Wnt7a/Fzd7	133
DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES.....	137
I. R-spondin1 pendant la myogenèse développementale.....	139
II. R-spondin1 pendant la myogenèse régénérative	140
II. 1) La dynamique des cellules satellites	140
II. 2) L'engagement dans le lignage myogénique.....	140
II. 3) Formation de nouvelles fibres musculaires.....	141
III. La signalisation Wnt est régulée par R-spondin1	142
III. 1) Activation de la voie Wnt/ β -caténine	142
III. 2) Inhibition de la voie Wnt7a/Fzd7	143
III. 3) L'interaction des voies Wnt	144
IV. Expression de R-spondin1	145
V. R-spondin1 agit-il sur les autres cellules résidentes dans le muscle squelettique ?	146
VI. Thérapie	148
ANNEXES.....	151
BIBLIOGRAPHIE	167

TABLE DES FIGURES

Figure 1. Les divers composants du muscle squelettique adulte	3
Figure 2. Schéma d'une myofibre	5
Figure 3. Organisation du sarcomère	7
Figure 4. Expression des différents marqueurs géniques au cours de la progression myogénique de la cellule satellite	14
Figure 5. Division asymétrique et symétrique des cellules souches musculaires	18
Figure 6. Les étapes du développement musculaire	23
Figure 7. La régénération du tissu squelettique (Hematoxylin et Eosine)	26
Figure 8. Etapes de la régénération musculaire	28
Figure 9. Les voies Wnt	32
Figure 10. Les corécepteurs de la voie Wnt	34
Figure 11. La voie Wnt/PCP	37
Figure 12. La régulation de la voie Wnt/ β -caténine	42
Figure 13. Régulation de la transcription des gènes cibles de Wnt	46
Figure 14. Les voies de signalisation Wnt régulent la myogenèse régénérative	53
Figure 15. Les voies non-canoniques contribuent à la régénération musculaire	55
Figure 16. La structure des protéines R-spondins humaines	66
Figure 17. La voie Wnt/ β -caténine potentialisée par R-spondin/Lgr	69
Figure 18. Rôle des R-spondins dans la myogenèse	73
Figure 19. Rôle des Lgr5/R-spondin dans la régénération de l'épithélium intestinal	78
Figure 20. L'hétérozygotie Rspo1 n'altère pas l'homéostasie du muscle sain	110
Figure 21. L'hétérozygotie Rspo1 n'altère pas la régénération du Tibialis Antérieur, 21 jours après l'injection de Cardiotoxine	112
Figure 22. Une absence d'expression de Rspo1 dans le muscle squelettique sain ne perturbe pas l'organisation du tissu	114
Figure 23. R-spondin1 est nécessaire pour la différenciation des cellules souches, 4 jours après l'injection de Cardiotoxine	116

Figure 24. R-spondin1 limite la fusion des cellules souches, 7 jours après l'injection de Cardiotoxine	118
Figure 25. R-spondin1 limite la fusion cellulaire et la taille des myofibres, 62 jours après l'injection de Cardiotoxine	120
Figure 26. Une absence de R-spondin1 n'altère pas la morphologie des cellules primaires	122
Figure 27. R-spondin1 n'altère pas la prolifération des cellules musculaires primaires	124
Figure 28. R-spondin1 contrôle l'initiation de la différenciation des myoblastes	126
Figure 29. R-spondin1 contrôle la motilité des cellules musculaires	128
Figure 30. Une absence de R-spondin1 améliore la fusion cellulaire	130
Figure 31. Une absence de R-spondin1 altère la différenciation des myoblastes par l'inhibition de la stimulation de la voie Wnt/ β -caténine	132
Figure 32. Une absence de R-spondin1 stimule l'activation de la voie Wnt7a/Fzd7	134
Figure 33. R-spondin1 est nécessaire pour maintenir un équilibre de l'activation entre les voies Wnt	138

TABLE DES TABLEAUX

Table 1. Concentration des réactifs pour le traitement avec des siRNA	90
Table 2. Quantité et Réactif pour l'incorporation EdU	94
Table 3. Liste des Anticorps Primaires utilisés pour les Immunomarquages	95
Table 4. Liste des Anticorps Secondaires utilisés pour les Immunomarquages	95
Table 5 : Séquences et localisations des amorces utilisées pour la PCR	97
Table 6. Quantité des réactifs nécessaires pour la PCR (par point)	97
Table 7. Protocole de PCR	97
Table 8. Quantité des réactifs nécessaires pour la PCR (par point)	98
Table 9. Protocole de PCR	98
Table 10. Quantité des réactifs nécessaires pour la Transcription Réverse (par point)	100
Table 11. Protocole de Transcription Réverse	100
Table 12. Quantité des réactifs nécessaires pour la PCR quantitative (par point)	100
Table 13. Protocole de PCR quantitative	101
Table 14. Liste des séquences des amorces	102
Table 15. Gamme de BSA	103
Table 16. Liste des Anticorps primaires utilisés pour le Western Blot	105

ABREVIATIONS

Les protéines et gènes portent leur nom anglais

ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPK	Protein Kinase, AMP-Activated
APC	Adenomatous Polyposis Coli
ARN	Acide ribonucléique
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMP4	Bone Morphogenetic Protein 4
CAMKII	Calcium/Calmodulin-Dependent Protein 2Kinase
CBP	CREB Binding Protein
CKI	Casein Kinase 1
DAAM1	Dishevelled Associated Activator Of Morphogenesis 1
Dkk1	Dickkopf WNT Signaling Pathway Inhibitor 1
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dNTP	Désoxyribonucléotides
EDL	Extensor digitorum longus muscle
FBS	Fœtal Bovin Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
FOXO1	Forkhead Box O1
FRP	Secreted Frizzled-Related Protein 1
FSHR	Follicle Stimulating Hormone Receptor
Fzd	Frizzled
GBP	Guanylate Binding Protein
GSK3	Glycogen Synthase Kinase 3
HDAC	Histone Deacetylase
HEK293T	Human Embryonic Kidney 293 cells
Het	Hétérozygote
HGF	Hepatocyte Growth Factor
IGF	Insulin-Like Growth Factor
IQGAP	Q Motif Containing GTPase Activating Protein
LEF1	Lymphoid Enhancer-Binding Factor 1
Lgr	Leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor
LRP	Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein
Mef2a	Myocyte Enhancer Factor 2A
MgCl2	Chlorure de magnésium
mL	Millilitre
mLST8	MTOR Associated Protein, LST8 Homolog
MRF	Muscle regulatory factor
mTOR	Mechanistic Target Of Rapamycin
Myf5	Myogenic Factor 5

MyoD	Myogenic Differentiation
NFAT	Nuclear Factor Of Activated T-Cells
NLK	Nemo-Like Kinase
Pax	Paired Box
PCP	Planar cell polarity
PFA	Paraformaldehyde
PKC	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase C
PTK7	Protein Tyrosine Kinase 7
Qsp	Quantité suffiante pour
Rac1	Ras-Related C3 Botulinum Toxin Substrate 1
Raptor	Regulatory Associated Protein Of MTOR
RhoA	Ras Homolog Family Member A
ROCK	Rho-Associated, Coiled-Coil Containing Protein Kinase
ROR	RAR-Related Orphan Receptor
rpm	Tour par minute
Rspo	R-spondin
RYK	Receptor-Like Tyrosine Kinase
Ryk	Receptor-Like Tyrosine Kinase
Siah2	Siah E3 Ubiquitin Protein Ligase 2
Six1	SIX Homeobox 1
SOX9	SRY (Sex Determining Region Y)-Box 9
SRY	Sex Determining Region Y
TA	Tibialis Antérieur
TAK1	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 7
TCF	Transcription Factor (T-Cell Specific, HMG-Box)
TSHR	hyroid Stimulating Hormone Receptor
µL	Microlitre
Vegf	Vascular Endothelial Growth Factor
WIF1	WNT Inhibitory Factor 1
Wnt	Wingless-Type MMTV Integration Site Family
WT	Sauvage
Znrf3	Zinc And Ring Finger 3

RESUME

Le muscle squelettique adulte a une importante capacité à se régénérer après une lésion. La régénération musculaire dépend de divers signaux moléculaires tels que l'activation de la signalisation Wnt dans les cellules souches musculaires, appelées cellules satellites. Les protéines R-spondins (Rspo) composent une famille de quatre protéines qui ont un rôle d'activateurs/potentialisateurs sur les voies Wnt dans les cellules souches de différents tissus. Bien qu'il soit connu que ces protéines sont importantes pour la régénération de ces tissus, leur rôle dans la myogenèse régénérative n'a pas été étudié à ce jour. L'expression génique de R-spondin1 étant sur-régulée par Pax7, le marqueur des cellules satellites, nous avons émis l'hypothèse que R-spondin1 participe à la régénération musculaire.

Nous avons, tout d'abord, isolé les cellules souches musculaires des modèles murins d'invalidation constitutive pour Rspo1 et avons observé qu'une déficience de R-spondin1 n'altère pas le cycle cellulaire de ces cellules. Cependant, une altération de l'expression de Rspo1 induit un défaut global de la cinétique de différenciation myogénique. Nous montrons que R-spondin1 inhibe la fusion des cellules musculaires puisque les myotubes déficients pour R-spondin1 possèdent un plus grand nombre de noyaux. Nous avons ensuite induit la régénération du muscle squelettique Tibialis Antérieur par une injection de Cardiotoxine et nous avons analysé les muscles à différents temps de régénération. Nos données prouvent qu'en l'absence de R-spondin1, les cellules souches présentent un retard de différenciation alors qu'elles possèdent une plus grande capacité de fusion, ayant pour conséquence une hypertrophie des myofibres dans le muscle.

Concordant au rôle de R-spondin dans les cellules souches intestinales ou dans le follicule pileux, la protéine R-spondin1 stimule l'expression des gènes cibles de la voie Wnt canonique dans les cellules souches musculaires. Nous avons mis en évidence que R-spondin1 potentialise la voie Wnt canonique et régule négativement l'activation de la voie non-canonique dans les cellules. Nos résultats démontrent que la protéine R-spondin1 contribue à la régénération du muscle squelettique adulte par la régulation de l'activation des voies Wnt.

ABSTRACT

Adult mammalian skeletal muscles have the remarkable ability to repair after injury. Muscle regeneration depends on various cellular and molecular responses, such as activation of Wnt signaling pathways in muscle stem cells called satellite cells. R-spondin (Rspo) proteins are able to potentiate Wnt signaling pathways *in vivo* in many stem cells and play important role for regeneration of several tissues. The role of R-spondin in injury-induced myogenesis has not been studied. Given that R-spondin1 gene expression is up-regulated by Pax7, the satellite cell-specific transcription factor, we explored the hypothesis that R-spondin1 plays a role during skeletal muscle regeneration.

We firstly isolated primary myoblasts from *Rspo1* constitutive knock-out mice and observed that a depletion of Rspo1 did not alter cell cycle of these cells. However, a lack of R-spondin1 on cells resulted in global alteration of differentiation kinetics. We found that R-spondin1 inhibits muscle cell fusion, as *Rspo1* knock-out myotubes contain an higher number of myonuclei. Then, we injured the Tibialis Anterior (TA) muscle of *Rspo1-null* mice and littermates controls by Cardiotoxin injection and analyzed muscle regeneration at different time points following injury. Our data show that R-spondin1 removal results in a delay of stem cell differentiation. In contrast, a R-spondin1 deficiency leads to better cell capacity to fuse to damaged myofibers, giving rise to myofiber hypertrophy.

As with other tissue-specific stem cells, such as hair follicle or intestinal crypt stem cells, R-spondin1 potentiates canonical Wnt signaling target genes expression in muscle stem cells. We proved that R-spondin1 potentiates canonical Wnt signaling target genes expression and negatively regulates non-canonical signaling in muscle stem cells. Our results demonstrate that R-spondin1 is crucial for adult muscle regeneration through a tightly cross-talk regulation between Wnt signalings.

INTRODUCTION

I. Physiologie Musculaire

Les animaux sont des êtres vivants organisés ayant entre autre la capacité de se déplacer. Pour la grande majorité des animaux, le déplacement s'effectue grâce aux mouvements musculaires. L'acquisition des cellules musculaires au cours de l'évolution des espèces est apparue chez les Métazoaires. Cependant, certains clades comme les Porifera sont dépourvus de muscles (Lorenz et al., 1996).

Les vertébrés ont acquis deux types de muscles : les muscles striés et les muscles lisses. Les muscles lisses sont des muscles à mouvements involontaires et nécessaires à la circulation sanguine, à la digestion et à la respiration (www.institut-myologie.org). Les muscles striés peuvent être squelettiques (et reliés aux os grâce aux tendons) ou peauciers. Les muscles squelettiques permettent notamment le mouvement ou la locomotion du corps, puisque la contraction de ces muscles est volontaire et est directement contrôlée par l'influx nerveux (Sunderland and Ray, 1950). Le muscle cardiaque, bien que strié, est considéré comme un muscle à contraction involontaire et permet la contraction du cœur afin de propulser le sang dans les vaisseaux sanguins.

Pendant mon Doctorat, j'ai principalement étudié le muscle Tibialis Antérieur, qui est un muscle squelettique de la patte arrière de la souris. Le muscle squelettique est un tissu organisé qui contient plusieurs types cellulaires nécessaires pour le maintien de son homéostasie. Cette hétérogénéité cellulaire contribue, entre autre, à sa régénération après une blessure. En effet, le muscle possède une importante capacité à se régénérer chez l'individu adulte. Les cellules souches musculaires participent à la formation du muscle au stade embryonnaire et à sa réparation au stade adulte.

Malgré le fort potentiel de régénération que possède le muscle, une désorganisation dans sa structure peut engendrer des maladies ou de graves malformations.

I. 1) Le muscle squelettique

Le corps humain comprend plus de 600 muscles squelettiques. Un muscle squelettique est contractile, excitable, extensible et élastique (www.afm-telethon.fr). La contractilité est la faculté qui permet au muscle à se contracter avec force tandis que l'excitabilité lui permet de répondre à un stimulus. L'extensibilité et l'élasticité sont respectivement la propriété qu'un muscle a de s'étirer au delà de sa longueur de repos, et la faculté musculaire à reprendre la longueur de repos après une contraction.

Organisation du muscle squelettique

Chez les vertébrés, un muscle squelettique est protégé par une couche de tissu conjonctif (Figure 1) appelée épimysium (classes.midlandstech.edu). Le muscle se compose de plusieurs faisceaux de fibres musculaires (www.afm-telethon.fr), appelées myofibres, pourvues d'une multitude d'unités contractiles. Les myofibres sont des cellules plurinucléées résultant de la fusion de plusieurs milliers de cellules mononucléées au cours du développement embryonnaire ou au cours de la régénération musculaire après la naissance. Ainsi, une fibre musculaire peut mesurer plusieurs dizaines de centimètres de longueur et jusqu'à 100 µm de diamètre. Les noyaux sont localisés à la périphérie de chaque myofibre. Plusieurs dizaines de fibres musculaires sont rassemblées en faisceaux et entourées par le péri-mysium (classes.midlandstech.edu). L'endomysium sépare chaque fibre musculaire. La fibre musculaire est entourée de la lame basale et du sarcolemme (Figure 2). Tous les organites nécessaires au fonctionnement musculaire comme les

nombreuses mitochondries et le réticulum sarcoplasmique sont localisés dans le cytoplasme de la myofibre appelé sarcoplasme.

Les cellules souches musculaires sont localisées à la périphérie des fibres musculaires. Leur nom de **cellules satellites** provient de leur localisation le long de la fibre puisqu'elles sont nichées à la périphérie de celle-ci entre la lame basale et le sarcolemme (Mauro, 1961). A l'état homéostatique du muscle adulte, les cellules satellites sont quiescentes. Leur prolifération est contrôlée puisque leur activation et leur entrée dans le cycle cellulaire ne s'effectuent que pour régénérer le muscle en cas de nécessité (Buckingham and Relaix, 2007). Certaines cellules restent alors indifférenciées et permettent le maintien et le renouvellement de la population des cellules satellites.

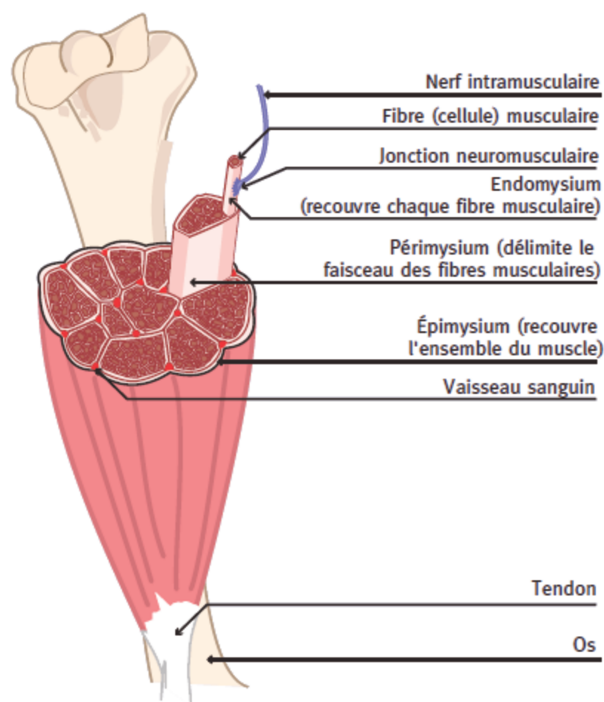


Figure 1. Les divers composants du muscle squelettique adulte

Le muscle squelettique est relié aux os par les tendons. Plusieurs couches de tissu conjonctif (endomysium, périmysium et épimysium) permettent la protection du muscle.

D'après "Repères et Comprendre" de www.afm-telethon.fr

Dans le muscle squelettique, il existe différents types de fibres : les fibres de type I, type IIa et type IIb (Braun and Gautel, 2011). Selon la fonction et la localisation anatomique du muscle, la composition du type de myofibres qui le compose peut varier. En 1970, Brooke a défini un typage de fibres sur l'activité

ATPasique des myofibres et les enzymes du métabolisme (Brooke and Kaiser, 1970). Aujourd'hui, le typage de fibre est principalement détecté par Immunofluorescence pour les isoformes I, IIa ou IIb de la protéine Myosine Heavy Chain (MyHC) (Braun and Gautel, 2011). Les fibres de type I sont appelées fibres lentes puisqu'elles possèdent une faible activité ATPasique, contiennent beaucoup de mitochondries et utilisent principalement la phosphorylation oxydative pour produire l'ATP (Adénosine Triphosphate) nécessaire à leur contraction (Roy et al., 2008). De plus, la vascularisation est très développée autour de ces fibres. Ces dernières ont une forte résistance à la fatigue et sont principalement retrouvées dans les muscles posturaux.

Les fibres de type II sont à l'inverse appelées fibres rapides. Elles possèdent moins de mitochondries et sont moins vascularisées que les fibres de type I. De plus, elles ont un métabolisme glycolytique (Roy et al., 2008). La vitesse de contraction des fibres rapides est trois fois plus importante que celle des fibres lentes. Les fibres de type IIa ont à la fois un grand potentiel de contraction et de résistance à la fatigue. Elles sont souvent appelées fibres intermédiaires car elles possèdent une coloration intermédiaire entre les fibres de type I et de type IIb. On les retrouve principalement dans les muscles inférieurs (de la jambe). Les fibres de type IIb se contractent rapidement mais sont sensibles à la fatigue. On les retrouve dans les muscles inférieurs principalement (du bras).

La plupart des muscles squelettiques sont composés d'une combinaison de tous les types de fibres (Roy et al., 2008). Lors d'un effort léger, les fibres de type I seront sollicitées, tandis que lors d'un effort plus soutenu, les fibres de type IIb se contracteront. Enfin, lors d'un effort intense, les fibres IIa permettront une meilleure résistance musculaire contre la fatigue. Selon l'effort physique régulier de l'individu, un typage de fibre peut devenir prédominant dans le muscle. Par exemple, un sportif pratiquant régulièrement un sport d'endurance modifiera progressivement le typage de ses fibres en type I.

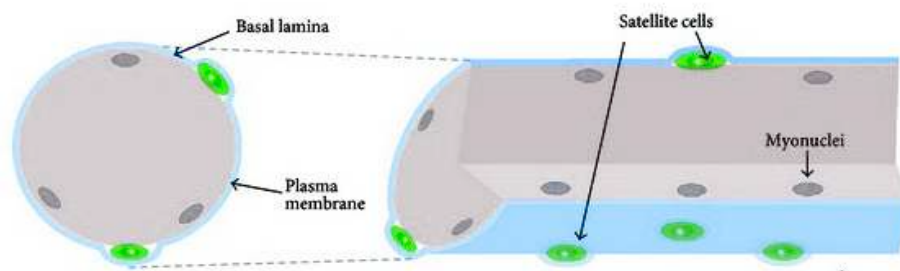


Figure 2. Schéma d'une myofibre

Les cellules satellites, en vert, sont nichées entre la lame basale et le sarcosome. Les noyaux sont localisés à la périphérie de la myofibre.
D'après Fujimaki et al., 2013

Contraction musculaire

La contraction du muscle strié provient de la contraction coordonnée des fibres musculaires, tout d'abord initiée par un signal nerveux puis poursuivie par une cascade moléculaire.

Les myofibrilles sont les structures musculaires qui permettent la contraction volontaire du muscle squelettique. Elles sont constituées d'unités contractiles répétitives appelées sarcomères, identifiables par la présence de stries claires et foncées (Braun and Gautel, 2011). Cette série de stries présentes dans les sarcomères explique l'appartenance du muscle squelettique à la famille des muscles striés. Le sarcomère est composé de deux sortes de filaments qui jouent des rôles majeurs dans la contraction musculaire: des filaments fins constitués d'Actine-F et d'Actine-G sous forme de double hélice et des filaments épais constitués d'un ensemble de protéines (Braun and Gautel, 2011). Chaque sarcomère est délimité par des stries foncées, dites stries Z, sur lesquels sont stabilisés les filaments d'Actine (Figure 3). Les protéines Troponine et Tropomyosine sont également nécessaires dans les sarcomères pour la production de la force musculaire (Poole et al., 2006). Lorsque le muscle est au repos, la Tropomyosine se fixe sur l'actine, empêchant toute interaction entre la Myosine et cette première.

La jonction neuromusculaire est une région sur laquelle s'effectue le contact entre une terminaison axonale et la fibre musculaire. Lorsqu'un influx nerveux est envoyé par les neurones et la moelle épinière jusqu'aux muscles cibles, le signal électrique parcourt les axones et atteint les points de jonctions neuromusculaires, créant un potentiel d'action. Le courant électrique pénètre dans la cellule par les Tubules-T qui sont en contact avec le réticulum sarcoplasmique. Lors de la réception de ce stimulus, les canaux calcium voltage-dépendants sont ouverts, augmentant ainsi considérablement la concentration en ions Ca^{2+} dans le sarcoplasme (Braun and Gautel, 2011). Lorsque le muscle est au repos, ces ions sont stockés dans le réticulum sarcoplasmique. Ce changement brutal de concentration d'ions Ca^{2+} permet la libération du neurotransmetteur Acétylcholine à la membrane post-synaptique. Le potentiel d'action engendré par ces phénomènes se propage le long du sarcolemme. La présence d'ions Ca^{2+} libres dans le sarcoplasme permet le déclenchement de la contraction des unités motrices (Braun and Gautel, 2011).

La contraction des myofibrilles requiert la disponibilité de l'ATP. Les longueurs des filaments d'Actine ou de Myosine lors de la contraction musculaire restent identiques à celles du muscle au repos. En effet, la contraction du sarcomère s'effectue uniquement par le chevauchement des deux filaments (Huxley and Hanson, 1954). Sous l'action des ions Ca^{2+} , la Tropomyosine change de conformation, permettant à la Troponine de libérer les sites de liaison de l'Actine (Poole et al., 2006). Les têtes de Myosine utilisent l'énergie apportée par l'ATP pour se fixer sur les points de fixation de l'Actine. La libération d'énergie de l'ATP déplace les têtes de Myosine vers l'Actine, permettant le glissement des filaments. Les têtes de Myosine vont ensuite libérer leurs liaisons avec l'Actine, et mettre fin à un cycle de glissement de filaments. Lors d'un stimulus, le cycle se reproduit plusieurs fois. L'action coordonnée de tous les filaments permet la contraction totale de la myofibre, rapidement suivie de la contraction du muscle entier (Poole et al., 2006).

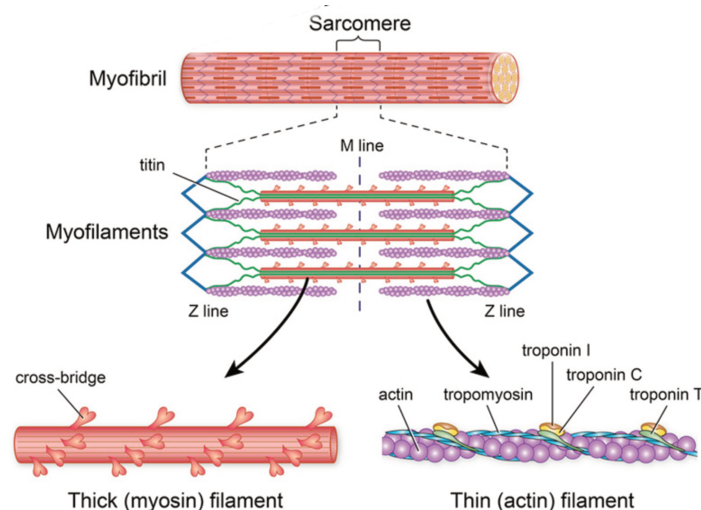


Figure 3. Organisation du sarcomère

Les filaments d'Actine et de Myosine permettent le raccourcissement du sarcomère et la contraction de la myofibrille.

D'après Golob et al., 2014

Environnement des fibres musculaires

Le muscle squelettique comporte un environnement riche en types cellulaires hétérogènes qui entourent les fibres musculaires. Cet environnement comprend les motoneurones, les vaisseaux sanguins, les cellules immunitaires ou encore les cellules interstitielles, nécessaires à l'homéostasie musculaire. Une régulation de la composition cellulaire de cet environnement contribue activement à la régénération musculaire chez l'adulte.

Chez les mammifères, les **motoneurones** permettent la transmission des signaux émis du cerveau vers les muscles. Leurs axones sont ramifiés sur un même muscle. Un même axone possède des contacts synaptiques (la jonction neuromusculaire) avec plusieurs fibres et permet la stimulation contractile rapide et simultanée de ces fibres (Padykula and Gauthier, 1970). L'ensemble du motoneurone ainsi que les fibres musculaires afférentes constituent l'unité contractile la plus petite du système nerveux : l'unité motrice.

La vascularisation permet l'apport nutritif et respiratoire nécessaire au fonctionnement musculaire par de fins capillaires. Le débit sanguin peut être rapidement régulé afin d'anticiper la demande en oxygène par le muscle pendant un effort musculaire. Lors d'un exercice important, elle peut être multipliée par dix (Rådegran and Saltin, 1998). Les **péricytes**, cellules localisées autour des capillaires sanguins, jouent un rôle important dans la régulation du débit sanguin par leur fonction contractile (Hamilton et al., 2010).

Le rôle premier du **système immunitaire** est de protéger les muscles contre les agents pathogènes. Lors d'une inflammation, les phagocytes mononucléés résidents (macrophages et cellules dendritiques) et les mastocytes s'activent les premiers afin d'initier la défense immunitaire. Le second rôle du système immunitaire est de maintenir l'homéostasie musculaire (McLennan, 1996). Les macrophages vont, notamment, permettre la dégradation et l'évacuation des débris cellulaires. Ils sont nécessaires au maintien du muscle squelettique.

Les **cellules interstitielles** sont une population fibroblastique hétérogène présente dans l'espace interstitiel entre les fibres musculaires. Ces cellules contribuent à l'entretien de cet espace par sécrétion de Collagène, de Laminine, de Fibronectine et d'autres protéines de la matrice extracellulaire. Parmi les cellules interstitielles, deux types ont été caractérisées : les PICS (cellules interstitielles PW1+ / Pax7-) et les FAPs (Fibro/adipogenic progenitors) qui sont présentes en grand nombre dans un muscle sain, mais leur rôle a été récemment reconnu pour la réparation du tissu musculaire endommagé (Joe et al., 2010).

Maladies musculaires

Les maladies neuromusculaires sont des maladies touchant près de 30 000 personnes en France (www.ffn-neurologie.org). Elles se manifestent par une faiblesse musculaire dont la cause peut être génétique, immunitaire ou environnementale. Ces maladies peuvent impacter le bon fonctionnement des motoneurons (amyotrophies spinales), des cellules immunitaires (myasthénie auto-

immune), des mitochondries (syndrome de MELAS) ou de la protéine Dystrophine (myopathie de Duchenne).

La **myopathie de Duchenne** est la forme de myopathie d'origine génétique la plus répandue chez l'enfant, affectant les garçons. Elle se traduit par une dégénérescence du tissu musculaire. Cette myopathie est due à une mutation dans le gène codant la Dystrophine, localisée sur le chromosome X. La Dystrophine est une protéine présente dans le sarcolemme et contribue à la stabilité des myofibrilles avec la matrice extracellulaire par son interaction avec 18 autres protéines (Matsumura et al., 1993). Lorsque le gène codant pour la Dystrophine possède une mutation, les protéines partenaires de la Dystrophine ne sont plus localisées au niveau du sarcolemme, fragilisant ainsi la membrane des myofibres. Les actions répétées de contraction des myofibres amplifient cette fragilité et affectent la perméabilité membranaire. Sous ces contraintes, les myofibres se nécrosent. A long terme, la mutation entraîne une dégénérescence progressive des muscles de l'organisme (Pastoret and Sebillé, 1993).

A ce jour, aucun médicament ou aucune thérapie commercialisée ne permet de guérir de la myopathie de Duchenne. La principale stratégie thérapeutique explorée à ce jour est centrée sur le saut d'exon afin de rétablir l'expression d'une protéine fonctionnelle. La thérapie génique est actuellement l'approche la plus prometteuse malgré ses contraintes (injection de vecteurs viraux ou de plasmides, introduction du matériel génétique dans un grand nombre de fibres et persistance de l'expression génique).

I. 2) Les cellules souches musculaires

Les cellules souches musculaires jouent un rôle principal dans le maintien de l'homéostasie musculaire et dans la régénération du muscle squelettique adulte. Elles sont caractéristiques de par leur localisation à la périphérie de la fibre musculaire et par l'expression de marqueurs spécifiques. Après une lésion musculaire, la cellule satellite, alors quiescente, s'active et prolifère sous l'influence d'une régulation parfaitement orchestrée de signaux et de molécules. La cellule

alors activée peut se différencier en myocytes afin de s'engager dans la réparation des fibres musculaires (Snow, 1977). Enfin, la présence de cellules neuronales, immunitaires, interstitielles et endothéliales est nécessaire pour la fonction des cellules satellites et la réorganisation du muscle.

Cellules souches

Les cellules souches sont des cellules indifférenciées capables de générer plusieurs types cellulaires d'un organisme. Elles ont la propriété de s'auto-renouveler pour entretenir le nombre de cellules souches et de produire un grand nombre de cellules différenciées. La capacité que possède la cellule à engendrer différents types cellulaires différenciés définit sa potentialité (www.inserm.fr).

Les cellules souches ayant la plus grande potentialité sont celles qui constituent un embryon au stade précoce de développement (jusqu'au stade blastocyste, 8 jours après la fécondation pour les mammifères). Ces cellules peuvent donner naissance à trois feuillets embryonnaires (mésoderme, endoderme, ectoderme) et générer tous les types cellulaires de l'organisme, sauf les cellules germinales (www.medicalnewstoday.com et www.inserm.fr). Elles ont une capacité illimitée d'auto-renouvellement. Par ces caractères, elles sont les seules cellules à être **totipotentes**. Au cours du développement embryonnaire, les cellules souches embryonnaires s'engagent dans un destin cellulaire et leur potentialité se réduit progressivement, devenant **pluripotentes** car elles peuvent se différencier en tous types cellulaires du feuillet embryonnaire auquel elles appartiennent (www.medicalnewstoday.com et www.inserm.fr).

Les cellules souches adultes participent au renouvellement de tous les tissus adultes. Elles ont une capacité de différenciation restreinte mais sont essentielles à la maintenance des tissus de l'organisme. Certaines cellules, comme les cellules souches hématopoïétiques, sont **multipotentes** car elles peuvent se différencier en un nombre limité de cellules. Par exemple, les cellules souches hématopoïétiques issues de la moelle osseuse sont à l'origine de toutes les cellules sanguines (www.inserm.fr). Les cellules qui ne peuvent se différencier qu'en un seul type

cellulaire comme les kératinocytes ou les myoblastes sont appelées cellules souches **unipotentes**.

Les cellules iPS sont des cellules souches pluripotentes adultes qui ont, par manipulation *in vitro*, acquis des caractéristiques de cellules souches pluripotentes. Des cellules iPS générées *in vivo* ont une excellente plasticité de différenciation et ont acquis de fortes similitudes avec les cellules embryonnaires (Abad et al., 2013).

Découverte des cellules satellites

Les cellules souches musculaires ont été découvertes en 1961 par Mauro (Mauro, 1961) par observation en microscopie électronique des fibres musculaires isolées. Ces cellules ont été nommées cellules satellites par leur stricte localisation à la périphérie de la fibre musculaire. Les cellules souches musculaires sont des cellules unipotentes et mononucléées qui peuvent s'engager uniquement dans la voie de différenciation musculaire. Depuis le stade embryonnaire, elles sont originaires des somites (Cossu et al., 1996).

Les cellules satellites représentent 2 à 5% du nombre total de noyaux que comprend le muscle adulte. La majorité des cellules satellites sont mitotiquement et transcriptionnellement quiescentes (cellules satellites quiescentes) mais en réponse à une blessure dans le tissu, elles s'activent et initient leur prolifération (cellules satellites activées) et leur différenciation (myoblastes). Les cellules satellites quiescentes, activées et les myoblastes ont des caractéristiques transcriptionnelles et fonctionnelles distinctes (Yin et al., 2013).

Les cellules souches musculaires ont la particularité de se localiser entre la lame basale et le sarcolemme de la myofibre. La lame basale est composée de Collagène de type IV, principalement sécrété par les fibroblastes résidents dans le muscle (Kühl et al., 1984) et de Laminine (isoforme $\alpha 2$, $\beta 1$ et $\gamma 1$). Ces deux protéines sont étroitement liées entre elles et créent un réseau dense interagissant avec les Glycoprotéines de la matrice extracellulaire. Les cellules souches musculaires expriment les Intégrines $\alpha 7$ et $\beta 1$ qui interagissent avec la Laminine de

la lame basale (Blanco-Bose et al., 2001). Contrairement à la plupart des cellules souches, les cellules satellites n'ont pas besoin d'un environnement riche en facteurs sécrétés par un grand nombre de cellules afin de maintenir leur quiescence. Cependant, la matrice extracellulaire joue un rôle important dans l'activation des cellules souches musculaires. En plus de son rôle de maintenance et de protection des fibres musculaires, la matrice extracellulaire influence la sortie de quiescence des cellules satellites (Urciuolo et al., 2013) et leur différenciation. Le potentiel mécanique, électrique et chimique de la myofibre influence également la fonction de la cellule satellite (Chargé and Rudnicki, 2004).

Expression génique et marqueurs moléculaires de la cellule satellite

La sortie de quiescence, l'activation ou encore la différenciation des cellules souches musculaires sont des événements régulés par des signaux intracellulaires et extracellulaires tels que des marqueurs moléculaires, le modelage de la chromatine, les voies de signalisation et les microARN.

Le facteur de transcription **Pax7** (Paired Box 7) est considéré comme un marqueur spécifique des cellules satellites en quiescence et des cellules activées en prolifération (Seale et al., 2000). Il est nécessaire pour maintenir leur activité et leur fonction dans le muscle squelettique adulte. Une altération génique de Pax7 dans les cellules satellites diminue la capacité de régénération du muscle (Maltzahn et al., 2013). De plus, une délétion de Pax7 a pour conséquence un arrêt du cycle cellulaire, un défaut d'auto-renouvellement et une différenciation précoce des cellules satellites, montrant ainsi que Pax7 est un facteur transcriptionnel important pour la maintenance et l'expansion des cellules souches musculaires (Günther et al., 2013).

L'expression de Pax7 permet directement de réguler l'expression de Facteurs de Régulation Myogéniques appelés **MRFs**, impliqués dans l'activation, la prolifération et la différenciation des cellules satellites, et plus largement dans le processus de myogenèse (McKinnell et al., 2008, Jo et al., 2011 et Sartorelli and

Caretti, 2005). Cette famille de facteurs comprend Myf5, MyoD, Mrf4 et Myogénine (Figure 4).

Une régulation directe de l'expression de **Myf5** (Myogenic Factor 5) par Pax7 a été mise en évidence il y a quelques années (McKinnell et al., 2008). En effet, Pax7 recrute un complexe protéique au niveau du gène codant pour Myf5 capable de remodeler la chromatine et de méthyliser la Lysine 4 de l'histone H3 (H3K4). L'action de ce complexe protéique sur le locus Myf5 permet l'activation transcriptionnelle de ce dernier. Au début de la régénération musculaire, Myf5 est détectable dans 90% des cellules satellites (McKinnell et al., 2008). Cependant, son expression est peu détectée dans les cellules satellites quiescentes, montrant que les cellules exprimant Myf5 sont pré-engagées dans la différenciation myogénique. L'expression génique de ce facteur détermine le destin cellulaire de la cellule.

La progression des cellules dans le lignage myogénique dépend également d'autres facteurs tels que **MyoD** (Myogenic Differentiation). Le gène codant pour MyoD n'est pas exprimé dans les cellules en quiescence, mais son expression est importante pour la prolifération des cellules activées et particulièrement leur entrée en phase S (Zhang et al., 2010). Les muscles des souris déficientes pour MyoD présentent un défaut de régénération et une masse musculaire réduite, causés par un défaut de différenciation des cellules satellites (Wood et al., 2013). Dans les cellules satellites, l'activation de MyoD est principalement régulée par phosphorylation. La forme déphosphorylée de MyoD est transportée dans le noyau, et initie la transcription des gènes permettant la différenciation des cellules musculaires (Jo et al., 2011), alors qu'une phosphorylation de la protéine ne permet pas à MyoD de se fixer sur ses sites de fixation à l'ADN.

Alors que MyoD est un facteur pré-myogénique, l'expression de la **Myogénine** et de Mrf4 dans les cellules myogéniques est importante pour les dernières étapes de différenciation (Hasty et al., 1993). La transcription de la Myogénine nécessite la déphosphorylation et la translocation de MyoD dans le noyau. En effet, MyoD se fixe stablement sur le promoteur du gène codant pour la Myogénine et permet son expression (Sartorelli and Caretti, 2005). De plus, une régulation étroite entre les MRFs et Pax7 est établie. Myogénine inhibe l'activité transcriptionnelle de Pax7 alors que ce dernier diminue celle de MyoD (Olguin et al., 2007), établissant ainsi un destin cellulaire parfaitement régulé et orchestré dans les cellules souches musculaires. Une mutation dans le gène codant pour la

Myogénine altère la formation de nouveaux myotubes et la régénération musculaire chez la souris (Hasty et al., 1993), montrant que la Myogénine est importante pour la dernière étape de différenciation et les premières étapes de fusion des cellules musculaires.

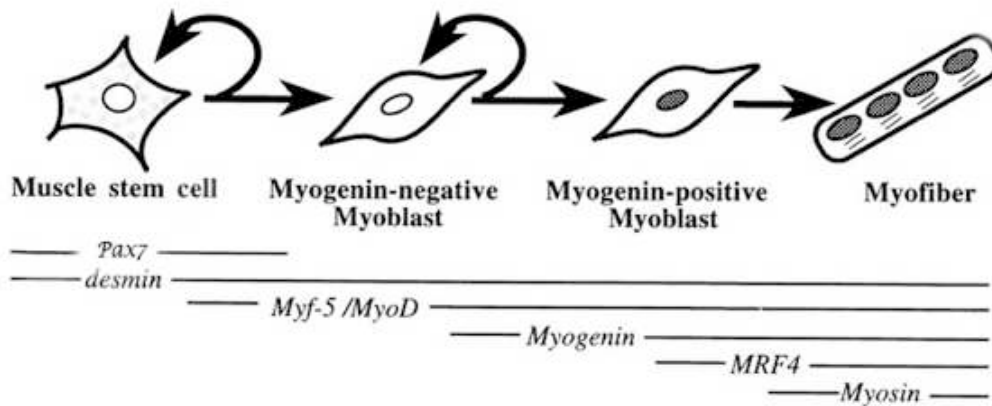


Figure 4. Expression des différents marqueurs géniques au cours de la progression myogénique de la cellule satellite

Le facteur Pax7 permet l'auto-renouvellement des cellules satellites alors que Myf5 et MyoD stimulent l'activation et la différenciation cellulaire. Les facteurs Myogénine et MRF4 sont importants pour les dernières étapes de différenciation et de fusion des cellules.

D'après Dominov et al., 1998

Des facteurs de transcription de la famille **Mef2** (Myocyte-specific Enhancer Factor 2) permettent également la régulation de gènes impliqués dans la myogenèse (Molkentin and Olson, 1996 et Ornatsky et al., 1997). Les facteurs Mef2C et Mef2D coopèrent activement avec les MRFs pour la régulation des gènes importants pour l'activité myogénique. L'expression de MyoD, Myogénine et Mef2C permet la transcription de gènes spécifiés dans la structure et la fonctionnalité du muscle, tel que les gènes codant pour l'Actine, la Myosine et la Troponine (Yin et al., 2013).

Les cellules satellites expriment également un panel de protéines et signaux, nécessaires pour le maintien de leur fonction au sein du muscle, tels que le facteur de transcription homeobox Barx2, la protéine d'adhésion M-cadhérine, le récepteur Tyrosine kinase c-Met, le récepteur $\alpha 7$ -intégrine, les Protéoglycans transmembranaires Syndecan-3 and Syndecan-4, le récepteur des chemokines CXCR4, la protéine Cavéoline-1, et les protéines de l'enveloppe nucléaire Lamine A/C et Emerine (Yin et al., 2013). De plus, la protéine Six1 (SIX Homeobox 1) contrôle l'expression de MyoD et de Myogénine. Elle est par conséquent nécessaire pour la régulation de l'auto-renouvellement et pour l'activation des cellules satellites (Le Grand et al., 2012). L'antigène CD34 est exprimé dans la majorité des cellules souches musculaires quiescentes. Cette protéine facilite la migration cellulaire et joue un rôle important dans l'initiation de la prolifération des cellules activées (Alfaro et al., 2011). Des microARN (miRNA) interviennent également dans la régulation du programme myogénique. Le miR-431 cible l'expression de Pax7 et est impliqué dans l'initiation de la différenciation des cellules souches musculaires (Wu et al., 2015).

Plusieurs voies de signalisation influencent également la myogenèse. L'activation de la voie Notch induit l'expansion des cellules satellites puisque la protéine Notch1 est activée dans les cellules musculaires lors de la sortie de la quiescence (Conboy and Rando, 2002), influençant la prolifération cellulaire. Il a été démontré que l'activation de la voie Notch est transitoire et permet l'activation rapide de la voie Wnt canonique lors de la différenciation des cellules souches. L'activation des voies de signalisation Wnt stimule l'expression de Myf5 et de MyoD et permet aux cellules satellites d'acquérir un potentiel myogénique (Brack et al., 2008).

Dynamique des cellules satellites

En réponse à une blessure musculaire, les cellules satellites traversent plusieurs états selon leur destin cellulaire (un état prolifératif pour maintenir la population de cellules satellites ou état de différenciation et de fusion pour contribuer à la régénération du tissu lésé).

Après une lésion musculaire, les cellules satellites quittent leur état de quiescence et s'activent transcriptionnellement (Buckingham and Relaix, 2007). Bien que le contrôle de l'**activation** soit étroitement régulé par les signaux intracellulaires (*cf partie I-2-Expression génique et marqueurs moléculaires de la cellule satellite*), l'initiation de l'activation est influencée par plusieurs signaux externes (Yin et al., 2013) tels que HGF (Hepatocyte Growth Factor), FGF (Fibroblast Growth Factor), IGF (Insulin-like Growth Factor) et NO (Nitric Oxide). HGF est sécrété dans la matrice extracellulaire et assurent le regroupement de récepteurs sous forme de complexe pour transmettre les signaux intracellulaires aux cellules satellites (Gill et al., 2010). Ce facteur est important pour l'expression de MyoD dans les cellules sortant de quiescence (Floss et al., 1997), alors que le NO a un rôle dans l'activation des cellules avant la sécrétion de HGF dans la matrice extracellulaire (Wozniak and Anderson, 2007). Selon la concentration en NO, les cellules satellites interpréteront différemment le signal reçu. A faible ou forte concentration, le NO aura une action positive sur l'activation des cellules musculaires tandis qu'à concentration « moyenne » il stimulera la différenciation cellulaire (Wozniak and Anderson, 2007). Les cellules satellites activées, dans lesquelles les facteurs pro-myogéniques tels que Myf5 et MyoD sont exprimés, sont appelées **Myoblastes**. Les cellules activées contribuent parallèlement à la régénération musculaire par leur différenciation.

La balance entre ces deux destins cellulaires est cruciale pour le maintien de l'homéostasie du tissu musculaire lésé. Un défaut de l'auto-renouvellement cellulaire induit une diminution du nombre de cellules satellites qui aura pour conséquence une altération de la régénération musculaire. Lorsque les cellules sont activées, elles prolifèrent dans leur niche de façon symétrique ou asymétrique (Kuang et al., 2007). La caractéristique de la division cellulaire déterminera le destin de chaque cellule fille. Le choix de la division symétrique ou asymétrique est déterminé par l'orientation du fuseau mitotique et par la concentration de facteurs dans la cellule mère.

La **division symétrique** s'effectue en parfaite symétrie à tout temps de la division. Dans 92% des cas, les cellules filles sont donc parfaitement semblables à la cellule mère, tant au niveau moléculaire que dans leur localisation (Kuang et al.,

2007). Les deux cellules filles sont en contact avec la lame basale et restent dans la niche le long de la fibre musculaire par la polarisation apportée par $\alpha 7$ -intégrine. La division s'est alors effectuée de façon planaire à la fibre, contrôlée par la voie Wnt non-canonique (Wnt7a/PCP) (Le Grand et al., 2009). De plus, la localisation de la protéine Vangl2 dans les cellules filles influence leur adhérence à la lame basale et leur destin cellulaire (Le Grand et al., 2009). La division symétrique permet l'expansion des cellules satellites (Figure 5).

Alors que la division symétrique permet uniquement la maintenance de la population de cellules souches, la **division asymétrique** permet à la fois le renouvellement de la population de cellules souches et la génération de cellules destinées à la différenciation cellulaire. La génération de deux cellules moléculairement différentes est un phénomène produit par 82% des divisions asymétriques (Kuang et al., 2007). Lors de la division asymétrique, la cellule se divise en direction apico-basal de par sa polarité et par son interaction avec la matrice extracellulaire (Kuang et al., 2008). Dans la cellule mère, la protéine $\alpha 7$ -intégrine est localisée au contact avec la lame basale alors que la M-cadhérine est localisée au pôle apical de la cellule. Ce différentiel de localisation des protéines participe à l'établissement de la polarité de la cellule. De plus, Numb, un antagoniste de la voie Notch est localisé asymétriquement lors de la mitose de la cellule mère (Shinin et al., 2006). Au cours de la division, Numb est concentré uniquement dans une des cellules filles. Il a été démontré que seule la cellule fille avec une forte concentration en protéine Numb peut s'auto-renouveler (Shinin et al., 2006). La division s'effectuant de manière apico-basal, une des cellules filles générée est alors poussée vers le sarcolemme et n'est plus en contact avec la lame basale (Figure 5). Cette cellule s'engagera dans la voie de différenciation. L'autre cellule fille reste en contact avec la lame basal et permettra la maintenance des cellules souches musculaires. Les cellules activées et préposées à la voie myogénique peuvent également se diviser de façon symétrique afin d'entretenir une population de cellules souches musculaires en différenciation (Kuang et al., 2007).

Les cellules filles issues de la division asymétrique et adhérentes à la lame basale resteront Pax7-positive mais n'exprimeront ni Myf5 ni MyoD (Kuang et al., 2007). Les cellules filles qui ne sont plus en contact avec la lame basale seront Pax7-positive, Myf5-positive et MyoD-positive à l'issue de la division. Lorsque ces dernières seront totalement engagées dans le lignage myogénique, elles

n'exprimeront plus Pax7 mais continueront à exprimer les facteurs myogéniques tels que MyoD (Kuang et al., 2007). Ces cellules sont alors appelées **Myocytes**.

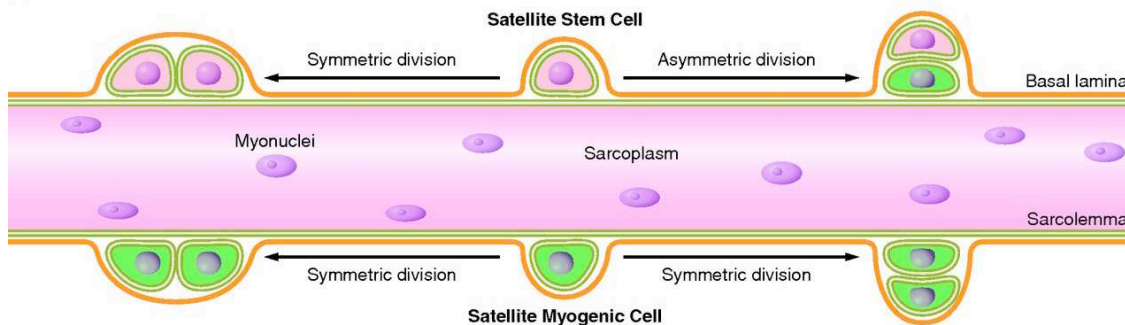


Figure 5. Division asymétrique et symétrique des cellules souches musculaires

La division asymétrique s'effectue selon un axe apico-basal et génère deux cellules filles distinctes : une engagée dans la voie myogénique et une pour la maintenance de la population de cellules souches. La division symétrique s'effectue selon un axe planaire et génère deux cellules filles identiques qui permettent l'expansion des cellules satellites ou le processus de myogenèse.

D'après Yin et al., 2013

Hétérogénéité cellulaire

L'hétérogénéité des cellules souches est démontrée par la capacité régénérative des cellules et est déterminée selon leur profil d'expression, leur capacité d'auto-renouvellement et par leur régulation moléculaire.

Les caractéristiques des cellules satellites dépendent du type musculaire. Des différences d'expression génique ont été étudiées entre les cellules satellites de l'EDL (Extensor Digitorum Longus) et celles du muscle masséter (Ono et al., 2010). Une grande proportion de cellules satellites n'exprimant pas Pax7 mais exprimant MyoD a été observée dans le muscle de l'EDL, alors que dans le muscle masséter la proportion de ces cellules reste faible. Les cellules satellites de différents muscles

peuvent donc être génétiquement et fonctionnellement différentes (Ono et al., 2010). L'origine de cette hétérogénéité reste à déterminer mais elle pourrait être développementale ou environnementale.

Après une blessure musculaire, les cellules satellites se divisent en deux populations principalement issues de la division asymétrique (Kuang et al., 2007). Une faible proportion de cellules satellites reste dans un état indifférencié et possède la capacité de retourner à un état de quiescence. De plus, un différentiel de **la capacité proliférative** au sein de la population des cellules souches musculaires a été mis en évidence (Ono et al., 2012). La population de cellules souches ayant un faible potentiel à s'engager dans le cycle cellulaire a une forte capacité d'auto-renouvellement alors que les cellules à prolifération rapide s'engageront dans la différenciation myogénique. De plus, des expériences de transplantation ont mis en évidence que les cellules à faible capacité de prolifération ont conservé leur potentiel de cellule souche (Ono et al., 2012).

L'expression de MRFs influence la prolifération des cellules souches musculaires. Les cellules en prolifération sont Pax7-positives et MyoD-positives mais Myf5-négatives alors que les cellules en début de différenciation expriment majoritairement MyoD puis Myogénine. Les cellules exprimant Pax7 avec un faible niveau d'expression de Myf5 ne s'engagent pas dans le cycle cellulaire et seront des cellules de réserve (Day et al., 2009). L'**expression non homogène** de Myf5 et de Pax7 au sein de la population de cellules souches installe une inégalité dans l'engagement des cellules dans la différenciation myogénique. Les cellules Pax7-positives et Myf5-négatives ont une meilleure aptitude à retrouver leur potentiel de cellules souches, et de constituer un réservoir de cellules Pax7-positive et Myf5-negative et de cellules Pax7-positive et Myf5-positive (Kuang et al., 2007). La distribution asymétrique de la protéine Numb dans les cellules filles générées par la division apico-basale d'une cellule satellite pourrait influencer l'expression de Myf5 dans ces cellules (Shinin et al., 2006)

Interaction des cellules satellites avec leur environnement

L'innervation musculaire est très importante puisque l'activité électrique stimule la prolifération des cellules satellites. La dénervation d'un muscle sain cause une atrophie musculaire et ne permet plus à la cellule satellite de proliférer (Guo et al., 2012). Après une lésion et la dégénérescence du tissu, les myofibres séparées de la plaque motrice par la zone de nécrose seront ré-innervées, ainsi que les myofibres néoformées.

Il a été démontré que 82% des cellules satellites murines sont localisées à moins de 21µm des capillaires et des cellules endothéliales (Christov et al., 2007). Ces dernières stimulent la prolifération des cellules satellites via leur action paracrine. Par expérience de co-culture, il a été démontré que les cellules endothéliales favorisent l'activation des cellules souches musculaires par sécrétion de facteurs de croissance tels que HGF, VEGF ou FGF (Yin et al., 2013). Une augmentation de l'expression de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) stimule la prolifération des cellules souches et permet une meilleure régénération musculaire (Arsic et al., 2004), montrant ainsi que ce facteur de croissance joue un rôle important dans la fonction des cellules satellites.

Après une blessure, les cellules immunitaires sont rapidement recrutées au lieu de la lésion et sécrètent des facteurs qui seront reçus par les cellules satellites à travers la lame basale. Le recrutement des cellules immunitaires permet l'activation des cellules satellites et les protège de l'apoptose (Sonnet et al., 2006). Les cellules immunitaires telles que les neutrophiles et les macrophages permettent l'élimination des fibres endommagées et nécrotiques. Ainsi, la réaction inflammatoire localisée au niveau de la lésion du muscle est nécessaire pour la régénération du muscle (Tidball and Bertoni, 2014).

Les cellules interstitielles sont également importantes pour la régénération musculaire. Les FAPs (Fibro/adipogenic progenitors) peuvent se différencier en adipocytes ou en fibroblastes selon les signaux environnementaux qu'ils reçoivent. L'environnement régénératif dans le muscle permet tout d'abord aux FAPs de

proliférer (Uezumi et al., 2010) puis de se différencier. La prolifération des FAPs dans le milieu interstitiel favorise l'engagement myogénique des cellules satellites (Yin et al., 2013) alors que leur différenciation en fibroblastes contribue à la formation de la matrice extracellulaire par sécrétion de Collagène, de Laminine et de Fibronectine. Les PICs (cellules interstitielles PW1+ et Pax7-), stimulent la formation de nouvelles fibres musculaires au cours de la régénération (Yin et al., 2013).

I. 3) La myogenèse

La signification du mot myogenèse provient du grec, signifiant la *naissance du muscle*. La myogenèse est un processus de formation du tissu musculaire qui est requis tout d'abord lors du développement embryonnaire et qui peut être sollicité lors de la régénération musculaire.

Myogenèse développementale

Au cours du développement, la myogenèse s'effectue en trois principales étapes : la détermination avec la formation des principaux tissus dans l'embryon, la différenciation des cellules et la maturation des fibres musculaires.

Au début du développement de l'embryon chez les métazoaires triploblastiques, les cellules s'organisent en trois différents feuillets embryonnaires : l'ectoderme, l'endoderme et le mésoderme. La majorité des muscles squelettiques des vertébrés a pour origine les cellules mésodermiques. Les cellules provenant du mésoderme permettent la formation des somites, qui eux-mêmes produisent le dermomyotome (qui initie la formation de la peau et des muscles squelettiques) et le sclérotome (qui génère la structure du squelette) (Cossu et al., 1996). Le dermomyotome est composé de deux zones bien distinctes: le myotome pour la zone interne et le dermatome pour la zone externe. Les cellules du myotome,

appelées myoblastes, sont des progéniteurs myogéniques et sont à l'origine de la musculature du fœtus (Kalchauer and Ben-Yair, 2005). Elles ont la capacité de proliférer, d'exprimer des gènes spécialisés dans la myogenèse, de se différencier et de fusionner ensemble pour générer des fibres musculaires. La formation de fibres musculaires au cours du développement est effectuée par les myoblastes embryonnaires et les myoblastes fœtaux (Kollias and McDermott, 2008). Les myoblastes embryonnaires peuvent contribuer à la myogenèse ou devenir des myoblastes fœtaux en proliférant (Figure 6). Ces derniers contribueront à la formation de fibres secondaires, plus petites que les premières formées par les myoblastes embryonnaires. L'ensemble des myofibres néoformées permet la mise en place d'une architecture musculaire complexe (Kollias and McDermott, 2008). La myogenèse, se distinguant alors par deux vagues de différenciation cellulaire, est principalement régulée par deux familles de protéines: les MRFs (Muscle Regulatory Factor) et les Mef (Myocyte Enhancer Factor).

Les Mef sont des co-activateurs de la famille des MRFs. L'expression de MRFs dans les myoblastes tels que MyoD ou Myf5 permet la différenciation précoce des cellules alors que l'expression de Myogénine et de MRF4 permet la différenciation terminale des myoblastes. Il a été démontré que les embryons n'exprimant pas la Myogénine meurent prématurément d'un défaut de différenciation des myoblastes et d'une absence de fibres musculaires (Hasty et al., 1993). Les MRFs et les Mefs permettent d'initier et de maintenir la différenciation myogénique des cellules et la formation des muscles chez l'individu. Les Pax (Paired-box transcription factors) jouent également un rôle important dans la régulation de la myogenèse (Musrò, 2014). Le gène codant pour la protéine Pax3 est exprimé dans les cellules dès la formation des somites alors que Pax7 n'est exprimé qu'après la maturation des somites (Musrò, 2014). Ces deux protéines régulent l'expression initiale de MyoD dans les myoblastes. Le facteur Pax3 contrôle l'expansion des cellules musculaires et permet la migration des cellules du somite vers les membres en formation (Bober et al., 1994). Les embryons déficients pour Pax3 présentent une anomalie de formation du dermomyotome, alors que les embryons qui n'expriment pas Pax7 n'ont pas un développement musculaire altéré (Mansouri et al., 1996), suggérant des rôles distincts au cours du développement pour ces deux protéines. Alors que l'expression de Pax3 est cruciale pour la mise en

place de la myogenèse au cours du développement, sa faible expression dans les cellules musculaires quelques jours avant la naissance permet d'affirmer que Pax3 a un rôle primaire principalement au cours du développement musculaire. Au contraire, Pax7 est important pour l'émergence des cellules satellites dès le dernier stade de développement et chez l'adulte (Kassar-Duchossoy et al., 2005). Les myoblastes perçoivent également des signaux externes induisant la régulation de voies de signalisation tels que les Wnt ou les BMP (Bone Morphogenetic Protein). Par exemple, BMP4 est sécrété par le tube neural et régule négativement l'expression de Myf5 et de MyoD (Reshef et al., 1998) alors que les Wnt (Wnt1, Wnt3, Wnt7a et Wnt11) sont sécrétés par la notochorde, le tube neural et l'ectoderme et stimulent l'expression génique des MRFs dans le myotome (Cossu, 1999). Les voies de régulation et l'expression des MRFs coordonnent une balance entre prolifération et différenciation des cellules.

Au cours du développement musculaire, une faible proportion de cellules reste dans un état indifférencié et se niche à la surface des fibres néoformées. Après la naissance, les myofibres deviennent matures et les cellules souches exprimant Pax7 deviennent transcriptionnellement quiescentes.

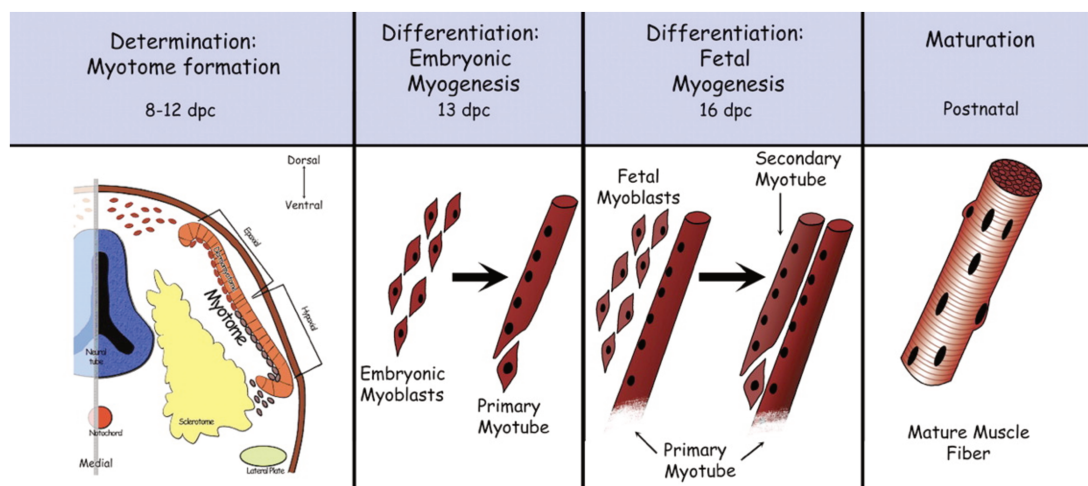


Figure 6. Les étapes du développement musculaire

La première étape est la détermination et la formation des principaux tissus dans l'embryon. La seconde étape consiste en la différenciation des myoblastes embryonnaires et fœtaux. La troisième étape permet la maturation du muscle squelettique.

D'après Kollias and McDermott, 2008

Myogenèse régénérative

Après une lésion, le muscle squelettique adulte a une remarquable capacité à se régénérer grâce à l'activité des cellules satellites. Initialement quiescentes, elles ont le potentiel de s'activer très rapidement après l'induction de la blessure. Elles vont alors proliférer et se différencier afin de fusionner entre elles et recréer des fibres musculaires multinucléées (Snow, 1977). La régénération musculaire comporte trois principales étapes et commence par la nécrose des tissus endommagés. Rapidement, une réponse inflammatoire est localisée au niveau de la lésion et les cellules souches musculaires se différencient. Enfin, de nouvelles fibres musculaires sont formées (Figure 7).

La régénération peut être induite par injection de Cardiotoxine dans le muscle. La **Cardiotoxine** est une myotoxine extraite du venin de Cobra cracheur à cou noir (*Naja nigricollis*), utilisée comme modèle de blessure musculaire chez la souris. Cette toxine est un inhibiteur de la kinase C et est une Phospholipase A2. De ce fait, elle induit une dépolarisation irréversible au niveau de la myofibre, qui se propage rapidement le long des Tubules-T (Shiau et al., 1976). Ainsi, le sarcolemme est fragilisé et devient perméable. Les ions calcium présents dans le réticulum sarcoplasmique sont propagés dans le sarcoplasme, affectant la structure et la fonction des fibres musculaires. Quelques minutes après l'injection de cette toxine, le muscle est paralysé et le tissu commence à se nécroser (Mann et al., 2011).

La nécrose du tissu stimule la **réponse inflammatoire** sur le site de lésion. La réponse inflammatoire est très forte dans les premiers jours qui suivent la blessure musculaire par l'injection de Cardiotoxine (McLennan, 1996). Les neutrophiles sont les premières cellules immunitaires à infiltrer les fibres musculaires nécrotiques, et restent sur le lieu de l'inflammation environ 24 heures. Leur rôle phagocytaire permet d'éliminer rapidement les premiers débris cellulaires. De plus, ces cellules sécrètent des cytokines, stimulant le recrutement de monocytes et de macrophages dans le tissu (Musrò, 2014). Le nombre de macrophages augmente donc dès les premières 24 heures de régénération et sont les cellules immunitaires principales dans le muscle lésé. En plus de leur activité phagocytaire, elles sécrètent des facteurs influençant l'activation de la population de cellules

souches musculaires. Les macrophages régulent la balance entre les signaux pro-inflammatoires et anti-inflammatoires. Les signaux pro-inflammatoires stimulent la prolifération des cellules stellites (Arnold et al., 2007) alors que les signaux anti-inflammatoires favorisent la différenciation des myoblastes, l'angiogenèse et la restructuration de la matrice extracellulaire (Zhang et al., 2013). Les fibroblastes migrent également rapidement sur le site de lésion musculaire et permettent un remodelage de la matrice extracellulaire (Mann et al., 2011). Ce processus est crucial au cours de la régénération puisque la matrice extracellulaire permet un alignement correct des nouvelles myofibres dans le tissu. Un remodelage incorrect de la matrice extracellulaire peut entraîner un dépôt de fibrose qui altérerait la fonction du muscle. La réponse inflammatoire est un processus initiant la régénération musculaire par la stimulation de la capacité régénérative des cellules satellites et par restructuration du tissu.

Lors de la nécrose du tissu, la niche des cellules satellites est détruite. Le nombre de cellules satellites diminue pendant les dix-huit premières heures de régénération. Cependant, par leur importante capacité de prolifération, leur nombre augmente rapidement (Hardy et al., 2016) après cette phase. Les cellules souches vont alors progresser dans le lignage myogénique sous l'influence de signaux moléculaires et cellulaires (voir partie I.2-Cellules souches musculaires). Quelques heures après la lésion musculaire, les cellules souches sont activées. La voie de signalisation Notch et celle de l'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1) stimulent la prolifération des cellules satellites alors que la voie Wnt permet l'initiation de la différenciation des myoblastes (Brack et al., 2008). Ainsi, les cellules musculaires expriment rapidement des facteurs myogéniques tels que Myf5 ou MyoD. Les myoblastes déficients pour MyoD présentent un défaut d'engagement dans la voie myogénique, montrant que l'expression de MyoD est importante pour la différenciation des cellules au cours de la régénération (Sabourin et al., 1999). De plus, MyoD stimule l'expression de Myogénine et de MRF4 dans les myocytes (Musrò, 2014).

En réponse à une lésion musculaire, les cellules satellites migrent vers la zone de nécrose. Des cellules satellites localisées sur des myofibres saines sont capables de migrer jusqu'aux myofibres endommagés, montrant que les cellules

souches musculaires ont une grande faculté de **motilité** et de **migration** au sein du muscle squelettique (Hughes and Blau, 1990). La migration des cellules souches est essentielle lors de la régénération musculaire. Il a été démontré que la migration des cellules satellites est cruciale pour l'initiation de la fusion des cellules et pour la formation de myofibres (Bae et al., 2008) puisque la migration permet le contact et la communication entre cellules. Dans une cellule en migration, l'Actine est majoritairement localisée sur la partie antérieure de la cellule. La cellule est adhérente à la fibre musculaire par des points focaux d'adhésion qui sont des complexes composés notamment de filaments d'Actine et d'Intégrines (Block et al., 2008). La migration cellulaire est initiée par la polarisation du cytosquelette. L'Actine monomère (Actine G) et l'Actine filamenteuse (Actine F) présentes dans la cellule se polymérisent, projetant la membrane vers l'avant de la cellule où de nouveaux points focaux d'adhésion sont mis en place (Vicente-Manzanares et al., 2009). Enfin, la Myosine II localisée à l'arrière de la cellule se contracte, permettant à la cellule de se déplacer vers l'avant. Les points focaux d'adhésion à l'arrière de la cellule sont déstabilisés, rompant le contact entre la membrane et la myofibre. La migration cellulaire est un processus important pour la fusion des cellules satellites (Jansen and Pavlath, 2006).

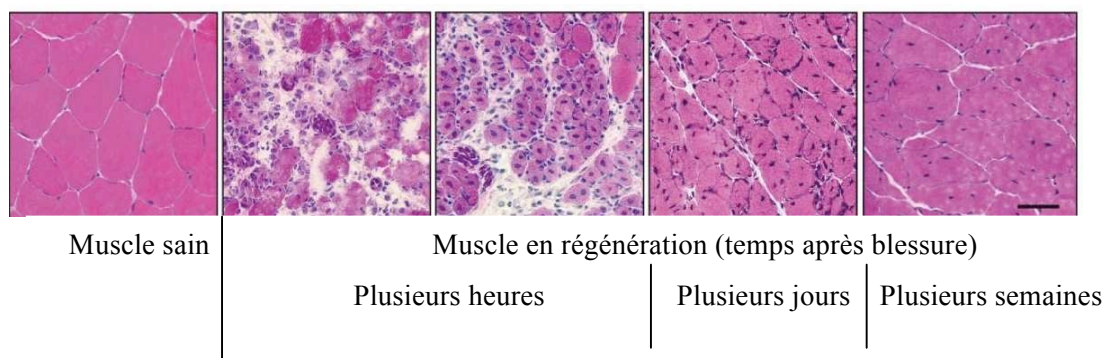


Figure 7. La régénération du tissu squelettique (Hematoxylin et Eosine)

Une lésion musculaire cause une rapide réaction inflammatoire et un dépôt de Collagène. Quelques jours après l'injection de Cardiotoxine, les fibres sont rapidement reformées. Les noyaux sont localisés centralement dans les myofibres. Quelques semaines après la blessure, les fibres s'hypertrophient.

D'après Mann et al., 2011

La fusion des myocytes est un processus moléculaire qui comprend l'adhésion cellule-cellule, l'alignement des membranes cellulaires, le réarrangement du réseau d'Actine au niveau des sites de contact entre cellules, et l'union des deux membranes (Chen et al., 2007). Au cours de la régénération musculaire, la fusion entre cellules commence lorsque les cellules sont engagées dans la voie myogénique et expriment la Myogénine. Fusionnant entre eux, les myocytes forment des cellules multinucléées appelées myotubes ou myofibres (Figure 8). La différenciation des cellules et la formation de nouveaux myotubes sont des phénomènes observés quelques jours après la lésion musculaire. Les fibres musculaires en régénération sont facilement identifiables par leurs noyaux centraux, contrairement aux fibres saines qui ont leurs noyaux le long de leur membrane (Mann et al., 2011). La formation de fibres musculaires ramifiées et entourées de la même lame basale est possible et s'explique par une fusion incomplète ou incorrecte des fibres en régénération (Bourke and Ontell, 1984). Cet événement est souvent observé dans les muscles des patients atteints de maladies neuromusculaires, ou dans le cas d'étude du vieillissement musculaire chez les souris et est associé à une capacité de régénération anormale.

Au cours de la **fusion cellulaire**, plusieurs protéines sont spécifiquement exprimées et/ou interviennent activement dans le processus de régénération musculaire. Une protéine membranaire, appelée Myomaker, joue un rôle primordial dans la fusion cellulaire. Par suppression de l'expression de Myomaker, il a été démontré que les cellules déficientes pour cette protéine ne peuvent former de nouvelles cellules multinucléées (Millay et al., 2013). Les Cadhérines sont des protéines transmembranaires connues pour contribuer à l'interaction cellule-cellule. La M-cadhérine est essentielle pour la fusion des myocytes et est principalement exprimée après une lésion musculaire dans les cellules satellites (Chargé and Rudnicki, 2004). Cependant, une étude menée sur des souris déficientes pour la M-cadhérine démontre que les muscles lésés par injection de Cardiotoxine ne présentent pas une altération de la régénération (Hollnagel et al., 2002). Ces résultats mettent en évidence un mécanisme de compensation entre Cadhérines (N-cadhérine et la R-cadhérine) au cours du processus de fusion cellulaire. D'autres protéines telles que la Vimentine, la Desmine, la Nestine jouent un rôle important dans la fusion. Les fibres formées de novo sont caractérisées par l'expression de la forme embryonnaire de la Myosine à chaîne lourde (Myosin Heavy Chain).

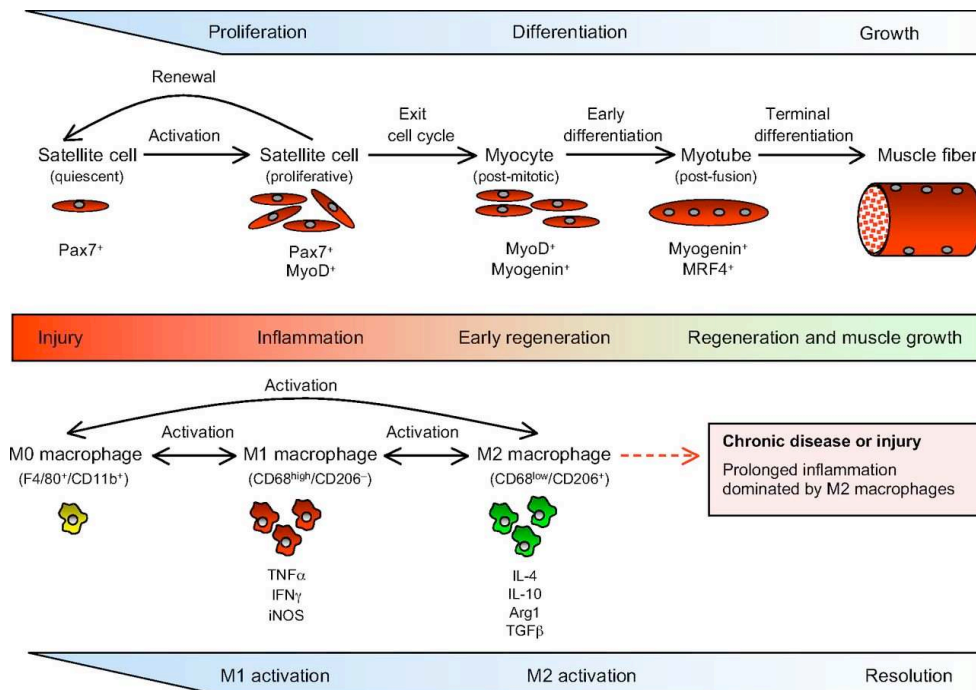


Figure 8. Etapes de la régénération musculaire

Après une lésion musculaire, les cellules satellites s'activent et prolifèrent. Certaines cellules peuvent retourner à un état quiescent pour entretenir la population de cellules souches musculaires. Les cellules qui s'engagent dans la voie myogénique, fusionnent entre elles et forment de nouvelles fibres musculaires plurinucléées. La maturation des myofibres est la dernière étape de la régénération musculaire. La réponse inflammatoire joue un rôle important au cours de la réparation du muscle dès les premières heures après la lésion. M1 et M2 sont deux types de macrophages.

D'après Tidball et al., 2014

La régénération musculaire se termine par la **maturation des myofibres** néoformées. Lors de l'étape de maturation, les noyaux migrent à la périphérie de la fibre musculaire. De plus, un mois après la lésion musculaire, le nombre de cellules satellites est semblable à celui observé dans un muscle non blessé (Hardy et al., 2016). Enfin, les fibres musculaires s'hypertrophient (augmentation du volume des fibres) grâce à la synthèse des protéines contractiles. La fibre mature exprime alors une nouvelle forme de Myosine à chaîne lourde : la Myosine de type I ou de type II (Musarò, 2014). A la fin de la régénération, le muscle lésé sera morphologiquement et fonctionnellement semblable à un muscle sain (Chargé and Rudnicki, 2004).

II. Les voies Wnt

Les voies Wnt sont des voies de signalisation complexes, uniquement activées par la liaison des protéines Wnt sur des récepteurs spécifiques. La signalisation Wnt comprend la voie canonique et les voies non-canoniques. Ces voies font intervenir diverses protéines, kinases et récepteurs, qui influenceront plusieurs processus cellulaires. L'activation des voies Wnt influence le comportement de nombreuses cellules souches adultes, par le contrôle de la prolifération, la survie, la migration ou encore la différenciation cellulaire. La signalisation intervient également au cours du développement embryonnaire et participe à la régénération de nombreux tissus (Cadigan and Nusse, 1997). Ainsi, une dérégulation de la voie Wnt peut engendrer de nombreuses malformations, maladies ou cancers. Au cours de mon Doctorat, je me suis intéressée à la régulation des voies Wnt canonique et non-canonique.

II. 1) Les intervenants de la signalisation Wnt

Les protéines Wnt sont des molécules qui subissent plusieurs modifications post-traductionnelles. Leur sécrétion régulée permet une activation des voies de signalisation contrôlée. Les voies Wnt correspondent à trois voies de signalisation (Wnt/ β -caténine, Wnt/ Ca^{2+} et Wnt/PCP) bien distinctes mais toutes activées par la liaison des Wnt sur les récepteurs Frizzled. La présence de corécepteurs et leur interaction avec le récepteur principal des Wnt déterminera spécifiquement l'activation d'une des voies.

Protéines Wnt

Les Wnt sont des protéines conservées chez les métazoaires. Le nom Wnt provient de l'association de Wg (Wingless chez la drosophile) et de int1 (Mouse

Mammary Tumor Virus Integration Site). Chez les mammifères, la famille Wnt comprend dix-neufs ligands (provenant de différents gènes) d'environ 350-400 acides aminés. Les protéines Wnt sont des glycoprotéines sécrétées riches en cystéines (Miller, 2002).

Le premier gène codant pour une protéine Wnt chez la souris a été découvert en 1982. La protéine Wnt1 a été découverte comme étant un proto-oncogène (Nusse and Varmus, 1982), démontrant à l'époque l'implication des protéines Wnt dans le développement et l'oncogenèse. Il a été découvert quelques années plus tard que les Wnt composent une famille de protéines importante dans la morphogenèse. La liaison des protéines Wnt sur leurs récepteurs permet l'activation d'une cascade de signaux dans le cytoplasme et une régulation de l'expression de certains gènes, tant au cours du développement embryonnaire que dans différents tissus adultes.

La protéine Wnt3a a été la première protéine purifiée (Willert et al., 2003). Il a ainsi été montré que la sécrétion de Wnt3a hors de la cellule nécessite la N-glycosylation de la protéine ainsi que des modifications lipidiques sur son domaine N-terminal. Ces dernières expliquent la propriété hydrophobe des protéines Wnt (Hausmann et al., 2007). La première modification lipidique consiste en l'ajout d'un groupe palmitate sur la Cystéine 77 (Cys77) des Wnt (Willert et al., 2003). La seconde modification est l'ajout d'un acide palmitoléique sur la Sérine 209 (Ser209) des Wnt. Alors que l'acylation de la Cys77 est requise pour l'activité des Wnt, celle de la Ser209 est importante pour le transport de la protéine à la membrane et à sa sécrétion (Takada et al., 2006). Porcupine, une acyltransférase, est l'enzyme qui catalyse l'ajout des groupes acyles sur les protéines Wnt non matures (Takada et al., 2006). Porcupine est une protéine à huit domaines transmembranaires localisée au niveau du réticulum endoplasmique. Cette protéine est le principal responsable de l'ajout du groupe acyle sur les deux sites des Wnt. Une étude a démontré que la sécrétion des Wnt est inhibée dans les cellules dont le gène codant pour la Porcupine a été muté, ayant pour conséquence une accumulation de Wnt non matures dans le réticulum endoplasmique (van den Heuvel et al., 1993). De plus, une mutation au niveau de la Sérine 209 ne permet pas aux protéines Wnt d'être excrétées hors du réticulum endoplasmique montrant que l'ajout d'un acide palmitoléique sur cette Sérine est cruciale pour la maturation des protéines Wnt et leur sortie du réticulum endoplasmique. Chez la drosophile (D.

melanogaster), les embryons déficients pour Porcupine ont le même phénotype que les embryons mutants pour Wingless, l'homologue de Wnt (Cadigan and Nusse, 1996), confirmant que Porcupine est nécessaire pour la sécrétion de Wingless.

Après l'ajout de modifications lipidiques par Porcupine, les protéines matures sont transportées jusqu'au golgi puis à la membrane cellulaire par des vésicules. Il a été proposé que les protéines Wnt peuvent être « recyclées » par les cellules (Pfeiffer et al., 2002). Les Wnt sécrétées peuvent être endocytosées par les cellules receveuses puis retenues dans le compartiment endosomal avant d'être sécrétées de nouveau.

La voie canonique est également appelée voie Wnt/ β -caténine puisque cette voie est dépendante de la β -caténine. Les voies non-canoniques sont la voie calcium Wnt/ Ca^{2+} et la voie Wnt/PCP (Planar Cell Polarity) qui sont indépendantes de la β -caténine (Figure 9). Bien que les Wnt aient des propriétés différentes, l'activation des différentes voies dépend majoritairement du type cellulaire. Par exemple, Wnt5a est spécifique de la voie Wnt/ β -caténine pour la mise en place des axes embryonnaires lors du développement du Xénope (He et al., 1997) alors qu'il participe au relargage d'ions calcium dans le cytoplasme des cellules embryonnaires de Zebrafish via la voie Wnt/ Ca^{2+} (Slusarski et al., 1997). De plus, Wnt4 active la voie Wnt canonique dans les gonades en développement (Maatouk et al., 2013) alors qu'il contribue au développement du rein via la voie Wnt non-canonique (Burn et al., 2011). Le contexte cellulaire semble donc essentiel pour l'activation spécifique d'une voie Wnt. Cependant, ce principe reste controversé dans le monde scientifique. En effet, il existe un classement des Wnt (les Wnt sont classés en sous-famille) établi par la voie de signalisation qu'ils activent. Par exemple, selon ce classement, la sous-famille Wnt1 (comprenant Wnt1, Wnt3a et Wnt8) active spécifiquement la voie canonique alors que la sous-famille Wnt5a (comprenant Wnt5a et Wnt11) active la voie non-canonique (Niehrs, 2012 et Miller, 2002). Bien que ce classement soit soutenu dans plusieurs publications afin de prédire l'action des Wnt sur les voies de signalisation, il est évident qu'il ne peut être considéré comme totalement fiable pour les raisons citées ci-dessus.

Les différentes voies Wnt sont bien distinctes par l'intervention de protéines spécifiques dans la cascade de signalisation. La voie canonique fait majoritairement

intervenir GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3), l'Axine, l'APC (Adenomatosis Polyposis Coli) et la CK1 α (Casein Kinase I α). La transcription génique s'effectue par la coopération de la β -caténine avec TCF (T Cell Factor) (Niehrs, 2012).. L'activation de la voie PCP nécessite l'activation de GTPases telles que RhoA et Rac1 et de kinases telles que ROCK (RHO kinase) et JNK (JUN-N-terminal kinase). Enfin, l'activité de la voie Calcium est transmise par les kinases CAMKII (calmodulin-dependent kinase II), PKC (protein kinase C) et par la Calcineurine (Niehrs, 2012).

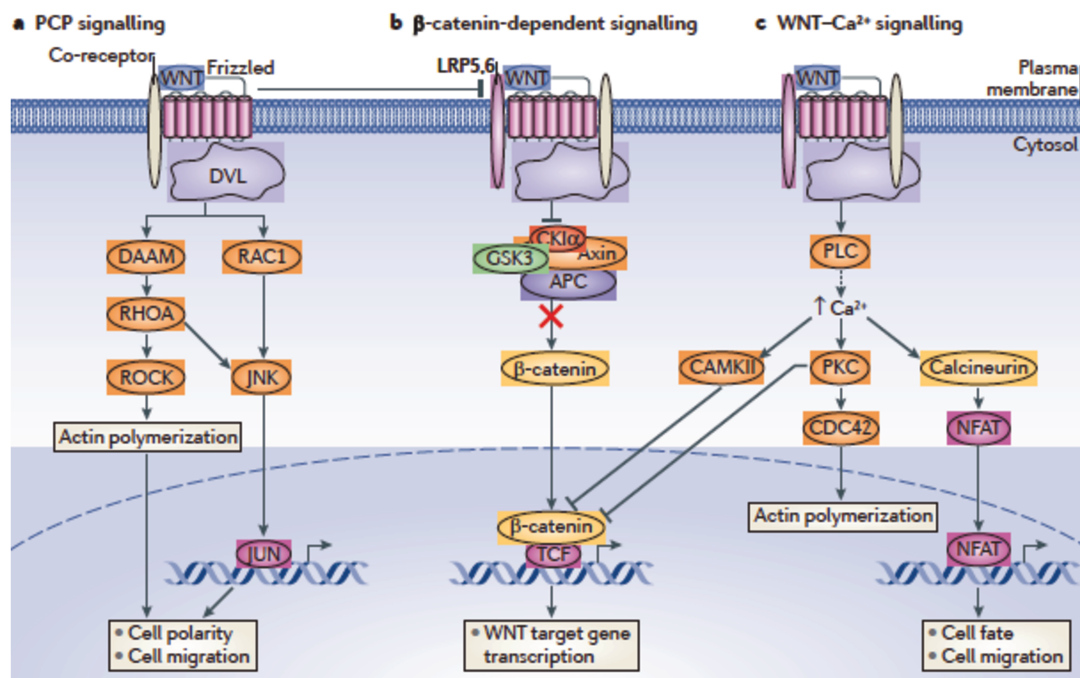


Figure 9. Les voies Wnt

La voie canonique Wnt/ β -caténine est dépendante de l'activité de la protéine β -caténine. L'activation des voies non-canoniques Wnt/Ca²⁺ et Wnt/PCP est transmise par des GTPases et des kinases.

D'après Niehrs, 2012

Dans le muscle sain, les Wnt2b, Wnt4, Wnt5a, Wnt9a, Wnt11 et Wnt16 sont majoritairement exprimés, alors qu'une lésion musculaire permet l'expression de Wnt2, Wnt4, Wnt5a, Wnt9a, Wnt10a, Wnt 11 et Wnt16 (Le Grand et al., 2009). Il a été démontré que Wnt1, Wnt3a et Wnt7a sont exprimés dans les fibres musculaires isolées (Otto et al., 2008). Dans le muscle squelettique, Wnt3a permet l'activation de la voie canonique tandis que Wnt7a permet la stimulation des voies non-canoniques.

Récepteurs

Les récepteurs des Wnt sont des protéines à sept domaines transmembranaires de la famille des **Frizzled** (Fzd). Chez l'humain, Frizzled est une famille de dix protéines avec un domaine extracellulaire très conservé et de forte affinité pour les Wnt (Janda et al., 2012). Cependant, ce domaine permet également l'interaction avec des corécepteurs de la voie, suggérant que Frizzled possède un autre site d'interaction avec les Wnt non déterminé à ce jour. Par liaison avec les ligands Wnt, le récepteur Frizzled se dimérise et interagit avec les protéines G qui permettent le recrutement de kinases (Niehrs, 2012). Les récepteurs peuvent être positivement régulés par liaison avec la protéine Dishevelled à leur domaine intracellulaire et par recrutement d'autres protéines telles que l'Axine ou GSK3 (Glycogen synthase kinase 3). Cette série de recrutement permet l'activation de la voie Wnt canonique. Les protéines Frizzled sont les uniques récepteurs des ligands Wnt contribuant à l'activation de la voie canonique et non-canonique.

Cependant, leur interaction avec des protéines partenaires telles que **LRP5/6** (LDL Receptor Related Protein) ou **ROR1/2** (Receptor Tyrosine Kinase-Like Orphan Receptor) détermineront l'engagement des signaux dans une voie spécifique (Niehrs, 2012). Il n'a pas encore été démontré si les récepteurs Frizzled peuvent activer les voies Wnt sans leur interaction avec des corécepteurs. Aussi, une interaction Fzd/LRP permettrait généralement l'activation de la voie canonique alors qu'une interaction Fzd/ROR permettrait l'activation de la voie non-canonique

(Grumolato et al., 2010). Frizzled peut également interagir avec RYK (Receptor-Like Tyrosine Kinase) et activer une des voies Wnt (Figure 10).

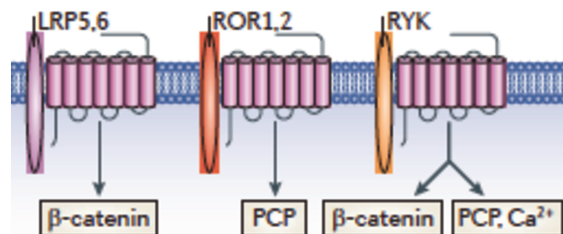


Figure 10. Les corécepteurs de la voie Wnt

L'interaction entre le récepteur principal de la voie, Frizzled, et les corécepteurs tels LRP5/6 ou ROR1/2 détermine l'activation d'une voie Wnt spécifique (Wnt/β-caténine pour LRP5/6 et PCP pour ROR1/2). L'interaction de Frizzled avec RYK permet une activation des voies canoniques et non-canoniques Wnt.

D'après Niehrs, 2012

La famille des LRP comprend LRP6, qui possède notamment un rôle primordial dans l'embryogénèse, et LRP5 qui contribue principalement à l'homéostasie des os chez l'adulte. Il a été démontré que la proximité des récepteurs LRP et Frizzled est suffisante pour activer la voie Wnt canonique (Cong et al., 2004). La région extracellulaire de LRP6 permet de maintenir une interaction stable entre le récepteur Frizzled et le ligand Wnt. L'activité de LRP6 est régulée par phosphorylation sur son domaine intracellulaire et cette phosphorylation est nécessaire pour l'activation de la voie canonique (Tamai et al., 2004). La forme phosphorylée de LRP6 se lie directement à GSK3 pour inhiber l'activité de cette dernière et stabiliser la forme active de la β-caténine (Piao et al., 2008).

ROR 1/2 sont des récepteurs tyrosines kinases transmembranaires avec un domaine extracellulaire riche en cystéine. L'activité des ROR est régulée par homodimérisation et par la phosphorylation de ses résidus tyrosines (Liu et al., 2008).

Elle peut également être régulée par les kinases GSK3 et par TAK1 (TGF β -activated protein kinase 1). La phosphorylation de ROR2 par TAK1 affecte l'activation de la voie non-canonique (Winkel et al., 2008).

Les récepteurs et corécepteurs des Wnt subissent des modifications post-traductionnelles afin de maintenir une régulation de la voie de signalisation. La régulation positive ou négative de la voie de signalisation est possible par phosphorylation (sur Frizzled, LRP6 et ROR), par ubiquitination (sur Frizzled et RYK) ou par protéolyse (sur Frizzled, LRP6 et RYK). La combinaison de l'ensemble des protéines Wnt et Frizzled fait que le rôle de chaque Wnt n'est pas encore parfaitement connu à ce jour.

II. 2) Les voies non-canoniques

Les voies Wnt non-canoniques sont moins bien connues que la voie canonique. Elles comprennent plusieurs voies de signalisation, distinctes moléculairement: la voie Wnt/PCP (Planar Cell Polarity) et la voie Wnt/Ca²⁺. Ces voies ne sont pas dépendantes de la β -caténine, ni de son interaction avec TCF ou LEF mais leur signalisation permet également la régulation des expressions géniques (Niehrs, 2012). Ces deux voies font intervenir des kinases et diverses protéines différentes. La voie PCP est impliquée dans la division symétrique des cellules satellites dans le muscle squelettique adulte en régénération (Le Grand et al., 2009). La voie Calcium, qui a été initialement identifiée chez le *Xenopus* et le *Zebrafish*, permet notamment de réguler la libération de calcium par le réticulum endoplasmique et de contrôler les niveaux de calcium intracellulaire. Il a été récemment découvert que l'activation de la voie Akt/mTOR par les Wnt entraîne l'hypertrophie des fibres musculaires via la stimulation de la synthèse protéique dans les cellules (von Maltzahn et al., 2012a).

Voie Wnt/PCP

La voie non-canonique la mieux caractérisée est la voie Wnt/PCP. Cette voie a été découverte chez la drosophile (*D. melanogaster*) et son activation est importante pour la polarité des cellules épithéliales et mésenchymateuses dans divers organismes (Dale et al., 2009). L'activation de la voie ne requiert pas l'expression des LRP ni de la β -caténine.

La signalisation est initiée par la liaison des Wnt sur le récepteur Frizzled et par l'activation des corécepteurs NRH1, Ryk, PTK7 ou ROR2 (Staal et al., 2008). La protéine Dishevelled est alors recrutée au niveau des récepteurs (Figure 11) et forme un nouveau complexe avec la protéine activatrice DAAM1 (Dishevelled associated activator of morphogenesis 1). Cette dernière active les GTPases RhoA et Rac1 et de réguler la réponse au stress via l'activité de la kinase Jun N-terminal (JNK). Cette voie permet l'induction de la transcription de gènes cibles de Jun (von Maltzahn et al., 2012a). De plus, la kinase ROCK1 (Rho-Associated, Coiled-Coil Containing Protein Kinase 1) peut également être activée et est un des principaux régulateurs du cytosquelette (Niehrs, 2012).

D'autres protéines ont la propriété de réguler la voie PCP telles que Vangl (Vladar et al., 2009, Le Grand et al., 2009) ou la kinase CK1 ϵ . Cette dernière est un régulateur connu de la voie Wnt non-canonique chez la drosophile (Strutt et al., 2006) puisque l'activité de cette kinase est indispensable pour la signalisation PCP (Klein et al., 2006).

La voie PCP est importante pour l'adhésion et la migration cellulaire par le contrôle du modelage du cytosquelette. Cette voie régule la polarisation de l'Actine et la polarité cellulaire (Staal et al., 2008).

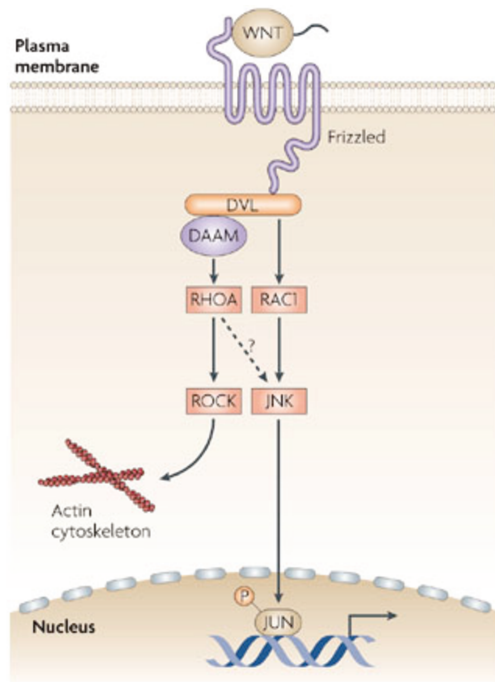


Figure 11. La voie Wnt/PCP

La voie PCP permet l'activation des GTPases RHOA et Rac1 et des kinases JNK et ROCK1. Le cytosquelette est remodelé, agissant sur la motilité et l'adhésion cellulaire.

Image issue de Staal et al., 2008

Voie Wnt/Ca²⁺

L'interaction des ligands Wnt avec les récepteurs Frizzled permet le recrutement de la protéine Dishevelled au complexe membranaire (Niehrs, 2012). Les protéines G associées au complexe sont alors activées, et permettent de stimuler l'activité des protéines PLC (phospholipase C) et de PIP2 (phosphatidyl-inositol-diphosphate). Ce dernier est clivé en deux protéines distinctes: IP3 (Inositol 1,4,5-Trisphosphate) et DAG (1,2-diacylglycérol).

Par liaison de IP3 à son récepteur sur le réticulum endoplasmique, le calcium est libéré dans le cytoplasme (Niehrs, 2012). Le flux d'ions Ca²⁺ intracellulaire peut activer des seconds messagers tels que la PKC (protéine kinase C), CaMKII (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase) et la Calcineurine (Kohn and Moon, 2005). Cette dernière induit l'activation du facteur de transcription NFAT (Nuclear factor of activated T-cells), qui est transporté dans le noyau et permet la transcription de gènes impliqués dans l'adhésion ou la migration cellulaire.

Cette voie de signalisation est également impliquée dans le réarrangement du cytosquelette (par exemple lors de la division cellulaire) et au cours du développement embryonnaire (Kohn and Moon, 2005). Le rôle des Wnt dans le processus de relargage d'ions calcium dans le cytoplasme est crucial puisqu'une étude a prouvé que des injections d'ARNm de Wnt5a ou de Wnt11 dans le Zebrafish ou le *Xenopus* ont permis de doubler la concentration de calcium intracellulaire (Slusarski et al., 1997).

Voie Akt/mTOR

Dans le muscle squelettique, la liaison de Wnt7a sur Frizzled7 induit l'hypertrophie des myofibres par l'activation directe de la voie Akt/mTOR (Mammalian Target of Rapamycin). L'interaction entre le récepteur Frizzled et la kinase PI3 (phosphoinositide 3-kinase) est cruciale pour l'activation de cette voie non-canonique (von Maltzahn et al., 2011). En effet, la phosphorylation de la PI3K stimule la voie Akt/mTOR (Miyazaki and Esser, 2009). Par expérience d'immunoprécipitation de Frizzled7, il a été démontré que PI3K se fixe à ce récepteur dans les myotubes mais pas dans les cellules en prolifération (von Maltzahn et al., 2011). Le complexe composé de Wnt7a, Frizzled7 et PI3K régule alors l'activation de la voie de Akt/mTOR spécifiquement dans les myotubes.

Le complexe mTORC1 se compose de mTOR, Raptor (regulatory associated protein of mTOR) et mLST8 (mammalian homologue yeast LST8). La Sérine/Thréonine kinase mTOR est un élément important de ce complexe. Cette kinase active la sous-unité ribosomique S6 kinase (S6K) pour stimuler la synthèse protéique (Miyazaki and Esser, 2009). La voie mTOR fait également intervenir d'autres protéines kinases telles que l'Akt / PKB, l'AMPK, et GSK-3.

L'activation de la voie permet de stimuler la biogenèse des ribosomes et la synthèse protéique, faisant de la voie Akt/mTOR le premier mécanisme moléculaire pour lier la signalisation Wnt à une stimulation de la synthèse des protéines. La

signalisation Wnt7a/Frizzled7 régule l'homéostasie à deux niveaux : l'hypertrophie des fibres musculaires par la voie mTOR et l'expansion des cellules souches par la voie PCP. Ces régulations mettent en avant la capacité de Wnt7a à influencer et à réguler deux différentes voies dans le muscle (von Maltzahn et al., 2012b).

Régulateurs de la voie non-canonique

Lors de l'activation de la voie Wnt/PCP, la protéine Rac1 (de la famille des Rho GTPases) est phosphorylée et devient ainsi active, permettant de stimuler l'activité de JNK et la transcription des gènes cibles. L'activation et l'inactivation de Rac1 s'effectuent selon un cycle (Nagase and Fujita, 2013) selon lequel la protéine peut être continuellement activée et associée à une molécule de GTP (Guanosine triphosphate) et inactivée par association avec une molécule de GDP (Guanosine diphosphate). Une molécule chimique (appelée EHOp-016) a été synthétisée pour reconnaître spécifiquement les GTPases et inhiber l'activité des protéines Rac (Montalvo-Ortiz et al., 2012). L'inhibiteur EHOp-016 (ainsi que l'inhibiteur NSC23766) bloque l'activité de Rac en inhibant l'interaction de celle-ci avec les molécules GTP qui pourraient lui transmettre leur unité phosphatée. Par cette action, Rac1 ne peut être sous forme GTP, et le signal d'activation ne pourra pas être transmis aux autres intervenants de la voie PCP (Nagase and Fujita, 2013). L'activation de la voie non-canonique sera inhibée.

La Rapamycine est un inhibiteur spécifique de mTOR (Mammalian Target Of Rapamycin) et de la voie qui lui est associée (Kim et al., 2002). Cette molécule se lie au site catalytique de mTOR et bloque les fonctions de ce dernier. En effet, la Rapamycine n'inactive pas mTOR mais empêche son interaction avec d'autres protéines. Par exemple, lors de l'activation de la voie Akt/mTOR, la Rapamycine inhibe la formation du complexe mTOR/Raptor (Kim et al., 2002). Moléculairement, l'inhibition de mTOR ne permet pas la transmission du signal de la voie non-canonique. Au niveau cellulaire, la Rapamycine bloque les signaux nécessaires à la croissance et à la prolifération des cellules (Ballou and Lin, 2008).

II. 3) La voie canonique

Le rôle de la β -caténine dans la voie canonique a été mis en évidence il y a une trentaine d'années (Riggelman et al., 1990). Il a été très tôt démontré que la β -caténine interagit avec LEF1 (Lymphocyte Enhancer Binding Factor 1) et TCF (T Cell Factors) et permet la transcription de certains gènes sous l'influence de signaux Wnt. Aujourd'hui, les protéines contribuant à l'activation de la voie Wnt/ β -caténine sont connues, ainsi que la transmission du signal au niveau moléculaire.

Signalisation

La voie Wnt/ β -caténine est la voie de signalisation Wnt la plus connue. Son activation est initiée par l'interaction des ligands Wnt avec les récepteurs Frizzled et les corécepteurs LRP5/6.

En l'absence de ligands Wnt, la β -caténine cytoplasmique est transportée vers un **complexe de destruction** composé d'APC (adenomatous polyposis coli), CK1 α (Casein kinases) et GSK3 β (glycogen synthase kinase 3). Le complexe de dégradation est associé à d'autres protéines telles que GBP (GSK-binding protein, également appelé FRAT1/2) ou PP2A (protein phosphatase 2A). Bien que GSK3 soit l'enzyme responsable de la phosphorylation de la β -caténine, l'interaction directe entre APC, l'Axine et la β -caténine est nécessaire pour la phosphorylation de cette dernière (Niehrs, 2012). Le rôle de l'APC dans la dégradation de la β -caténine reste encore en débat. En effet, les cellules cancéreuses du côlon ayant une mutation dans le gène codant l'APC peuvent soit maintenir la phosphorylation de la β -caténine sans pouvoir dégrader la protéine, soit limiter la phosphorylation et la dégradation. Ces variations sont explicables par la localisation de la mutation sur le gène (Sadot et al., 2002). Lorsque la β -caténine est phosphorylée, elle est dégradée par le protéasome (Figure 12) par reconnaissance de son site phosphorylé par β -TrCP (β -transducin repeat-containing protein) qui est un composant du complexe de l'Ubiquitine ligase E3. Par conséquent, en l'absence de Wnt, la concentration de β -caténine cytoplasmique reste faible, et les facteurs de transcription LEF1 et TCF

interagissent avec Groucho dans le noyau pour réprimer des gènes cibles Wnt-spécifiques (Roose et al., 1998).

La seule présence des récepteurs Frizzled n'est pas suffisante pour maintenir l'activité complète de la signalisation Wnt. L'activation de la voie requiert également la fonction des corécepteurs LRP5 et LRP6 (Tamai et al., 2000). Une étude a montré que les ligands Wnt se lient à l'extrémité amino-terminale des corécepteurs LRP et permettent la formation d'un **complexe Frizzled-LRP-Wnt** (Tamai et al., 2000). La stabilisation de ce complexe dépend de l'activité des protéines intracellulaires telles que la glycogène synthase kinase 3 (GSK3), l'Axine et Dishevelled (Bilić et al., 2007). Une coopération spatio-temporelle est établie entre les protéines pour permettre l'activité des récepteurs de la voie Wnt.

Par liaison des Wnt sur les récepteurs Frizzled, les corécepteurs LRP5-LRP6 sont phosphorylés par les kinases CK1 γ et GSK3 β (Davidson et al., 2005), permettant d'accroître leur activité. Plusieurs études sont contradictoires sur la phosphorylation des LRP. Une première étude a montré que GSK3 permet la phosphorylation d'une manière Wnt-dépendante (Zeng et al., 2005), alors qu'une seconde prouve que la stimulation des voies Wnt n'influence pas l'état de phosphorylation des corécepteurs (Davidson et al., 2005).

L'Axine est nécessaire pour la phosphorylation des corécepteurs LRP6. De plus, la phosphorylation par GSK3 β et CK1 γ du domaine C-terminal de LRP5/6 permet le recrutement de l'Axine à la membrane cytoplasmique. Une expérience de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) a démontré que l'Axine est recrutée au niveau du domaine C-terminal du corécepteur LRP5, quelques minutes après l'activation de Frizzled (Mao et al., 2001). La concentration d'Axine dans la cellule étant très faible, sa séquestration par LRP5 et LRP6 permettrait de réduire la proportion de protéines cytoplasmiques intégrées dans le complexe de dégradation de la β -caténine. L'interaction étroite entre ces deux protéines suggère une régulation positive entre LRP6 et l'Axine.

Dishevelled est une phosphoprotéine qui intervient activement dans la voie de signalisation Wnt. Elle participe également à la phosphorylation de LRP5 ou LRP6 (Zeng et al., 2008) et interagit avec les récepteurs Frizzled (Bilić et al., 2007) pour permettre l'activation de la voie canonique. Dishevelled pourrait inactiver le

complexe de dégradation β -caténine par son association avec l'Axine (Smalley et al., 1999).

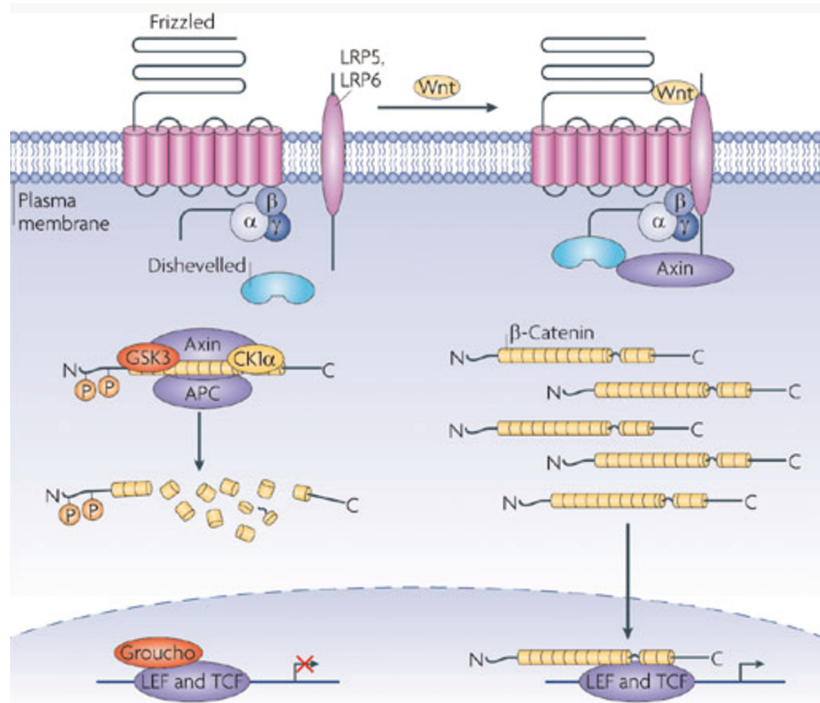


Figure 12. La régulation de la voie Wnt/ β -caténine

Sans activation par les ligands Wnt, les protéines APC, Axine, GSK3 et CK1 α forment un complexe de dégradation qui permet la phosphorylation et la dégradation de la β -caténine par le protéasome. La protéine est alors en faible concentration dans le cytoplasme. Après liaison des Wnt sur les récepteurs Frizzled, les corecepteur LRP5/6, les protéines G et Dishevelled sont activées. L'Axine est recrutée à la membrane plasmique, déstabilisant le complexe de dégradation et favorisant l'accumulation de la β -caténine dans le cytoplasme et sa translocation vers le noyau.

D'après Angers and Moon, 2009

Lorsque les ligands Wnt se fixent sur les récepteurs de la voie, Frizzled et LRP forment un complexe de signalisation qui conduit à la stabilisation de la β -caténine non phosphorylée (Tamai et al., 2000) via l'inhibition de l'activité de la Glycogène synthase kinase 3 (GSK3). De plus, la séquestration de l'Axine au

niveau des récepteurs permet une désorganisation du complexe de destruction (Figure 12). Cette perturbation permet la stabilisation et la translocation de la β -caténine cytoplasmique dans le noyau (Niehrs, 2012), et la formation d'un complexe transcriptionnel actif avec TCF (T-cell factor-1) et LEF1 (Lymphoid Enhancer-Binding Factor 1). La β -caténine n'ayant pas de domaine de liaison à l'ADN, son rôle de co-activateur transcriptionnel permet d'initier la transcription des gènes cibles de la voie Wnt canonique (Städli et al., 2006).

β -caténine

Contrairement à la grande majorité des protéines, la β -caténine est une protéine hautement conservée entre les espèces. Par exemple, seuls six acides aminés sont différents entre les protéines humaines et de *Xenopus* alors que la structure primaire de la β -caténine comporte 781 acides aminés (Shapiro and Weis, 2009).

Une délétion du gène CTNNB1 codant pour la β -caténine présente les mêmes phénotypes que la perte de la protéine Wingless (l'homologue de Wnt chez la *D. melanogaster*) au cours du développement de la drosophile (Peifer et al., 1991), montrant l'importance de cette protéine dans la voie de signalisation Wnt.

La β -caténine a un rôle majeur dans la transduction de la signalisation Wnt, mais également dans l'adhésion cellulaire. Elle permet de maintenir l'interaction entre Cadhérines et α -caténines dans les cellules afin de permettre leur adhésion (Yamada et al., 2005). Sa participation à l'un des deux processus biologiques est régulée par l'action de Tyrosines phosphatases et de Tyrosines kinases sur la β -caténine (Daugherty and Gottardi, 2007).

Dans la voie de signalisation Wnt, la dégradation de la β -caténine est contrôlée par phosphorylation de la protéine (Niehrs, 2012). L'Axine interagit avec GSK3 et CK1 α et coordonne la phosphorylation séquentielle du domaine N-terminale de la β -caténine. La protéine CK1 α permet l'ajout du groupe phosphate sur la Sérine 45, et autorise la phosphorylation de la Thréonine 41, la Sérine 33 et la

Sérine 37 de la β -caténine par GSK3 (Kimelman and Xu, 2006). Les phosphorylations sur les Sérines 33 et 37 sont reconnues par l'Ubiquitine ligase E3 β -TrCP, induisant l'ubiquitination de la β -caténine et sa dégradation par le protéasome.

Le transport de la β -caténine dans le noyau est un processus encore mal expliqué à ce jour. Plusieurs études prouvent que la β -caténine pénètre dans le noyau en interagissant directement avec les importines au niveau des pores nucléaires (Henderson, 2002). La β -caténine serait également capable de quitter le noyau, majoritairement aidée d'APC et de l'Axine (Henderson, 2002). En effet, l'Axine et l'APC favoriseraient une augmentation de la β -caténine dans le cytoplasme alors que TCF permettrait d'augmenter la β -caténine nucléaire.

Transcription des gènes cibles

En l'absence de la β -caténine nucléaire, les facteurs TCF interagissent avec les répresseurs transcriptionnels Groucho et CtBP (Cadigan and Waterman, 2012). Par interaction directe avec le complexe de transcription, Groucho et CtBP (Figure 13) empêchent l'expression des gènes cibles de Wnt puisque la présence de Groucho à l'ADN favorise la désacétylation des histones et la compaction de la chromatine (Daniels and Weis, 2005). La propriété d'activation transcriptionnelle que possèdent les facteurs LEF/TCF est principalement régulée par leurs partenaires de liaison (Cadigan and Waterman, 2012).

Dans le noyau, la β -caténine interagit avec les facteurs de transcription LEF/TCF par son domaine répété Armadillo. Bien que les facteurs TCF/LEF soient les partenaires principaux de la β -caténine, cette dernière peut également interagir avec d'autres cofacteurs, via son domaine C-terminal, tels que CBP/p300 (CREB Binding Protein) et Brg1 (Brahma-related *gene*-1) qui permettent la transcription des gènes cibles de Wnt (Lien and Fuchs, 2014). La famille LEF/TCF chez les mammifères comprend LEF1, TCF1, TCF3 et TCF4 (Hurlstone, 2002). Les facteurs de transcription TCF/LEF se fixent sur les régions régulatrices de certains gènes par

leur capacité à reconnaître certains motifs spécifiques. Par interaction de la β -caténine avec TCF/LEF, les corépresseurs Groucho et CtBP sont déplacés ou inactivés (Daniels and Weis, 2005) et des coactivateurs sont recrutés au niveau du complexe de transcription. Parmi les nombreux coactivateurs identifiés, les protéines Pygopus et BCL9 (B-Cell CLL/Lymphoma 9) sont les plus connues pour stimuler l'activité de la β -caténine (Li et al., 2007). Pygopus peut interagir directement avec le facteur de transcription TCF (Figure 12), où il joue un rôle au niveau des marqueurs d'histones de l'ADN afin de faciliter la transcription des gènes.

Lors de l'activation de la voie Wnt, la modification de la chromatine la plus fréquente dans la régulation des gènes cible Wnt est l'acétylation des histones. L'ajout de groupes acétyles sur plusieurs Lysines des histones H3 et H4 par des histones acétyltransférases (HAT) est fortement corrélé avec l'activation transcriptionnelle des gènes. En l'absence de β -caténine, cette réaction est contrebalancée par des histones désacétylases (HDAC) qui établissent la répression des cibles Wnt (Lyu et al., 2011). La protéine CBP est une histone acétyltransférase qui peut se fixer sur le domaine C-terminal de la β -caténine et réguler l'expression des gènes cibles de la voie (Mosimann et al., 2009). Le recrutement de CBP/p300 au niveau du complexe de transcription a été corrélé avec une augmentation de l'acétylation des histones H3 et H4 (Lyu et al., 2011). De plus, la triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me3) par les méthyltransférases s'effectue sur différents promoteurs cibles (Parker et al., 2008) et est nécessaire pour l'activation complète de plusieurs cibles de Wnt (Parker et al., 2008).

Plus de 80 gènes sont régulés par la voie Wnt/ β -caténine (Schwartz et al., 2003). Leur expression permet le contrôle de la prolifération (par exemple, la Cycline D1 and Id2 (inhibitor of DNA binding 2)) ou la différenciation des cellules (par exemple, Myf5). De plus, ces gènes jouent un rôle de régulateur de la voie canonique (comme l'Axine 2, β -TrCP (β -transducing repeat-containing protein), Dkk1 (Dickkopf-related protein 1) et sFRPs (secreted Fzd-related proteins)) (Sethi and Vidal-Puig, 2010).

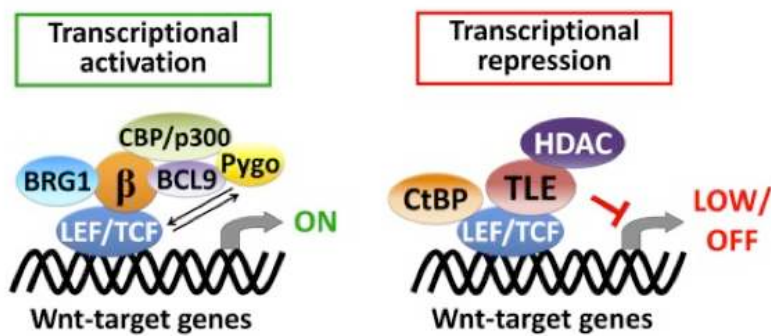


Figure 13. Régulation de la transcription des gènes cibles de Wnt

Lors de l'activation de la voie, l'interaction de la β -caténine avec les facteurs de transcription LEF/TCF permet le recrutement de CBP/p300. La structure de la chromatine est modifiée et la transcription génique est activée. En l'absence de la β -caténine, le répresseur transcriptionnel Groucho est recruté au niveau des facteurs LEF/TCF.

D'après Lien and Fuchs, 2014.

Régulateurs de la voie canonique

Des protéines ou des drogues permettent d'inhiber ou d'activer la voie canonique selon leurs propriétés et leurs actions sur les protéines cibles. Certaines sont étudiées pour leur potentiel thérapeutique en médecine régénérative. La voie Wnt/ β -caténine est impliquée dans le développement embryonnaire et dans l'homéostasie des tissus adultes. Elle permet notamment la prolifération, la différenciation, la migration et la survie des cellules (Rulifson et al., 2007, Andl et al., 2002 et Pinto et al., 2003). L'utilisation de molécules agonistes/antagonistes permet d'envisager une régulation contrôlée de la voie. L'activation de la voie canonique peut être régulée à plusieurs niveaux : sur l'activité des récepteurs ou la stabilisation de la β -caténine

Une étude a montré que la fonction des cellules dans les cryptes intestinales était altérée par l'absence de la β -caténine ou par l'expression de l'inhibiteur Dickkopf1 (Pinto et al., 2003) montrant l'importance de la signalisation Wnt/ β -

caténine dans ce tissu. **Dickkopf** est une famille de quatre protéines (Dkk1-4). Chez l'homme, Dkk1 se lie spécifiquement au corécepteur de la voie LRP5/6, limitant son activation. Ce ligand est un inhibiteur spécifique de la voie canonique (Glinka et al., 1998). Les **sFRP** sont des protéines qui ont un domaine riche en cystéine, homologue au domaine de liaison de Frizzled (Rattner et al., 1997). Ainsi, sFRP peuvent se fixer sur les récepteurs et sur les Wnt et bloquer l'activité du récepteur en limitant l'interaction ligand-récepteur. Ces protéines ont été étudiées en tant que potentiel thérapeutique contre certains cancers. Les protéines **WIF-1** sont capables de se lier sur les ligands Wnt, inhibant ainsi l'interaction entre Wnt et le récepteur Frizzled (Hsieh et al., 1999). Cet antagoniste de la voie est un facteur sécrété qui a un contact direct avec les Wnt. D'autres protéines agissent sur la voie Wnt/ β -caténine et spécifiquement sur la phosphorylation de la β -caténine. La kinase **TAK1** (kinase protein TGF β -activated kinase 1) et **NLK** (Nemo-like kinase) permettent de phosphoryler la β -caténine et d'initier son processus de dégradation jusqu'au protéasome. Ce processus est notamment régulé par les voies non-canoniques (Ishitani et al., 2003) et permet d'inhiber l'activité transcriptionnelle de la β -caténine. De plus, la **Wogonine** (5,7-dihydroxy-8-methoxyflavone) permet un arrêt du cycle cellulaire, directement par inactivation de la voie β -caténine. La Wogonine stimule la dégradation de cette dernière et interfère avec l'activité transcriptionnelle de TCF/Lef. Cette molécule diminue également l'activité kinase de CDK8, un oncogène impliqué dans le développement des cancers colorectaux (He et al., 2013).

Dans le muscle en régénération, l'activation de la **voie Notch** est suivie par l'activation de la signalisation Wnt (Brack et al., 2008). L'activité de cette dernière mène à l'inhibition rapide de la voie Notch. L'équilibre entre ces voies se traduit par l'état d'activation de la GSK3. La voie Notch maintient cette kinase dans un état actif alors que la voie Wnt inactive la fonction de GSK3. Ainsi, la GSK3 β est un déterminant essentiel dans la régulation de l'activation des signalisations Notch et Wnt (Brack et al., 2008). Dans les cryptes intestinales, la voie Wnt est très activée dans les cellules situées à la base de la crypte et le niveau d'activité des Wnt est décroissant le long de l'axe crypte-villosité. La signalisation Wnt permet la prolifération et la différenciation des cellules souches. A contrario, la signalisation **BMP4** (bone morphogenetic protein) est moins élevée dans les cellules des cryptes. Cette activité diminuée est en corrélation avec la présence de **Noggin**, un inhibiteur

de la voie BMP (He et al., 2004). La voie BMP exerce un rôle de régulateur négatif sur la signalisation WNT, et inhibe la prolifération des cellules. Une inactivation du récepteur BMP ou une sur-expression de Noggin permet le transport de la β -caténine dans le noyau, et la transcription des gènes cibles de Wnt (He et al., 2004). Cela montre une régulation étroite entre les voies Wnt et BMP. Des nouvelles molécules telles que **LGK974** permettent d'inhiber l'action de Porcupine, et par conséquent la maturation et la sécrétion des Wnt (Liu et al., 2013). LGK974 est actuellement utilisée lors de tests cliniques pour traiter le cancer du sein ou encore le cancer colorectal.

Les familles de protéines **Norrine** et **R-spondin** sont des agonistes de la voie Wnt/ β -caténine. Bien que Norrine interagisse spécifiquement avec Frizzled4, elle n'altère pas la fonction de ce dernier. Son interaction avec Frizzled4 et LRP5/6 permet de stimuler la voie Wnt, comme il l'a été prouvé au cours de la vascularisation de la rétine (Xu et al., 2004). Les protéines R-spondin interagissent avec Wnt, Frizzled et LRP6 (Nam et al., 2006) et permettent d'augmenter le signal lors de l'activation de la voie Wnt.

Des molécules chimiques permettent de cibler directement l'activité de GSK3 et d'inhiber ses fonctions. L'enzyme GSK3 est responsable de la phosphorylation de la β -caténine et de sa dégradation. Quatre principaux inhibiteurs chimiques, **BIO**, **SB-216763**, **CHIR-99021** et **CHIR-98014**, ont été étudiés. Ils possèdent une capacité à sur-activer la voie canonique (Naujok et al., 2014). Ces molécules sont considérées comme de puissants hyper-activateurs de la voie canonique.

II. 4) Une compétition entre les voies Wnt ?

Les voies de signalisation Wnt canoniques et non-canoniques ne doivent pas être considérées comme des voies totalement exclusives ou unidirectionnelles. Plusieurs études ont démontré que ces voies peuvent être amplifiées ou désensibilisées par des facteurs externes mais également qu'elles peuvent être

antagonistes entre elles. En effet, il a été étudié que la signalisation canonique peut être inhibée par la signalisation non-canonique (Sato et al., 2010).

Dans de nombreux types cellulaires, Wnt5a active la voie non-canonique. Des premières études dans les embryons de *Xenopus* montrent qu'une altération de Wnt5a permet l'activation de la voie Wnt/ β -caténine et modifie les axes de développement de l'embryon (Torres et al., 1996). Plusieurs mécanismes antagonistes ont été mis en évidence pour expliquer l'action inhibitrice de Wnt5a sur la voie Wnt/ β -caténine.

Wnt5a est capable d'inhiber la voie Wnt/ β -caténine en agissant directement sur les récepteurs (Sato et al., 2010). En effet, Wnt5a peut rivaliser avec Wnt3a (qui stimule la voie canonique) en se fixant à la place de ce dernier sur le récepteur Frizzled2. En empêchant l'interaction entre Wnt3a et Frizzled2, Wnt5a ne permet pas l'activation de la voie Wnt/ β -caténine dans les cellules HeLa (Sato et al., 2010).

Wnt5a peut également activer la voie Wnt/ Ca^{2+} et stimuler le relargage intracellulaire des ions calciums. Par stimulation de cette voie, Wnt5a entraîne la dégradation de la β -caténine indépendamment de GSK3, ne permettant pas à la voie canonique d'être active. La stimulation de la voie calcium induit l'expression d'une ubiquitine ligase E3 (Siah2) responsable de la dégradation de la β -caténine, au cours du développement des membres de la souris (Topol et al., 2003). Il est ainsi prouvé que la signalisation non-canonique peut affecter la stabilité de la β -caténine cytoplasmique.

Enfin, l'activation de la voie non-canonique inhibe l'expression des gènes cibles de β -caténine. La présence de Wnt5a sur les récepteurs Frizzled permet l'activation de kinases NLK (Nemo-like kinase) ou des corécepteurs ROR (Lee et al., 2010). Ainsi, NLK serait capable de phosphoryler la β -caténine et d'initier son processus de dégradation. De plus, par activation de PKC α et phosphorylation des ROR, les co-activateurs transcriptionnels de la β -caténine CBP/p300 ne peuvent être recrutés au niveau des gènes cibles de la voie canonique et permettre l'expression des gènes.

Ainsi, l'antagonisme entre les voies de signalisation Wnt s'effectue à la surface cellulaire, dans le cytoplasme et dans le noyau (Kikuchi et al., 2011). Bien que l'antagonisme des deux principales voies de signalisation soit assez bien déterminé dans le développement de l'embryon, et particulièrement chez le

Xenopus, il reste un processus très mal connu au sein des tissus adultes, et notamment dans le muscle squelettique.

II. 5) Les voies Wnt dans le muscle squelettique

La signalisation Wnt contribue au développement musculaire, à la fois pour la détermination embryonnaire du muscle (dans les somites) et également pour la régénération musculaire adulte (dans les cellules satellites).

L'activation de la voie Wnt/ β -caténine est importante lors de l'embryogenèse chez les mammifères. Elle permet l'expression des déterminants myogéniques Pax3, MyoD et Myf5 dans les premiers stades de développement musculaire. Les embryons de souris déficients pour Wnt1 et Wnt3a possèdent un défaut de formation du myotome (Ikeya and Takada, 1998). De plus, l'expression de Myf5 est diminuée dans les progéniteurs myogéniques aux premiers jours de développement, montrant que la signalisation Wnt est nécessaire pour l'expression de ce facteur myogénique dans le myotome.

Au stade post-embryonnaire, le muscle squelettique adulte possède des cellules souches (cellules satellites) quiescentes, capables d'être activées et de s'engager dans le lignage myogénique en réponse à un stress. La régulation de leur différenciation et de leur auto-renouvellement est essentielle lors de ce processus afin de maintenir la population de cellules satellites et de générer un nombre suffisant de cellules différenciées. Après une lésion musculaire, la signalisation Wnt est activée dans les cellules satellites (Parisi et al., 2015). Plus précisément, l'expression de Wnt5a, Wnt5b, Wnt7a et Wnt7b est stimulée quelques jours après la blessure musculaire (Polesskaya et al., 2003).

Par fixation sur son récepteur Frizzled7, Wnt7a induit la polarisation cellulaire et la division symétrique des cellules souches musculaires (Figure 15). Une étude montre qu'un traitement de Wnt7a sur les cellules myogéniques en culture n'augmente pas l'expression de TCF7, de l'Axine2 ou de la β -caténine (Le Grand et al., 2009). Ainsi, Wnt7a n'agit pas sur l'activation de la voie canonique

lors de la régénération musculaire mais stimule la voie non-canonique PCP et contribue à l'**expansion des cellules satellites** (Le Grand et al., 2009). Les animaux déficients pour Wnt7a présentent un nombre réduit de cellules satellites au cours de la régénération, montrant l'importance de la signalisation PCP sur l'expansion des cellules souches et la réparation du muscle (Le Grand et al., 2009).

En plus de son rôle dans le développement musculaire (Anakwe et al., 2003), la signalisation Wnt canonique contribue à la **différenciation des cellules** au cours de la régénération du tissu adulte (Velden et al., 2006). Le traitement des fibres isolées par sFRP3, un inhibiteur de Wnt, quelques jours après leur isolation diminue le nombre de cellules engagées dans la voie myogénique (Brack et al., 2008). De plus, il a été démontré que la β -caténine interagit avec le facteur myogénique MyoD et induit directement la différenciation myogénique (Kim et al., 2008a). La sur-activation de la voie Wnt/ β -caténine dans les myoblastes permet une augmentation de l'expression de la Myogénine et de la Myosine à chaîne lourde (MHC) (Tsivitse, 2010) et résulte en une différenciation prématurée des cellules musculaires suivie d'un défaut du maintien de la population de cellules souches (von Maltzahn et al., 2012a). Au cours de la régénération musculaire, une inhibition de la voie Notch et une activation de la voie Wnt favorisent la différenciation des cellules (Velden et al., 2006) chez l'adulte.

Plusieurs études prouvent que le contrôle de l'activation de la voie Wnt canonique au cours de la régénération musculaire chez l'adulte est crucial pour maintenir un équilibre entre la prolifération et la différenciation des progéniteurs. Tout d'abord, une délétion de l'*Axin1* dans les cellules satellites, causant une répression de l'activation de la voie Wnt/ β -caténine, maintient les cellules en prolifération et limite leur engagement dans le lignage myogénique (Figeac and Zammit, 2015). De plus, une étude menée dans notre laboratoire sur la protéine APC montre que la voie Wnt canonique est sur-activée dans les cellules satellites déficientes pour APC (Parisi et al., 2015). L'absence d'APC induit un défaut de prolifération et stimule la mort des cellules satellites, menant à une incorrecte régénération musculaire. Une expression mono-allélique d'APC dans les cellules satellites induit également une incorrecte régénération, bien que ce phénotype soit moins sévère que celui observé dans les cellules totalement déficientes pour APC. Cette étude a mis en évidence un rôle régulateur de la signalisation Wnt sur la

prolifération des cellules satellites, défini selon la concentration de la β -caténine dans le cytoplasme. Ces différentes concentrations vont induire différentes réponses cellulaires et mener à différents degrés de régénération musculaire (Parisi et al., 2015). Il est également possible d'étudier directement les conséquences d'une inhibition ou d'une sur-activation de la voie Wnt canonique dans les cellules satellites *in vivo* grâce à différents modèles murins (délétion de la β -caténine ou activation de la β -caténine) (Rudolf et al., 2016 et Murphy et al., 2014). Une première étude démontre que la régénération musculaire n'est pas altérée lorsque la β -caténine est non-dégradable dans les cellules satellites, mais qu'une perte de la β -caténine cause un important défaut de régénération et augmente la fibrose dans le muscle squelettique (Murphy et al., 2014). De façon intéressante, une étude menée dans notre laboratoire, portant également sur le rôle de la β -caténine dans la régénération musculaire montre des résultats contradictoires avec ceux de Murphy et al. (Rudolf et al., 2016). Les deux modèles murins (délétion de la β -caténine ou activation de la β -caténine) présentent un défaut de régénération musculaire important lié à une régulation incorrecte entre la prolifération et la différenciation des cellules satellites. Les cellules satellites déficientes pour la β -caténine ont un défaut de différenciation alors que les cellules satellites dont la β -caténine est activée sont prématurément différenciées (Rudolf et al., 2016). Plusieurs observations peuvent expliquer ces différents résultats obtenus dans les deux études. Tout d'abord, Murphy et al. a étudié les souris hétérozygotes en tant que souris contrôles. Il est probable que ces souris possèdent déjà un défaut de régénération causé par une diminution de la concentration de la β -caténine dans le cytoplasme des cellules satellites. De plus, il est à noter ici l'importance des lignées de souris utilisées telles que la lignée Pax7-CRE. Il est très probable que l'efficacité de recombinaison (du système CRE/Lox) varie entre les différentes lignées de souris.

Ces études montrent que le niveau d'activation de la voie Wnt canonique est essentiel pour déterminer la fonction future des cellules satellites au cours de la régénération musculaire.

La signalisation Wnt participe également au développement de la **fibrose** musculaire (Figure 14). Une injection de protéine Wnt3a dans un jeune muscle en régénération mime le phénotype observé dans un muscle de souris âgé en régénération sans injection (von Maltzahn et al., 2012a). Les jeunes muscles

injectés développent un tissu conjonctif anormal, directement lié à l'action de Wnt3a et à la stimulation de la voie canonique.

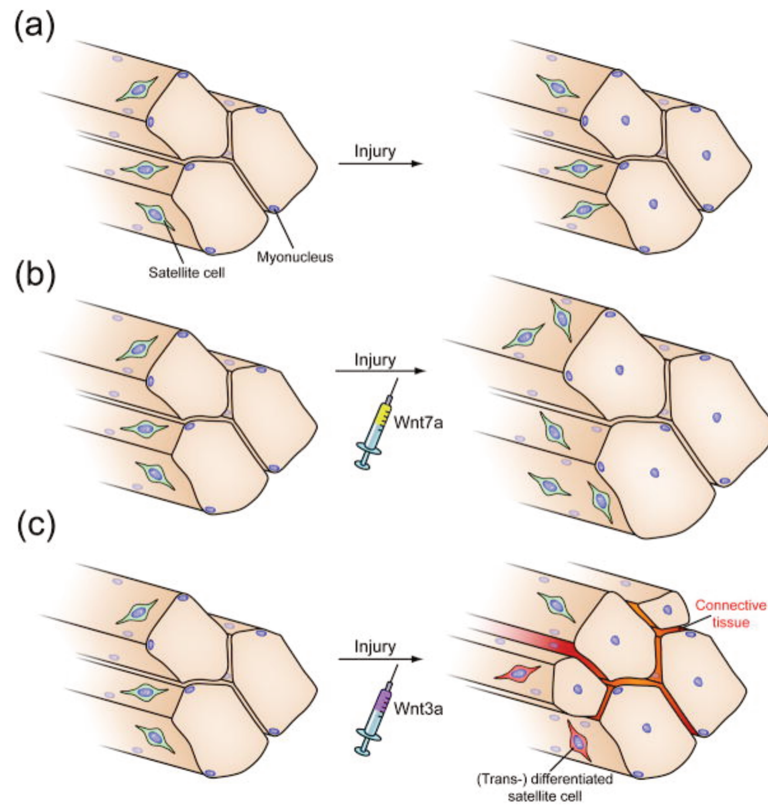


Figure 14. Les voies de signalisation Wnt régulent la myogenèse régénérative

(a) Les fibres régénérées possèdent des noyaux centraux. Après régénération, la taille des fibres est identique à celle avant blessure. (b) L'injection de Wnt7a dans les muscles en régénération permet l'expansion des cellules satellites par la voie Wnt/PCP et l'hypertrophie des myofibres par la voie Akt/mTOR. (c) L'injection de Wnt3a dans le muscle induit une hyperplasie des fibres et une augmentation du dépôt de tissu conjonctif.

D'après von Maltzahn et al., 2012a

Lors de la régénération musculaire, la **migration** des cellules semble cruciale pour l'initiation de la fusion des cellules et pour la formation de myofibres (Bae et al., 2008). Une étude montre qu'un traitement de Wnt7a sur les myoblastes permet d'augmenter leur migration (Figure 15) (Bentzinger et al., 2014). De plus,

les cellules des souris déficientes pour Frizzled7 ne peuvent initier le processus de migration. La même étude prouve que cette fonction, stimulée par Wnt7a, permet d'améliorer la prise de greffe et la dispersion des cellules dans un muscle atteint de dystrophie (Bentzinger et al., 2014).

La signalisation Wnt intervient dans la **détermination des types de fibres** musculaires. Dans le poulet, l'expression de Wnt5a permet d'induire un grand nombre de myofibres de types I via l'activation de la voie non-canonique, alors que Wnt11 permet d'augmenter le nombre de fibres de type II dans les muscles des ailes via l'activation de la voie canonique (Anakwe et al., 2003). Une autre étude montre que l'activation de la β -caténine est essentielle pour la détermination du type de fibres musculaires (Hutcheson et al., 2009). Une activation de la β -caténine permet d'augmenter le nombre de fibres de type II au cours du développement des muscles chez les vertébrés.

A la fin de la régénération, Frizzled7 est exprimé par les fibres musculaires. Son interaction avec Wnt7a permet la stimulation de la voie Akt/mTOR et l'augmentation de la taille des myofibres (von Maltzahn et al., 2011). Une injection de protéines recombinantes Wnt7a dans les muscles blessés (Figures 14 et 15) améliore le processus de régénération indépendamment d'un changement sur la différenciation cellulaire. La voie non-canonique, stimulée par Wnt7a, permet de stimuler la synthèse des protéines, créant une **hypertrophie des myofibres** (von Maltzahn et al., 2011).

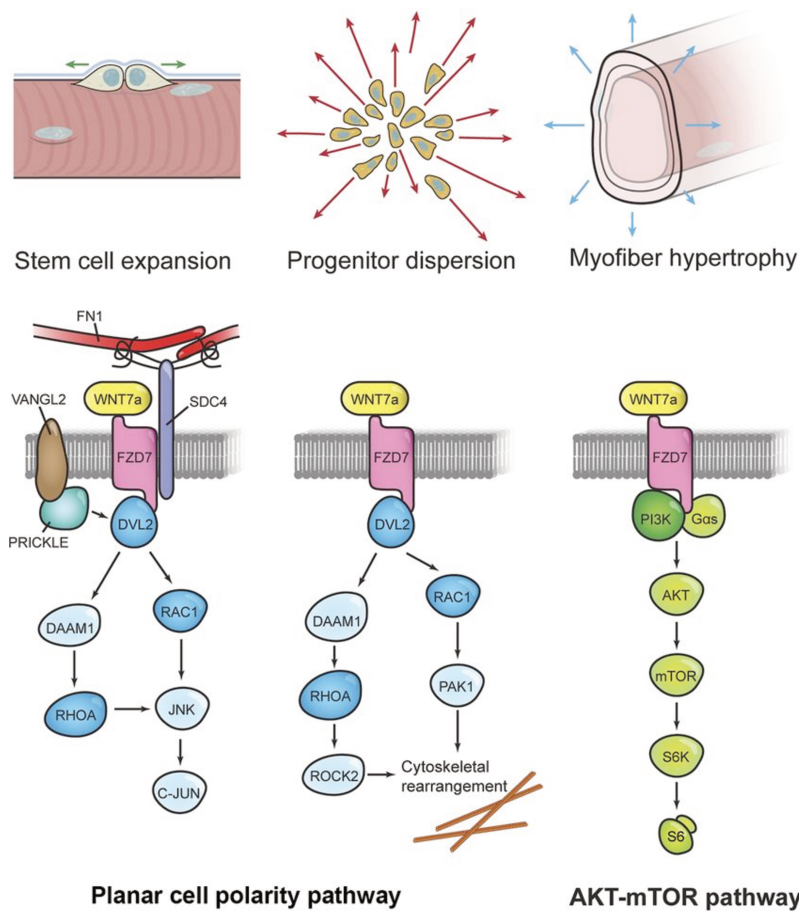


Figure 15. Les voies non-canoniques contribuent à la régénération musculaire

L'activation de la voie PCP par Wnt7a permet l'expansion et la migration des cellules satellites, alors que l'activation de la voie Akt/mTOR permet l'hypertrophie des myofibres.

D'après Bentzinger et al., 2014

II. 6) Les voies Wnt dans l'organisme adulte

L'activation des voies Wnt influence le comportement de nombreuses cellules souches adultes par le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire. La signalisation Wnt contribue au développement et au maintien de l'homéostasie des différents tissus. Selon le type cellulaire, elle joue un rôle dans la

régénération, la protection contre le stress, la synthèse des protéines ou encore la plasticité du tissu.

Dans le foie

Le maintien de la fonction hépatique chez les mammifères est crucial puisque le foie permet notamment le stockage du glycogène, la néoglucogenèse, la désintoxication et la production d'acides biliaires. Ces divers processus sont possibles par l'interaction complexe entre les différents types de cellules du foie (hépatocytes, cellules épithéliales biliaires, cellules de Küpffer ...). Le foie est un organe capable d'adapter les demandes métaboliques ou de faire face aux agressions toxiques (Apte et al., 2009). L'activation de la voie canonique est cruciale pour aider le foie à se régénérer ou se protéger contre le stress oxydatif toxique et métabolique. Les voies de signalisation Wnt ont la capacité de coordonner leur niveau d'activation selon les conditions physiologiques et physiopathologiques (Apte et al., 2009). La voie Wnt/ β -caténine est un régulateur important qui permet le maintien de l'homéostasie du foie et une altération de son activation peut conduire à des tumeurs bénignes et malignes du foie (Behari, 2010).

L'activation de la voie canonique contribue activement au processus de croissance post-natale de l'organe, ainsi qu'à sa régénération via l'activité de la Cycline D1 (Tan et al., 2006). De plus, la β -caténine contribue à la réponse au stress oxydatif par interaction avec FOXO (forkhead box O). Lorsque les cellules du foie sont exposées à plusieurs niveaux de stress oxydatif, l'interaction entre la β -caténine et FOXO est augmentée (Essers et al., 2005). Cela permet d'accroître l'activité de FOXO, de stopper la progression du cycle cellulaire et d'augmenter la résistance des cellules au stress oxydatif. Le foie des souris déficients pour la β -caténine présente un sévère phénotype de lésion après une induction de fort stress oxydatif, confirmant l'importance de l'activation de la voie Wnt/ β -caténine dans le foie et son rôle dans la réponse au stress oxydatif hépatique (Behari, 2010).

De plus, la signalisation Wnt/ β -caténine est nécessaire au développement du foie puisqu'il contribue à la maturation et la différenciation des hépatocytes biliaires.

Dans le pancréas

Le pancréas est un organe crucial pour la production d'enzymes digestives et d'hormones endocrines telles que l'Insuline et le Glucagon. La voie de signalisation Wnt/ β -caténine contribue à l'établissement des fonctions exocrine et endocrine du pancréas. Dans les îlots pancréatiques, les cellules β représentent 65 à 80 % de la population cellulaire et permettent la production et la libération d'Insuline de manière endocrine.

Les cellules β expriment plusieurs intervenants de la voie canonique tels que les Wnt, FRPs, LRPs et Dkks, montrant que celle-ci est impliquée dans la fonction des cellules β . De plus, TCF4 a également été identifié comme un facteur génétique impliqué dans la sécrétion d'Insuline (Welters and Kulkarni, 2008). Plusieurs études ont démontré que la signalisation Wnt/ β -caténine peut influencer d'autres fonctions biologiques des cellules β comme la prolifération (Rulifson et al., 2007) ou la survie cellulaire (Liu and Habener, 2009).

Une récente étude montre que la voie non-canonique participe activement aux fonctions des cellules β (Mori et al., 2009). L'Insuline et l'IGF-1 (insulin-like growth factor I) peuvent stimuler la voie Akt/mTOR en induisant la phosphorylation de PI3K. Le récepteur à l'Insuline et la voie Akt/mTOR jouent des rôles importants dans le métabolisme du glucose et dans le développement des cellules β . En effet, l'inhibition de mTOR par la Rapamycine bloque la prolifération des cellules β (Liu et al., 2009). De plus, une sur-activation de la voie mTOR cause une hypertrophie des cellules β et accroît la synthèse de l'insuline (Mori et al., 2009). Ce résultat montre que la voie non-canonique régule la production d'Insuline dans le pancréas.

Dans les intestins

L'homéostasie de l'intestin adulte est maintenue par les cellules souches capables de proliférer, se différencier et de migrer au niveau des cryptes ou des villosités de l'intestin. L'épithélium de l'intestin est soumis à un stress permanent

qui l'oblige à se régénérer grâce à la prolifération des cellules souches et la différenciation des progéniteurs.

La voie Wnt/ β -caténine contribue au maintien de l'homéostasie de l'intestin. Une inactivation forcée de cette voie par l'expression de Dkk1 a pour conséquence une altération de la maintenance de la population de cellules souches (Pinto et al., 2003). Par une expérience de sur-expression de la β -caténine dans les cellules de l'intestin, il a été démontré que l'activation de la voie canonique contribue à la différenciation des cellules progénitrices de l'intestin (dans le compartiment de Paneth). Cependant, en inhibant partiellement l'expression de la β -caténine, un défaut de prolifération des cellules souches a été mis en évidence en plus du défaut de différenciation des cellules progénitrices. Ces résultats prouvent que la voie canonique a un rôle direct dans la différenciation des cellules de Paneth (Andreu et al., 2008).

Dans les follicules pileux

Plusieurs études montrent que la voie canonique joue un rôle important dans l'épiderme interfolliculaire. Un taux élevé de Dkk1 dans l'épiderme, induisant la dégradation de la β -caténine, inhibe la formation des follicules pileux chez les souris (Andl et al., 2002). Les souris sont alors dépourvues de poils et de vibrisses. L'activation de la voie Wnt au cours du développement est nécessaire pour l'initiation du développement des follicules pileux.

Dans les tissus adipeux bruns/blancs

Les adipocytes bruns permettent la libération d'énergie sous le métabolisme oxydatif. Le rôle de la voie canonique dans le tissu adipeux brun est peu connu mais il a été démontré que l'activation de cette voie au stade de différenciation précoce des tissus inhibe l'adipogenèse du tissu brun, bien que la stimulation de la voie dans les adipocytes bruns matures permette leur conversion en adipocytes blancs. En

effet, l'expression transgénique de Wnt10b dans les adipocytes bruns a pour conséquence une inhibition du développement du tissu adipeux brun, ne permettant plus à l'organisme de réguler ses dépenses énergétiques (Longo et al., 2004)

Le tissu adipeux blanc est responsable du stockage et de la libération des réserves énergétiques de l'organisme. Ce tissu est capable de gérer sa masse en réponse à un changement nutritionnel (Sethi and Vidal-Puig, 2007). La voie canonique est impliquée dans la régulation de l'adipogenèse (Prestwich and MacDougald, 2007). La signalisation est activée différemment dans les adipocytes et les pré-adipocytes. Dans les pré-adipocytes, la signalisation est faiblement activée et permet le processus d'adipogenèse. Dans les adipocytes matures, les ligands Wnt sont sécrétés, ainsi que des répresseurs de la voie tels que les sFRP. Cela permet au tissu de conserver une plasticité permanente selon les conditions nutritionnelles, via la régulation de la voie Wnt (Sethi and Vidal-Puig, 2010). Dans ce tissu, la voie Wnt/ β -caténine est un répresseur du processus d'adipogenèse.

II. 7) Maladies et thérapies

La signalisation Wnt est impliquée dans le développement et l'homéostasie des tissus. Une mutation d'un des composants de la voie peut être associée à de nombreuses maladies ou à des cancers. L'activation de la voie Wnt peut être altérée par des mutations génétiques sur plusieurs niveaux moléculaires : les récepteurs, la sécrétion des Wnt, les agonistes ou antagonistes de la voie, la stabilisation de la β -caténine ou la transcription des gènes cibles. Les voies Wnt peuvent être régulées « artificiellement » dans le cadre de thérapies contre le cancer ou contre les maladies rares. Plusieurs drogues ou molécules chimiques ont prouvées leur efficacité pour maintenir l'homéostasie des tissus et un fonctionnement cellulaire correct dans les cellules mutées.

Pathologies

L'activité des récepteurs de la voie Wnt est cruciale pour l'activation de la signalisation. Une mutation dans le gène codant pour *Frizzled4* ou *LRP5* mène à une incorrecte vascularisation de la rétine, comme il a été observé dans la maladie de Norrie. Cette maladie, causée par une mutation du gène codant pour la protéine Norrine, se révèle par un développement rétinien anormal pouvant entraîner la cécité. L'implication de la protéine Norrine dans la maladie de Norrie a permis de déterminer que cette protéine est un agoniste de la voie Wnt (Xu et al., 2004).

Une mutation dans le gène APC, ayant pour conséquence la traduction d'une protéine courte et non-fonctionnelle, est la cause de beaucoup de cancers colorectaux (Rowan et al., 2000). Cette mutation ne permet plus à la protéine APC de reconnaître la β -caténine, ni de la recruter dans le complexe de dégradation. Ainsi, la β -caténine non dégradée est accumulée dans le cytoplasme, et mime les effets d'une stimulation continue et anormale de la voie canonique.

Cependant, un défaut d'APC n'est pas le seul responsable de la voie Wnt impliqué dans les cancers colorectaux. Une mutation de la β -caténine peut rendre cette protéine non dégradable. En effet, des délétions ou des mutations ponctuelles peuvent affecter la reconnaissance de la protéine par GSK3. Cette dernière ne pourra alors pas phosphoryler la β -caténine pour initier son processus de dégradation. Deux études ont démontré que deux à cinq mutations de la β -caténine sont impliquées dans plusieurs centaines de cancers colorectaux (Lüchtenborg et al., 2005 et Thorstensen et al., 2005).

Une mutation dans le gène codant pour le facteur de transcription TCF4 cause également de nombreux cancers. Les conséquences fonctionnelles de ces mutations restent à ce jour controversées, mais une étude montre qu'une mutation dans le gène codant TCF4 ne permet plus à ce facteur de transcription d'interagir avec la protéine répressive CtBP (Cuillière-Dartigues et al., 2006). Dans les cellules cancéreuses, CtBP ne peut plus réguler l'activité transcriptionnelle de TCF4. Sans régulation, ce dernier stimule l'expression des gènes cibles de la voie Wnt/ β -caténine et mène à une hyper-prolifération cellulaire.

Thérapies

Les conséquences d'une dérégulation de la voie Wnt canonique ont été largement étudiées, principalement via le cancer colorectal (Polakis, 2007). Plusieurs traitements permettent de bloquer la signalisation Wnt.

Une des thérapies envisagées est d'inhiber l'interaction entre les Wnt et leurs récepteurs, via la présence d'anticorps anti-Wnt ou d'inhibiteurs de la voie tels que WIF1 (He et al., 2005). D'autres molécules ont été isolées pour inhiber l'activité de Porcupine et ainsi prévenir la sécrétion extracellulaire des Wnt (Chen et al., 2009). Plusieurs agents moléculaires et chimiques sont actuellement à l'étude pour interférer sur la signalisation Wnt à plusieurs niveaux. Bien que ces agents soient des cibles thérapeutiques potentielles, leurs utilisations dans le cadre d'un traitement contre le cancer restent limitées puisqu'ils doivent cibler les cellules cancéreuses sans altérer l'homéostasie du tissu.

Une autre voie thérapeutique potentielle est la stabilisation de l'Axine dans le cytoplasme. Une nouvelle classe de molécules permet de stabiliser l'Axine, favorisant alors le recrutement de la β -caténine au complexe de dégradation et inhibant la signalisation Wnt (Chen et al., 2009), même dans les cellules cancéreuses déficientes pour APC. Bien que l'action directe de ces nouvelles molécules sur l'Axine soit encore mal comprise, elles restent des atouts thérapeutiques importants puisque l'accumulation de l'Axine permet de stimuler la dégradation de la β -caténine.

La signalisation Wnt est suractivée dans les muscles squelettiques âgés. Cela cause une faiblesse musculaire et un dépôt de fibrose important dans le muscle (Brack et al., 2007). Le dépôt de fibrose est également associé à des dystrophies musculaires (Mann et al., 2011). L'inhibition de la signalisation Wnt par l'inhibiteur Dkkopf chez la souris modèle pour la myopathie de Duchenne, a permis de réduire significativement la fibrose dans les muscles. Le contrôle de la voie Wnt par cet inhibiteur apporte un nouvel aspect thérapeutique pour les personnes âgées ou atteintes de dystrophie.

De plus, les laminopathies sont des maladies rares qui peuvent résulter d'une mutation du gène codant pour l'Emerine. Cette protéine est capable d'influencer l'activation de la voie Wnt/ β -caténine dans le muscle cardiaque. Une déficience pour l'Emerine cause un défaut de prolifération et de différenciation des cellules cardiaques. Une étude prouve que la régulation de la voie Wnt (via une inactivation mono-allélique de la β -caténine) dans les cellules déficientes pour l'Emerine permet de rétablir la prolifération et la différenciation des cardiomyocytes murins (Stubenvoll et al., 2015). La régulation de la voie Wnt est possible pour maintenir l'homéostasie du tissu et permet d'envisager une thérapie efficace contre les maladies.

III. Les protéines R-spondins

Les protéines R-spondins (Rspo) sont des protéines sécrétées importantes au cours du développement embryonnaire ainsi que dans un grand nombre de cellules souches adultes, notamment de l'intestin, de l'estomac et du foie. Ces protéines potentialisent la signalisation Wnt par l'interaction avec leurs récepteurs Lgr. Leur expression renforce le signal d'activation des voies canoniques et non-canoniques. Les R-spondins participent à la régulation de la prolifération ou de la différenciation des cellules embryonnaires ou adultes. Ces protéines étant exprimées dans de nombreux tissus et organes, une altération de l'activité de la protéine peut causer de nombreuses maladies. Mon travail de Doctorat s'est porté sur l'étude de la protéine R-spondin1. Dans ce chapitre, je prendrais cette protéine pour illustrer de nombreux exemples.

III. 1) Les ligands R-spondins et leurs récepteurs Lgr

Les protéines R-spondins forment une famille de quatre protéines sécrétées (Kamata et al., 2004) qui ont pour récepteurs les Lgr (Leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor). La structure de ces premiers leur permet d'être sécrété et d'interagir spécifiquement avec leurs récepteurs. Les Lgr sont une grande famille de récepteurs exprimés dans de nombreux tissus avec différentes propriétés. Seule une sous-famille de Lgr se lie aux R-spondins.

Expression des R-spondins

Les protéines R-spondin composent une famille de quatre ligands (Rspo1, Rspo2, Rspo3, Rspo4). Les quatre gènes codant pour ces protéines sont exprimés uniquement chez les vertébrés puisqu'aucun gène orthologue n'a été mis en

évidence à ce jour chez les invertébrés (Kamata et al., 2004). Le nom R-spondin (Roof plate specific-spondin) a été donné à cette famille de protéine suite à la découverte d'une nouvelle protéine ayant un domaine thrombospondin dans la plaque du tube neural (Roof plate) (Kamata et al., 2004).

Les séquences d'acides aminés des protéines R-spondins sont hautement conservées entre espèces. Ces quatre protéines, de 234 à 272 acides aminés, partagent en commun 40 à 60% de leur séquence (de Lau et al., 2012). Malgré leur conservation évidente, la localisation du gène codant pour R-spondin ou le nombre de transcrits peut varier selon les espèces. Par exemple, le gène codant pour R-spondin1 est localisé sur le chromosome 4, comporte 6 exons et code pour une seule protéine chez la souris alors que chez l'humain le gène est localisé sur le chromosome 1, comprend 7 exons et code pour 4 transcrits (www.ncbi.nlm.nih.gov). Le rôle des différents transcrits n'a pas été mis en évidence à ce jour (Parma et al., 2006). Cependant, quelque soit l'espèce, toutes les protéines R-spondins contiennent plusieurs domaines structurellement distincts (Figure 16) : un domaine N-terminal, deux domaines Furines riches en Cystéines, un domaine thrombospondin de type 1 et un domaine C-terminal comprenant un signal de localisation nucléaire (Kim et al., 2006). Les protéines diffèrent par leur domaine N-terminal et C-terminal, principalement par leur longueur. Cependant, les deux domaines Furines et le domaine thrombospondin sont très conservés dans les quatre protéines et sont nécessaires pour l'activation de la voie Wnt (Kazanskaya et al., 2004). Bien que les R-spondin possèdent un domaine de signal de localisation nucléaire, aucune étude ne démontre la présence de R-spondin dans le noyau.

Les R-spondins sont des protéines sécrétées dans le milieu extracellulaire (Nam et al., 2006). Elles possèdent un domaine de liaison aux Protéoglycanes héparane sulfate (Nam et al., 2006) qui leur permet de rester à la surface cellulaire via leur domaine C-terminal (Yoon and Lee, 2012). Les Protéoglycanes héparane sulfate (HSPG) sont des molécules capables d'interagir avec de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire ou de la membrane. Elles peuvent contribuer à la régulation des voies de signalisation WNT, FGF ou BMP. La sécrétion des R-spondins peut également être influencée par leur domaine riche en cystéines

puisque une étude a démontré qu'une mutation des résidus Cystéines 78 et 113 de ce domaine altère la sécrétion de la protéine R-spondin2 (Li et al., 2009).

Les R-spondins sont des protéines nouvellement découvertes, et la régulation de leur expression n'est pas encore comprise à ce jour. Plusieurs études montrent que les ligands R-spondins et Wnt sont exprimés par les mêmes cellules au cours du développement embryonnaire de la souris (Chadi et al., 2009), suggérant que ces deux familles de ligands régulent leur expression réciproquement. Une première étude a mis en évidence le défaut d'expression de R-spondin dans les embryons de souris déficients pour Wnt1, montrant que les Wnt peuvent réguler le niveau d'expression des R-spondin (Kamata et al., 2004). De plus, une altération de l'expression de R-spondin2 induit un défaut d'expression de Wnt3, Wnt7b et de l'Axe2 dans les poumons en développement chez les mammifères (Yamada et al., 2009), mettant en évidence une régulation des Wnt par R-spondin. Enfin, une sur-expression de Wnt11 augmente significativement la transcription de R-spondin2 dans les cellules ostéoblastiques (MC3T3) (Friedman et al., 2009). Les ligands Wnt et R-spondins pourraient réguler leur expression via un feedback positif dans différents types cellulaires.

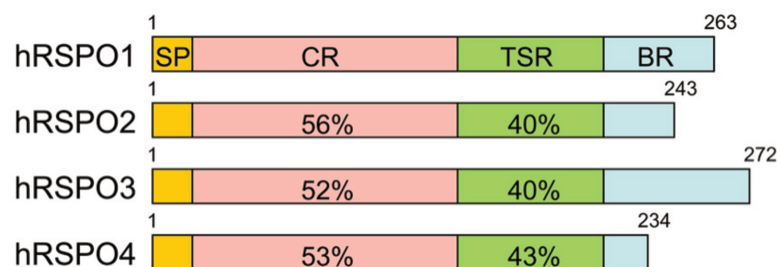


Figure 16. La structure des protéines R-spondins humaines

Les R-spondin ont quatre domaines conservés : un domaine C-terminal (SP), deux domaines Furine riches en cystéines (CR), un domaine thrombospondin de type 1 (TSR) et un domaine C-terminal riche en amino-acides (BR). Les pourcentages représentent le taux de similarité entre protéines.

D'après Yoon and Lee, 2012

Le rôle précis de la famille des R-spondins est encore peu connu dans le muscle squelettique en régénération. Cependant plusieurs études montrent que ces protéines jouent un rôle important au cours de la myogenèse régénérative puisque R-spondin2 favorise l'engagement des cellules dans la voie myogénique via l'activation de la voie Wnt canonique. Dans les tissus non musculaires, R-spondins est crucial pour la régulation de l'homéostasie et pour la régénération des tissus. Ces protéines, découvertes il y a une dizaine d'années, ont un rôle complexe mais important dans les tissus adultes et leur étude permettrait d'évaluer leur potentiel thérapeutique.

Lgr : récepteurs des R-spondins

Une étude a prouvé que les ligands R-spondins interagissent avec les récepteurs Lgr (Leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor) au niveau de la membrane cellulaire et potentialisent la voie Wnt canonique (Carmon et al., 2011).

Les Lgr sont une grande famille de protéines comprenant trois sous-familles (Kong et al., 2010). Le premier groupe comprend les protéines Lgr1, Lgr2, Lgr3, connues comme étant des récepteurs aux hormones, respectivement le récepteur de l'hormone folliculo-stimulante (FSHR), le récepteur de l'hormone lutéinisante (LHR) et le récepteur d'hormone stimulant la thyroïde (TSHR). Le groupe 2 rassemble les Lgr4, Lgr5 et Lgr6 qui peuvent être caractérisés par leurs importants ectodomaines et leurs rôles dans la prolifération ou différenciation des cellules souches adultes (Kong et al., 2010). Enfin, le troisième groupe inclue Lgr7 et Lgr8 qui sont des récepteurs aux hormones Relaxines (Kong et al., 2010).

Les Lgr du second groupe (dont je parlerai exclusivement dans ce mémoire) sont des récepteurs couplés aux protéines G à sept domaines transmembranaires. En plus de leurs domaines C-terminal et N-terminal riches en Cystéines, ils sont composés d'un volumineux ectodomaine riche en Leucines, nécessaire pour la liaison avec leur ligand. Les Lgr se lient directement au domaine Furine de R-spondin via cet ectodomaine en forme de fer à cheval (Xu et al., 2013).

Ces récepteurs participent au développement des organes et au maintien de l'homéostasie des tissus. En effet, l'expression des Lgr est importante pour le développement embryonnaire et peut être impliquée dans certains cancers chez l'adulte. Dans l'intestin, le récepteur Lgr4 est exprimé au niveau des cellules souches localisées au fond de la crypte, régulant la prolifération et la différenciation cellulaire (Mustata et al., 2011). Il a été démontré que Lgr5 est un marqueur de prolifération des cellules souches dans le colon (Barker et al., 2007), l'estomac (Barker et al., 2010) ou encore les follicules pileux (Jaks et al., 2008). L'expression de Lgr6 semble également restreinte à certains types cellulaires. Dans l'épiderme de la peau, Lgr6 est exprimé spécifiquement dans les cellules souches adultes au niveau du bulbe et de la glande sébacée. Plusieurs études ont démontré que les récepteurs Lgr5 et Lgr6 contribuent à la régénération épithéliale (Snippert et al., 2010) (Kasper et al., 2011). Ainsi, Lgr4/5/6 ont été identifiés comme des marqueurs de cellules souches adultes.

III. 2) R-spondin et les voies Wnt

Les R-spondins sont des protéines sécrétées qui sont essentielles pour divers processus cellulaires (prolifération, différenciation ou migration) ou développementaux (développement des membres ou du cartilage). Par leur interaction avec leurs récepteurs Lgr, les R-spondins contribuent à l'activation des voies de signalisation Wnt. Il a été largement étudié que les R-spondins sont des potentialisateurs de la voie Wnt/ β -caténine et que leur expression permet d'accroître l'activation de la voie canonique (de Lau et al., 2012). Le rôle des R-spondins au sein de la voie canonique a été mis en évidence il y a de nombreuses années. Ainsi, le processus de potentialisation de la voie est alors bien connu à ce jour. Cependant, le rôle des R-spondins sur les voies non-canoniques a été découvert il y a seulement quelques années et reste encore assez méconnu. Aucune étude ne démontre à ce jour qu'une des protéines R-spondins est engagée spécifiquement dans une des voies Wnt.

Voie canonique

L'expression de R-spondin est cruciale pour l'activation de la voie Wnt/ β -caténine et pour l'organisation des somites et des myotomes chez le *Xenopus*. En effet, une délétion de R-spondin2 inhibe la transcription génique de Myf5 et de MyoD (Kazanskaya et al., 2004). Il a été prouvé que toutes les protéines de la famille R-spondin reproduisent l'action des protéines Wnt sur les voies canoniques et qu'une déficience de R-spondin dans les tissus phénocopie les effets d'une inactivation de la voie Wnt. Chez le *Xenopus*, les R-spondins jouent un rôle important dans l'activation/potentialisation de la voie Wnt/ β -caténine (Kazanskaya et al., 2004) au cours du développement embryonnaire. Ces résultats ont été redémontrés chez les mammifères, où R-spondin régule l'activation de la voie Wnt canonique via la stabilisation de la β -caténine active (Kim et al., 2005). Les domaines Furines de R-spondin sont essentiels pour la régulation de la signalisation Wnt (Li et al., 2009), puisqu'une délétion d'une partie de ces domaines inhibe totalement l'action de R-spondin sur la voie canonique. De la même façon, les récepteurs Lgr4/5/6 ont une action synergique sur l'activation des voies Wnt. Dans les cryptes intestinales, les protéines R-spondins accroissent les signaux Wnt via leur interaction avec Lgr4/5 et le complexe Frizzled-LRP5/6. Les récepteurs Lgr4 et Lgr5 sont essentiels pour la transmission du signal apporté par R-spondin1 et pour permettre la prolifération des cellules (de Lau et al., 2011). Tout comme Lgr4/5, le récepteur Lgr6 est capable de potentialiser l'activation de la voie Wnt en réponse aux R-spondin (Gong et al., 2012).

L'action régulatrice des R-spondin sur la voie Wnt est dépendante de l'interaction des Wnt avec leurs récepteurs Frizzled (Kim et al., 2008b). En effet, l'inhibition *in vitro* de la sécrétion des protéines Wnt bloque la stimulation de la voie canonique, même en présence de R-spondin. Ce résultat montre que les ligands Wnt sont nécessaires pour l'activité des protéines R-spondins sur la signalisation Wnt. La famille R-spondin est une nouvelle famille de régulateurs de la voie Wnt. *In vitro*, un co-traitement de R-spondin et Wnt potentialise la voie canonique. Il a été démontré que la présence de R-spondin1 à la membrane cellulaire permet une meilleure stabilisation de la β -caténine dans les cellules HEK293 (Human Embryonic Kidney 293) (Kim et al., 2005).

Le signal apporté par R-spondin à la voie Wnt nécessite la présence de LRP6 puisqu'une sur-expression de LRP6 accroît l'activation du facteur de transcription TCF par les protéines R-spondins, alors qu'une délétion du domaine C-terminal de LRP6 (qui rend la protéine inactive) réduit l'activité de TCF, même sous stimulation par R-spondin (Kim et al., 2008b). De plus, les R-spondins induisent la phosphorylation de LRP6, augmentant l'activité de ce corécepteur. Sous l'activité de Wnt3a, R-spondin est responsable d'une phosphorylation plus importante de LRP6. Ces résultats suggèrent que les R-spondins régulent la voie canonique par une première action sur les LRP6 (Kim et al., 2008b). R-spondin peut interagir avec les domaines extracellulaires des récepteurs Frizzled8 et des corécepteurs LRP6 mais ne peut maintenir une interaction stable entre ces protéines, contrairement aux protéines Wnt (Nam et al., 2006).

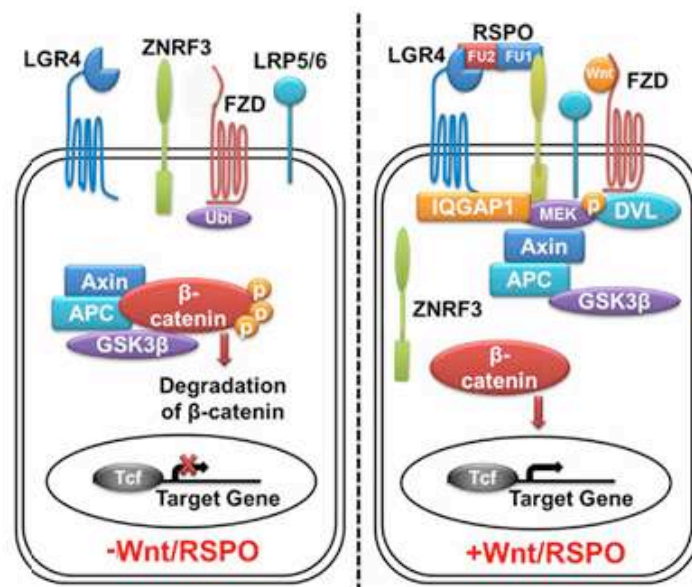


Figure 17. La voie Wnt/β-caténine potentialisée par R-spondin/Lgr

En l'absence de R-spondin ou de Wnt, la voie de signalisation n'est pas activée et la β-caténine est dégradée au protéasome. En présence de Wnt, la voie est activée et la β-caténine est transportée dans le noyau pour permettre la transcription des gènes cibles. Par liaison de R-spondin sur les Lgr via leur domaine Furine (FU), l'activité de ZnrF3 est inhibée, stabilisant le récepteur Frizzled et les co-récepteurs LRP5/6 à la membrane. De plus, Lgr et IQGAP1 interagissent au niveau de la membrane plasmique, permettant la phosphorylation et l'activité de LRP6. Le complexe membranaire est alors stabilisé, augmentant le signal d'activation de la voie Wnt.

D'après Li et al., 2015

L'activité du corécepteur LRP6 est régulée par l'inhibiteur Dkk1 (Dickkopf1) (Mao et al., 2002). La protéine Dkk1 est capable d'interagir directement avec LRP6 et de favoriser son internalisation, inhibant ainsi son activité au sein de la voie Wnt. En plus de leur action sur la phosphorylation des corécepteurs LRP6, les protéines R-spondins peuvent inhiber l'activité antagoniste de Dkk1 en perturbant l'interaction de cette dernière avec LRP6 (Kim et al., 2008b). Ainsi, l'internalisation de LRP6 est limitée et la concentration de ce récepteur est augmentée à la membrane plasmique (Binnerts et al., 2007). Le domaine Furine de R-spondin serait également nécessaire pour l'inhibition de l'activité de Dkk1 et serait suffisant pour potentialiser la voie canonique en présence des ligands Wnt (Kim et al., 2008b).

De plus, il a également été démontré que R-spondin participe à la stabilisation des récepteurs via l'inactivation de Znf3. Un complexe comprenant Lgr5, R-spondin et Rnf43/Znf3 a été isolé par cristallographie (de Lau et al., 2014 et Zebisch et al., 2013) montrant que R-spondin interagit directement avec Znf3. Ces protéines sont des antagonistes de la voie Wnt par induction de la dégradation des récepteurs Frizzled et des corécepteurs LRP6 par ubiquitination. La présence de R-spondin sur leurs récepteurs Lgr induit le recrutement de la protéine transmembranaire Znf3 au niveau du complexe R-spondin/Lgr (Abo and Clevers, 2012). Cette interaction mène à l'internalisation de Znf3, et à la stabilisation des récepteurs Frizzled et des corécepteurs LRP6 à la membrane. Les récepteurs de la voie Wnt s'accumulent alors à la membrane de la cellule, permettant d'augmenter le signal d'activation (Abo and Clevers, 2012).

Enfin, deux autres protéines ont été isolées par expérience de co-immunoprécipitation de Lgr4. Les protéines IQGAP1 et IQGAP3 (IQ Motif Containing GTPase Activating Protein) réguleraient l'interaction entre R-spondin et Lgr. Il a été démontré que l'expression de IQGAP1 dans les cellules HEK293T est nécessaire pour la potentialisation de la voie Wnt par R-spondin (Carmon et al., 2014). De plus, Lgr et IQGAP1 interagissent au niveau de la membrane plasmique, permettant la phosphorylation de LRP6. Les protéines IQGAP1 et IQGAP3 étant de nouvelles protéines identifiées dans la voie Wnt, leur processus d'action reste encore à être précisément étudié (Carmon et al., 2014).

Voie non-canonique

Chez le *Xenopus*, R-spondin3 active la voie Wnt non-canonique lors du développement embryonnaire. L'interaction entre R-spondin3, Wnt5a et Syndécan4 est nécessaire lors de la gastrulation et le développement du cartilage de la tête. Ces deux processus étant régulés par la voie Wnt/PCP, il a été démontré que R-spondin3 potentialise cette voie non-canonique. De plus, l'activation de la voie est dépendante de la présence de Syndécan4 et de l'internalisation de R-spondin3 dans la cellule par endocytose (Ohkawara et al., 2011). Cette étude montre que l'action de R-spondin est régulée par les Syndécans, qui sont une autre famille de corécepteurs de la voie Wnt impliqués dans la prolifération, la différenciation, l'adhésion ou la migration cellulaire (Bellin et al., 2002).

L'activation de la voie Wnt/PCP par R-spondin a également été mise en évidence dans les cellules de mammifères (Human adrenal corticocarcinoma H295R). En effet, une augmentation de l'expression de Lgr5 dans les cellules permet d'augmenter significativement l'activité de Jun, un intervenant de la voie Wnt/PCP. La présence de récepteurs Lgr5 au niveau de la membrane cellulaire active la voie non-canonique et induit la migration et la polarité des cellules (Shaikh et al., 2015). Lors de l'activation de la voie non-canonique, les récepteurs Lgr4/5 se lient au domaine Furine des R-spondins alors que les Syndécans interagissent avec le domaine thrombospondin de R-spondin, indiquant que R-spondin subit plusieurs interactions pour l'activation de la voie Wnt/PCP (Glinka et al., 2011). De plus, chez la souris, une délétion constitutive ou conditionnelle de R-spondin3 inhibe l'activation de la voie Wnt/Ca²⁺ dans la rétine et dans les poumons, sans altération de la voie canonique. Cette étude est la première à mettre en évidence l'implication des R-spondin dans la voie Wnt/Ca²⁺ (Scholz et al., 2016).

Malgré l'évidence que R-spondin potentialise les voies non-canoniques, les processus moléculaires régulant précisément ce processus restent à déterminer à ce jour, notamment concernant l'interaction entre les protéines Lgr, Frizzled et Syndécans. De plus, bien que les souris déficientes pour R-spondin3 aient un défaut d'activation de la voie non-canonique dans la rétine et dans les poumons (Scholz et al., 2016), elles présenteraient une altération de stimulation de la voie canonique au

niveau du cerveau. Cela montre que les fonctions des R-spondins dans la stimulation des voies seraient tissu-dépendants.

III. 3) Les protéines R-spondins dans la myogenèse

Le rôle des protéines R-spondins a été peu étudié dans le muscle squelettique en développement ou en régénération. Cependant, quelques études démontrent que cette famille de protéines est impliquée dans la différenciation myogénique des cellules souches.

Myogenèse embryonnaire

Les gènes codant pour R-spondin1 et R-spondin3 sont exprimés dans le tube neural des embryons de souris (Nam et al., 2007a). Cette expression est nécessaire pour la régulation transcriptionnelle de Myf5 dans les cellules du somite (Kazanskaya et al., 2004). En effet, la voie Wnt régule la différenciation du muscle squelettique et le développement musculaire. Au cours de la myogenèse primaire, les ligands Wnt contrôlent l'expression de Myf5 dans les cellules somitiques (Borycki et al., 1999). Plusieurs études montrent qu'une inhibition de l'expression de R-spondin2 altère l'expression des marqueurs myogéniques au cours de la myogenèse (Kazanskaya et al., 2004) notamment Myf5 et MyoD (Figure 18), suggérant que ces deux facteurs de différenciation myogénique peuvent être les cibles de la régulation de la voie stimulée par Wnt et R-spondin2.

De plus, l'expression de R-spondin2 est détectée dans les cellules mésenchymateuses dans les membres en développement au moment où les progéniteurs myogéniques migrent des somites jusqu'au bourgeon de membre. Les membres en développement des embryons déficients pour R-spondin2 présentent une altération d'expression de Myf5 via une inhibition de la voie Wnt/ β -caténine

(Han et al., 2011). Cela montre que la signalisation Wnt/R-spondin est nécessaire pendant la myogenèse primaire.

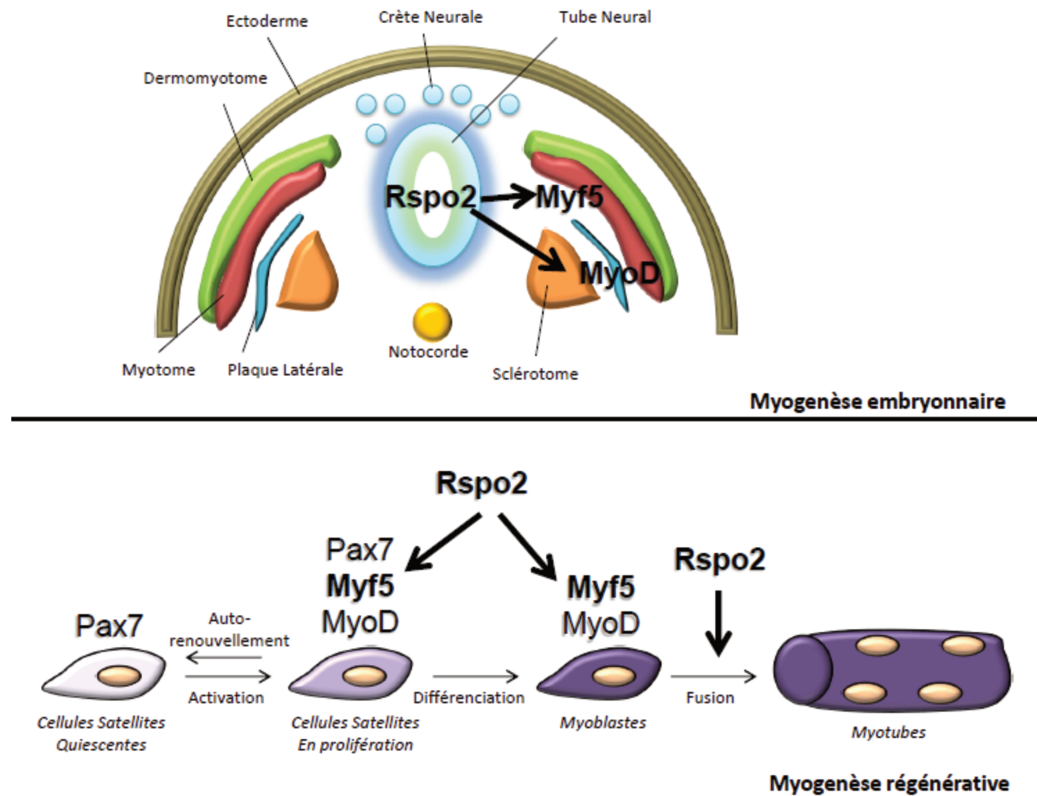


Figure 18. Rôle des R-spondins dans la myogenèse

A cours du développement embryonnaire, l'expression de R-spondin2 dans le tube neural est nécessaire pour l'expression des marqueurs myogéniques tels que Myf5 ou MyoD dans les cellules composant le myotome. Dans les cellules myogéniques adultes, R-spondin2 régule positivement l'expression de Myf5, mais n'influence pas l'expression de Pax7 ou MyoD. De plus, l'expression de R-spondin2 permet d'augmenter la taille des myotubes.

Myogenèse régénérative

Dans le muscle squelettique adulte, les cellules satellites sont responsables du maintien de l'homéostasie musculaire et de la régénération des myofibres.

L'activation de la voie Wnt/ β -caténine induit la différenciation des myoblastes (Brack et al., 2008) et est nécessaire lors de la régénération musculaire. Les gènes codant pour R-spondin1, R-spondin2, R-spondin3 sont exprimés dans les cellules satellites. Une étude démontre l'importance de R-spondin2 sur la différenciation myogénique dans les cellules C2C12 (Han et al., 2011). En effet, un traitement des cellules par R-spondin2 accroît l'engagement des cellules dans la voie myogénique via une régulation positive de l'expression de Myf5 (Figure 18). Cependant, R-spondin2 n'affecte pas l'expression de MyoD ou de Pax7 dans les cellules C2C12 ou dans les cellules satellites puisque dans les cellules déficientes pour R-spondin2, l'expression de Myf5 est altérée. De plus, la localisation membranaire de Lgr4 est nécessaire pour permettre l'induction du signal de R-spondin2 lors de la différenciation myogénique dans les cellules C2C12 (Han et al., 2014). L'induction de l'expression de Myf5 par R-spondin2 s'effectue via l'activation de la voie Wnt canonique. En effet, le complexe Lgr/R-spondin dans ces cellules induit la transcription des gènes cibles de la voie canonique (Han et al., 2014). De plus, un traitement de R-spondin2 sur les myotubes cause une hypertrophie des cellules (Han et al., 2014). Il a été démontré que R-spondin2 est un nouveau régulateur de la myogenèse (Han et al., 2011), mais le rôle des autres protéines de cette famille n'a pas encore été identifié dans ce processus.

III. 4) L'expression des R-spondins dans l'embryogenèse et les tissus adultes

La potentialisation de la signalisation Wnt par R-spondin permet à ces protéines d'avoir des rôles pléiotropes pendant l'embryogenèse. Pendant le développement embryonnaire, R-spondin1 est exprimé dans de nombreux organes ou tissus tels que les ovaires, les reins, les glandes mammaires, les os et dans le tube neural (Nam et al., 2007a). Le complexe R-spondin/Lgr permet également de réguler l'homéostasie et la régénération des tissus, comme l'épithélium du tube digestif. Les protéines R-spondins peuvent alors agir en tant que facteur de croissance ou de différenciation. L'expression de R-spondin est cruciale pour l'activité de cellules souches. Le domaine Furine de R-spondin est nécessaire pour

l'activation de la voie Wnt/ β -caténine. Une mutation de ce domaine cause une inactivation de la protéine, et une incapacité à potentialiser la voie Wnt, pouvant induire des tumeurs, principalement dans les ovaires ou les intestins.

Développement des membres et Masse osseuse

La protéine R-spondin2 est impliquée dans le développement des membres et de la structure crano-faciale. Les souris déficientes pour cette protéine présentent une altération de la formation des structures distales du squelette, causant leur décès quelques jours après leur naissance (Nam et al., 2007b). Une altération de l'expression de R-spondin2 cause un défaut d'activation de la voie canonique, et une dégradation de la β -caténine dans les cellules des tissus affectés (Jin et al., 2011).

L'importance de l'activation de la voie Wnt dans le développement terminal des phalanges a été démontrée chez la souris (Adamska et al., 2005). L'anonychie est une maladie liée à un développement incorrect des ongles et est caractérisée par leur absence totale ou partielle. Ce phénotype est directement la conséquence d'une mutation dans le domaine riche en Cystéine de R-spondin4, impactant l'activité de cette R-spondin sur la voie Wnt (Brüchle et al., 2008). Plusieurs études ont démontré que dix mutations du gène codant pour R-spondin4 sont impliquées dans l'anonychie.

La voie Wnt/ β -caténine joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie des os. Une étude démontre qu'une déficience en LRP5 cause une augmentation de la masse osseuse (Boyden et al., 2002). Une sur-expression de R-spondin2 induit la différenciation des ostéoblastes en présence de BMP (Friedman et al., 2009). De plus, l'expression de R-spondin1 est augmentée dans les ostéoblastes primaires humains lors de la différenciation cellulaire (Sharma et al., 2013) et une concentration élevée de R-spondin1 accroît la masse osseuse des souris atteintes d'ostéoporose. Il a été prouvé qu'une diminution de l'expression génique de R-spondin2 cause une déminéralisation des ostéoblastes via une

inactivation anormale de la voie Wnt chez les patients atteints d'ostéoarthrose (Abed et al., 2011). Les protéines R-spondins participent activement à la formation de la masse osseuse et à son maintien homéostatique.

Voies respiratoires

R-spondin2 est nécessaire pour le développement des structures dérivées de l'arc branchial telles que le larynx ou la trachée (Jin et al., 2011). Ainsi, le développement des voies respiratoires est contrôlé par l'expression de R-spondin2. Une diminution de l'expression de R-spondin altère le développement des poumons. Les poumons d'un fœtus mutant sont 50% plus petits que les poumons d'un fœtus sauvage. Cette hypoplasie n'est pas la conséquence d'une différenciation des cellules spécifiques (Bell et al., 2008) mais celle d'une réduction du nombre de bronchioles. Les organes déficients pour R-spondin2 ont un défaut d'activation de la voie Wnt/ β -caténine, indiquant que R-spondin2 agit par la voie canonique au cours du développement des voies respiratoires (Bell et al., 2008).

Reproduction

La détermination sexuelle de l'individu s'effectue par le développement des gonades mâles ou femelles au cours du développement embryonnaire. La conversion du phénotype sexuel femelle vers le phénotype sexuel mâle est rare et peut être causée par la translocation du gène SRY localisé sur le chromosome Y sur un autre chromosome (Koopman et al., 1991). Cependant, une mutation dans le gène codant pour R-spondin1 peut également être la cause d'une inversion de la détermination sexuelle. En effet, dans certains cas, des individus femelles ayant leurs chromosomes sexuels XX ont développé un phénotype masculinisé (Parma et al., 2006) causé par un défaut d'expression de R-spondin1 dans les gonades. Pendant l'embryogénèse, R-spondin1 est exprimé spécifiquement dans les gonades femelles et permet d'engager la différenciation des ovaires. Les souris femelles

mutantes pour R-spondin possèdent des ovaires masculinisés appelés ovotestis. Les ovaires de ces souris femelles sont dépourvus d'ovocytes et possèdent une vascularisation qui est retrouvée dans les gonades mâles. Par conséquent, elles sont très peu fertiles. De plus, les femelles ont un défaut de développement des glandes mammaires, causant une incapacité à produire du lait (Chadi et al., 2009) pour nourrir leur progéniture. De manière intéressante, un défaut d'expression de *Rspo1* ne cause pas une inversion sexuelle complète chez la souris, contrairement à l'espèce humaine. Une déficience de R-spondin1 induit un défaut d'activation de la voie WNT/ β -caténine dans les ovaires en développement, montrant que R-spondin1 participe au développement des organes reproducteurs et contrôle la détermination sexuelle via la signalisation Wnt. Une inversion sexuelle est également observée dans les souris déficientes pour *Wnt4*, suggérant que R-spondin1 potentialise la voie Wnt en présence de *Wnt4* (Vainio et al., 1999). L'association *Wnt4*/R-spondin1 dans les gonades femelles permet la différenciation des ovaires et l'inhibition de *Sox9*, un facteur favorisant le développement des testicules (Kashimada and Koopman, 2010). Les mâles ayant une mutation pour le gène codant pour R-spondin1 ne présentent pas de problème de stérilité (Chassot et al., 2008a). Cependant, R-spondin1 et *Wnt4* participent à la prolifération des cellules et à la différenciation des gonades mâles (Chassot et al., 2012).

Le développement du placenta débute au stade embryonnaire E8.5 par un réseau dense de vaisseaux sanguins établi entre la mère et l'embryon. Une densité insuffisante de vaisseaux a été démontrée chez les souris mutantes pour *Wnt2* et *Frizzled5*, réduisant les échanges gazeux et nutritifs par le placenta (Monkley et al., 1996). La protéine R-spondin3 est exprimée lors de la formation du placenta, et particulièrement lors de l'angiogenèse. Une délétion de R-spondin3 chez les embryons de souris cause une mauvaise vascularisation, et une mauvaise formation du placenta (Kazanskaya et al., 2008). Le réseau de vaisseaux sanguins développé par l'embryon étant insuffisant, l'embryon meurt au 10^{ème} jour de développement. Dans les embryons mutants, l'expression de *Vegf*, l'un des gènes cibles de la voie Wnt canonique, est significativement altéré et est responsable de l'angiogenèse. Cela démontre que R-spondin3 est nécessaire pour la vascularisation du placenta lors du développement embryonnaire.

Voies digestives

Les cellules souches des cryptes intestinales jouent un rôle essentiel dans l'homéostasie et la régénération de l'épithélium gastro-intestinal. La voie Wnt/ β -caténine est importante pour la régulation du processus d'auto-renouvellement cellulaire le long de l'axe crypte-villosité de l'intestin puisque la signalisation Wnt exerce une fonction mitogène sur les cellules progénitrices (Pinto and Clevers, 2005). Une sur-expression de R-spondin dans ces cellules accroît la prolifération cellulaire dans l'intestin grêle et le côlon, suggérant que R-spondin possède également un rôle mitogène au niveau de l'épithélium intestinal (Kim et al., 2005). En effet, une forte concentration de R-spondin1 cause une hyperprolifération cellulaire traduite par une augmentation du diamètre, du poids et de la longueur du tube digestif.

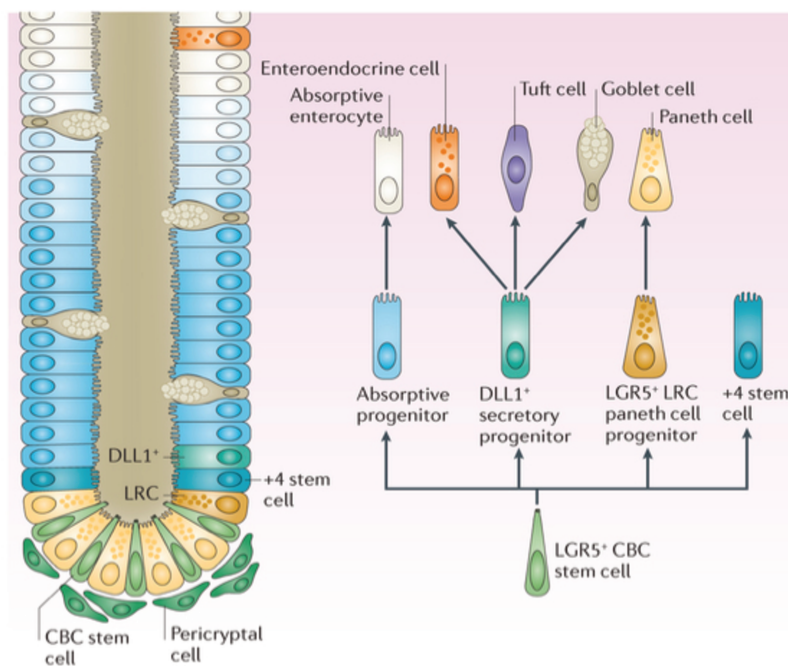


Figure 19. Rôle des Lgr5/R-spondin dans la régénération de l'épithélium intestinal

Les cellules exprimant Lgr5 régulent l'auto-renouvellement des cellules de l'épithélium (CBC) ou se différencient en cellules de Paneth (LRC). La prolifération des cellules souches intestinales nécessite l'expression de Lgr5 et de R-spondin1.

D'après Barker, 2014

Les cellules en prolifération présentent des niveaux élevés de β -caténine nucléaire (Kim et al., 2005). Cette hyperplasie de la crypte épithéliale causée par R-spondin1 est en corrélation avec une sur-activation de la voie canonique dans le tissu. Il a été démontré que R-spondin2/3/4 sont également capables d'induire une sur-activation de la voie canonique dans les cellules épithéliales de l'intestin. Enfin, la prolifération des cellules souches intestinales nécessite l'expression de Lgr5 (Figure 19) dans les cellules (Ootani et al., 2009). Les récepteurs Lgr4/5 permettent la transmission du signal apporté par R-spondin1 pour induire la prolifération des cellules (de Lau et al., 2011).

Métabolisme du glucose

Le diabète de type 2 est une maladie métabolique complexe qui peut être associée à une perte fonctionnelle des cellules β (Butler et al., 2003) via une incorrecte régulation de la voie Wnt. Plusieurs études montrent que la signalisation Wnt participe au développement du pancréas et à la croissance des cellules β (Heller et al., 2002). Dans le pancréas, R-spondin1 joue le rôle de facteur de croissance des cellules β et limite l'apoptose induite par les cytokines. De plus, R-spondin1 active la signalisation Wnt et contribue à la sécrétion d'Insuline (Wong et al., 2010), montrant ainsi que R-spondin agit sur le métabolisme du glucose.

Une récente étude a mis en évidence l'expression de Lgr4 et R-spondin1/3 dans l'hypothalamus et dans d'autres zones du cerveau (Li et al., 2014). Cependant, la présence de protéines R-spondin2/4 a été peu détectée dans le cerveau des rats (*Rattus norvegicus*), suggérant que ces deux protéines ont un rôle mineur dans les zones du cerveau contrairement aux R-spondin1/3 qui participent à la régulation des fonctions cérébrales. L'expression de ces deux R-spondins est régulée selon l'apport nutritif. En période de jeûne, l'expression de R-spondin1/3 est sous-réglée alors qu'elle est augmentée après une consommation de nourriture (Li et al., 2014). Ces expériences montrent que R-spondin1/3 sont des facteurs sécrétés dans l'hypothalamus, limitant la prise de nourriture.

Implication dans les cancers et les thérapies

Une expression incorrecte de R-spondin a été analysée dans les tumeurs. Un défaut d'expression de R-spondin1/2/4 peut être la cause des tumeurs développées dans l'estomac ou les ovaires (Kazanskaya et al., 2004).

De plus, R-spondin3 a été identifiée dans les cancers mammaires (Theodorou et al., 2007). Une insertion de la séquence d'ADN du MMTV (Mouse mammary tumor virus) proche du locus *Rspo3* cause une sur-expression de R-spondin3, suivie d'une hyperprolifération cellulaire dans les tissus mammaires.

Il a été démontré que R-spondin2 est également un potentiel oncogénique dans ce type de cancer (Theodorou et al., 2007). Dans les cellules cancéreuses du colon, l'expression de R-spondin2 est sur-réglée chez la souris (Starr et al., 2009). Cependant, l'implication de R-spondin2 reste à être déterminée dans le cancer colorectal humain.

Les îlots CpG du promoteur *Rspo1* sont hyperméthylés dans les cellules de patients atteints de leucémie (Tong et al., 2010) indiquant que R-spondin1 joue un rôle de suppresseur de tumeur contre les leucémies.

Enfin, une étude a démontré qu'une dérégulation de l'expression de R-spondin4 est impliquée dans les carcinomes de l'œsophage (Oka et al., 2009). Dans l'œsophage, R-spondin4 peut être sous-exprimée par une hyperméthylation du gène qui serait liée à la durée d'exposition à la fumée de cigarette.

Cette étude montre que les protéines de la famille R-spondin peuvent avoir des fonctions différentes selon le type de cancer.

La maladie de Crohn est une maladie inflammatoire chronique du système digestif qui cause la mort des cellules de l'épithélium intestinal. La protéine R-spondin1 présente ici une cible thérapeutique intéressante puisqu'une administration de celle-ci réduit l'inflammation dans les tissus, stimule la prolifération des cellules localisées dans les cryptes intestinales et améliore la régénération de l'épithélium, permettant de réduire les symptômes de la maladie (Zhao et al., 2007).

Une récente étude prouve que R-spondin1 possède un potentiel thérapeutique contre l'arthrose (Krönke et al., 2010) puisque R-spondin1 accroît le développement des ostéoblastes différenciés via la signalisation Wnt. La protéine

R-spondin1 active la différenciation des ostéoblastes et inhibe l'expression du collagène de type I, permettant de limiter la destruction du cartilage et des os. Une injection de R-spondin1 permet donc de rétablir l'homéostasie de l'ensemble du cartilage et des os.

IV. Objectifs du projet de Thèse

Chaque protéine de la famille R-spondin joue un rôle important au cours de l'embryogenèse et dans divers tissus adultes. L'expression de R-spondin1 et des Lgr est nécessaire pour la prolifération et la maintenance des cellules souches adultes dans les cryptes intestinales (Kim et al., 2005 et Sato et al., 2009) et dans le foie (Huch et al., 2013). De plus, une étude montre que R-spondin1 est une protéine nécessaire pour l'expansion des cellules souches dans les glandes mammaires via la régulation des hormones stéroïdiennes (Cai et al., 2014). Ainsi, dans de nombreux tissus, R-spondin1 possède un rôle mitogène crucial au sein des cellules souches adultes. Cependant, son rôle dans le muscle squelettique, n'a pas encore été correctement déterminé. Une étude transcriptionnelle de R-spondin1 montre que le gène *Rspo1* est exprimé dans les cellules satellites en différenciation (Han et al., 2011), et une expérience de ChIP-seq met en évidence l'expression génique de R-spondin1 induite par Pax7 (Soleimani et al., 2012). Plusieurs équipes de recherches ont étudié le rôle de R-spondin2 et ont démontré que cette protéine est un régulateur de la myogenèse nécessaire pour l'expression de Myf5 dans les cellules embryonnaires (Kazanskaya et al., 2004) et adultes (Han et al., 2011). Dans la lignée myogénique C2C12 en différenciation, une sur-expression de R-spondin2 induit une hypertrophie des myotubes, suggérant que R-spondin2 régule positivement la fusion cellulaire (Han et al., 2014). Basé sur ces résultats, je me suis intéressée au rôle de R-spondin1 dans le muscle squelettique adulte. Mon projet de thèse consiste à comprendre l'action de R-spondin1 sur la prolifération, la différenciation et la fusion des progéniteurs myogéniques.

Les R-spondins sont des ligands permettant d'augmenter le signal d'activation de la voie Wnt/ β -caténine (Li et al., 2009) et de la voie Wnt/PCP (Ohkawara et al., 2011). Lors du développement embryonnaire, la stimulation de la voie Wnt canonique par R-spondin2 est nécessaire pour la mise en place d'une correcte myogenèse (Kazanskaya et al., 2004). Au cours de la myogenèse

régénérative, l'activation des signalisations Wnt régule la migration, la prolifération, la différenciation des cellules satellites et est nécessaire à la régénération du muscle. La seconde partie de mon projet de thèse consiste à déterminer la voie de signalisation Wnt régulée par R-spondin1. En effet, aucune étude ne démontre que chaque R-spondin est spécifique d'une voie spécifique. Cependant, la régulation des voies Wnt permet une correcte régénération musculaire. Des travaux réalisés dans notre équipe démontrent qu'une délétion d'APC altère le potentiel myogénique des cellules satellites et la régénération musculaire, par augmentation de la stimulation de la voie Wnt/ β -caténine (Parisi et al., 2015). De plus, une sur-expression ou sous-expression de la β -caténine influence la dynamique de différenciation des cellules et cause une hypotrophie des fibres musculaires lors de la régénération (Rudolf et al., 2016). Ces études montrent qu'une fine régulation de la voie Wnt est nécessaire pour la mise en place de la régénération musculaire. La régulation de la signalisation Wnt par R-spondin1 est un processus essentiel au cours de la régénération musculaire, que j'ai mis en évidence.

Plusieurs mécanismes antagonistes entre les voies de signalisation Wnt ont été proposés comme agissant à la surface cellulaire, dans le cytoplasme et dans le noyau (Kikuchi et al., 2011). L'antagonisme des voies Wnt canoniques et non-canoniques a été étudié dans le développement embryonnaire du *Xenopus* (Torres et al., 1996), mais il reste inconnu dans le processus de régénération du muscle squelettique adulte. Les travaux effectués pendant mon Doctorat ont également mis en évidence une interaction négative entre les voies Wnt lors de la régénération du muscle squelettique adulte.

J'ai disposé d'un modèle murin d'invalidation constitutif qui m'a permis d'étudier *in vivo* la contribution de R-spondin1 à la myogenèse adulte.

MATERIELS ET METHODES

I. Préparation du tissu animal

I. 1) Souris mutantes *Rspo1*

Les souris mutantes *Rspo1* ont été données par Marie-Christine Chaboissier, du Laboratoire de Génétique du Développement Normal et Pathologique, situé à Nice (France). Les souris ont une délétion de l'exon 3 du gène codant la protéine R-Spondin1. La génération de ces souris a été décrite dans l'article de Anne-Amandine Chassot (Chassot et al., 2008b). Les souris ont un fond génétique mixte C57B6N/SV129.

I. 2) Régénération musculaire

Les souris sont préalablement endormies par un mélange de Kétamine (100mg de Kétamine par kg d'animal) et de Xylazine (10mg de Xylazine pour 1kg d'animal) en injection intrapéritonéale. Les pattes arrières de la souris sont désinfectées avec de l'alcool 70%. Avec une seringue à insuline, 50µL de Cardiotoxine¹ sont injectés dans le Tibialis Antérieur, sur toute la longueur du muscle. Un analgésique (Buprénorphine à 0,05mg/kg) est injecté aux souris par voie sous-cutanée avant de les replacer dans leurs cages respectives.

¹Cardiotoxine : suspension à 12µM dans du sérum physiologique (Lotaxan #L8102)

I. 3) Préparation des coupes de muscles

Dissection du Tibialis Antérieur

Les souris, âgées de 6 à 10 semaines, sont sacrifiées par dislocation cervicale. A l'aide de ciseaux fins, la peau des membres inférieurs est enlevée. Ensuite, l'épimysium du Tibialis Antérieur est délicatement repoussé vers le tendon du genou avec des ciseaux Westcott. Pour plus de facilité de dissection, le pied de la souris est retourné sur la table de dissection. Le tendon liant le muscle à l'os de la tarse est sectionné avec les ciseaux Westcott. Grâce à une pince courbée, le muscle est relevé délicatement par son tendon puis sectionné proche du genou avec les ciseaux. Enfin, grâce aux pinces courbées, le muscle EDL (extensor digitorum longus) est séparé du muscle Tibialis Antérieur.

Congélation du muscle

Le muscle est placé dans un bac fabriqué à partir d'aluminium (dimension 1 cm x 2 cm). De l'OCT est coulé dans le bac, immergeant ainsi totalement les muscles. Au préalable, de l'isopentane est placé dans un bac en plastique et refroidi sur bain d'azote liquide. Lorsque l'isopentane est froid, les bacs avec les muscles sont placés à la surface de l'isopentane. La congélation de l'OCT² s'effectue alors de façon concentrique dans le bac. Après complète congélation, les bacs sont laissés sur l'isopentane pendant 1 à 2 minutes puis sont conservés à -80°C.

²OCT: Cell Path #KMA010000A

Coupes de muscles

Des cryosections de 10µm d'épaisseur sont effectuées grâce au *Leica CM3050 S cryostat* avec une température de -19°C. Plusieurs cryosections de muscle sont déposées sur des lames en verre sodocalcique²⁴. Les lames peuvent être conservées à -80°C pendant plusieurs mois ou directement utilisées pour un immunomarquage.

I. 4) Extraction des myoblastes primaires

Les souris, âgées de 6 à 10 semaines, sont sacrifiées par dislocation cervicale. Les muscles prélevés (Quadriceps, Tibialis Antérieur, EDL, Gastrocnemius, Soleus, Gluteus) sont digérés mécaniquement avec une lame de rasoir sur glace jusqu'à complète dissociation des muscles. Les muscles sont ensuite digérés dans une solution enzymatique³. La digestion s'obtient par trois temps d'incubation de 17 minutes à 37°C suivis d'homogénéisation par pipetage. Lorsque la solution est complètement homogénéisée, 500µL de FBS (Fœtal Bovin Serum) sont ajoutés afin d'inhiber l'action des enzymes. La solution est ensuite filtrée, puis centrifugée. Le culot est resuspendu dans 4mL de milieu de croissance. Les cellules sont ensemencées dans des boîtes pendant 2h, afin de sélectionner une première fois les cellules satellites et de les séparer des fibroblastes. Les cellules sont ensuite transférées dans des boîtes coatées au Collagène et maintenues dans du milieu de croissance⁶ à 37°C et avec 5% de CO₂ jusqu'à confluence.

Les cellules satellites peuvent également être extraites par Cytométrie en flux (Fluorescence-activated cell sorting). La technique de Cytométrie en flux a été effectuée sur le trieur *Aria* des différentes plateformes et analysée avec le logiciel *BD FACS Software* selon le protocole mis au point par Ling Liu (Liu et al., 2015).

³Solution enzymatique: 3mL de collagenase B (Roche #11088831001 - 1,5 Unités/mL dans du PBS), 3mL de dispase II (Roche #04942078001 - 2,4 Unités/mL dans du PBS) et 6µL de CaCl₂ (2M)

II. Culture cellulaire

II. 1) Coating

Condition de prolifération : les boîtes de culture sont couvertes de solution de Collagène⁴ pendant 30 minutes à 37°C. Le surplus de Collagène est ensuite aspiré, puis recyclé. Les boîtes sont mises à sécher sous PSM (poste de sécurité microbiologique) jusqu'à complet séchage du collagène. Les boîtes préparées peuvent être gardées à 4°C pendant un mois maximum.

Condition de différenciation : les boîtes sont couvertes de solution de Matrigel⁵ pendant quelques minutes puis la solution est aspirée. Le Matrigel est toujours conservé dans la glace ou à 4°C et recyclé. Les boîtes sont mises à sécher sous PSM et sont utilisées le jour même.

⁴Collagène : 0,1% d'acide acétique, 1,4% de collagène type 1 de queue de rat 5 mg/mL (Sigma #c3867-1VL), 98,5% d'eau distillée stérile (Gibco #10977035)

⁵Matrigel (Corning #354230) : 1mg/mL dans du DMEM (Gibco #31966-021)

II. 2) Milieux de culture et concentration cellulaire

Condition de prolifération : les cellules sontensemencées dans du milieu de croissance⁶ à une concentration de 2000 cellules/cm² sur les boîtes coatées au Collagène. La confluence cellulaire est déterminée à 5000 cellules/cm².

Condition de différenciation : Les cellules sontensemencées à 15000 cellules/cm² dans du milieu de prolifération sur boîte préalablement coatée au Matrigel. Le lendemain, après aspiration du milieu de prolifération et rinçage au

PBS⁷, les cellules sont traitées avec du milieu de fusion⁸ pendant 24 heures (myocytes) ou 96 heures (myotubes).

⁶Milieu de croissance : 79% Ham's F-10 (Gibco #41550), 20% Fetal Bovin Serum (Eurobio #CVFSVF00-01), 2,5 ng/mL rhFGF (R&D Systems #4114-TC-01M) et 1% Pen/Strep (Gibco #15140)

⁷PBS : Gibco #14190-094

⁸Milieu de fusion : 97% DMEM (Gibco #31966-021), 2% Horse Serum (Gibco #16050-122) et 1% Pen/Strep (Gibco #15140)

II. 3) Traitement des cellules

Les cellules peuvent être traitées avec des siRNA, des protéines recombinantes ou des molécules chimiques.

Traitement avec des siRNA : les cellules sontensemencées à une concentration de 15000 cellules/cm² sur une boîte coatée au Collagène dans du milieu de croissance sans antibiotiques (Pen/Strep). Le lendemain, les siRNA sont préparés selon le protocole donné par le fournisseur de la Lipofectamine 2000. Les siRNA et la Lipofectamine sont chacun dilués dans de l'Opti-MEM⁹. La solution est incubée pendant 5 minutes à température ambiante, puis chaque solution contenant la Lipofectamine et les siRNA sont mélangées. Les solutions sont incubées pendant 20 minutes à température ambiante. Les cellules sont traitées par cette solution pendant 4 heures à 37°C et 5% de CO₂ puis sont rincées au PBS⁷ et incubées pendant au moins 24 heures avec du milieu de prolifération sans Pen/Strep.

Quantité	Réactif
50 uM	Si Fzd7 ¹⁰
50 uM	Si Control ¹¹
1/50ème	Lipofectamine ¹²

Table 1. Concentration des réactifs pour le traitement avec des siRNA

Traitement avec l'eHop-016 (inhibiteur de Rac1): les cellules sont traitées avec l'eHop-016¹³ pendant 8 heures, puis rincées avec du PBS⁷ et incubée dans le milieu approprié.

Traitement avec les protéines recombinantes: les cellules sont traitées avec les protéines recombinantes Wnt7a¹⁴, Wnt3a¹⁵ ou R-spondin1¹⁶ au minimum pendant 24 heures, puis rincées avec du PBS⁷ et incubées dans le milieu approprié.

⁹Opti-MEM : Gibco # 31985-047

¹⁰Si Fzd7: Thermofisher #4390771 - NCBI Location Chromosome:Chr.1: 59482147 - 59486955

¹¹Si contrôle : Thermofisher #AM4637

¹²Lipofectamine 2000 Transfection Reagent : Life Technologies #11668-027

¹³EHop-016 : conservé à 23mM dans du DMSO, et utilisation à 1,5uM final dans le milieu (Sigma #1380432-32-5)

¹⁴Protéine recombinante Wnt7a (humain) : 50 à 100ng/mL final (R&D Systems #3008-WN-025)

¹⁵Protéine recombinante Wnt3a (humain) : 50ng/mL final (R&D Systems #5036-WN-010)

¹⁶Protéine recombinante Rspodin1 (souris) : 50ng/mL final (R&D Systems #3474-RS-050)

II. 4) Scratch assay

Les cellules sontensemencées à 15000 cellules/cm² sur boîte coatée au Collagène. Les cellules peuvent être traitées avec des siRNA ou un inhibiteur de Rac1 (EHop-016) selon le protocole indiqué (*cf partie II-3-Traitement des cellules*). Le lendemain, elles sont traitées à la Mitomycin-c¹⁷ pendant 3h. Le scratch est effectué sur toute la longueur du puits grâce à l'embout d'une pointe 1000μL. Après deux rinçages au PBS, les cellules sont traitées avec du milieu de prolifération pendant 24h, avec si besoin les protéines recombinantes Rspodin-1, Wnt3a, Wnt7a, puis fixées avec du Paraformaldehyde 3,7% ¹⁸. Les cellules sont marquées par la Phalloidine²⁸ (Actine) et les noyaux sont marqués au Hoechst²⁷.

¹⁷Mitomycin-c : 10ug/mL final (SIGMA #M4297)

¹⁸PFA : Electron Microscopu Sciences #15735-90

II. 5) Vidéo-microscopie

Les cellules sontensemencées à 10000 cellules/cm² dans des boites Ibidi (*Ibidi #80821*) préalablement coatées avec du Matrigel dans du milieu de croissance. Le lendemain, la boîte est placée dans la chambre thermostatée du microscope avec 5% de CO₂. Le microscope est calibré pour prendre une photo toutes les 8 minutes pendant 24h, au grossissement 10 X en lumière blanche, BIN 2. Au moins 5 champs par puits sont photographiés. Les images sont assemblées sur le logiciel Métamorph afin de recréer les films, et analysées avec le logiciel ImageJ.

III. Histologie

III. 1) Immunofluorescence

Sur coupes de muscles adultes

Plusieurs protocoles d'immunofluorescence sont respectés selon les protéines à visualiser.

Marquage Pax7: les lames²⁴ sont réhydratées à température ambiante avec du PBS⁷, puis fixées avec 4% de PFA¹⁸ pendant 20 minutes. Elles sont ensuite lavées trois fois pendant 5 minutes avec du TBS¹⁹. Les coupes sont perméabilisées par traitement au méthanol pendant 6 minutes à -20°C et protégées de la lumière. Après plusieurs lavages au TBS, les lames sont immergées dans une solution de démasquage²⁰ à 90°C pendant 10 minutes. Elles sont laissées dans cette solution jusqu'à refroidissement puis sont lavées plusieurs fois avec du TBS. Après une incubation de 3 heures à température ambiante dans une solution de saturation²¹, les anticorps primaires sont dilués dans une solution de saturation nouvellement préparée, puis déposés sur les lames pendant la nuit à 4°C. Le lendemain les lames sont lavées au TBS. Les coupes sont incubées pendant 1h30 avec les anticorps secondaires dilués dans la solution de saturation, à température ambiante et protégées de la lumière. Entre plusieurs rinçages au TBS, les lames sont incubées avec du Hoechst²⁷ pendant 5 minutes. Enfin, les lames sont montées avec les lamelles²² et du milieu de montage²³ avant d'être stockées à 4°C.

Marquage Laminine/Myogénine/Dystrophine : les lames²⁴ sont réhydratées à température ambiante avec du PBS⁷, puis les coupes sont fixées avec 4% de PFA¹⁸ pendant 20 minutes. Entre plusieurs lavages au PBS, les lames sont incubées avec du 0,5 % Triton²⁵ pendant 5 minutes. Après une incubation d'une heure dans une solution de saturation²¹, les anticorps primaires sont dilués dans le Triton et mis à incuber sur les lames à 4°C pendant la nuit. Le lendemain, les lames sont lavées plusieurs fois avec du 0,2% Tween-20²⁶ puis les anticorps secondaires dilués

dans le Tween-20 sont déposés sur les coupes pendant 2 heures à température ambiante. Les lames sont rincées plusieurs fois avec du 0,2% Tween-20 puis incubées une fois avec du Hoechst²⁷ pendant 5 minutes. Enfin, les lames sont lavées avec du PBS, puis sont montées avec les lamelles²² et du milieu de montage²³ avant d'être stockées à 4°C.

Sur cellules

Lorsque les cellules sont à confluence, elles sont fixées dans leur boîte de culture pendant 8 minutes dans du PFA 3,7%¹⁸, puis plusieurs fois rincées durant 5 minutes au PBS⁷. Les cellules fixées sont traitées avec du 0,2% Triton²⁵ pendant 20 minutes, puis plusieurs fois rincées durant 5 minutes au PBS. L'anticorps primaire est dilué selon les recommandations ci-dessous, et mis sur les cellules pendant 1 heure à température ambiante. Après plusieurs rinçages au PBS, l'anticorps secondaire est incubé sur les cellules pendant 50 minutes. Entre plusieurs rinçages au PBS, les noyaux des cellules sont marqués au Hoechst²⁷ pendant 5 minutes. Les cellules marquées sont conservées à 4°C et les photos sont prises au microscope dans la semaine qui suit le marquage.

Incorporation EdU

L'incorporation EdU et la visualisation des noyaux ont été réalisées suivant le kit *Click-iT EdU Imaging Kits (Invitrogen #C10337)*. Les cellules sont incubées avec 10µm de la solution d'EdU pendant 1h à 37°C et 5% de CO₂. Elles sont ensuite fixées avec Paraformaldehyde 3,7%¹⁸ pendant 15 minutes, puis rincées au PBS⁷ avant d'être incubées à température ambiante pendant 20 minutes avec du 0,5% Triton²⁵. Les cellules sont rincées trois fois avec du PBS avec 3% de BSA²⁹ (Bovin Serum Albumin). Le cocktail réactionnel est fait suivant ce protocole (les réactifs sont ajoutés dans l'ordre) :

Quantité (pour 500uL)	Réactif
430 uL	Click-iT reaction Buffer (1X)
20 uL	CuSO ₄
1,2 uL	Alexa Fluor azide
50 uL	Reaction Buffer Additive

Table 2. Quantité et Réactif pour l'incorporation EdU

Les cellules sont ensuite incubées pendant 30 minutes à température ambiante et protégées de la lumière pendant la réaction. Après plusieurs rinçages au PBS avec 3% de BSA et les noyaux sont marqués au Hoechst²⁷. Les boîtes sont conservées à 4°C et les photos sont prises au microscope dans la semaine qui suit l'incorporation.

¹⁹TBS : 0,02 M TRIS et 0,138M NaCl

²⁰Solution de démasquage : Vector #H3301

²¹Solution de saturation : 4% BSA et 5% de sérum de chèvre dans du TBS

²²Lamelles : Menzel Gläser 24x50mm #1,5

²³Milieu de montage : DAKO #S3023

²⁴Lames : Superfrost Plus #J1800AMNZ

²⁵Triton : Sigma #T8787

²⁶Tween-20 : Sigma #P9416

²⁷Hoechst (1/30 000 dans du PBS) : Life Technologies #H3570

²⁸Phalloïdine : Santa Cruz #sc362065

²⁹BSA IgG free : Sigma #A9085

Anticorps Primaire	Commercialisation	Antigène	Dilution
Dystrophine	Leica – DYS2-CE	Souris IgG1	1/100
Ki67	Santa Cruz - sc15402	Lapin	1/200
Laminine α	Santa Cruz – sc59854	Rat	1/200
MyoD	Santa Cruz – sc304	Lapin	1/100
Myogénine	Santa Cruz – sc576	Lapin	1/200
Myosine MF20	R&D Systems MAB4470	Souris IgG2b	1/50
Pax7	Santa Cruz – sc81648	Souris IgG1	1/100
Phospho-Histone H3	Cell Signaling - 3377	Lapin	1/1000

Table 3. Liste des Anticorps Primaires utilisés pour les Immunomarquages

Anticorps secondaire	Commercialisation	Dilution
488 anti souris IgG1	Life Technologies – A21121	1/1000
546 anti lapin	Life Technologies – A11008	1/1000
546 anti souris IgG2b	Life Technologies – A21143	1/1000
546 anti rat	Life Technologies – A11081	1/1000
546 anti souris IgG1	Life Technologies – A21127	1/1000
550 anti lapin	Bethyl – A120-201D3	1/1000

Table 4. Liste des Anticorps Secondaires utilisés pour les Immunomarquages

III. 2) Coloration Hematoxyline/Eosine

Les coupes de muscles sont décongelées pendant 30 minutes avant coloration, puis rincées à l'eau distillée. Elles sont plongées dans l'Hémaroxyline³⁰ 3 à 4 minutes (selon coloration). Les coupes sont rincées à l'eau du robinet quelques secondes puis mises dans un bain d'Eosine³¹ pendant 2 à 3 minutes. Elles sont de nouveau rincées à l'eau du robinet, puis lavées successivement pendant 40 secondes à l'éthanol 70%, 90 %, et deux fois à 100%. Enfin, les coupes sont baignées deux fois dans du Xylène pendant 2 minutes puis montées avec du E-kit.

³⁰Hematoxyline : de Mayer (Sigma #51275)

³¹Eosine : Solution alcoolique (Sigma #HT220232)

IV. Biologie moléculaire et biochimie

IV. 1) Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN à partir de biopsies congelées peut s'effectuer suivant deux protocoles différents.

La première méthode est réalisable sans kit. Chaque biopsie est disposée dans un tube avec 400µL de tampon de lyse³² et 2µL de protéinase K à 55 °C pendant la nuit. Le lendemain, les échantillons sont centrifugés à 12000 rpm pendant 15 minutes. Le surnageant est récupéré et mélangé à 750µL d'isopropanol. Les échantillons sont vortexés et centrifugés à 11000 rpm pendant 2 minutes. Avant une seconde centrifugation identique, le culot est resuspendu dans 600µL d'éthanol 70%. Le surnageant est alors prélevé et le culot séché. Lorsque l'éthanol est complètement évaporé, l'ADN extrait est resuspendu dans 50µL d'eau. Les échantillons sont stockés à 4°C.

La seconde méthode d'extraction d'ADN est réalisable avec le kit *Phire Tissue Direct PCR* (ThermoScientific #F-170). Les biopsies sont incubées avec 20µL du tampon de dilution provenant du kit, et 0,5 µL de *DNARElease Additive* à température ambiante pendant 2 à 3 minutes, puis chauffées à 98°C pendant 2 minutes. Le surnageant est transféré dans un tube et conservé à 4°C.

³²Tampon de lyse : 0,1M Tris pH8, 0,2% SDS, 5mM EDTA, 0,2M NaCl

IV. 2) Génotypage

Le génotypage peut s'effectuer selon deux protocoles différents. Trois différentes amorces permettent d'amplifier l'allèle muté ou l'allèle sauvage. Le couple d'amorces « P2 » et « +/- » permet l'amplification de l'allèle sauvage avec

une taille d'amplicon de 550 paires de bases, tandis que le couple d'amorces « P2 » et « Lac Z » permet celle de l'allèle muté avec une taille d'amplicon de 450 paires de base.

Amorce	Séquence	Localisation dans le gène
P2	5' ACATTCCCTTTGTGCAATGA 3'	Début de l'exon 3
+/-	5' TGC GGGCATCAAAGTATCCAG 3'	Fin de l'exon 3
Lac Z	5' AATATCGCGGCTCATTCGAGG 3'	Sur la séquence mutée de l'exon 3

Table 5 : Séquences et localisations des amorces utilisées pour la PCR

PCR classique : le génotypage peut être effectué avec une polymérase Hot Start (*Promega # M740B*). Les réactifs utilisés sont listés ci-dessous, ainsi que le protocole de PCR.

Quantité finale	Réactif
Qsp 25uL	H2O
4 mM	MgCl2
0,2 mM	dNTP
1X	Tampon
1 uM	Amorce P2
1 uM	Amorce +/- ou Lac Z
1,25 U	Polymérase
1 uL	DMSO
1 uL	ADN

Table 6. Quantité des réactifs nécessaires pour la PCR (par point)

Etape	Programme	Température	Temps	Cycle
Etape 1	Pre-incubation	95°C	5 min	1
Etape 2	Dénaturation	95°C	30 sec	35 pour allèle sauvage 29 pour allèle mutant
Etape 3	Hybridation et Extension	58°C	30 sec	
		72 °C	1 min	
Etape 4	Extension finale	72 °C	7 min	1
Etape 5	Cooling	4 °C	∞	1

Table 7. Protocole de PCR

PCR avec le kit *Phire Tissue Direct PCR* : la PCR est effectuée selon les conditions suivantes, avec la polymérase provenant du kit. Les trois primers peuvent être mis ensemble dans la même réaction PCR.

Quantité finale	Réactif
Qsp 20uL	H2O
10 uL	PCR Master Mix
1 uL	Amorce P2
1 uL	Amorce +/-
1 uL	Amorce LacZ
1 uL	ADN

Table 8. Quantité des réactifs nécessaires pour la PCR (par point)

Etape	Programme	Température	Temps	Cycle
Etape 1	Pre-incubation	98°C	5 min	1
Etape 2	Dénaturation	95°C	5 sec	35
Etape 3	Hybridation et Extension	58°C	5sec	
		72 °C	30 sec	
Etape 4	Extension finale	72 °C	1 min	1
Etape 5	Cooling	4 °C	∞	1

Table 9. Protocole de PCR

IV. 3) Extraction d'ARN

Les ARN sont extraits soit par kit Qiagen (*RNeasy Mini Plus Kit # 74106 et colonnes QIAshredder #79656*) soit par TRIzol (*Life technologies # 15596018*).

L'extraction par TRIzol est effectuée selon le protocole du fournisseur : après aspiration du milieu de culture, 1mL de Trizol (par puits pour une plaque 6 puits) est déposé sur les cellules puis mis dans des tubes Eppendorf stériles. Les échantillons sont homogénéisés et incubés 5 minutes à température ambiante avant d'ajouter 200µL de chloroforme par tube. Après avoir retourné les tubes plusieurs

fois, ils sont incubés pendant 3 minutes à température ambiante puis centrifugés 12000g pendant 15 minutes à 4°C. La phase supérieure est prélevée et l'ARN est précipité par l'ajout de 5µg de glycogène (*ThermoFisher Scientific #10814010*) et de 500µL d'isopropanol. Les tubes sont retournés six fois doucement avant d'être disposés à -20°C pendant 5 minutes puis centrifugés 12000g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est totalement aspiré et le culot est lavé deux fois avec 1mL d'éthanol 75% avant d'être centrifugé à 7500g pendant 5 minutes à 4°C. L'éthanol est ensuite évaporé pendant 10 à 15 minutes. Le culot d'ARN est resuspendu dans 30µL d'eau RNase-free et les tubes sont chauffés à 55 degrés pendant 15 minutes. Un traitement à la DNase est ensuite effectué avec le *DNase-free DNA Removal kit* (*ThermoFisher Scientific #AM1906*). Avant incubation à 37°C pendant 30 minutes, 3µL de tampon et 1µL de rDNase I sont ajoutés dans la suspension d'ARN. Puis 3µL d'inhibiteur de rDNase sont ajoutés par tube, avec un temps d'incubation de 2 minutes à température ambiante. Les tubes sont centrifugés à 10000g pendant 90 secondes et les ARN sont transférés dans un nouveau tube. Ils sont conservés à -80°C.

IV. 4) Transcription Réverse

Les ARN sont dosés par spectrophotomètre *De Novix DS11+* ou par *Nanodrop*. La transcription réverse est effectuée avec 100ng d'ARN, avec le kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (de *ThermoFisher # 4368813*) suivant le protocole suivant. Un témoin négatif est réalisé dans les mêmes conditions, en remplaçant l'enzyme MultiScribe par de l'eau. Les ADNc sont ensuite conservés à -20°C ou utilisés immédiatement.

Quantité	Réactif
2 uL	Random Primer (10X)
0,8uL	dNTP (25X)
3,2uL	H ₂ O
2uL	Tampon (10X)
1uL	RNase out (Life Technologies #10777019)
1uL	MultiScribe (50 U/uL)
10uL	100ng ARN + H ₂ O

Table 10. Quantité des réactifs nécessaires pour la Transcription Réverse (par point)

	Etape 1	Etape 2	Etape 3	Etape 4
Température	25°C	37°C	85°C	4°C
Temps	10 min	120 min	5 min	∞

Table 11. Protocole de Transcription Réverse

IV. 5) qPCR

Les ADNc sont dilués dans 80µL d'eau pure. Une gamme (un point d'ADNc dilué et 3 dilutions successives 1/5^{ème}) est effectuée afin de contrôler l'efficacité des amorces et de la PCR. La PCR quantitative est réalisée avec du SyBr Green (480 SYBR Green I Master de Roche #04707516001) selon le protocole suivant sur plaque 96 puits (Roche #04729692001):

Quantité	Réactif
1uL	Primer forward (10uM)
1uL	Primer reverse (10uM)
3,5uL	H ₂ O
2,5uL	SyBr mix
2uL	ADNc

Table 12. Quantité des réactifs nécessaires pour la PCR quantitative (par point)

La PCR est quantifiée par le LightCycler 480 (*Roche*), suivant le programme suivant prédéfini (*template SYBR Green Reaction Protocol*) :

Etape	Programme	Température	Temps	Cycle	Mode d'analyse
Etape	Pre-incubation	95°C	5 min	1	/
Etape	Amplification	95°C	10 sec	45	/
		60°C	10 sec		/
		72°C	10 sec		Single
Etape	Melting Curve	95°C	5 sec	1	/
		65°C	1 min		/
		97°C	*		Continuous
Etape	Cooling	40°C	30 sec	1	/

Table 13. Protocole de PCR quantitative. * : tous les 5°C

Analyses

La qualité de la qPCR et des primers est vérifiée par la « *Melting Curve Analysis* » et le nombre de cycles est calculé par la « *Quantification Analysis* » sur le light Cycler. L'efficacité des amorces est vérifiée par calcul sur Excel (l'efficacité est considérée correcte si elle est comprise entre 1,8 et 2). Le dCT et le ddCT sont ensuite calculés. Les résultats peuvent être normalisés par le point contrôle de l'expérience.

Amorces

Les amorces sont sélectionnées sur deux exons séparés par un intron par Ensemble Genome Browser, BLAST nucleotide et Primer 3.

Nom du gène	Forward	Reverse
MyoG	5' GCA ATG CAC TGG AGT TGC 3'	5' ACG ATG GAC GTA AGG GAG TG 3'
FST	5' TGA CCT GTA ATC GGA TTT GC 3'	5' TGG AAT CCC ATA GGC ATT TT 3'
Cyclophilin	5' AAG AAG ATC ACC ATT TCC GAC T 3'	5' TTA CAG GAC ATT GCG AGC 3'
BMP2	5' AGA TCT GTA CCG CAG GCA CT 3'	5' CCG TTT TCC CAC TCA TCT CT 3'
Pax7	5' CTG GAT GAG GGC TCA GAT GT 3'	5' GGT TAG CTC CTG CCT GCT TA 3'
MyoD	5' TAC CCA AGG TGG AGA TCC TG 3'	5' CAT CAT GCC ATC AGA GCA GT 3'
TGFb2	5' ATC GTC GGC TTT GAT GTC TC 3'	5' GCT GGG TGG GAG ATG TTA AG 3'
Fzd7	5' TAT CGC CTA CAA CCA GAC CA 3'	5' ACA CGG GTG CGT ACA TAG AG 3'
Gja5	5' CAA CTT CGA CCT CAC TCT GAG C 3'	5' AGC ATG CGG AAA ATG AAC AGG 3'

Table 14. Liste des séquences des amorces

IV. 6) Extraction des protéines

L'extraction des protéines cytoplasmiques et nucléaires se fait selon le protocole du kit *NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction reagents* (Thermoscientific #78833). Les cellules sont cultivées sur une boîte de 15cm de diamètre jusqu'à confluence. Elles sont trypsinées et centrifugées à 500g pendant 5 minutes. Le culot est resuspendu dans du PBS puis les cellules sont centrifugées 500g pendant 5 minutes. Le surnageant est aspiré et 100µL de tampon CERI (provenant du kit) avec un inhibiteur de protéase est ajouté sur les cellules. Les tubes sont vortexés et mis à incuber 10 minutes dans la glace, puis 5,5µL de CERII (provenant du kit) sont ajoutés dans chaque tube. Les tubes sont vortexés pendant 5 secondes puis incubés pendant 1 minute dans la glace. Ils sont de nouveau vortexés puis centrifugés à vitesse maximum. Le surnageant contenant les protéines cytoplasmiques est transféré rapidement dans un nouveau tube. Le culot est resuspendu dans 50µL de tampon NER (provenant du kit) avec un inhibiteur de protéase. Les tubes sont vortexés pendant 15 secondes toutes les 10 minutes, pour un temps total de 40 minutes. Les tubes sont centrifugés à vitesse maximum pendant 10 minutes. Le surnageant contenant les protéines nucléaires est transféré dans un nouveau tube. Les protéines peuvent être conservées à 4°C pendant 2h, ou à -80°C.

IV. 7) Dosage des protéines

Une solution de BSA (Bovine Serum Albumin) à 2µg/µL est préalablement préparée. Une gamme de BSA est réalisée sur une plaque 96 puits comme suit (pour un volume totale de 10µL) :

µg de BSA	0	1	2	4	5	6	10	12
µL BSA à 2µg/µL	0	0,5	1	2	3	4	5	6
µL H₂O	10	9,5	9	8	7	6	5	4

Table 15. Gamme de BSA

Sur la même plaque, 1µL de chaque échantillon de protéines est déposé dans un puits, à compléter avec 9µL d'eau. Les protéines sont dosées grâce au kit *BCA Protein Assay Kit* (Pearce #23225). Le réactif B (provenant du kit BCA) est dilué à 1/50^{ème} dans le réactif A (provenant du kit BCA) et 200µL du réactif final est distribué dans chaque puits. La plaque est incubée dans le noir, à 37°C pendant 20 minutes. L'absorbance de chaque puits est lue par un lecteur de plaque ou par le spectrophotomètre *De Novix DS11+*.

L'absorbance mesurée des puits de la gamme permet d'obtenir une droite linéaire (avec coefficient de corrélation = 1) servant à quantifier la quantité de protéines extraites. La droite représentant l'absorbance mesurée de la BSA en fonction de la quantité (µg), la quantité des protéines extraites est facilement calculable grâce à leur absorbance.

Pour effectuer le Western Blot, 20 à 50µg de protéines sont prélevées pour chaque échantillon. Le volume de protéines est complété avec du Laemmli³⁵ et du tampon de lyse, afin d'avoir un volume final de 20µL.

IV. 8) Western Blot

Migration

Les échantillons sont chauffés pendant 5 minutes à 94°C. Le gel BIS-TRIS NuPAGE 4-12%³³ est installé dans la cuve remplie de tampon de migration³⁴ et les échantillons sont déposés dans les puits. Les puits vides sont remplis du marqueur de poids moléculaire³⁶ (7µL) ou de Laemmli³⁵ (20µL). Les échantillons sont migrés environ 1 heure à 120 Volts.

Transfert liquide

Le gel est délicatement extrait de sa cassette. Il est déposé sur une membrane de Nitrocellulose sans qu'aucune bulle ne soit présente entre les deux éléments. Le gel et la membrane sont montés de part et d'autre entre 3 feuilles de papier Whatman et d'éponges et disposés dans la cassette de transfert (*Mini Trans-Blot Cell BioRad*) de sorte que la membrane soit du côté du pôle positif de la cuve à transfert. La cuve est remplie de tampon de transfert³⁷ et mis sous tension à 250 mA pendant 2 heures à 4°C.

Révélation des protéines

Après le transfert, la membrane est lavée à l'eau, puis incubée avec du rouge ponceau³⁸ pendant 3 minutes. Le rouge ponceau est recyclé et la membrane est rincée à l'eau afin d'en extraire le surplus. La membrane est alors scannée numériquement, puis lavée avec du TBST³⁹ pour décolorer le ponceau. La membrane est saturée avec la solution de lait⁴⁰ pendant 30 minutes à 37°C puis pendant 30 minutes à température ambiante. Après rinçages au TBST, la membrane est incubée avec les anticorps primaires dilués dans la solution de lait pendant la nuit à 4°C. La solution d'anticorps se recycle et se conserve à -20°C jusqu'à la prochaine utilisation. Le lendemain, la membrane est lavée 3 fois avec le TBST, puis incubée avec les anticorps secondaires dilués dans une solution de 2,5% de lait,

1 heure à température ambiante. La membrane est ensuite lavée avec du TBST puis révélée avec le *SuperSignalWest Pico Chemiluminescent Substrate* (ThermoScientific #34080) avec la machine *ImageQuant TL LAS 4000* (GE Healthcare).

³³Gels : NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris Protein Gels, 1.5 mm, 15 well (Life Technologies # NP0336BOX)

³⁴Tampon de migration : 5% MOPS SDS running Buffer (#NP0001-02), 95% H₂O

³⁵Laemmli 6X : 20% Tris 1M pH6,8, 30 % SDS 20%, 45% glycérol 100%, 5% de b-mercapto-éthanol 100% (soir 14,3M) et 0,3% Bleu de bromophenol

³⁶Marqueur : Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder (Thermoscientific # 26619)

³⁷Tampon de transfert 1X : 25mM Tris, 0,2M Glycine, 20% Ethanol

³⁸Ponceau : Amresco #K793

³⁹Tampon TTBS : 5% TBS 20X, 95% H₂O, 0,05% Tween 20

⁴⁰Solution lait 5% : 95% TBS 1X, 0,2% NP40, 5% Lait demi écrémé en poudre

Tampon TBS 1X : 5% TBS 20X, 95% H₂O

Anticorps secondaires (dilution 1/20 000) :

Anti-souris couplé à la peroxidase : Sigma #A2304

Anti-lapin couplé à la peroxidase : Sigma #A6154

Anticorps Primaire	Commercialisation	Antigène	Dilution
Lamine A/C	Cell Signaling - 2032	Lapin	1/1000
β-caténin active	Cell Signaling - 8814	Lapin	1/200
Tubuline alpha	Sigma – T6074	souris	1/2000

Table 16. Liste des Anticorps primaires utilisés pour le Western Blot

V. Méthodes d'Analyses

V. 1) Analyse du transcriptome par puce Affymetrix

La puce utilisée est *Affymetrix Mouse Gene 2.1 ST Array*. Les données Affymetrix ont été traitées par la *plateforme Séquençage et Génomique* de l'Institut Cochin avec le logiciel R (*R Development Core Team, 2011*). Les niveaux d'expressions géniques ont été comparés par une ANOVA. L'analyse fonctionnelle des listes de gènes est réalisée par le logiciel Ingenuity Pathway Analysis (Qiagen).

V. 2) Programmes informatiques et logiciels

Analyse d'image : Image J 1.49p, Graphpad Prism version 6.0c, Adobe Photoshop CS3 version 10.0

Animalerie : Anibio (Noraybio)

Microarray : Ingenuity Pathway Analysis (IPA)

Microscopie : MetaMorph Microscopy Automation and Image Analysis Software, NIS-Element (Nikon)

V. 3) Plateformes

Animalerie : Recombinaison Homologue, Transfert d'Embryon et Cryoconservation de l'Institut COCHIN (Marcio DO CRUZEIRO), Centre de l'animalerie EOPS de l'Institut COCHIN (Agnès LEBON) et Centre d'Expérimentation Fonctionnelle de la Faculté de médecine PITIE-SALPETRIERE (Serban MOROSAN).

Cytométrie : Cytométrie et Immunobiologie de l'Institut COCHIN (Muriel ANDRIEU) et Plateforme de Cytométrie en flux de l'Université Pierre et Marie-Curie du site PITIE-SALPETRIERE (Chantal HOUSSET).

Génomique : Génomique et transcriptomique de l'Institut COCHIN (Franck LETOURNEUR).

Microscopie : Imagerie cellulaire de l'Institut COCHIN (Pierre BOURDONCLE) et Plate-forme d'Imagerie Cellulaire PITIE-SALPETRIERE PICPS (Claude-Marie BACHELET).

Protéomique : Plateforme Post-génomique de la PITIE-SALPETRIERE (Olivier SILVIE).

V. 4) Microscopes

-Macroscope AZ100 Nikon de l'Institut COCHIN et de l'Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière (ICM)

-Microscope EVOS FL Cell Imaging System de l'Institut de MYOLOGIE

-Microscope inversé à épi-illumination Zeiss Axio Observer.Z1 de l'Institut COCHIN

-Microscope inversé Zeiss Axiovert 200M inversé de l'Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière (ICM)

-Microscope Axio Scan.Z1 de l'Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière (ICM)

-Microscope Olympus BX63F de l'Institut COCHIN

RESULTATS

I. Phénotype des souris hétérozytes $Rspo1^{+/-}$

Pour étudier le rôle de la protéine R-spondin1 dans le muscle squelettique adulte, nous disposons d'un modèle murin knock-out pour $Rspo1$ (Chassot et al., 2008b). Les souris $Rspo1^{-/-}$ n'expriment pas la protéine et les femelles présentent un phénotype de stérilité lié à un développement incorrect des gonades femelles (Chassot et al., 2008b). En revanche, les souris hétérozygotes sont fertiles et ne présentent aucun phénotype sexuel. Dans notre étude, des souris sauvages (WT) et hétérozytes (Het) âgées de huit semaines ont été étudiées en tant que souris contrôles. Nous avons comparé la structure et la morphologie du muscle Tibialis Antérieur de ces souris différentes génétiquement afin de vérifier qu'une expression mono-allélique de $Rspo1$ n'influence pas l'homéostasie ou la régénération musculaire.

I. 1) L'hétérozygotie n'altère pas l'homéostasie du muscle sain

Afin d'analyser l'homéostasie musculaire, nous avons effectué une coloration avec l'Hématoxyline et l'Eosine (Figure 20A) sur les cryosections de muscles sauvages ou hétérozygotes pour $Rspo1$ (Figure 20A). Cette coloration permet de visualiser les cellules musculaires et les cellules environnantes dans le muscle squelettique. Nous observons que le tissu musculaire des souris hétérozygotes conserve son intégrité comparé au tissu des souris sauvages.

Dans le but d'étudier la morphologie des fibres musculaires, nous avons visualisé la Laminine par Immunofluorescence (Figure 20B) sur coupes de muscles et avons mis en évidence que les fibres musculaires sont correctement structurées.

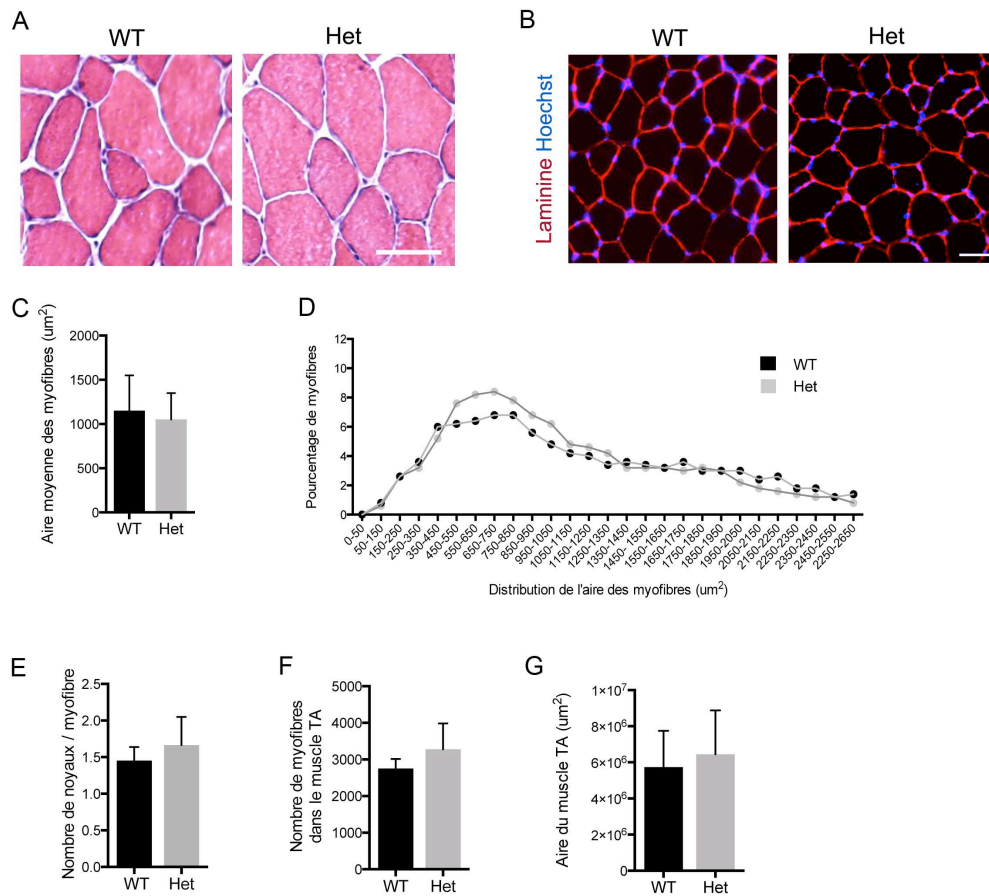


Figure 20. L'hétérozygotie *Rspo1* n'altère pas l'homéostasie du muscle sain

(A) Coloration Hématoxyline et Eosine des cryosections du muscle Tibialis Antérieur des souris sauvages ou hétérozygotes âgées de 2 mois. Barre : 50 μm . (B) Immunomarquage de la protéine Laminine sur les cryosections de muscles sains. Les noyaux sont marqués par Hoechst (en bleu). Barre : 50 μm . (C) Quantification de l'aire moyenne des myofibres sauvages ou hétérozygotes. (D) Distribution du nombre de myofibres sauvages ou hétérozygotes en fonction de leur aire. (E) Quantification du nombre de noyaux par myofibre. (F) Nombre total de myofibres dans le muscle Tibialis Antérieur. (G) Quantification de l'aire du muscle Tibialis Antérieur.

Les graphs représentent les moyennes avec écartypes.

La quantification de l'aire moyenne (Figure 20C) et de la distribution de l'aire (Figure 20D), montrent que l'hétérozygotie ne modifie pas la taille des fibres musculaires. De plus, la structure et l'organisation des myofibres ne sont pas altérées, puisque le nombre moyen de noyaux par myofibre (Figure 20E) dans le Tibialis Antérieur est identique dans le muscle sauvage ou hétérozygote.

Enfin, nous avons étudié l'homéostasie du Tibialis Antérieur en quantifiant le nombre total de myofibres dans ce muscle (Figure 20F) ou l'aire du muscle (Figure 20G).

Dans un muscle sain, l'homéostasie du tissu musculaire est correctement maintenue malgré une expression mono-allélique de R-spondin1.

I. 2) L'hétérozygotie n'affecte pas le processus de régénération musculaire

Nous avons ensuite étudié l'influence d'une expression mono-allélique de Rspo1 au cours de la régénération musculaire. Nous avons induit la régénération du muscle squelettique Tibialis Antérieur sauvage et hétérozygote avec une injection de Cardiotoxine et étudié l'homéostasie des muscles, 21 jours après l'injection de la toxine.

Tout d'abord, la quantification de l'aire du muscle (Figure 21A) et du nombre total de myofibres dans le Tibialis Antérieur (Figure 21B) indiquent qu'une expression mono-allélique de Rspo1 n'altère pas la physiologie musculaire. L'hétérozygotie n'influence pas le processus de régénération, puisque l'aire moyenne des myofibres (Figure 21C) ainsi que le nombre de noyaux par myofibre des hétérozygotes (Figure 21D) sont semblables à ceux des fibres musculaires contrôles.

Le facteur de transcription Pax7 étant crucial pour la maintenance de la population de cellules satellites (Günther et al., 2013), nous avons quantifié le nombre de cellules Pax7-positives par myofibre (Figure 21E) dans les muscles sauvages et hétérozygotes. Nous n'avons observé aucune modification du nombre de cellules satellites dans les muscles hétérozygotes, montrant qu'une expression mono-allélique de Rspo1 n'influence pas l'expansion des cellules satellites.

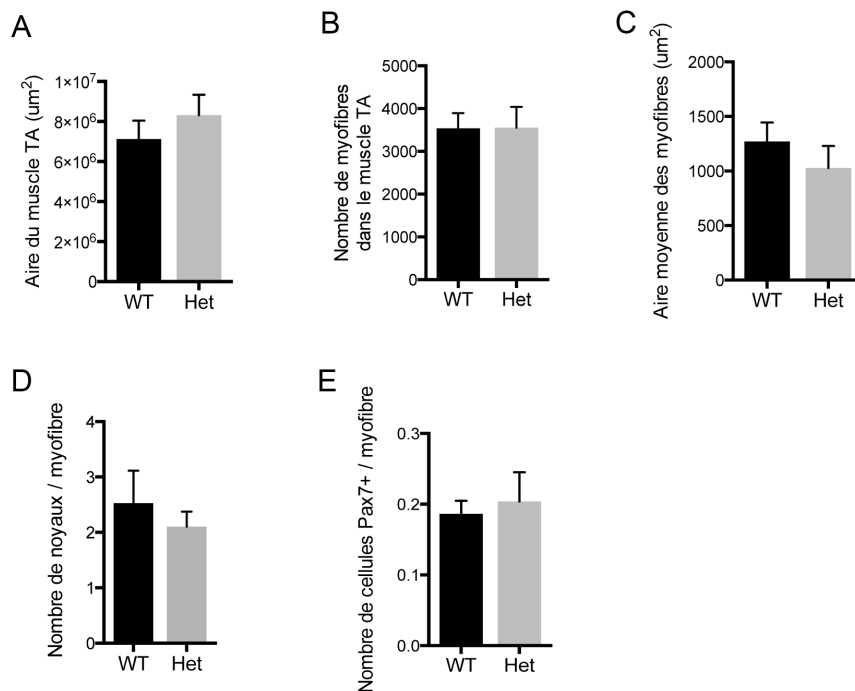


Figure 21. L'hétérozygotie *Rspo1* n'altère pas la régénération du Tibialis Antérieur, 21 jours après l'injection de Cardiotoxine

(A) Quantification de l'aire du muscle Tibialis Antérieur des souris âgées de 2 mois. (B) Nombre total de myofibres dans le muscle Tibialis Antérieur. (C) Quantification de l'aire moyenne des myofibres sauvages ou hétérozygotes. (D) Quantification du nombre de noyaux par myofibre. (E) Nombre de cellules satellites (Pax7-positives) par myofibre.

Les graphs représentent les moyennes avec écartypes.

Basé sur nos résultats, nous concluons qu'une expression mono-allélique de *Rspo1* n'altère pas l'homéostasie du muscle sain ou régénéré. Lors de nos expériences ultérieures, nous avons étudié les muscles sauvages ou hétérozygotes en tant que contrôles.

II. Implication de R-spondin1 dans le muscle squelettique

L'objectif de mon travail de Doctorat étant d'étudier le rôle de R-spondin1 dans le muscle squelettique, nous comparons les phénotypes observés dans les muscles des souris *Rspo1*^{-/-} avec ceux des souris contrôles. Dans un premier temps, nous avons étudié le rôle de cette protéine dans le maintien homéostatique du tissu sain. Puis, dans un second temps, nous avons étudié l'action de R-spondin1 au cours de la régénération musculaire.

II. 1) La protéine R-spondin1 ne contrôle pas l'homéostasie du tissu musculaire sain

Nous avons tout d'abord analysé la structure du muscle des souris saines, âgées de 8 semaines, par coloration des cryosections de muscles avec l'Hématoxyline et l'Eosine (Figure 22A). Nous n'avons observé aucune altération histologique entre les muscles contrôles et mutants.

Afin d'étudier plus précisément le rôle de R-spondin1 dans les cellules musculaires, nous avons visualisé les protéines Laminine et Pax7 par Immunofluorescence sur cryosections (Figure 22B). Le nombre de cellules satellites, représentées par le nombre de cellules Pax7-positives (Figure 22C), n'est pas altéré par une inhibition complète de l'expression de R-spondin1.

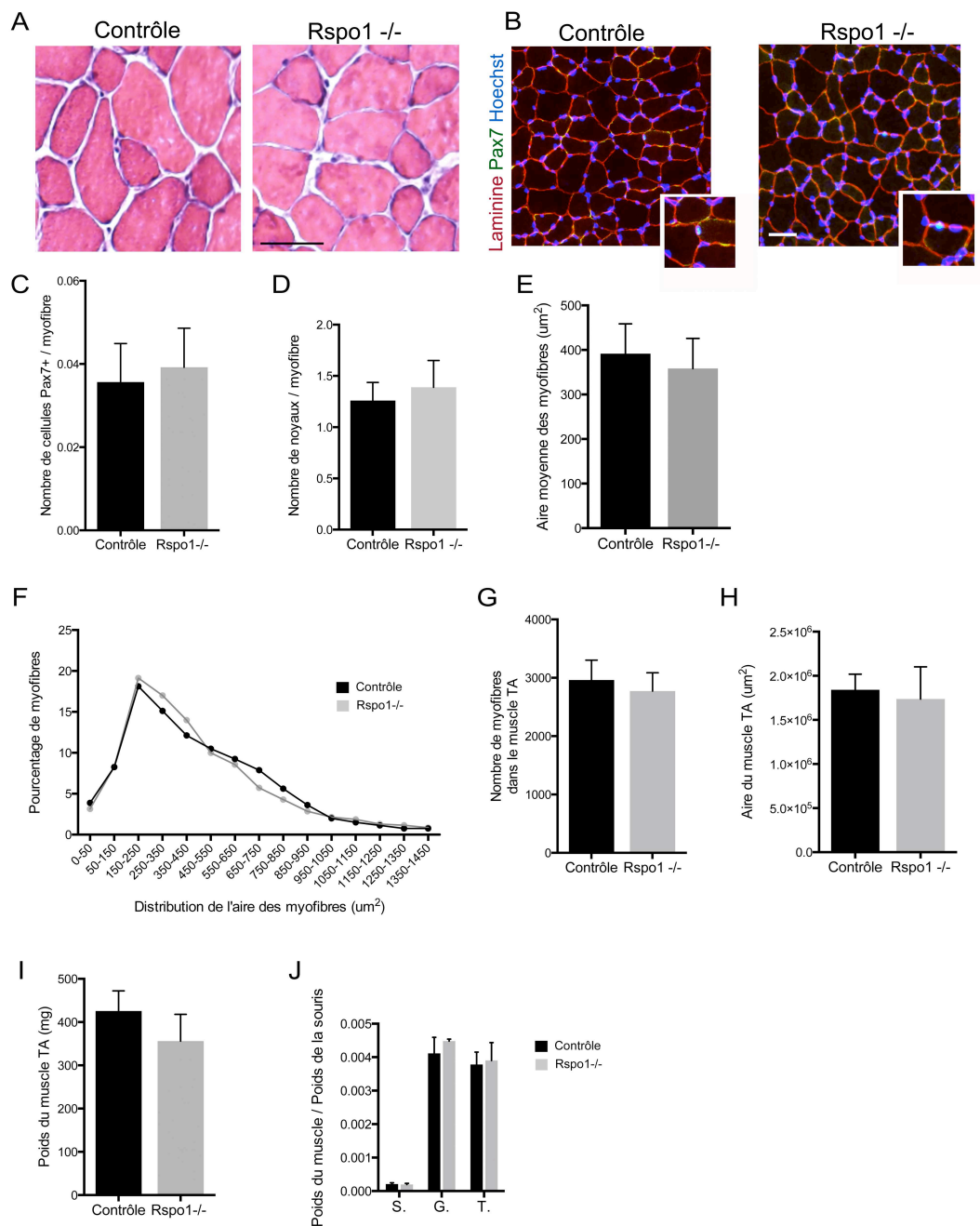


Figure 22. Une absence d'expression de Rspo1 dans le muscle squelettique sain ne perturbe pas l'organisation du tissu

(A) Coloration Hématoxyline et Eosine des cryosections du muscle Tibialis Antérieur des souris âgées de 2 mois. Barre : 50 µm. (B) Immunomarquage des protéines Laminine et Pax7 sur les cryosections de muscles sains. Les noyaux sont marqués par Hoechst (en bleu). Barre : 50 µm. Le panneau montre un agrandissement de 2,2X. (C) Nombre de cellules satellites (Pax7-positives) par myofibre. (D) Quantification du nombre de noyaux par myofibre. (E) Quantification de l'aire moyenne des myofibres contrôles ou Rspo1^{-/-}. (F) Distribution du nombre de myofibres en fonction de leur aire. (G) Nombre total de myofibres dans le muscle Tibialis Antérieur. (H) Quantification de l'aire du muscle Tibialis Antérieur. (I) Quantification de l'aire des muscles Soléaire (S), Gastrocnémien (G) ou Triceps (T) contrôles ou Rspo1^{-/-}.

Les graphs représentent les moyennes avec écartypes.

Ce résultat démontre que R-spondin1 n'influence pas la maintenance des cellules souches musculaires dans un muscle sain.

Le nombre de noyaux par myofibre (Figure 22D) en condition mutante est également similaire à celui observé en condition contrôle. De plus, une déficience totale de R-spondin1 dans le muscle ne modifie pas l'aire moyenne des myofibres (Figure 22E) et la distribution des myofibres en fonction de leur aire (Figure 22F).

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'ensemble du Tibialis Antérieur afin de déterminer si R-spondin1 possède un rôle de régulation global dans le muscle. Un défaut d'expression de *Rspo1* ne modifie pas le nombre de myofibres (Figure 22G) ou l'aire du muscle (Figure 22H). De plus, la quantification du poids du muscle Tibialis Antérieur sain (Figure 22I) confirme qu'une absence de R-spondin1 n'altère pas l'organisation du Tibialis Antérieur ou le maintien de son homéostasie. Bien que mon projet porte sur l'étude du muscle Tibialis Antérieur, nous avons jugé intéressant d'étudier les conséquences d'une délétion de *Rspo1* dans divers muscles squelettiques. Aucune différence de poids n'a été observée dans les muscles Soléaire (S), Gastrocnémien (G) ou Triceps (T) des souris contrôles ou déficientes pour R-spondin1 (Figure 22J), indiquant que R-spondin1 n'altère pas l'homéostasie musculaire en condition basale, quel que soit le muscle squelettique.

II. 2) R-spondin1 induit la différenciation des cellules satellites lors des étapes précoces de régénération musculaire

Nous avons induit la régénération des muscles contrôles ou déficients pour R-spondin1 par l'injection intramusculaire de Cardiotoxine et avons observé les conséquences d'une absence de R-spondin1 à différentes étapes de régénération.

Dans le but de déterminer le rôle de R-spondin1 dans les étapes précoces de régénération, nous avons analysé les muscles à 4 jours après l'injection de Cardiotoxine. Par coloration à l'Hématoxyline et l'Eosine (Figure 23A) des cryosections de muscle, nous avons observé la nécrose des myofibres contrôles et déficientes pour R-spondin1 (*Rspo1*^{-/-}).

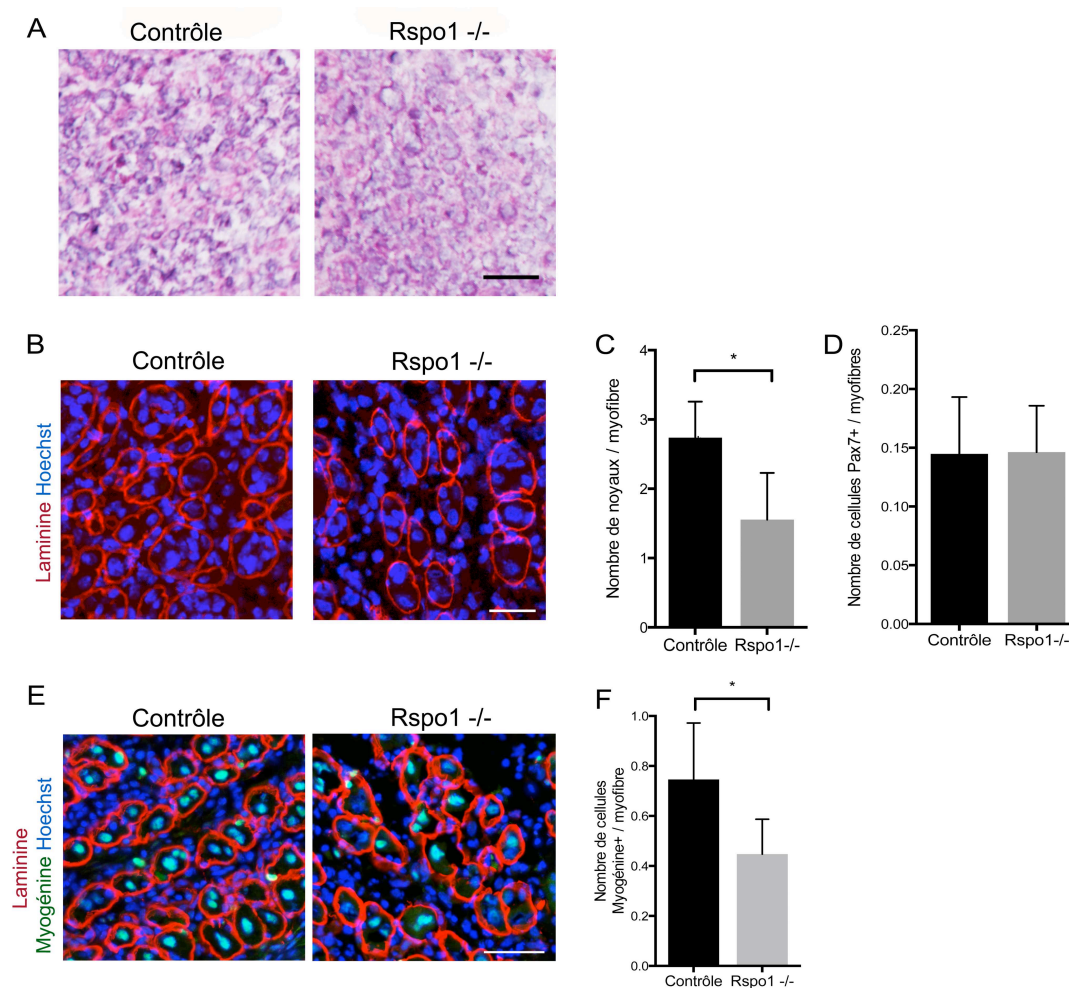


Figure 23. R-spondin1 est nécessaire pour la différenciation des cellules souches, 4 jours après l'injection de Cardiotoxine

(A) Coloration Hématoxyline et Eosine des cryosections du muscle Tibialis Antérieur des souris âgées de 2 mois. Barre : 50 μ m. (B) Immunomarquage de la protéine Laminine sur les cryosections de muscles régénérés. Les noyaux sont marqués par Hoechst (en bleu). Barre : 35 μ m. (C) Quantification du nombre de noyaux par myofibre. (D) Nombre de cellules satellites (Pax7-positives) par myofibre. (E) Immunomarquage des protéines Laminine et Myogénine sur les cryosections de muscles contrôles ou déficients pour R-spondin1. Les noyaux sont marqués par Hoechst (en bleu). Barre : 50 μ m. (F) Quantification du nombre de cellules myogéniques (Myogénine-positives) par myofibre. Les graphes représentent les moyennes avec écartypes. *: p value < 0,05.

La visualisation de la protéine Laminine par Immunofluorescence sur les cryosections de muscles en régénération (Figure 23B) indique qu'une absence de R-spondin1 dans le muscle n'altère pas l'initiation de la régénération musculaire ou la formation de nouvelles myofibres. Cependant, nous avons observé que les myofibres *Rspo1*^{-/-} néo-formées possèdent 45% de noyaux en moins comparées aux myofibres contrôles (Figure 23C). Ce dernier résultat met en avant un défaut initial de fusion entre les cellules *Rspo1*^{-/-} qui a pour conséquence l'établissement de myofibres avec peu de noyaux centraux.

Nous avons quantifié le nombre de cellules satellites par myofibre (Figure 23D), afin de comprendre si ce défaut de fusion était lié à un défaut d'expansion du nombre de cellules satellites. R-spondin1 n'influence pas l'expansion de la population des cellules souches musculaires lors des premières étapes de régénération du tissu.

La quantification du nombre de cellules positives pour la Myogénine (Figure 23E et Figure 23F) par myofibre montre que l'engagement des cellules satellites dans le lignage myogénique est affecté par une absence de R-spondin1.

Dans les premières étapes de la régénération musculaire, R-spondin1 est nécessaire pour l'induction de la différenciation des progéniteurs musculaires issus des cellules satellites.

II. 3) R-spondin1 régule la fusion des précurseurs myogéniques

Nous avons ensuite analysé les muscles, 7 jours après l'injection de Cardiotoxine. A ce stade, les myofibres sont nouvellement reformées et la matrice extracellulaire remodelée.

Avec une coloration à l'Hématoxyline et l'Eosine sur les cryosections de muscles contrôles ou déficients pour R-spondin1 (Figure 24A), nous avons observé que R-spondin1 ne semble pas affecter la restructuration du muscle squelettique adulte.

Par quantification du nombre de cellules exprimant le facteur Pax7 (Figure 24B), nous montrons que R-spondin n'est pas nécessaire pour l'expansion des cellules souches musculaires à ce stade de régénération. En effet, l'activation et la

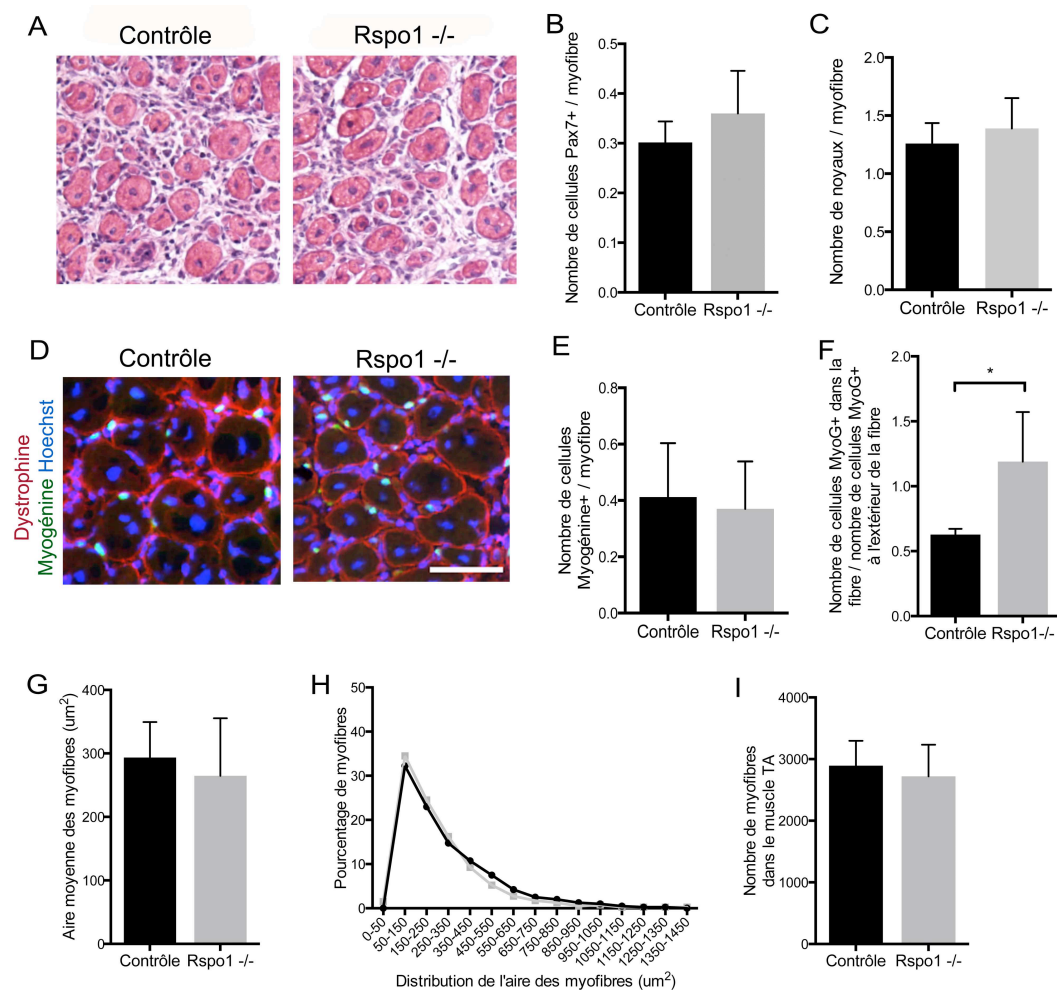


Figure 24. R-spondin1 limite la fusion des cellules souches, 7 jours après l'injection de Cardiotoxine

(A) Coloration Hématoxyline et Eosine des cryosections du muscle Tibialis Antérieur des souris âgées de 2 mois. (B) Nombre de cellules satellites (Pax7-positives) par myofibre. (C) Quantification du nombre de noyaux par myofibre. (D) Immunomarquage des protéines Dystrophine et Myogénine sur les cryosections de muscles contrôles ou Rspo1^{-/-}. Les noyaux sont marqués par Hoechst (en bleu). Barre : 50 µm. (E) Quantification du nombre de cellules myogéniques (Myogénine-positives) par myofibre. (F) Ratio du nombre de cellules myogéniques (Myogénine-positives) localisées dans la myofibre sur le nombre de cellules myogéniques (Myogénine-positives) localisées à l'extérieur de la myofibre. (G) Quantification de l'aire moyenne des myofibres contrôles ou Rspo1^{-/-}. (H) Distribution du nombre de myofibres en fonction de leur aire. (I) Nombre total de myofibres dans le muscle Tibialis Antérieur.

Les graphs représentent les moyennes avec écartypes. *: *p* value < 0,05.

prolifération des cellules souches musculaires sont deux processus importants à cette étape de reconstruction du tissu.

Nous avons observé que l'absence de R-spondin1 n'affecte pas le nombre de noyaux par myofibre (Figure 24C), montrant que le retard de fusion observé aux premiers stades de régénération est compensé en quelques jours. De plus, à ce stade de régénération, les cellules contrôles ou déficientes pour R-spondin1 sont engagées dans la voie myogénique (Figure 24D et Figure 24E). Cependant, le nombre de cellules myogéniques fusionnées avec les myofibres est supérieur dans le muscle *Rspo1*^{-/-} (Figure 24F). Ces résultats indiquent que les cellules déficientes pour R-spondin1 nouvellement différenciées possèdent une importante capacité de fusion.

L'aire moyenne des fibres (Figure 24G) et la distribution du nombre de fibres en fonction de leur aire (Figure 24H) ne sont pas altérées dans les muscles déficients pour R-spondin1. Enfin, le nombre total de myofibres dans le Tibialis Antérieur sauvage (Figure 24I) ne diffère pas de celui calculé dans le muscle déficient pour R-spondin1, montrant que la structure du muscle est maintenue en l'absence de R-spondin1.

Ainsi, 7 jours après l'injection de Cardiotoxine, le retard de différenciation cellulaire initial n'est plus observé. Cependant, les nouvelles cellules différenciées possèdent une importante capacité de fusion, compensant le défaut de fusion observé au cours des premiers jours de régénération. Cette capacité de fusion n'induit pas une croissance prématurée des myofibres, ni la formation de nouvelles myofibres.

II. 4) La protéine R-spondin1 inhibe le processus de fusion cellulaire à un stade tardif de régénération musculaire

Nous avons ensuite étudié le rôle de R-spondin1 à une étape tardive de régénération, 62 jours après l'injection de Cardiotoxine.

La visualisation de l'organisation du tissu avec une coloration à l'Hématoxyline et l'Eosine sur les cryosections de muscles contrôles ou *Rspo1*^{-/-} (Figure 25A) indique que le processus de régénération n'est pas terminé dans les deux conditions, puisque les myofibres possèdent des noyaux centraux.

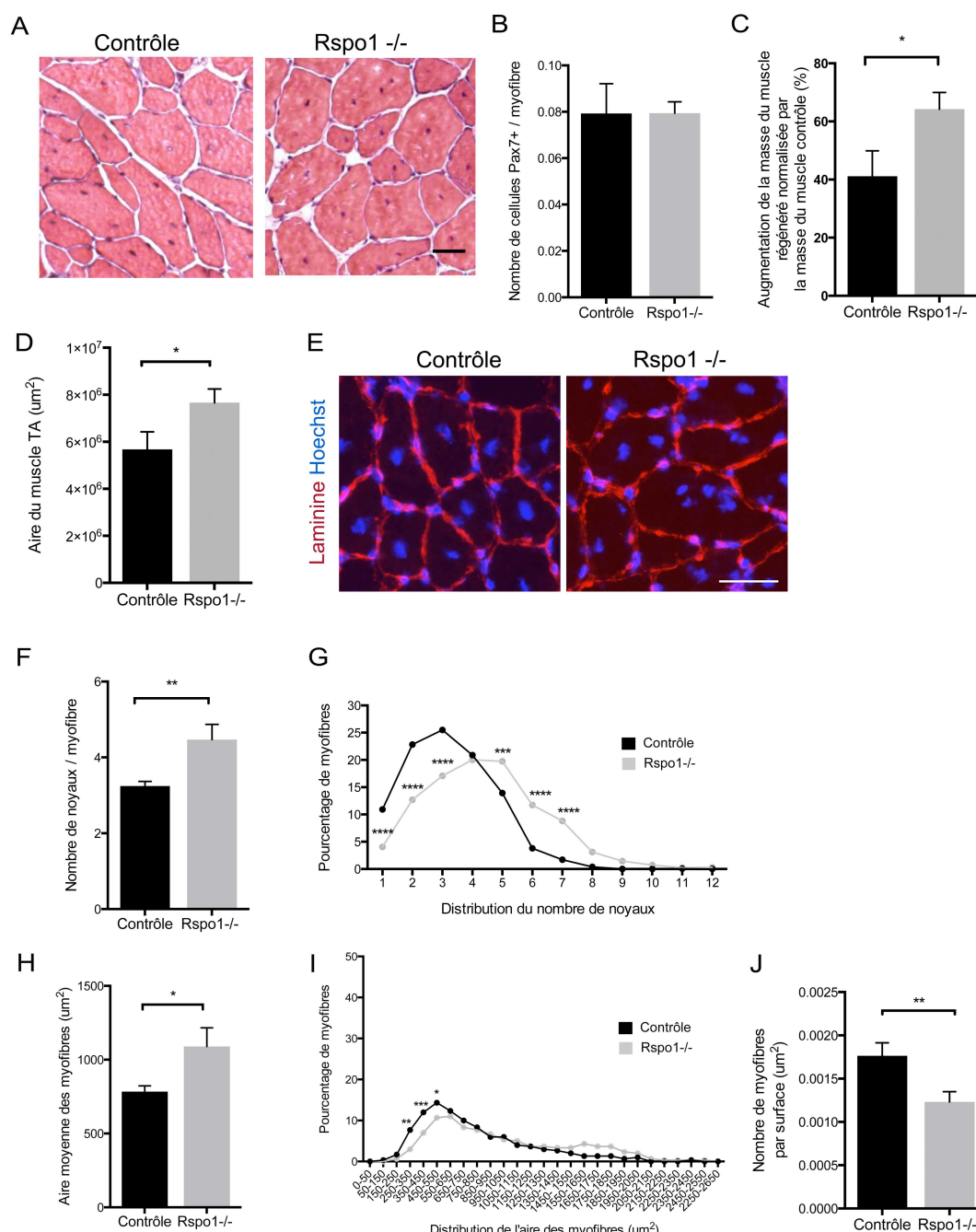


Figure 25. R-spondin1 limite la fusion cellulaire et la taille des myofibres, 62 jours après l'injection de Cardiotoxine

(A) Coloration Hématoxyline et Eosine des cryosections du muscle Tibialis Antérieur des souris âgées de 2 mois. Barre : 50 µm. (B) Nombre de cellules satellites (Pax7-positives) par myofibre. (C) Poids du muscle régénéré normalisé par le poids du muscle sain des souris contrôles ou déficientes pour R-spondin1. (D) Quantification de l'aire moyenne des muscles. (E) Immunomarquage de la protéine Laminine sur les cryosections de muscles contrôles ou Rspo1^{-/-}. Les noyaux sont marqués par Hoechst (en bleu). Barre : 35 µm. (F) Quantification du nombre de noyaux par myofibre. (G) Distribution du nombre de myofibres en fonction du nombre de noyaux. (H) Quantification de l'aire moyenne des myofibres contrôles ou Rspo1^{-/-}. (I) Distribution du nombre de myofibres en fonction de leur aire. (J) Quantification du nombre de myofibres par surface.

Les graphes représentent les moyennes avec écartypes. *: p value < 0,05. **: p value < 0,01.

A ce stade de régénération, peu de cellules satellites sont engagées dans le cycle cellulaire mais elles contribuent à l'entretien de la population des cellules souches musculaires. Aucune altération du nombre de cellules exprimant Pax7 n'a été mise en évidence en condition *Rspo1*^{-/-} (Figure 25B), montrant qu'un défaut d'expression de *Rspo1* ne modifie pas la maintenance des cellules satellites.

Nous avons observé que le muscle régénéré des souris déficientes pour R-spondin1 possédait une masse (Figure 25C) et une surface en coupe transversale (Figure 25D) plus importante que les muscles sauvages. La cause de cette augmentation peut être diverse. En effet, une hypertrophie ou une hyperplasie des myofibres peut induire une augmentation volumique du muscle squelettique. Nous avons donc visualisé la protéine Laminine et les noyaux par Immunofluorescence (Figure 25E) et quantifié le nombre de noyaux par myofibre (Figure 25F). Les myofibres *Rspo1*^{-/-} présentent une augmentation de 40% du nombre de noyaux comparées aux myofibres sauvages. De plus, la distribution du nombre de myofibres en fonction du nombre de noyaux qu'elles contiennent (Figure 25G) confirme que R-spondin1 limite la fusion des cellules musculaires. Nous avons démontré que l'amélioration du processus de fusion présente dans les muscles déficients pour R-spondin1 induit un accroissement de l'aire des myofibres (Figure 25H et Figure 25I). La quantification du nombre de myofibres par surface (Figure 25J) confirme qu'un défaut de l'expression de *Rspo1* induit une amélioration du processus de fusion cellulaire ayant pour conséquence un accroissement de la taille des myofibres et du muscle Tibialis Antérieur.

Nos résultats indiquent que R-spondin1 possède un double rôle selon les stades de régénération musculaire. Cette protéine contrôle l'initiation de la différenciation des précurseurs et la fusion des cellules myogéniques.

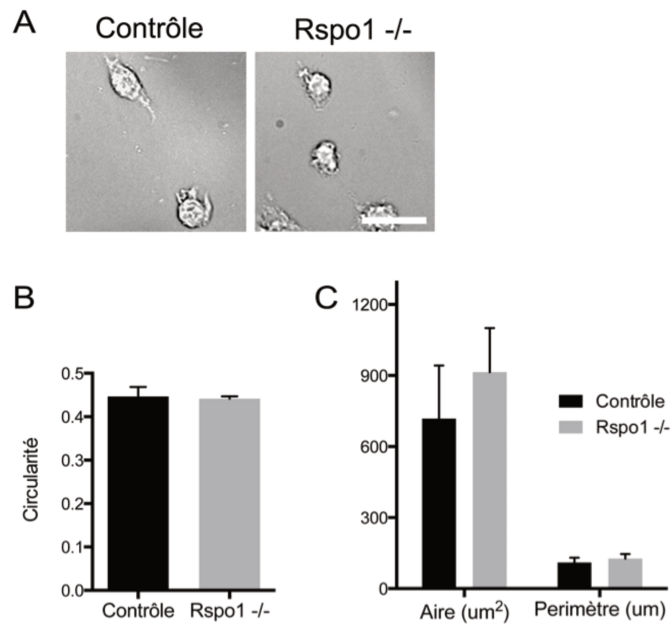


Figure 26. Une absence de R-spondin1 n'altère pas la morphologie des cellules primaires

(A) Photographie par microscopie des cellules primaires en prolifération. Barre : 50 μm . (B) Quantification de la circularité des cellules contrôles ou Rspo1^{-/-}. (C) Quantification de l'aire et du périmètre des cellules.

Les graphes représentent les moyennes avec écartypes.

III. Rôle de R-spondin1 dans les cellules primaires

Afin de confirmer le rôle de R-spondin1 observé dans le muscle squelettique adulte en régénération, nous avons isolé les cellules satellites des muscles squelettiques contrôles ou déficients pour R-spondin1. Nous avons ainsi pu étudier, *in vitro*, les processus de prolifération, différenciation et fusion des cellules musculaires.

III. 1) R-spondin1 n'affecte pas la morphologie des cellules primaires

Après isolation des cellules primaires, nous avons étudié la morphologie des cellules Rspo1^{-/-}. Nous avons observé par microscopie (Figure 26A) que les cellules mutantes et contrôles en prolifération semblaient morphologiquement identiques. Nous avons confirmé ce résultat par la quantification de la circularité (Figure 26B) qui consiste à observer la forme des cellules. De plus, la quantification de l'aire ou du périmètre des cellules (Figure 26C) indique que R-spondin1 n'influence pas la taille des cellules. Nos résultats montrent qu'une absence de R-spondin1 n'altère pas la morphologie de la cellule musculaire.

III. 2) La protéine R-spondin1 ne contrôle pas l'auto-renouvellement des myoblastes

Les myoblastes primaires sont tout d'abord cultivés en condition de prolifération. Par Immunofluorescence, nous avons observé que les cellules contrôles et déficientes pour R-spondin1 (Figure 27A) expriment le marqueur des cellules satellites Pax7. Ainsi, dans les deux conditions les cellules conservent leurs

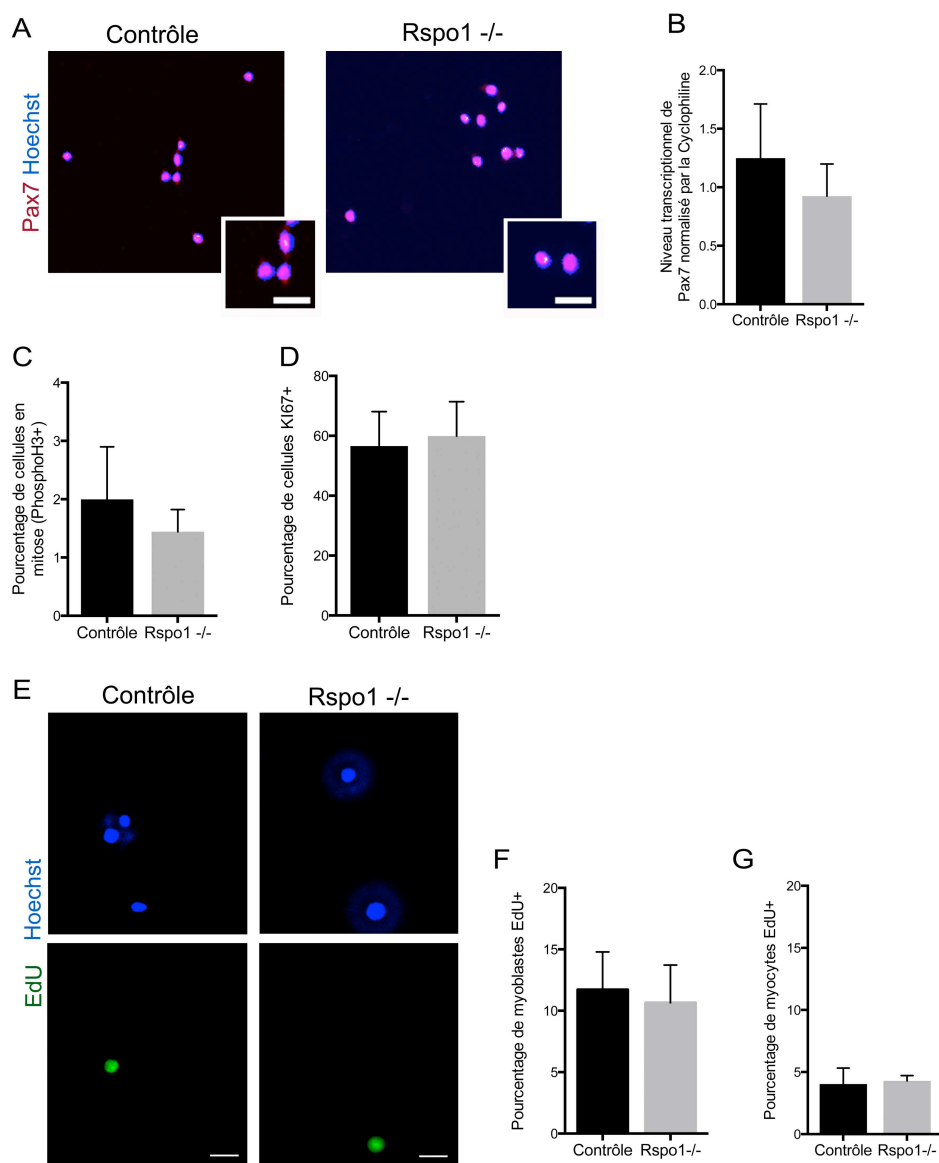


Figure 27. R-spondin1 n'altère pas la prolifération des cellules musculaires primaires

(A) Immunomarquage de la protéine Pax7 sur les myoblastes contrôles ou Rspo1^{-/-}. Les noyaux sont marqués par Hoechst (en bleu). Barre : 30 μm. Le panneau montre un agrandissement de 2,5X. (B) Expression génique de Pax7 dans les myoblastes par qPCR. (C) Nombre de cellules engagées en mitose (cellules PhosphoHistoneH3-positives). (D) Nombre de cellules engagées dans les phases G1, S, G2 et M (cellules KI67-positives). (E) Immunomarquage de l'EdU sur les myoblastes contrôles ou Rspo1^{-/-}. Les noyaux sont marqués par Hoechst (en bleu). Barre : 20 μm. (F) Quantification du nombre de myoblastes engagées dans la phase S (cellules EdU-positives). (G) Quantification du nombre de myocytes engagées dans la phase S (cellules EdU-positives).

Les graphes représentent les moyennes avec écartypes.

propriétés de cellules souches. Nous avons validé ce résultat en quantifiant le niveau transcriptionnel de Pax7 dans ces cellules (Figure 27B).

Nous avons ensuite étudié la capacité proliférative des cellules par quantification du nombre de cellules engagées dans la phase mitotique (Figure 27C) ou dans le cycle cellulaire (Figure 27D) par leur expression respective pour l'histone H3 phosphorylée et Ki67. Un défaut d'expression de Rspo1 n'altère pas le nombre de cellules en prolifération. Afin de confirmer ces résultats, nous avons observé par Immunofluorescence le nombre de cellules engagées dans la phase S par une incorporation d'EdU (Figure 27E). R-spondin1 n'influence pas l'entrée des myoblastes (Figure 27F) ou des myocytes (Figure 27G) en phase S.

Le nombre de cellules contrôles ou Rspo1^{-/-} engagées dans la cycle cellulaire étant identique, R-spondin1 ne participe pas à la régulation de la prolifération des cellules souches musculaires.

III. 3) R-spondin1 favorise l'engagement des cellules dans le lignage myogénique

Nous avons ensuite déterminé le potentiel myogénique que possèdent les myoblastes en culture. Pour cela, nous avons incubé les cellules dans du milieu de différenciation pendant 24 heures et observé le nombre de noyaux exprimant la Myogénine par Immunofluorescence (Figure 28A). Au début du processus de différenciation, le nombre de cellules différenciées (noyaux Myogénine-positifs) est diminué de 25% en condition Rspo1^{-/-} (Figure 28B) montrant que R-spondin1 est nécessaire pour l'initiation de la différenciation des myoblastes. Cependant, ce défaut de différenciation n'est pas observé au-delà de 48 heures de culture (Figure 28B).

Dans le but de déterminer le mécanisme moléculaire influencé par une absence de R-spondin1, nous avons effectué une analyse des ARNm provenant des cellules différenciées pendant 24 heures par microarray Affymetrix. Par cette analyse, nous avons isolé tous les gènes dont l'expression était dérégulée dans les cellules déficientes pour R-spondin1.

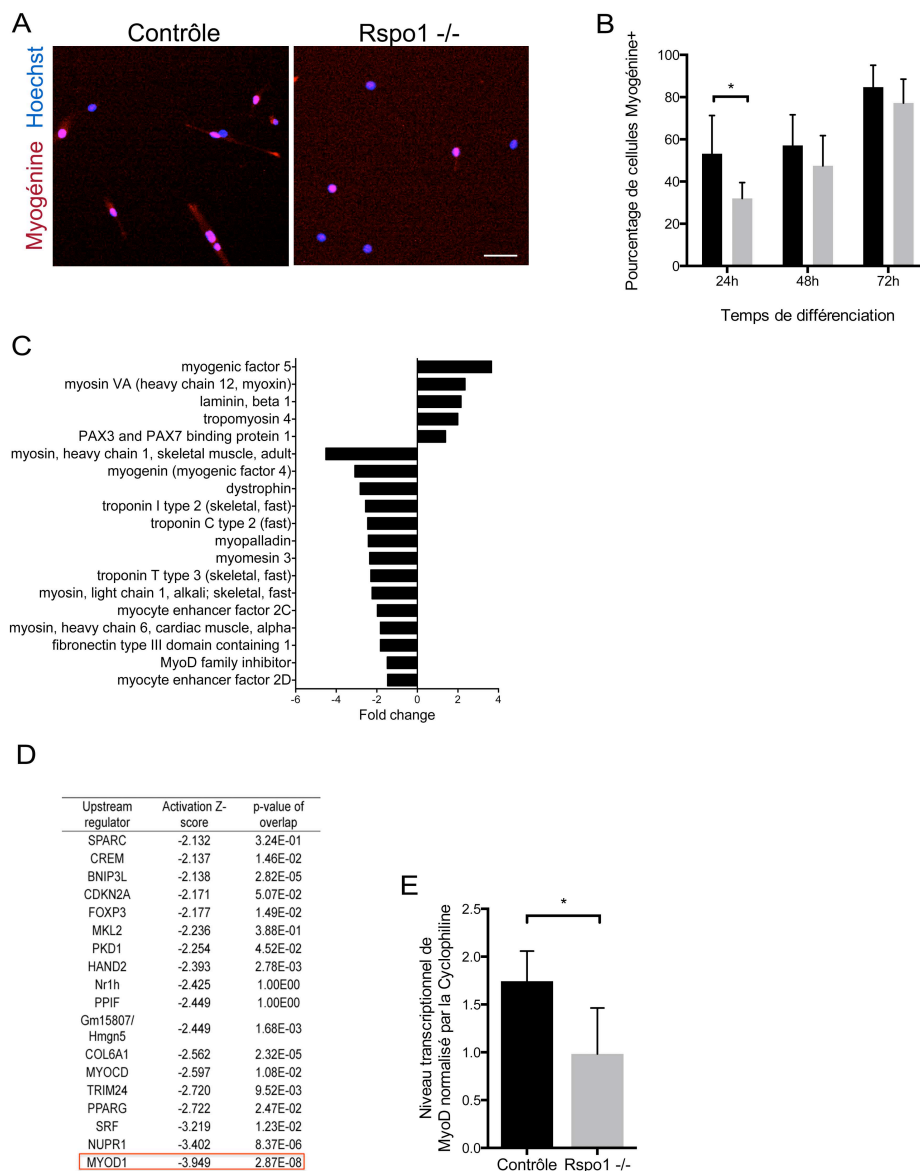


Figure 28. R-spondin1 contrôle l'initiation de la différenciation des myoblastes

(A) Immunomarquage de la protéine Myogénine dans les myocytes contrôles et Rspo1^{-/-}. Les noyaux sont marqués par Hoechst (en bleu). Barre : 50 µm. (B) Expression génique de Myogénine dans les cellules en différenciation par qPCR en fonction du temps de différenciation. (C) Liste des gènes impliqués dans la myogenèse dérégulés par une absence de R-spondin1 dans les cellules en différenciation, par microarray Affymétrie. (D) Liste de gènes régulateurs (Upstream Regulators) dans les cellules Rspo1^{-/-}, par microarray Affymétrie. (E) Expression génique de MyoD dans les cellules en différenciation par qPCR.

Les graphs représentent les moyennes avec écartypes. *: *p* value < 0,05.

Nous avons observé qu'une grande majorité des gènes impliqués dans la myogenèse sont sous-régulés (Figure 28C) en l'absence de R-spondin1. L'analyse nous a également permis d'isoler un groupe de gènes (Upstream Regulators) qui sont responsables de la dérégulation de l'expression de gènes précédemment listés. Le gène MyoD, connu pour réguler la différenciation des cellules musculaires, est le régulateur principale dont l'expression est la plus sous-régulée (Figure 28D). R-spondin1 est donc nécessaire pour l'expression génique des facteurs de régulation myogéniques (MRFs). Nous avons analysé l'expression génique de MyoD par qPCR (Figure 28E). Les myocytes *Rspo1*^{-/-} présentent une diminution de l'expression de MyoD de 50% comparé à l'expression des myocytes contrôles.

Ces résultats démontrent que l'expression de R-spondin1 est nécessaire pour l'initiation de la différenciation cellulaire via l'expression de MyoD et Myogénine.

III. 4) R-spondin1 régule la migration des cellules différenciées

Nous avons étudié le mouvement migratoire des cellules contrôles ou déficientes pour R-spondin1 par vidéo-microscopie (Figure 29A) pendant plusieurs heures. En examinant le déplacement des cellules en différenciation, nous avons mis en évidence que les cellules *Rspo1*^{-/-} ont une vitesse moyenne augmentée de 20% comparée à la vitesse de déplacement des cellules contrôles (Figure 29B). De plus, la vitesse minimum calculée, correspondant à la vitesse la plus faible à laquelle se déplacent les cellules, est significativement augmentée dans les cellules en absence de R-spondin1 (Figure 29C). Ces résultats prouvent que les cellules déficientes pour R-spondin1 possèdent une meilleure capacité migratoire.

Nous avons ensuite étudié la capacité d'invasion que possèdent les cellules primaires par une expérience de Scratch Assay, qui consiste à étudier la capacité cellulaire à envahir un espace sans cellules (Figure 29D). La quantification du nombre de cellules ayant migré dans cet espace (Figure 29E) indique qu'une absence de R-spondin1 augmente la migration invasive des cellules.

Ces résultats prouvent que R-spondin1 régule négativement la motilité des myocytes et la capacité invasive des cellules musculaires.

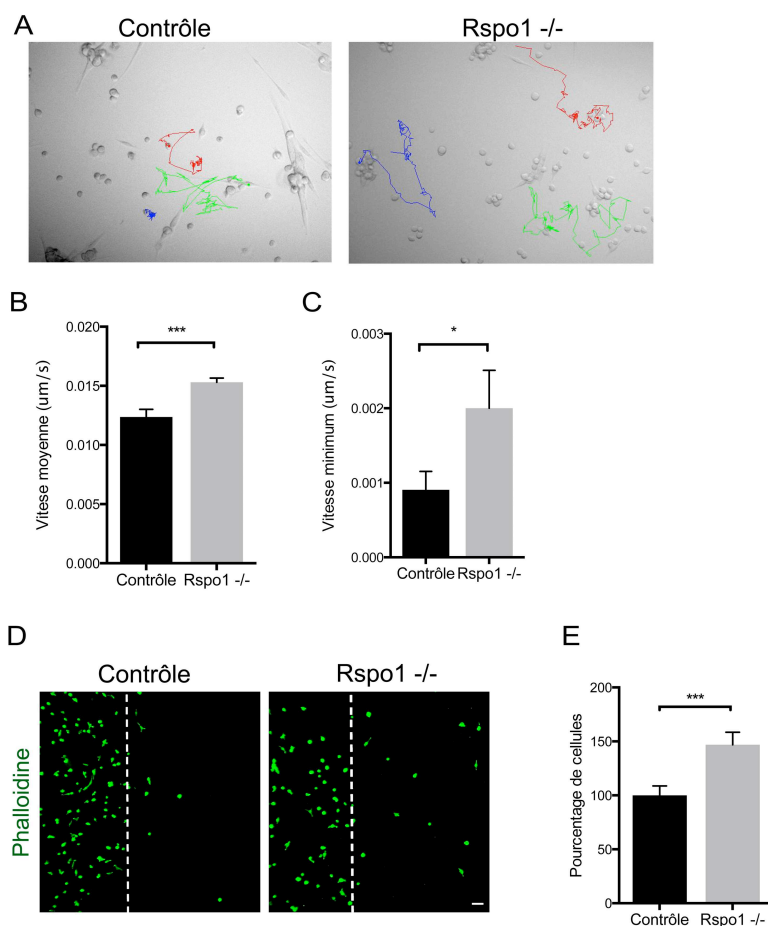


Figure 29. R-spondin1 contrôle la motilité des cellules musculaires

(A) Photographie par vidéo-microscopie des cellules primaires en différenciation. Chaque tracé représente la distance parcourue par une cellule pendant 24 heures. (B) Quantification de la vitesse moyenne des cellules. (C) Quantification de la vitesse minimum des cellules. (D) Immunomarquage de l'Actine (Phalloïdine) des cellules sauvages et Rspo1^{-/-} lors du Scratch Assay. Les barres blanches représentent la limite de l'espace vide. Barre : 50 µm. (E) Quantification du nombre de myoblastes présents dans l'espace vide.

Les graphs représentent les moyennes avec écartypes. *: p value < 0,05.

***: p value < 0,001

III. 5) La protéine R-spondin1 contrôle la fusion des précurseurs myogéniques

Dans le but de déterminer si le défaut de différenciation des cellules déficientes pour R-spondin1 influence la fusion cellulaire, nous avons incubé les myoblastes primaires dans du milieu de différenciation pendant 96 heures.

Par Immunofluorescence, nous avons observé une absence de fins myotubes Rspo1^{-/-} (Figure 30A) comparés aux myotubes contrôles. La quantification du nombre de myotubes par surface (Figure 30B) montre une diminution du nombre de myotubes Rspo1^{-/-} formés. Cependant, aucune altération de l'index de fusion n'est causée par une absence de Rspo1 (Figure 30C), montrant que le même nombre de cellules fusionne dans les deux conditions.

Nous avons quantifié le diamètre moyen des myotubes (Figure 30D) et la distribution des myotubes en fonction de leur diamètre (Figure 30E). Les myotubes déficients pour R-spondin1 sont 30% plus gros que les myotubes contrôles. Cette augmentation peut s'expliquer par une amélioration du processus de fusion en l'absence de R-spondin1 puisque la proportion du nombre de myotubes avec plus de 7 noyaux est significativement augmenté (Figure 30F) alors que la proportion de myotubes avec 2 noyaux est diminuée comparée à celle observée avec les myotubes contrôles.

Ces résultats démontrent qu'un défaut d'expression de Rspo1 cause une fusion incorrecte des précurseurs myogéniques et induit la formation de myotubes avec un grand nombre de noyaux.

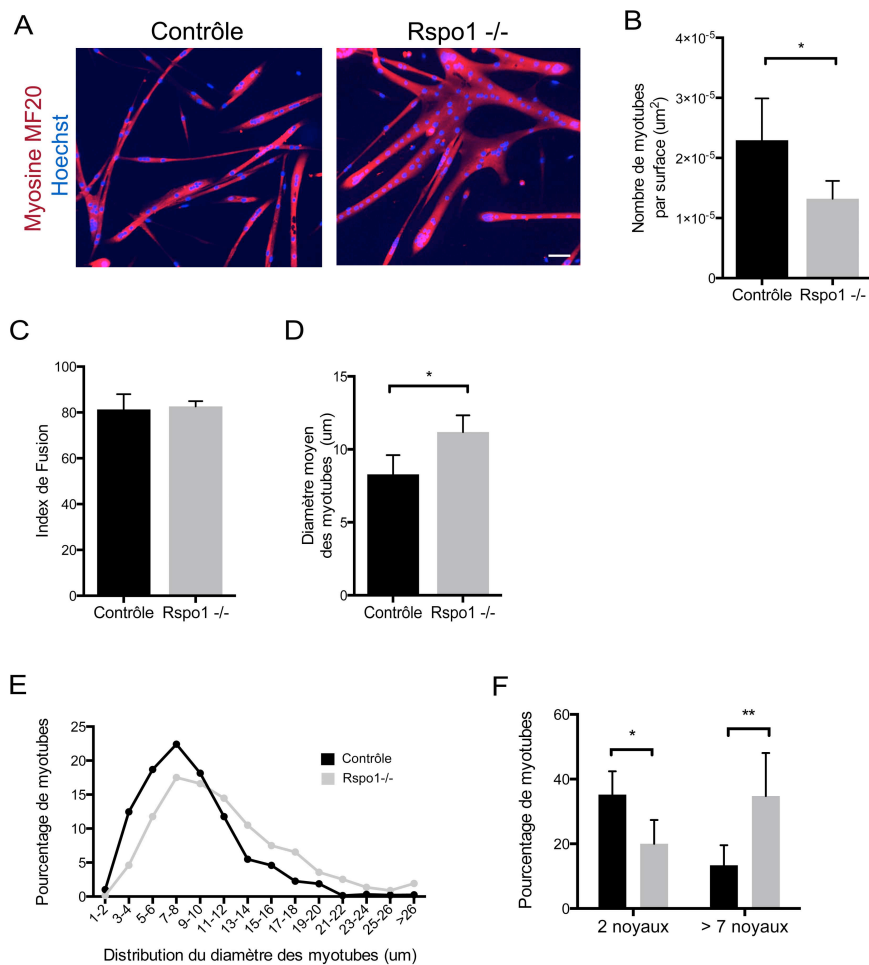


Figure 30. Une absence de R-spondin1 améliore la fusion cellulaire

(A) Immunomarquage de la protéine Myosine Mf20 sur les myotubes contrôles ou Rspo1^{-/-}. Les noyaux sont marqués par Hoechst (en bleu). Barre : 50 μm . (B) Quantification du nombre de myotubes par surface. (C) Index de fusion représentant le nombre de noyaux dans les myotubes par le nombre de noyaux totaux. (D) Quantification du diamètre moyen des myotubes. (E) Nombre de myotubes contrôles ou Rspo1^{-/-} en fonction de leur diamètre. (F) Quantification du nombre de myotubes en fonction du nombre de noyaux qu'ils contiennent.

Les graphs représentent les moyennes avec écartypes. *: p value < 0,05.

** : p value < 0,01

IV. Contrôle des voies Wnt par R-spondin1

Nous avons ensuite étudié les voies de signalisation directement régulées par R-spondin1 puisque les protéines R-spondins peuvent potentialiser la voie Wnt/ β -caténine (Carmon et al., 2011) et la voie Wnt/PCP (Glinka et al., 2011) selon le type cellulaire. Nous avons donc étudié la régulation de la voie Wnt canonique et de la voie Wnt non-canonique dans les cellules déficientes pour R-spondin1, afin de déterminer l'influence de ce ligand sur les signalisations Wnt.

IV. 1) R-spondin1 régule la différenciation cellulaire par la potentialisation de la voie Wnt/ β -caténine

Par analyse des ARNm dans les myocytes déficients pour R-spondin1 par microarray Affymétrie, nous avons observé que les gènes impliqués dans la voie Wnt/ β -caténine tels que Follistatine (FST), Porcupine ou la protéine de jonction $\alpha 5$ (Gja5) ont une expression sous-réglée (Figure 31A) en l'absence de R-spondin1. Nous avons quantifié le niveau transcriptionnel de certains gènes cibles de la β -caténine tels que Follistatine (Figure 31B) ou BMP2 (Figure 31C). Dans les cellules déficientes pour R-spondin1, l'expression de ces gènes est diminuée de 100 à 150%, montrant qu'un défaut d'expression de Rspo1 altère l'expression des gènes cibles de Wnt.

Dans le but de déterminer si ces gènes cibles peuvent être exprimés dans les cellules Rspo1^{-/-} lorsque la voie canonique est stimulée, nous avons traité les cellules primaires avec la protéine recombinante Wnt3a, connue pour activer la voie Wnt/ β -caténine. L'expression des gènes Follistatine (Figure 31D et E), Gja5 (Figure 31F et G) ou TGF β 2 (Figure 31H et I) a été analysée par qPCR. Alors que l'expression de ces gènes est augmentée de 300 à 400% dans les cellules contrôles traitées avec Wnt3a, aucune augmentation n'est observée dans les cellules déficientes pour R-spondin1 traitées avec la protéine recombinante.

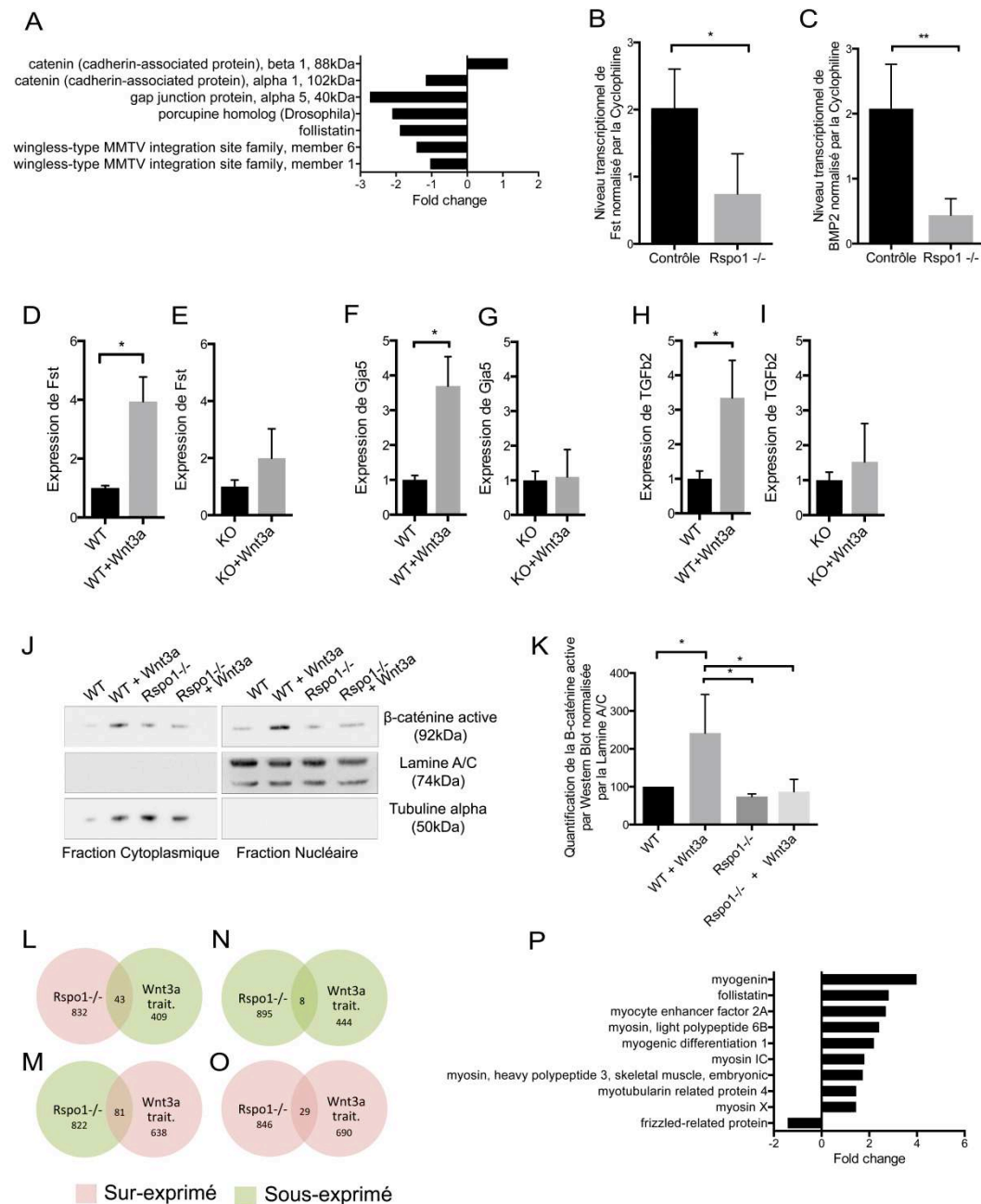


Figure 31. Une absence de R-spondin1 altère la différenciation des myoblastes par l'inhibition de la stimulation de la voie Wnt/β-caténine

(A) Liste des gènes impliqués dans la voie Wnt/β-caténine et régulés par une absence de R-spondin1 dans les cellules en différenciation, par microarray Affymétrie. (B) Expression génique de Follistatine dans les cellules en différenciation par qPCR. (C) Expression génique de BMP2 par qPCR. (D) Expression génique de Follistatine dans les cellules contrôles (WT) et (E) dans les cellules Rspo1^{-/-} (KO) après traitement par la protéine recombinante Wnt3a, par qPCR. (F) Expression génique du gène cible de la voie canonique Gja5 dans les cellules contrôles et (G) dans les cellules Rspo1^{-/-} après traitement par la protéine recombinante Wnt3a. (H) Expression génique de TGFβ2 dans les cellules contrôles et (I) dans les cellules Rspo1^{-/-} après traitement par Wnt3a. (J) Western Blot de la β-caténine active, LamineA/C et Tubuline α. (K) Quantification du taux de β-caténine nucléaire dans les cellules contrôles et déficientes pour R-spondin1 après stimulation de la voie canonique, observé par le Western Blot.

Ces résultats montrent que R-spondin1 est nécessaire pour l'activation de la voie canonique.

Nous avons analysé la localisation de la protéine β -caténine active par Western Blot dans les cellules contrôles ou déficientes pour R-spondin1 (Figure 31J). Pour cela, les protéines nucléaires et cytoplasmiques ont été isolées et la β -caténine active a été révélée avec des anticorps spécifiques. Alors qu'une activation de la voie canonique dans les cellules contrôles augmente le taux de la protéine β -caténine nucléaire (Figure 31K), aucune augmentation n'est présente dans les noyaux des cellules $Rspo1^{-/-}$. R-spondin1 est donc crucial pour la translocation de la β -caténine active dans le noyau.

Par analyse des ARNm par microarray Affymétrie, nous avons observé que la proportion de gènes dont la régulation est antagoniste (Figure 31L et M) est plus grande que la proportion de gènes dont la régulation est agoniste (Figure 31N et O) entre les cellules traitées par Wnt3a et les cellules $Rspo1^{-/-}$. Cela confirme une action agoniste de R-spondin1 sur l'activation de la voie Wnt/ β -caténine.

Les analyses Affymetrix réalisées sur les cellules traitées par Wnt3a montrent que la majorité des gènes impliqués dans la myogenèse ont une expression sur-régulée (Figure 31P). Cette observation permet de comprendre que le défaut de différenciation des cellules satellites déficientes pour R-spondin1 est lié à une inhibition de l'activation de la voie Wnt/ β -caténine.

IV. 2) R-spondin1 contrôle la migration et la fusion cellulaire par l'inhibition de la voie Wnt7a/Fzd7

Nous avons ensuite étudié le rôle de R-spondin1 lors de l'activation de la voie Wnt/PCP. Nous avons traité les myoblastes primaires contrôles par les protéines recombinantes Wnt7a et $Rspo1$ (Figure 32A) et répété l'expérience de Scratch Assay.

Figure 31 (suite). (L-M-N-O) Diagramme de Venn montrant le nombre de gènes partagés entre les myocytes traités par Wnt3a les myocytes $Rspo1^{-/-}$, par microarray Affymétrie. Le chiffre dans chaque partie indique le nombre de gènes dont la régulation n'est pas partagée. Le chiffre au centre du diagramme de Venn indique le nombre de gènes communs. (P) Liste de gènes impliqués dans la myogenèse, régulés par l'activation de la voie Wnt canonique, par microarray Affymétrie.

*Les graphes représentent les moyennes avec écartypes. *: p value <0,05. **: p value <0,01*

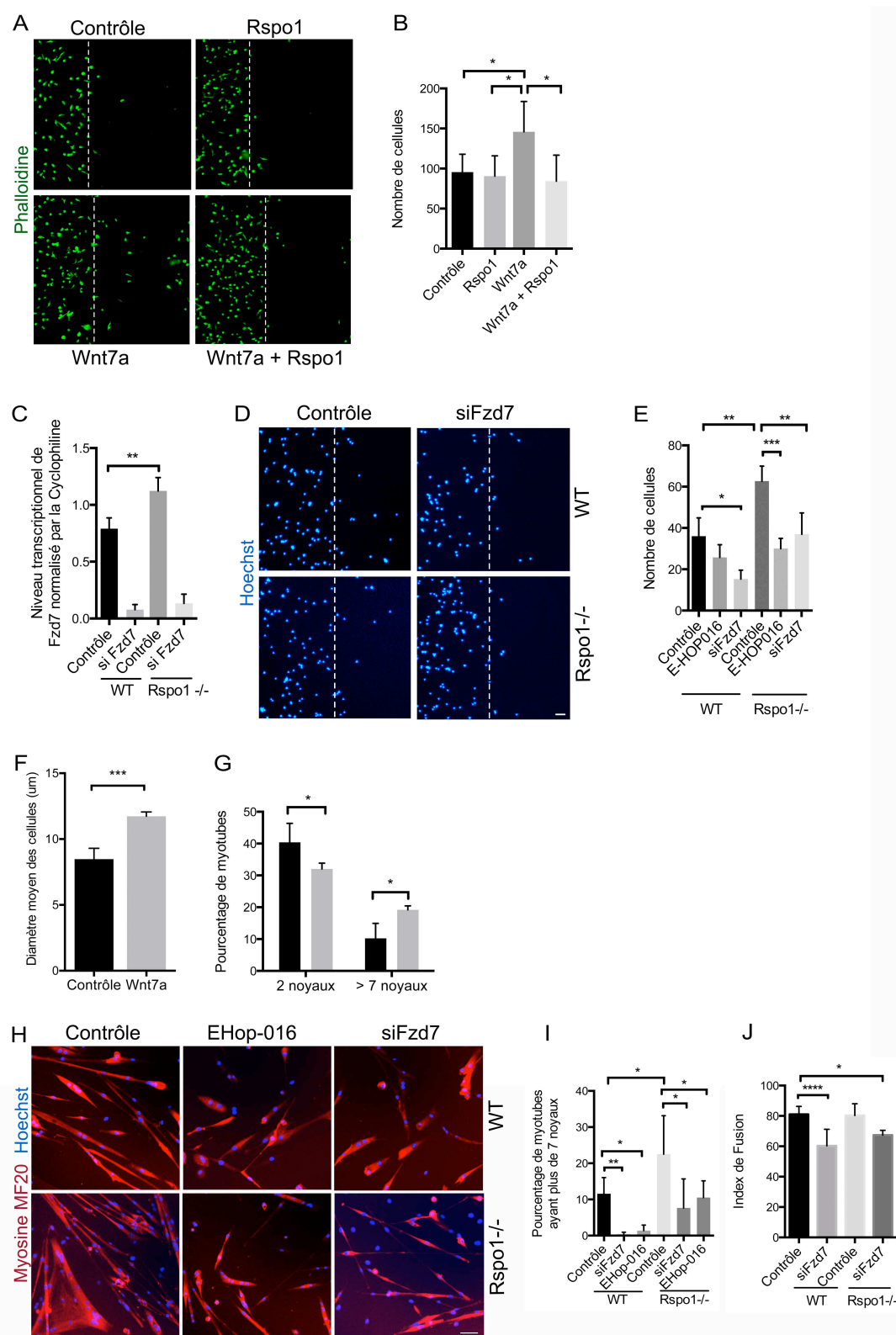


Figure 32. Une absence de R-spondin1 stimule l'activation de la voie Wnt7a/Fzd7

(A) Immunomarquage de l'Actine (Phalloïdine) sur les myoblastes contrôles ou Rspo1^{-/-} lors du Scratch Assay après traitement par la protéine recombinante Wnt7a ou R-spondin1 ou après co-traitement Wnt7a/R-spondin1. Les noyaux sont marqués par Hoechst (en bleu). Les barres blanches représentent la limite de l'espace vide.

Un traitement par Wnt7a augmente de 50% le nombre de cellules présentes dans l'espace vide. R-spondin1 inhibe l'action stimulatrice de Wnt7a sur la migration cellulaire puisque le nombre de cellules traitées par R-spondin1 ou co-traitées par R-spondin1/Wnt7a ayant migré dans l'espace vide est identique à celui calculé avec les cellules contrôles non traitées (Figure 32B).

Nous avons ensuite traité les cellules contrôles ou déficientes pour R-spondin1 avec des siARN contre Frizzled7 (Fzd7) afin d'inhiber l'activation de la voie Wnt non-canonique. L'efficacité du siARN utilisé dans cette expérience a été validée par qPCR, par quantification du niveau d'expression de Frizzled7 (Figure 32C). Dans les cellules contrôles et *Rspo1*^{-/-}, le traitement par siFzd7 diminue significativement l'expression génique de Frizzled7. De façon intéressante, R-spondin1 régule négativement l'expression de Frizzled7 (Figure 32C).

Nous avons répété l'expérience de Scratch Assay sur les cellules contrôles et *Rspo1*^{-/-} traitées par siFzd7 (Figure 32D), et avons mis en évidence qu'une inhibition de l'activation de la voie non-canonique diminue la migration des cellules dans les deux conditions. Les cellules déficientes pour R-spondin1 traitées par siFzd7 présentent le même nombre de cellules migrées dans l'espace vide que les cellules contrôles non traitées (Figure 32E). Ce résultat montre que R-spondin1 possède un rôle antagoniste à celui de Wnt7a dans le processus de migration des cellules musculaires et que le contrôle de la stimulation de la voie dans les cellules *Rspo1*^{-/-} permet de reproduire le phénotype cellulaire sauvage.

L'activité de la protéine Rac1 étant importante pour induire la migration des cellules, nous avons traitées les cellules avec un inhibiteur de Rac1 appelé EHOp-016 (Montalvo-Ortiz et al., 2012).

Figure 32 (suite). (B) Quantification du nombre de cellules dans l'espace vide après traitement par la protéine recombinante Wnt7a ou R-spondin1. (C) Niveau d'expression de Frizzled7 dans les myoblastes après traitement par siFzd7. (D) Immunomarquage de l'Actine (Phalloïdine) sur les myoblastes contrôles ou *Rspo1*^{-/-} lors du Scratch Assay après traitement par siFzd7. Les noyaux sont marqués par Hoechst (en bleu). Les barres blanches représentent la limite de l'espace vide. Barre : 50 µm. (E) Quantification du nombre de cellules contrôles ou *Rspo1*^{-/-} dans l'espace vide après traitement par siFzd7 et EHOp-016. (F) Quantification du diamètre moyen des myotubes après traitement par Wnt7a. (G) Distribution du nombre de myotubes en fonction du nombre de noyaux après un traitement par Wnt7a. (H) Immunomarquage de la protéine Myosine MF20 sur les myotubes contrôles ou *Rspo1*^{-/-} après traitement par EHOp-016 ou siFzd7. Les noyaux sont marqués par Hoechst (en bleu). Barre : 50 µm. (I) Quantification du nombre de myotubes avec 7 noyaux ou plus après traitement par EHOp-016 ou siFzd7. (J) Quantification de l'index de fusion après traitement par siFzd7.

*Les graphs représentent les moyennes avec écartypes. *: p value <0,05. **: p value <0,01 ***: p value <0,001 . ****: p value <0,0001*

Le traitement avec l'EHop-016 diminue la migration des myoblastes contrôles et $Rspo1^{-/-}$ (Figure 32E), en corrélation avec les résultats obtenus par le traitement avec les siFzd7.

Le rôle antagoniste entre R-spondin1 et Frizzled7 s'effectue via l'activité de Rac1.

Nous avons différencié les myoblastes primaires pendant 96 heures après un traitement par la protéine recombinante Wnt7a. La stimulation de la voie non-canonique dans les myoblastes contrôles par un traitement par Wnt7a induit la fusion cellulaire puisque nous avons observé une augmentation la taille des myotubes (Figure 32F) et du nombre de myotubes possédants plus de 7 noyaux mais diminue celui des myotubes avec 2 noyaux (Figure 32G).

Nous avons répété cette expérience en traitant les cellules contrôles ou $Rspo1^{-/-}$ par l'EHop-016 ou par siFzd7 (Figure 32H). Nous avons démontré qu'une inhibition de l'activation de la voie Wnt7a/Fzd7 inhibe la formation de myotubes contrôles ou déficients pour R-spondin1 comprenant plus de 7 noyaux (Figure 32I). De façon intéressante, le nombre de myotubes $Rspo1^{-/-}$ après traitement est identique à celui observé dans les cellules contrôles sans traitement. La quantification de l'index de fusion (Figure 32J) après l'inhibition de la stimulation de la voie Wnt7a/Fzd7 indique que cette voie régule positivement la fusion cellulaire lors de la myogenèse.

Nos résultats indiquent que la formation de larges myotubes $Rspo1^{-/-}$ est liée à une activation de la voie non-canonique. La protéine R-spondin1 permet donc la régulation négative de la voie Wnt/PCP lors de la migration et la fusion des cellules musculaires.

DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES

Mes recherches ont mis en évidence un rôle important pour R-spondin1 dans la régulation des voies de signalisation Wnt au cours de la régénération du muscle squelettique. Les rôles de la famille R-spondin dans divers tissus sont connus. Par exemple, R-spondin1 est considéré comme un facteur mitogène des cellules souches adultes intestinales en potentialisant la voie Wnt/ β -caténine (Kim et al., 2005). Au cours de mon étude, j'ai montré que R-spondin1 possède un nouveau rôle non-mitogène dans le tissu musculaire squelettique puisque R-spondin1 ne contrôle pas l'expansion ou la maintenance de la population des cellules souches musculaires. Cependant, j'ai démontré que R-spondin1 est nécessaire pour la myogenèse régénérative, par le contrôle de la différenciation et de la fusion des cellules souches musculaires. Le retard initial de la différenciation des cellules déficientes pour R-spondin1 est ensuite compensé par une fusion secondaire rapide et anarchique des cellules, créant de larges myotubes multinucléées.

Au cours de la régénération du muscle squelettique, de nombreuses protéines Wnt sont sécrétées et participent à la régulation de la myogenèse adulte. Un défaut d'expression de *Rspo1* cause une importante altération de l'activation de la voie Wnt/ β -caténine, mettant en évidence le rôle de potentialisateur de R-spondin sur la voie Wnt canonique. J'ai également démontré que R-spondin1 régule négativement la fusion et la migration des progéniteurs musculaires, montrant un rôle antagoniste avec la voie non-canonique Wnt7a/Fzd7.

La voie Wnt canonique étant sur-activée en présence de R-spondin1, nous suggérons que cela affecte l'activation de la voie Wnt non-canonique. Dans les cellules déficientes pour R-spondin1, la voie Wnt/ β -caténine ne peut être stimulée. Cela ne permet plus l'inhibition de la voie Wnt/Fzd7 et conduit à la régulation

positive de cette dernière. L'incorrecte régulation des voies de signalisation Wnt mène à une désorganisation de la régénération du muscle squelettique.

Les recherches effectuées lors de mon Doctorat sont regroupées dans un article, actuellement en rédaction.

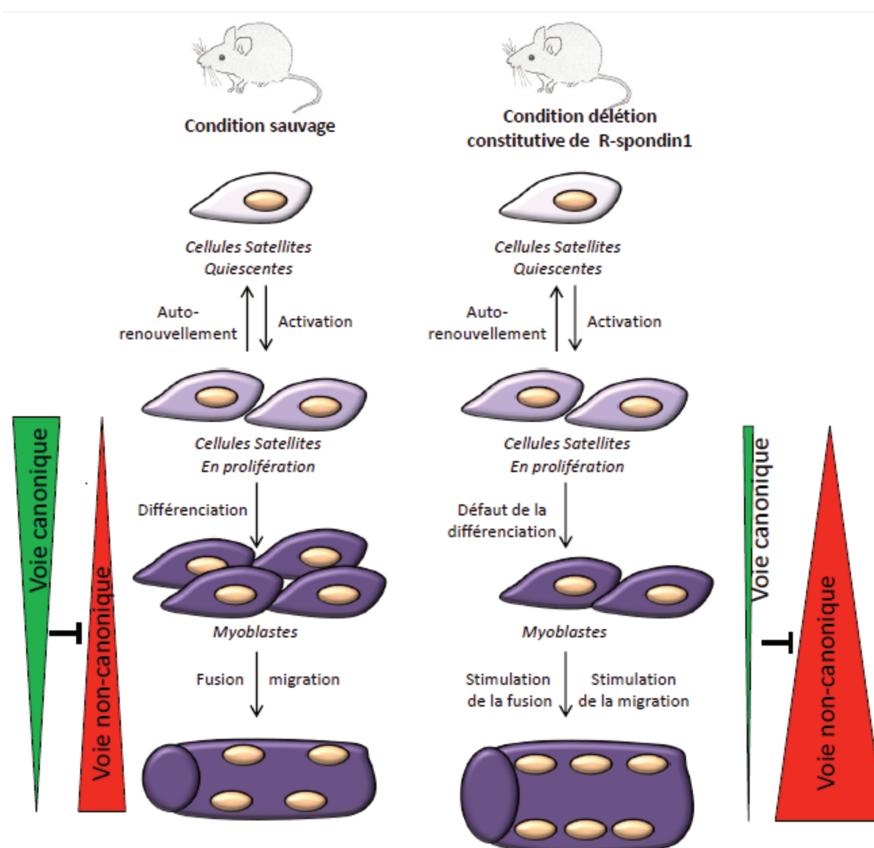


Figure 33. R-spondin1 est nécessaire pour maintenir un équilibre de l'activation entre les voies Wnt

La voie Wnt/ β -caténine n'est pas activée dans les cellules quiescentes et dans les cellules en prolifération. Dans les cellules sauvages engagées dans la voie myogénique, l'activation de la voie canonique permet l'expression de facteurs myogéniques et la différenciation terminale des cellules. La voie non-canonique induit la migration et la fusion des cellules différenciées. Dans les cellules déficientes pour R-spondin1, l'activation de la voie canonique est altérée, induisant un défaut de différenciation des précurseurs myogéniques. Le défaut d'activation de la voie Wnt/ β -caténine cause une sur-activation de la voie Wnt/PCP, stimulant la migration et la fusion cellulaire.

I. R-spondin1 pendant la myogenèse développementale

R-spondin est une famille de protéines dont les gènes sont exprimés au cours du développement embryonnaire, contribuant à la différenciation sexuelle, au développement des ongles, du placenta ou des membres distaux. Bien que le rôle de R-spondin1 n'ait pas été décrit au cours de la myogenèse développementale, il a été démontré que ce gène est exprimé dans le tube neural et le mésoderme des embryons de souris (Nam et al., 2007a), suggérant un rôle de la protéine dans la mise en place des muscles squelettiques. Nos résultats montrent qu'une déficience totale de R-spondin1 n'altère ni l'intégrité ni la structure du Tibialis Antérieur de nos souris adultes, suggérant que R-spondin1 ne possède pas un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie du tissu musculaire. Basé sur cette observation, nous pouvons émettre deux hypothèses.

La première, et la plus simple, est que R-spondin1 n'est pas nécessaire pour le développement du muscle squelettique. Si R-spondin1 possédait un rôle crucial lors de la myogenèse embryonnaire, nous aurions observé un défaut de la structure du muscle adulte.

La deuxième hypothèse propose un rôle pour l'ensemble des protéines de la famille R-spondin dans la myogenèse développementale. Plusieurs études chez le xénope (Kazanskaya et al., 2004) ou la souris (Han et al., 2011) ont montré que Rspo2 est nécessaire pour la transcription de Myf5 et l'induction de la différenciation des précurseurs myogéniques au cours de la myogenèse primaire. Il est possible que R-spondin1 ait également un rôle dans la myogenèse embryonnaire, mais que son absence soit compensée par l'expression des autres R-spondins.

Une étude précise des embryons déficients pour R-spondin1 pourrait confirmer une de nos hypothèses.

II. R-spondin1 pendant la myogenèse régénérative

II. 1) La dynamique des cellules satellites

R-spondin1 régule la prolifération cellulaire dans certains tissus. Par exemple, il a été démontré que R-spondin1 accroît la densité cellulaire par stimulation de la prolifération des cellules de l'endothélium de la cornée chez l'humain (Okumura et al., 2014). Dans ce tissu, R-spondin1 induit la prolifération cellulaire par induction de la progression des cellules dans la phase S, via l'expression de la Cycline D et la phosphorylation de la protéine p27 (Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B). Cependant, dans notre étude, les myoblastes primaires déficients pour R-spondin1 ne présentent aucun défaut de prolifération. De plus, le nombre de cellules satellites dans le Tibialis Antérieur en régénération n'est pas altéré par une absence de l'expression de R-spondin1. Selon le type cellulaire dans lequel il est exprimé, R-spondin1 agit sur différents mécanismes cellulaires. Le rôle prolifératif des R-spondins est donc tissu-dépendant.

II. 2) L'engagement dans le lignage myogénique

Dans les cellules myogéniques (C2C12 ou les myoblastes primaires), un traitement par la protéine recombinante R-spondin2 induit l'expression prématurée de Myf5 (Han et al., 2011). Nous avons émis l'hypothèse que R-spondin1 possède un rôle similaire à R-spondin2. Un défaut d'expression de Rspo1 limite l'expression de Myogénine dans les cellules satellites. Par analyse de transcriptome (Microarray), le gène MyoD a été identifié en tant que gène régulateur responsable de l'inhibition transcriptionnelle des gènes impliqués dans la différenciation des myoblastes primaires. Ces résultats démontrent que R-spondin1 participe positivement à l'expression des facteurs myogéniques. Cependant, le gène codant pour Myf5 dans les cellules déficientes pour R-spondin1 semble être surexprimé, suggérant qu'une altération de l'expression de R-spondin1 maintient les cellules dans un état de

prédiﬀérenciation où les cellules restent activées. Ainsi, R-spondin1 est nécessaire à l'initiation et l'établissement de la diﬀérenciation cellulaire au cours de la myogenèse régénérative.

II. 3) Formation de nouvelles ﬁbres musculaires

Le rôle des protéines R-spondins dans la fusion des cellules musculaires est mal établi encore à ce jour. Deux études effectuées par la même équipe de recherche, démontrent que R-spondin2 induit une augmentation de l'index de fusion et une augmentation de la taille des myotubes *in vitro* (Han et al., 2011). Dans notre étude, nous avons observé que les cellules musculaires déﬁcientes pour R-spondin1 et exprimant la Myogénine ont une meilleure capacité de fusion dans les muscles aux premiers stades de régénération. De plus, en l'absence de R-spondin1, les ﬁbres musculaires régénérées possèdent signiﬁcativement plus de noyaux centraux. Puisque les cellules musculaires diﬀérenciées et déﬁcientes pour R-spondin1 présentent une grande capacité d'invasion et de migration, nous suggérons que le phénotype de fusion observé est directement lié à la capacité migratoire des cellules.

En eﬀet, plusieurs études prouvent que la fusion des myoblastes est directement inﬂuencée par le processus de migration cellulaire. Une inhibition de l'expression du gène codant pour la protéine membranaire CD164 réduit la motilité des cellules C2C12 et le nombre de myotubes multinucléés (Bae et al., 2008). De plus, une absence du récepteur Mannose (Jansen and Pavlath, 2006) ou de MOR23 (Olfactory Receptor 23) (Griffin et al., 2009) dans les cellules musculaires limite leur vitesse de déplacement ou leur directionnalité et la formation de nouveaux myotubes. Ces études montrent une corrélation étroite entre la migration des myoblastes et la fusion cellulaire. Cependant, une étude menée sur le rôle du récepteur de Prostaglandine dans les myoblastes démontre que les myoblastes déﬁicients pour ce récepteur possèdent une meilleure motilité que les myoblastes contrôles mais présentent un défaut de fusion (Bondesen et al., 2007). Cela montre que la corrélation positive entre la migration et la fusion des cellules musculaires dépend

principalement de la protéine étudiée et de son rôle au sein de la cellules, et qu'elle n'est pas valable dans tous les modèles.

Nous pensons que les cellules *Rspo1*^{-/-} possédant une meilleure motilité vont accroître leur probabilité de rencontre et de contact avec les précurseurs myogéniques. Ainsi, la probabilité de fusion est également augmentée. Nous proposons un modèle selon lequel R-spondin1 contribue à l'inhibition de la migration cellulaire. Ainsi, le contact membranaire entre cellules est limité et influence directement le processus de fusion cellulaire. Dans ce modèle, R-spondin1 a un rôle antagoniste à celui de R-spondin2. En effet, alors que R-spondin1 régule négativement la fusion, R-spondin2 facilite le contact entre cellules et la formation de nouvelles cellules plurinucléées (Han et al., 2011). Ainsi, notre étude montre un nouveau rôle pour une des protéines de la famille R-spondin au cours de la régénération musculaire.

Dans cette étude, le processus moléculaire de migration ou de fusion n'est pas étudié. Il serait intéressant d'analyser la polymérisation de l'Actine afin d'étudier le mécanisme de migration restreint par R-spondin1. De plus, plusieurs protéines telles que la M-cadhérine, la Vimentine, la Desmine et la Nestine sont essentielles pour la fusion entre cellules. Analyser l'expression génique, la localisation ou l'interaction entre ces protéines permettrait de comprendre par quel mécanisme moléculaire R-spondin1 régule la fusion des cellules myogéniques.

III. La signalisation Wnt est régulée par R-spondin1

III. 1) Activation de la voie Wnt/β-caténine

Dans la plupart des tissus de mammifères, la famille R-spondin régule positivement l'activation de la voie Wnt canonique via la stabilisation de la β-caténine active (Li et al., 2009). *In vitro* et *in vivo* R-spondin1 accroît la stabilité de

la β -caténine active, initialement induite par les Wnt et permet l'expression des gènes cibles de la voie canonique (Kim et al., 2005). Ainsi, il a été montré que R-spondin1 est un potentialisateur de la voie canonique dans divers tissus. Les signalisations Wnt jouent un rôle majeur dans la régénération du muscle squelettique. Une absence de R-spondin1 dans les myoblastes primaires altère l'expression des gènes cibles de la voie Wnt canonique, montrant que cette protéine est importante pour la stimulation de la voie canonique. De plus, une inhibition de l'expression de Rspo1 diminue la concentration de β -caténine active nucléaire. Nos résultats obtenus dans le muscle adulte sont concordants avec ceux observés dans plusieurs tissus : R-spondin1 est un potentialisateur de la voie Wnt canonique. L'absence de R-spondin1 altérant sensiblement la différenciation myogénique des cellules satellites, nous proposons un modèle selon lequel R-spondin1 favoriserait l'expression des facteurs myogéniques via l'activation de la signalisation Wnt. La protéine R-spondin1 induit la différenciation des myoblastes en stabilisant la β -caténine et en potentialisant l'expression de MyoD et de Myogénine.

III. 2) Inhibition de la voie Wnt7a/Fzd7

L'activation de la cascade Wnt7a/Fzd7 induit la division symétrique et la migration des cellules satellites au cours de la régénération musculaire. Ces processus sont cruciaux pour maintenir la population des cellules souches (Le Grand et al., 2009) et initier la migration et la fusion des précurseurs myogéniques (Bentzinger et al., 2014). La régulation de l'activation de la voie non-canonique par la famille R-spondin n'a pas été démontrée dans les cellules musculaires. Cependant, il a été démontré que R-spondin3 active la voie Wnt non-canonique pendant le développement embryonnaire du *Xenopus* (Ohkawara et al., 2011). L'activation de cette voie par R-spondin a également été mise en évidence dans les cellules de mammifères (Shaikh et al., 2015).

Notre étude sur R-spondin1 démontre que la population de cellules souches musculaires est correctement maintenue en l'absence de cette protéine. Cela

suggère que R-spondin1 n'influence, ni négativement ni positivement, l'activation de la voie Wnt/PCP lors de la division cellulaire des cellules satellites.

Cependant, nous avons observé que R-spondin1 est nécessaire pour réguler négativement la migration des cellules musculaires. En empêchant l'activation de la voie Wnt7a/Fzd7 dans les cellules déficientes pour R-spondin1, nous avons rétabli la fonction migratoire correcte des cellules. Nous avons alors mis en évidence que R-spondin1 régule négativement la stimulation de la voie non-canonique. La fonction de régulation de la voie non-canonique par R-spondin reste encore à être explorée au niveau moléculaire. Cependant, au niveau cellulaire, nous avons démontré que R-spondin1 peut inhiber l'activation de la voie Wnt7a/Fzd7 au cours de la régénération musculaire. Jusqu'à ce jour, ce rôle d'inhibition de R-spondin1 sur la voie non-canonique n'a pas été étudié, quelque soit le tissu ou l'espèce animale.

III. 3) L'interaction des voies Wnt

Les voies de signalisation Wnt canoniques et non-canoniques induisent des processus cellulaires et moléculaires bien distincts mais ont en commun plusieurs familles de protéines nécessaires à leur activation telles que les Wnt, les R-spondins, les Frizzled et les Lgr. Ainsi, l'activation exclusive et spécifique d'une voie Wnt est possible par l'interaction sélective entre les ligands et les récepteurs. Un antagonisme entre les voies a été mis en évidence dans divers tissus, suggérant une régulation fine de l'activation des voies. Par exemple, une injection de Wnt5a (permettant l'activation de la voie non-canonique) dans l'embryon du *Xenopus* antagonise les effets induits par une injection de Wnt8 (activant la voie canonique), montrant que la voie non-canonique possède un mécanisme de contrôle sur l'activation de la voie canonique (Torres et al., 1996). Plusieurs études ont prouvé que cette régulation peut être induite par la dégradation de la β -caténine (Topol et al., 2003) ou par l'inhibition du recrutement des partenaires nucléaires de la β -caténine (Lee et al., 2010).

Dans cette étude, nous avons mis en évidence un rôle antagoniste entre les voies Wnt dans les cellules musculaires, nécessaire pour la régénération du muscle squelettique adulte. Dans les cellules déficientes pour R-spondin1, le défaut d'activation de la voie canonique permettrait de sur-activer la voie non-canonique, montrant que R-spondin1 contribue à la régulation de l'activation des voies Wnt. Nous pensons que l'antagonisme entre ces deux voies Wnt s'effectue dans le cytoplasme. Nous proposons une hypothèse selon laquelle la protéine Dishevelled2 serait nécessaire pour l'activation des deux voies, mais serait totalement recrutée lors de la stimulation de la voie Wnt/ β -caténine dans les cellules musculaires en différenciation. Ainsi, cette protéine ne serait plus disponible pour l'activation de la voie Wnt7/Fzd7. Enfin, lorsque l'activation de la voie canonique est réduite, la protéine Dishevelled2 serait disponible pour la voie non-canonique. Il est également possible que l'antagonisme s'effectue au niveau de la membrane, par une neutralisation de récepteurs ou de ligands.

IV. Expression de R-spondin1

Dans un grand nombre de types cellulaires, les ligands R-spondins et Wnt partagent la même régulation temporelle de leur expression (Chadi et al., 2009). Plusieurs études suggèrent que ces deux familles de protéines contrôlent réciproquement leur expression génique puisqu'un défaut d'expression d'un des gènes d'une famille induit une répression génique de l'autre famille (Yamada et al., 2009 et Kamata et al., 2004). Cela montre qu'il existe un mode de régulation positif entre les R-spondins et les Wnt. Aucune publication ne démontre un tel mécanisme de régulation dans les cellules musculaires. Pendant mon Doctorat, nous avons eu pour objectif d'étudier l'expression génique de R-spondin1 dans les cellules primaires. Cependant, nos méthodes de quantification utilisées (qPCR) n'ont pu mettre en évidence l'expression de R-spondin1, par manque de sensibilité de l'expérience. De plus, R-spondin1 étant une protéine sécrétée, la détermination de sa localisation par Immunofluorescence est très complexe. Nous pensons, cependant, que R-spondin1 est exprimé dans les cellules satellites. Il a été mis en

évidence qu'une sur-expression de Pax7 dans les myoblastes primaires induit une forte expression génique de R-spondin1 (Soleimani et al., 2012), montrant que R-spondin1 est exprimé dans les cellules satellites. Les protéines R-spondin1 et Wnt3a sont nécessaires pour l'initiation de la différenciation myogénique des myoblastes. Nous pouvons émettre l'hypothèse que R-spondin1 et Wnt3a contrôlent réciproquement leur expression et qu'ils sont fortement exprimés simultanément dans les myoblastes activés en prédifférenciation. Une étude prouve que R-spondin1 est exprimé dans les cellules musculaires en différenciation (Han et al., 2011). Analyser l'expression de R-spondin1 au cours de la régénération musculaire est difficile car l'expression transcriptionnelle de Rspo1 semble être régulée assez finement. Cependant, par étude des phénotypes causés par une délétion de Rspo1, nous pouvons conclure que R-spondin1 est nécessaire dès l'étape de l'activation des cellules souches musculaires.

V. R-spondin1 agit-il sur les autres cellules résidentes dans le muscle squelettique ?

L'interaction des cellules satellites avec d'autres types cellulaires résidents dans le muscle squelettique favorise la régénération musculaire. Les cellules immunitaires, endothéliales, interstitielles ou nerveuses sont essentielles pour la réparation du muscle squelettique. En effet, les cellules immunitaires sont les premières cellules recrutées sur le site de la lésion. Elles participent à l'activation des cellules satellites et les protègent de l'apoptose (Sonnet et al., 2006). Les cellules interstitielles comprennent notamment les FAPs (Fibro/adipogenic progenitors) et les PICs (PW1+ Pax7-). Ces cellules favorisent l'engagement myogénique des cellules satellites, stimulent la formation de nouvelles fibres musculaires et forment la matrice extracellulaire par sécrétion de Collagène, de Laminine et de Fibronectine (Uezumi et al., 2010). Les cellules endothéliales et nerveuses stimulent l'activation et la prolifération des cellules satellites (Arsic et al., 2004).

En plus de son action sur les cellules satellites, la signalisation Wnt influence le développement du tissu conjonctif pendant la régénération musculaire. Une sur-activation de la voie canonique induit un dépôt fibrotique autour des myofibres (von Maltzahn et al., 2012a).

Il est ainsi possible que l'absence de R-spondin1 dans les cellules résidentes du muscle squelettique en régénération altère leur fonction vis-à-vis des cellules souches musculaires. Basé sur ces éléments, est-ce R-spondin1 contrôle les fonctions des cellules environnantes du muscle squelettique ?

De futurs projets de recherche pourront donc s'intéresser au rôle de R-spondin1 dans les différents types cellulaires permettant la régénération du muscle. Plus particulièrement, une altération de la fonction des FAPs affecte le métabolisme musculaire et la régénération du tissu (Farup et al., 2015). Ces cellules peuvent se différencier en adipocytes ou en fibroblastes et sécréter du Collagène, de la Laminine et de la Fibronectine dans le domaine extracellulaire. Des études préliminaires, menées pendant mon Doctorat, ne montrent pas une altération majeure de la prolifération des FAPs en l'absence de R-spondin1. Par coloration spécifique des cryosections de muscles adultes déficients pour R-spondin1, nous n'avons pas observé de dépôts lipidiques mais des structures aberrantes ont été observées dans le tissu conjonctif des muscles régénérés déficients pour R-spondin1. Toutefois, ces résultats restent préliminaires et des expériences plus poussées sont nécessaires pour confirmer que R-spondin1 a un impact dans la différenciation des FAPs. Afin d'étudier précisément le rôle de R-spondin1 dans les cellules non-myogéniques résidentes dans le muscle squelettique, il sera nécessaire d'analyser la régénération musculaire de modèles murins d'invalidation conditionnelle pour R-spondin1.

VI. Thérapie

L'utilisation de protéines R-spondin comme cible thérapeutique reste une possibilité nouvelle pour traiter les diverses pathologies. Le rôle potentiel thérapeutique de R-spondin1 a été étudié contre l'inflammation chronique du système digestif (Zhao et al., 2007) ou contre l'arthrose (Krönke et al., 2010). Cette protéine possède-t-elle également un rôle thérapeutique dans le muscle squelettique ?

Il est intéressant de savoir si une sur-expression de R-spondin1 permet d'améliorer la régénération musculaire. Nous avons injecté la protéine recombinante R-spondin1 dans un muscle en régénération d'une souris sauvage (données non montrées). Nous n'avons observé aucune altération de la dynamique ou de la différenciation cellulaire et de la morphologie musculaire, comparé au muscle contrôle. Nos résultats montrent qu'une injection de R-spondin1 dans le muscle n'améliore pas sa régénération. Cependant, nous ne pouvons pas affirmer qu'une plus forte dose de R-spondin1 n'améliorerait pas la réparation du muscle. Il est possible que la protéine injectée ait été dégradée rapidement avant qu'elle agisse sur les cellules satellites, que son effet soit également dose-dépendant ou que la protéine agisse pendant un laps de temps réduit et que nous l'ayons injecté dans le muscle en dehors de cette période. L'injection de protéines recombinantes n'est pas la meilleure méthode pour analyser le potentiel effet thérapeutique de R-spondin1 mais elle est la plus rapide et la moins coûteuse. Afin que nous puissions conclure à un effet thérapeutique de R-spondin1 au cours de la régénération musculaire, il sera nécessaire de procéder à une expérience d'électroporation.

Nous souhaitons étudier l'effet d'une délétion de *Rspo1* dans un muscle de souris atteintes de myopathie. Pour cela, nous avons croisé les souris *mdx*, un modèle murin de Dystrophie Musculaire de Duchenne (Ohlendieck and Campbell, 1991), avec nos souris déficientes pour R-spondin1. Dans le modèle *mdx*, le gène codant pour la Dystrophine possède une mutation non-sens, inhibant alors la transcription. Les manifestations phénotypiques de l'absence de Dystrophine chez

la souris restent moins sévères que celles observées chez l'humain. L'étude des muscles des souris *mdx/Rspo1^{-/-}* est actuellement en cours. Les muscles squelettiques des souris *mdx* âgées sont assujettis à une forte fibrose (Pastoret and Sebillé, 1993). Une étude démontre qu'une injection de Wnt3a dans un muscle sain crée un dépôt de collagène semblable à celui observé dans un muscle dystrophique non injecté, et qu'une inhibition de la voie canonique dans les muscles dystrophiques réduit la fibrose (Trensz et al., 2010).. La protéine R-spondin1 stimulant la voie Wnt/ β -caténine dans le muscle squelettique, une inhibition de l'expression de *Rspo1* permettrait d'inhiber l'activation de la voie canonique et de limiter le dépôt de collagène dans les muscles malades. Nos prochaines études concernant le rôle de R-spondin1 dans les souris *mdx* pourraient mettre en évidence un potentiel thérapeutique de la protéine contre la Dystrophie Musculaire de Duchenne, par une thérapie génique.

ANNEXES

Présentations aux Congrès

Mai 2016 (Dourdan – France) : communication orale et poster au Forum de l'Ecole Doctorale Bio Sorbone Paris Cité

Juin 2015 (Lucca – Italie) : poster au Congrès *Myogenesis* organisé par Gordon Research Conferences et Gordon Research Seminars

Octobre 2014 (Broom – Australie) : poster au Congrès *Wnt signalling : Stem cells, development and disease* organisé par EMBO

Novembre 2013 (Montpellier – France) : poster aux *Journées Annuelles de la Société Française de Myologie*

Liste des publications

R-spondin1 regulates myoblast fusion through control of antagonist wnt signaling pathways **Lacour F**, Vezin E, Bentzinger F, Sincennes MC, Mitchell R, Patel K, Rudnicki M, Chaboissier MC, Chassot AA & Le Grand F.
(en écriture pour Cell Press)

APC is required for muscle stem cell proliferation and skeletal muscle tissue repair
Parisi A, **Lacour F**, Giordani L, Colnot S, Maire P & Le Grand F.
J Cell Biol. (2015)

Floriane Lacour, Elsa Vezin, Florian Bentzinger, Marie-Claude Sincennes, Robert David Mitchell, Ketan Patel, Michael Rudnicki, Marie-Christine Chaboissier, Anne-Amandine Chassot & Fabien Le Grand
Centre de Recherche en Myologie de la Pitié Salpêtrière - 105, boulevard de l'Hôpital - 75013 Paris - France

Introduction

Adult mammalian skeletal muscles have the remarkable ability to repair after injury. The muscle stem cells, called **satellite cells**, are essential for muscle regeneration. After an injury, they proliferate and give rise to transient amplifying myoblasts that will fuse to form new myofibers.

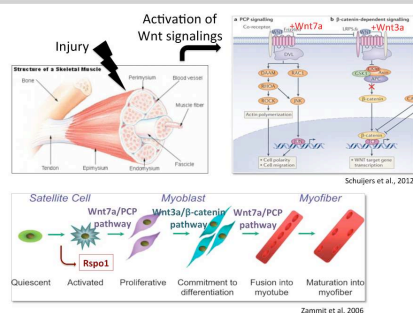
Muscle regeneration depends on various cellular and molecular responses, such as activation of **Wnt signaling pathways** in muscle satellite cells. Wnt binding to the specific receptor Frizzled can activate different signaling pathways.

The canonical Wnt/ β -catenin pathway is required for muscle progenitor cell differentiation. In the presence of Wnt ligands (such as Wnt3a in skeletal muscle), β -catenin is not phosphorylated anymore (active β -catenin) and translocates to the nucleus where the protein binds TCF/LEF transcription factors leading to the activation of Wnt target genes.

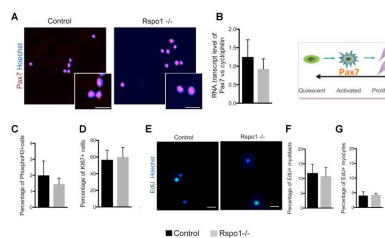
The **non-canonical Wnt/PCP** signaling pathway induces the symmetric expansion of satellite stem cells by activating the anabolic Akt growth pathway in myofibers. This pathway includes the activation of some kinases such as Rac1 or Rock.

R-spondin (Rspo) proteins are able to potentiate the Wnt signaling pathways in **stem cells** of many different tissues such as

Given that R-spondin1 (*Rspo1*) transcript expression is up-regulated by Pax7, a marker of satellite cells we explored the hypothesis that *Rspo1* plays a role during skeletal muscle regeneration.



1. R-spondin1 does not influence primary myoblast proliferation



Rspo1-null cells proliferate properly

(A) Immunolocalization of Pax7 proteins in control and *Rispol1-null* myoblasts. Nuclei are stained with Hoechst (blue). Bars: 30 μ m.

(B) Gene expression of Pax7 in myoblasts by qPCR, showing that a depletion of *Rispol1* does not change Pax7 gene expression.

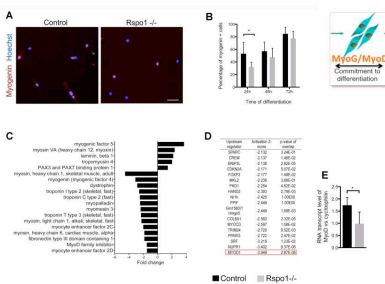
(C) Quantification of the percentage of cells engaged in mitotic phase, by Phospho-Histone H3 staining.

(D) Quantification of the percentage of proliferating cells, by Ki67 staining, showing no differences of cell number engaged in G1, S, G2 and M phases.

(E) Immunostaining of EdU incorporation in control and *Rispol1*-deficient myoblasts after 1h EdU treatment. Bars: 20 μ m.

(F) Quantification of the number of proliferating cells and (G) differentiating cells with EdU incorporation. Error bars correspond to standard deviation. Inset panels show a 2.5 $\times$ enlargement.

2. R-spondin1 controls muscle cell differentiation



Rspo1-null cells have a differentiative

(A) Immunolocalization of Myogenin proteins in control and in *Rspo1*-null myocytes. Nuclei are stained with Hoechst [blue]. Bars: 50 μ m.

(B) Quantification of the Myogenin-positive cells depending on the time differentiation.

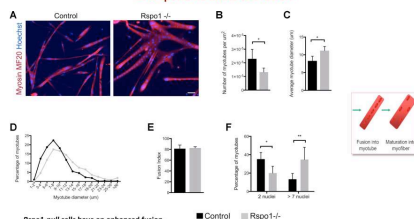
(C) List of genes involved in muscle development and regulated by *Rspo1*, depending on their fold change in *Rspo1*-null myocytes, by microarray.

(D) Upstream regulators shown by microarray in *Rspo1*-null myocytes.

(E) Gene expression of MyoD by qPCR in myocytes, showing that a *Rspo1* depletion alters MyoD gene expression.

Error bars indicate standard deviation. *: p value <0.05

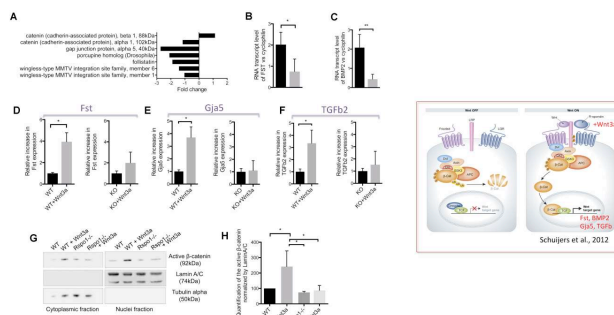
3. R-spondin1 limits cell fusion



***Rspo1*-null cells have an enhanced fusion.**

(A) Immunolocalization of Myosin MF20 proteins in control and Rspo1^{-/-} myotubes at 4 days of differentiation. Nuclei are stained with Hoechst. Bars = 50 μ m.
(B) Quantification of the number of myotubes per surface.
(C) Mean diameter of myotubes showing that Rspo1^{-/-} nuclei myotubes are 30% bigger than control ones.
(D) Distribution of the percentage of myotubes depending on their diameter size.
(E) Quantification of the number of fused nuclei normalized by the total number of cells.
(F) Quantification of nuclei per myotubes showing a decrease in the number of Rspo1^{-/-} myotubes with 2 nuclei and an increase in number of Rspo1^{-/-} myotubes with a high number of nuclei.
Error bars indicate standard deviation. * p value < 0.05. ** p value < 0.01.

4. R-spondin1 acts through the Wnt/ β -catenin pathway



Rspo1-null cells have an impaired activation of the Wnt/ β -catenin pathway

(A) List of regulated genes involved in Wnt pathway in Rspo1 mutant myocytes, by microarray.

(B) Follistatin gene expression in differentiated cells by qPCR, showing an alteration of Follistatin gene expression in Rspo1 mutant cells.

(C) BMP2 gene expression in proliferating cells by qPCR, showing a loss of Rspo1 alters BMP2 gene expression.

(D) Relative increase of Follistatin expression calculated by qPCR in WT cells or in Rspo1-null cells after a 24h-Wnt3a-treatment.

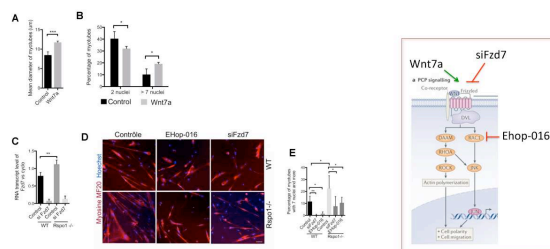
(E) Relative increase of Gja5 expression calculated by qPCR in WT cells or in Rspo1-null cells after a 24h-Wnt3a-treatment.

(F) Relative increase of Tgfb2 expression calculated by qPCR in WT myoblasts or in Rspo1-null myoblasts after a 24h-Wnt3a-treatment.

(G) Western blot and quantification (H) of the active β -catenin showing a decrease in β -catenin protein level in nuclei on Rspo1-null mutant proliferating primary myoblasts treated with Wnt3a recombinant protein.

Ercc.hvns.inf@recherche.fredon.fr, p.vallier@univ-lyon1.fr, a.vallier@univ-lyon1.fr

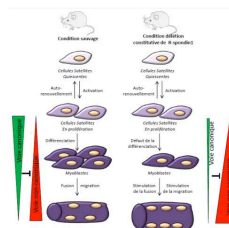
5. R-spondin1 down-regulates the Wnt/PCP pathway



A depletion of Rspo1 potentiates the Wnt/PCP signaling

(A) Mean diameter size of control and Wnt7a-treated cells, after 4 days of differentiation.
(B) Quantification of the number of nuclei per myotubes showing a decrease proportion of Wnt7a-treated-myotubes with 2 nuclei and an increase number of Wnt7a-treated-myotubes with a high number of nuclei
(C) Gene expression of Fzd7 in myoblasts by qPCR, showing that a depletion of Rspo1 in cells increases Fzd7 gene expression.
(D) Immunostaining of myotubes M20 in WT and Rspo1. Cells were treated with Wnt7aP2C signaling inhibitors. Nuclei are stained with Hoechst. Bars : 50 μ m.
Quantification of the number of nuclei per myotubes with more than 7 nuclei showing an increase number of myotubes with a high number of nuclei upon inhibitor treatment. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. *ns* = no significant difference. *ns* = no significant difference.

Conclusion



R-spondin1 increases differentiation but limits fusion kinetics. As with other tissue-specific stem cells, such as hair follicle or intestinal crypt stem cells, R-spondin1 seems to potentiate canonical Wnt/ β -catenin pathway. On a other way, R-spondin1 regulates the Wnt/PCP pathway.

We propose a model in which the canonical pathway controls the activation of the non-canonical pathway. In absence of R-spondin1, the canonical pathway can not be activated, and the non-canonical signaling is over-activated. A deregulation of the Wnt signalings lead to an impaired skeletal muscle regeneration.

Our studies suggest that R-spondin1 plays a major role during the skeletal muscle regeneration through the regulation of Wnt signalings

Congrès *Myogenesis* organisé par Gordon Research Conferences et Gordon Research Seminars



R-spondin1 regulates muscle stem cell fusion and tissue hyperplasia

Floriane Lacour et Fabien Le Grand
Centre de Recherche en Myologie de la Pitié Salpêtrière U974 / UMR9574 / UPMC / FRE3617, PARIS



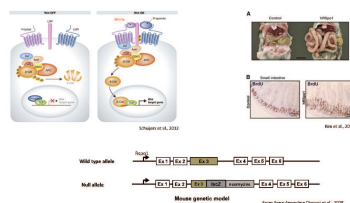
Adult mammalian skeletal muscles have the remarkable ability to repair after injury. The muscle stem cells, called satellite cells, are essential for muscle regeneration. After an injury, they proliferate and give rise to transient amplifying myoblasts that will fuse to form new myofibers. Newly formed myofibers will then hypertrophy and the tissue is fully reconstructed at 21 days post injury.

Muscle regeneration depends on various cellular and molecular responses, such as activation of Wnt signaling pathways in muscle satellite cells. Wnt binding to the specific receptor Frizzled can activate different signaling pathways. The canonical Wnt/β-catenin pathway is the most understood. In the presence of Wnt ligands (such as Wnt3a in skeletal muscle), β-catenin is not phosphorylated anymore (active β-catenin) and translocates to the nucleus where the protein binds TCF/LEF transcription factors leading to the activation of Wnt target genes.

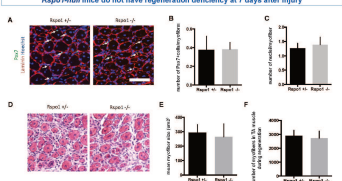
R-spondin (Rspo) proteins are able to potentiate the Wnt signaling pathways in stem cells of many different tissues such as intestinal crypt stem cells and hair follicle stem cells. At the bottom of the intestinal crypts, Rspo1 can induce hyperproliferation of stem cells by increasing the β-catenin signaling.

Given that R-spondin1 (Rspo1) transcript expression is up-regulated by Pax7, a marker of satellite cells, we explored the hypothesis that Rspo1 plays a role during skeletal muscle regeneration.

We injured the Tibialis Anterior (TA) muscle of Rspo1 null mice and littermate controls by cardiotoxin injection to induce regeneration. We then analyzed muscle regeneration at different time points following injury. We also isolated primary myoblasts from Rspo1 null mice in order to study cell fusion in vitro.



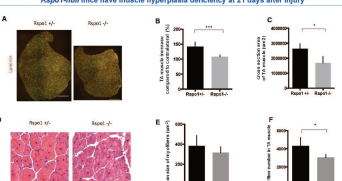
Rspo1 null mice do not have regeneration deficiency at 7 days after injury



Rspo1 deficiency does not impair myofiber regeneration 7 days after injury

- Immunohistochemistry (IHC) of control (control) and Rspo1 null (Rspo1^{-/-}) TA muscle. Arrows: Rspo1 null muscle, Rspo1+/+ muscle.
- Quantification of the number of Pax7 positive cells (arrow) in different number of satellite cells per myofiber.
- Quantification of the number of Pax7 positive cells per myofiber (arrow) in Rspo1 null muscle.
- Immunohistochemistry (IHC) of control (control) and Rspo1 null (Rspo1^{-/-}) TA muscle. Arrows: Rspo1 null muscle, Rspo1+/+ muscle.
- Quantification of the number of Pax7 positive cells (arrow) in different number of satellite cells per myofiber.
- Quantification of the number of Pax7 positive cells per myofiber (arrow) in Rspo1 null muscle.
- Quantification of the number of Pax7 positive cells per myofiber (arrow) in Rspo1 null muscle.
- Quantification of the number of Pax7 positive cells per myofiber (arrow) in Rspo1 null muscle.

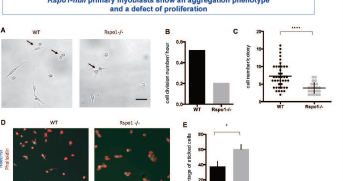
Rspo1 null mice have muscle hyperplasia deficiency at 21 days after injury



Rspo1 deficiency leads to muscle hyperplasia 21 days after injury, with a decrease of the total number of myofiber in TA muscle

- Immunohistochemistry (IHC) of control (control) and Rspo1 null (Rspo1^{-/-}) TA muscle. Arrows: Rspo1 null muscle, Rspo1+/+ muscle.
- Quantification of the number of Pax7 positive cells (arrow) in different number of satellite cells per myofiber.
- Quantification of the number of Pax7 positive cells per myofiber (arrow) in Rspo1 null muscle.
- Immunohistochemistry (IHC) of control (control) and Rspo1 null (Rspo1^{-/-}) TA muscle. Arrows: Rspo1 null muscle, Rspo1+/+ muscle.
- Quantification of the number of Pax7 positive cells (arrow) in different number of satellite cells per myofiber.
- Quantification of the number of Pax7 positive cells per myofiber (arrow) in Rspo1 null muscle.
- Quantification of the number of Pax7 positive cells per myofiber (arrow) in Rspo1 null muscle.
- Quantification of the number of Pax7 positive cells per myofiber (arrow) in Rspo1 null muscle.

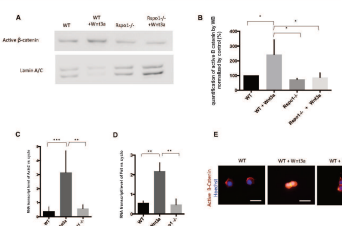
Rspo1 null primary myoblasts show an aggregation phenotype and a defect of proliferation



Rspo1 null myoblasts have proliferation deficiency and stay in cluster

- Immunohistochemistry (IHC) of control (control) and Rspo1 null (Rspo1^{-/-}) TA muscle. Arrows: Rspo1 null muscle, Rspo1+/+ muscle.
- Quantification of the number of Pax7 positive cells (arrow) in different number of satellite cells per myofiber.
- Quantification of the number of Pax7 positive cells per myofiber (arrow) in Rspo1 null muscle.
- Immunohistochemistry (IHC) of control (control) and Rspo1 null (Rspo1^{-/-}) TA muscle. Arrows: Rspo1 null muscle, Rspo1+/+ muscle.
- Quantification of the number of Pax7 positive cells (arrow) in different number of satellite cells per myofiber.
- Quantification of the number of Pax7 positive cells per myofiber (arrow) in Rspo1 null muscle.
- Quantification of the number of Pax7 positive cells per myofiber (arrow) in Rspo1 null muscle.
- Quantification of the number of Pax7 positive cells per myofiber (arrow) in Rspo1 null muscle.

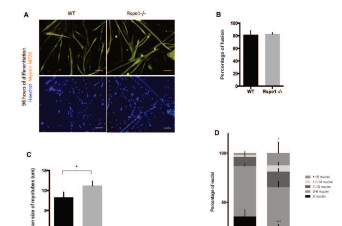
Rspo1 acts through Wnt/β-catenin pathway in vivo



A depletion of Rspo1 alters the Wnt/β-catenin pathway activation in myoblasts and myocytes

- Western blot of myoblasts and myocytes (AEC) treated with or without a 24h-treatment of Wnt3a (control) or Rspo1 (Rspo1^{-/-}).
- Quantification of Western blot showing a significant decrease of the β-catenin level in Rspo1 null muscle. The β-catenin is not phosphorylated in Rspo1 null muscle after 24h-treatment of Wnt3a.
- Quantification of Western blot showing a significant decrease of the β-catenin level in Rspo1 null muscle. The β-catenin is not phosphorylated in Rspo1 null muscle after 24h-treatment of Wnt3a.
- Quantification of Western blot showing a significant decrease of the β-catenin level in Rspo1 null muscle. The β-catenin is not phosphorylated in Rspo1 null muscle after 24h-treatment of Wnt3a.
- Quantification of Western blot showing a significant decrease of the β-catenin level in Rspo1 null muscle. The β-catenin is not phosphorylated in Rspo1 null muscle after 24h-treatment of Wnt3a.
- Quantification of Western blot showing a significant decrease of the β-catenin level in Rspo1 null muscle. The β-catenin is not phosphorylated in Rspo1 null muscle after 24h-treatment of Wnt3a.
- Quantification of Western blot showing a significant decrease of the β-catenin level in Rspo1 null muscle. The β-catenin is not phosphorylated in Rspo1 null muscle after 24h-treatment of Wnt3a.
- Quantification of Western blot showing a significant decrease of the β-catenin level in Rspo1 null muscle. The β-catenin is not phosphorylated in Rspo1 null muscle after 24h-treatment of Wnt3a.

Rspo1 null differentiated cells have enhanced fusion



Rspo1 null myoblasts are bigger and have more nuclei than WT ones

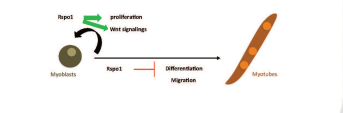
- Immunohistochemistry (IHC) of control (control) and Rspo1 null (Rspo1^{-/-}) TA muscle. Arrows: Rspo1 null muscle, Rspo1+/+ muscle.
- Quantification of the number of Pax7 positive cells (arrow) in different number of satellite cells per myofiber.
- Quantification of the number of Pax7 positive cells per myofiber (arrow) in Rspo1 null muscle.
- Immunohistochemistry (IHC) of control (control) and Rspo1 null (Rspo1^{-/-}) TA muscle. Arrows: Rspo1 null muscle, Rspo1+/+ muscle.
- Quantification of the number of Pax7 positive cells (arrow) in different number of satellite cells per myofiber.
- Quantification of the number of Pax7 positive cells per myofiber (arrow) in Rspo1 null muscle.
- Quantification of the number of Pax7 positive cells per myofiber (arrow) in Rspo1 null muscle.
- Quantification of the number of Pax7 positive cells per myofiber (arrow) in Rspo1 null muscle.

Conclusion

In vivo, Rspo1 increases the number of myofibers during regeneration, as a depletion of Rspo1 leads to a skeletal muscle hyperplasia after injury.

In vitro, Rspo1 contributes to an efficient cell cycle and limits adhesion/communication between cells. As with other tissue-specific stem cells, such as hair follicle or intestinal crypt stem cells, Rspo1 seems to potentiate canonical Wnt/β-catenin pathway.

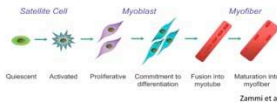
Our studies suggest that R-spondin1 plays a major role during the skeletal muscle regeneration, by affecting fusion, and has effects on tissue hyperplasia.



A non-Wnt role for R-spondin1 in skeletal muscle: implication for myogenic fusion

Floriane Lacour and Fabien Le Grand
Institut Cochin, INSERM U1016, CNRS UMR8014, Dept. Genetics and Development, PARIS

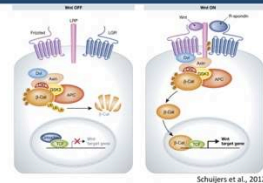
Adult mammalian skeletal muscles have the remarkable ability to repair after injury. The muscle stem cells, called satellite cells, are essential for muscle regeneration. After an injury, they proliferate and give rise to transient amplifying myoblasts that will fuse to form new myofibers. Newly formed myofibers will then hypertrophy and the tissue is fully reconstructed at 21 days post injury.



Zamini et al. 2006

Muscle regeneration depends on various cellular and molecular responses, such as activation of Wnt signaling pathways in muscle satellite cells.

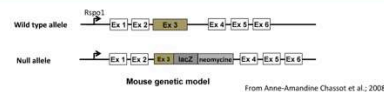
R-spondin (Rspo) proteins are able to potentiate the Wnt signaling pathways in stem cells of many different tissues such as intestinal crypt stem cells and hair follicle stem cells. At the bottom of the intestinal crypts, Rspo1 can induce hyperproliferation of stem cells by increasing the β -catenin signaling.



Schuijers et al., 2012

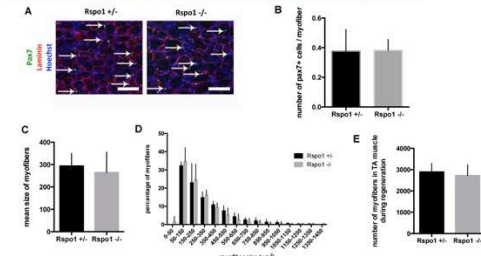
Given that R-spondin1 (Rspo1) transcript expression is up-regulated by Pax7, a marker of satellite cells, we explored the hypothesis that Rspo1 plays a role during skeletal muscle regeneration.

We injured the Tibialis Anterior (TA) muscle of *Rspo1*-null mice and littermate controls by cardiotoxin injection to induce regeneration. We then analyzed muscle regeneration at different time points following injury. We also isolated primary myoblasts from *Rspo1*-null mice in order to study cell fusion in vitro.



From Anne-Amandine Chassot et al., 2008

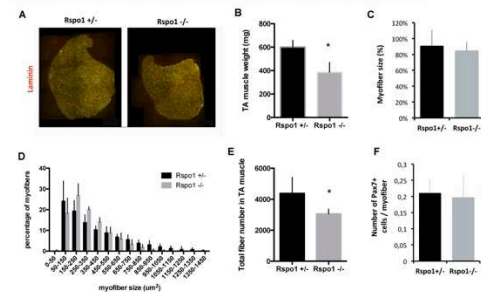
1. *Rspo1*-null mice do not have regeneration deficiency at 7 days after injury



Rspo1 deficiency does not impair myofiber regeneration 7 days post-injury

A. Immunohistochemistry of Pax7 and laminin proteins in injured *Rspo1* heterozygous (*Rspo1*^{+/-}) and homozygous (*Rspo1*^{-/-}) TA muscles. Arrows indicate satellite cells. Nuclei are stained with Hoechst (blue). Scale bars: 50 μ m.
B. Quantification of the number of Pax7-positive cells showing no difference of number of satellite cells per myofiber.
C. Myofiber size quantification in whole TA muscles showing no difference of myofiber size in homozygous mice.
D. Cross-section area distribution of the percentage of myofibers depending on their size.
E. Total number of myofibers in whole TA muscles showing no decrease in homozygous mice.
N=5 mice. Error bars correspond to standard deviation.

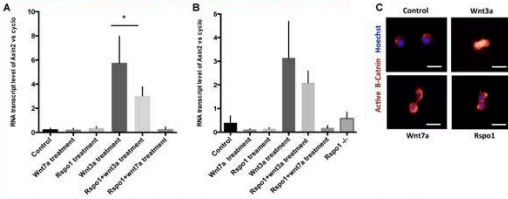
2. *Rspo1*-null mice have muscle hyperplasia deficiency at 21 days after injury



Rspo1 deficiency leads to muscle hyperplasia 21 days post-injury, with a decrease of the total number of myofiber in TA muscles.

A. Immunohistochemistry of Pax7 and laminin proteins in regenerated *Rspo1* heterozygous (*Rspo1*^{+/-}) or homozygous (*Rspo1*^{-/-}) TA muscles.
B. Quantification of TA muscle weights, showing a decrease of the injured muscle weight in homozygous mice.
C. Myofiber size quantification in whole TA muscles showing no difference between heterozygous and homozygous.
D. Cross-section area distribution of the percentage of myofibers depending on their size.
E. Total number of myofibers in whole TA muscles showing a decrease in homozygous mice.
F. Quantification of the Pax7-positive cells showing no difference of the number of satellite cells per myofiber.
N=4 mice. *p value < 0.05. Error bars correspond to standard deviation.

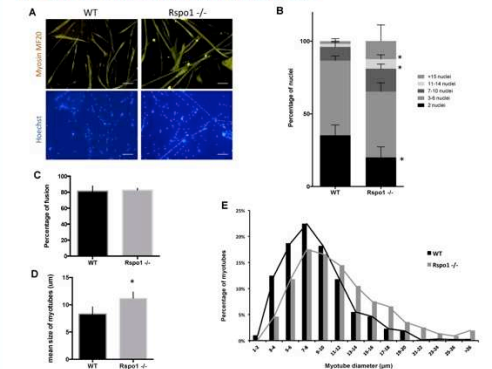
3. *Rspo1* does not act through Wnt β -catenin pathway in vitro



Rspo1 does not activate Wnt β -catenin pathway in myoblasts or myocytes. In myoblasts, a *Rspo1*/Wnt3a co-treatment alters the activation of the pathway.

A. Gene expression of *Ank2*, a target gene of Wnt β -catenin pathway, by qPCR after 24h-treatment of recombinant proteins in myoblasts.
B. Gene expression of *Ank2* by qPCR after 24h-treatment of recombinant proteins in myocytes or in *Rspo1*^{-/-} cells.
C. Immunohistochemistry of active β -catenin which indicates the activation of the canonical pathway after Wnt3a, *Rspo1* and Wnt7a 24h-treatment on primary. Nuclei are stained with Hoechst (blue).
N=3-5. *p value < 0.05. Error bars correspond to standard deviation. Scale bars: 10 μ m. Controls are WT cells.

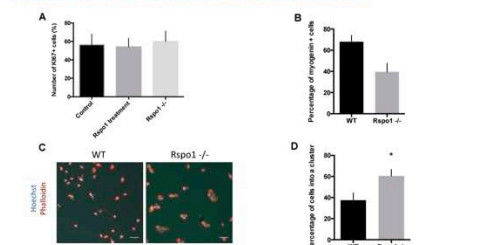
5. *Rspo1*-null differentiated cells have enhanced fusion



Rspo1-null myoblasts are bigger and have more nuclei than WT ones

A. Immunohistochemistry of myosin MF20 in WT and *Rspo1*^{-/-} myoblasts at 4 days of differentiation. Nuclei are stained with Hoechst.
B. Quantification of the number of nuclei per myoblasts showing an increase number of myoblasts with an high number of nuclei in *Rspo1*^{-/-} cells.
C. Percentage of fusion indicating that the ratio myoblasts/non-differentiated cells is the same between mutant and WT.
D. Mean size of myoblasts in both conditions. *Rspo1*^{-/-} myoblasts are 30% bigger than WT ones.
E. Distribution of the percentage of myoblasts depending on their diameter size (μ m).
N=3-5. *p value < 0.05. Error bars correspond to standard deviation.

4. *Rspo1*-null primary myoblasts show an aggregation phenotype



Rspo1-null myoblasts stay in cluster but do not have proliferation deficiency.

A. Quantification of the number of proliferating cells, by Ki67 staining, showing no differences of cell number engaged in G1, S, G2 and M phases.
B. Quantification of myogenic cells, showing a deficiency of differentiation in *Rspo1*^{-/-} cells. Ki-67.
C. Immunohistochemistry of phalloidin (actin). Nuclei are stained with Hoechst. Scale bar indicates 80 μ m.
D. Quantification of the percentage of cells into a cluster in both wild-type and mutant condition, showing that 60% of *Rspo1*^{-/-} cells are in cluster compared to 30% for WT cells.
E. N=3-5. *p value < 0.05. Error bars correspond to standard deviation.

Conclusion

We propose a model based on *in vitro* results.

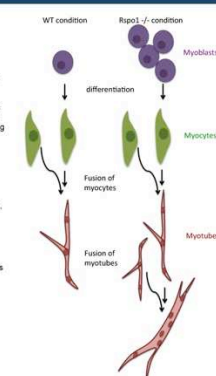
1. We have shown that *Rspo1* plays a role on cell adhesion independently of Wnt β -catenin pathway in myoblasts. Without *Rspo1*, myoblasts stay into cluster and seem less motile.
2. During the first differentiation stages, both WT and *Rspo1*^{-/-} myocytes do not form clusters and we have shown that *Rspo1* do not activate Wnt β -catenin pathway. We hypothesized that fusion of *Rspo1*^{-/-} myocytes properly occurs during this stage, giving thin myotubes.
3. *Rspo1*^{-/-} myotubes could be able to fuse together giving long, large and high-pluri-nuclei myotubes.

This model could explain the phenotype shown *in vivo*. At 21 days post injury, *Rspo1* is important for having good myofiber regeneration. By this way, we think that fusion of myofibers happens only with a depletion of *Rspo1*, reducing the total number of myofiber in muscle.

Open questions

As myoblasts form clusters, we would like to know if the cause is a defect in motility or in migration of myoblasts. The phenomenon of fusion between myocytes and between myofibers need to be highlighted to confirm our hypothesis.

In order to understand how the increase of fusion occurs, we could like to observe the motility of myocytes or myotubes. A higher motility will result in clumped cells, probably following by fusion cells.



The secreted protein R-SPONDIN1 contributes to the skeletal muscle regeneration

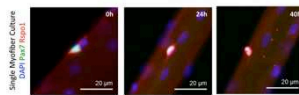
Floriane Lacour and Fabien Le Grand

Institut Cochin, INSERM U1016, CNRS UMR8014, Dept. Genetics and Development, PARIS

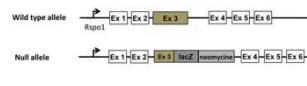
Introduction

Adult mammalian skeletal muscles have the remarkable ability to repair after injury. Muscle regeneration depends on various cellular and molecular responses, such as activation of Wnt signaling pathways in muscle stem cells called satellite cells. Activation of the canonical Wnt pathway leads to β -catenin stabilization and translocation into the nucleus to form a complex with TCFs to activate transcription of Wnt target genes. Non-canonical Wnt signaling, such as the Planar Cell Polarity Pathway (PCP), exert their activities independently of β -catenin. Activation of the PCP pathway by Wnt7a in activated satellite cells enhances satellite cell symmetric expansion and also leads to increased satellite cell migration and fusion, resulting in the generation of bigger myotubes following injury.

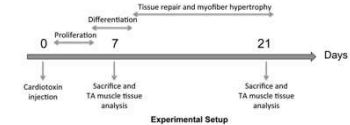
R-spondin (Rspo) proteins are able to potentiate the Wnt signaling pathways in stem cells of many different tissues such as intestinal crypt stem cells and hair follicle stem cells. Given that R-spondin1 (Rspo1) transcript expression is up-regulated by Pax7, a marker of satellite cells, we explored the hypothesis that Rspo1 plays a role during skeletal muscle regeneration. First, we observed that Rspo1 acts as a potentiator of non-canonical Wnt7a/PCP signaling in satellite cells. Specifically Rspo1/Wnt7a signaling drives satellite cell migration and fusion in vitro. Next, we injured the Tibialis Anterior (TA) muscle of *Rspo1*-null mice and littermates controls by cardiotoxin injection and analyzed muscle regeneration at different time point following injury (as shown below). Our data show that Rspo1 deficiency results in an increase of small myofibers at 7 days post injury (d.p.i.) and a decrease of the total number of myofibers at 21 d.p.i.. Our studies suggest that Rspo1 plays a major role during the skeletal muscle regeneration by controlling muscle tissue hypertrophy and hyperplasia following injury.



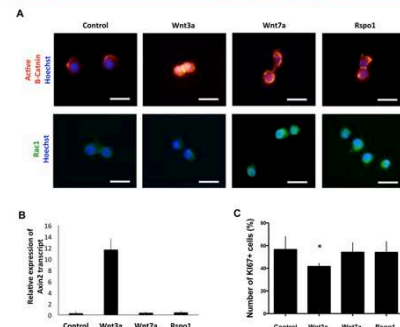
Localization of Rspo1 proteins in Satellite cells



Mouse genetic model
From Anne-Amandine Chassot et al., 2008



1. RSPD1 activates the non canonical Wnt7a/PCP Pathway in Satellite cells

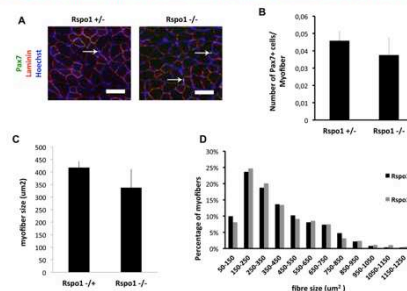


RSPD1 treatment phenocopies the effects of WNT7A treatment

- Immunolocalization of active β -catenin (in red) which indicates the activation of the canonical pathway after Wnt3a treatment, and immunolocalization of Rspo1 (in green) which indicates the activation of the non-canonical Wnt7a/PCP pathway after Rspo1 and Wnt7a treatment, on primary myoblasts cultured in growth medium supplemented with BSA (control) and proteins for 24 hours. Nuclei are stained with Hoechst (blue). Scale bars: 10 μ m.
- Relative expression of *Axin2* transcript, by qPCR in control condition and after 24 hours of protein treatment showing the activation of canonical pathway after Wnt3a treatment.
- Quantification of the number of Ki67-positive cells on proliferative myoblasts.

* p value < 0.05. Error bars correspond to standard deviation

2. Rspo1-null mice do not present skeletal muscle tissue defect at basal state

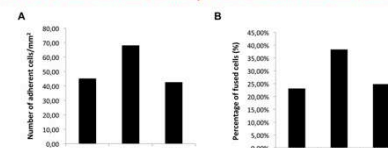


Analysis of satellite cells numbers and myofiber size at basal state

- Immunolocalization of Pax7 (satellite cell marker, arrows) and Laminin proteins in uninjured *Rspo1* heterozygous (*Rspo1*^{+/+}) TA muscles that serve as controls or *Rspo1* homozygous (*Rspo1*^{-/-}) TA muscles. Nuclei are stained with Hoechst (blue).
- Quantification of the number of Pax7-positive cells showing no difference of the number of satellite cells per myofiber between heterozygous and homozygous muscle.
- Myofiber size quantifications in TA muscles showing no difference between heterozygous and homozygous mice.
- Cross-section area distribution of the percentage of myofibers depending on their size.

N=6 mice. Scale bars: 50 μ m. Error bars correspond to standard deviation

4. RSPD1 treatment has a tendency to increase adherence and fusion



Analysis of adherence and fusion in control or after Rspo1 and Wnt7a treatment

- Quantification of the number of adherent cells in growth medium supplemented with BSA (control) and proteins for 24 hours. Cells are plated in collagen-coated plates and then washed one hour later. Only adherent cells are counted by Hoechst staining.
- Quantification of the number of fused cells. Myoblasts are treated 24 hours by proteins and plated on 72 hours-differentiated GP myotubes. They are then cultured in differentiation medium during 48 hours. The percentage of fused cells are counted. RSPD1 treatment seems to increase the fusion between myoblast and myotubes.

N=1

3. Rspo1-null mice have defective muscle regeneration

APC is required for muscle stem cell proliferation and skeletal muscle tissue repair

Alice Parisi,^{1,2} Floriane Lacour,^{1,2} Lorenzo Giordani,^{1,2} Sabine Colnot,^{1,2} Pascal Maire,^{1,2} and Fabien Le Grand^{1,2}

¹Institut Cochin, Université Paris-Descartes, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR 8104, 75014 Paris, France

²Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1016, 75014 Paris, France

The tumor suppressor adenomatous polyposis coli (APC) is a crucial regulator of many stem cell types. In constantly cycling stem cells of fast turnover tissues, APC loss results in the constitutive activation of a Wnt target gene program that massively increases proliferation and leads to malignant transformation. However, APC function in skeletal muscle, a tissue with a low turnover rate, has never been investigated. Here we show that conditional genetic disruption of APC in adult muscle stem cells results in the abrogation of adult muscle regenerative potential. We demonstrate that APC removal in adult muscle stem cells abolishes cell cycle entry and leads to cell death. By using double knockout strategies, we further prove that this phenotype is attributable to overactivation of β -catenin signaling. Our results demonstrate that in muscle stem cells, APC dampens canonical Wnt signaling to allow cell cycle progression and radically diverge from previous observations concerning stem cells in actively self-renewing tissues.

Introduction

The *APC* gene codes for a large protein with multiple cellular functions and interactions (Fodde et al., 2001a; McCartney and Näthke, 2008; Nelson and Näthke, 2013). APC is an essential component of the canonical Wnt signaling pathway and is required for the formation of a cytoplasmic complex that targets β -catenin for proteasomal degradation when Wnt signals are absent (Clevers and Nusse, 2012). APC also participates in several cellular processes: cell adhesion and migration (Watanabe et al., 2004), actin dynamics (Moseley et al., 2007), and chromosome segregation (Fodde et al., 2001b). In humans, APC mutations lead to the second most common cause of cancer death (Morin et al., 1997). More specifically, in high turnover tissues, such as in the intestine, loss or mutation of APC leads to uncontrolled proliferation and accumulation of aberrant cells, thereby leading to carcinogenesis (Sansom et al., 2004; Andreu et al., 2005). Due to its role in controlling cell cycle progression of several stem cell compartments, APC was a good candidate to regulate muscle stem cell proliferation and quiescence, which to date are poorly characterized.

In adult skeletal muscle, a tissue with slow turnover, a pool of Pax7+ muscle stem cells called satellite cells ensures myofibers regeneration after injury (Seale et al., 2000; Lepper et al., 2011; Günther et al., 2013). Satellite cells are quiescent and lie under the basal lamina of their host muscle fibers unless

activated upon injury. After exit from quiescence, satellite cells leave their niche, proliferate, and either differentiate to fuse and form new fibers or self-renew to replenish the stem cell niche (Yin et al., 2013). Although a diverse range of signals have been shown to regulate skeletal muscle regeneration, the molecular mechanism underlying cell cycle progression of muscle stem cells remains to be fully elucidated.

Results and discussion

Loss of APC does not perturb satellite cell quiescence

To understand APC function in adult regenerative myogenesis, we used inducible gene inactivation. The *APC* gene was conditionally deleted in satellite cells by crossing *APC^{fllox/flox}* mice (Colnot et al., 2004) with tamoxifen (TM)-inducible Pax-7^{CreERT2} mice (Lepper et al., 2009; termed APC SC-KO mice). After four daily TM injections in 2-mo-old animals (see Materials and methods; Fig. 1 A), we isolated by FACS and genotyped the satellite cells and the fibroblasts of tamoxifen-treated APC-SC-KO mice (Fig. 1 B). As expected, the APC-deleted specific band was detected only in satellite cells of APC-SC-KO mice but not in satellite cells of control mice. Notably, the APC-deleted band was absent in the fibroblast's genomic DNA (Fig. 1 B), thus confirming that APC gene disruption occurred selectively in satellite cells. We further observed the ab-

Correspondence to F. Le Grand: fabien.legrand@inserm.fr

F. Lacour, L. Giordani, and F. Le Grand's present address is Myology Research Center, Sorbonne Universités, University Pierre et Marie Curie, UMR76, 75013 Paris, France.

A. Parisi's present address is Nestlé Institute of Health Sciences SA, 1015 Lausanne, Switzerland.

Abbreviations used in this paper: EDL, extensor digitorum longus; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; TM, tamoxifen.

© 2015 Parisi et al. This article is distributed under the terms of an Attribution–Noncommercial–Share Alike–No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.rupress.org/terms>). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution–Noncommercial–Share Alike 3.0 Unported license, as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).

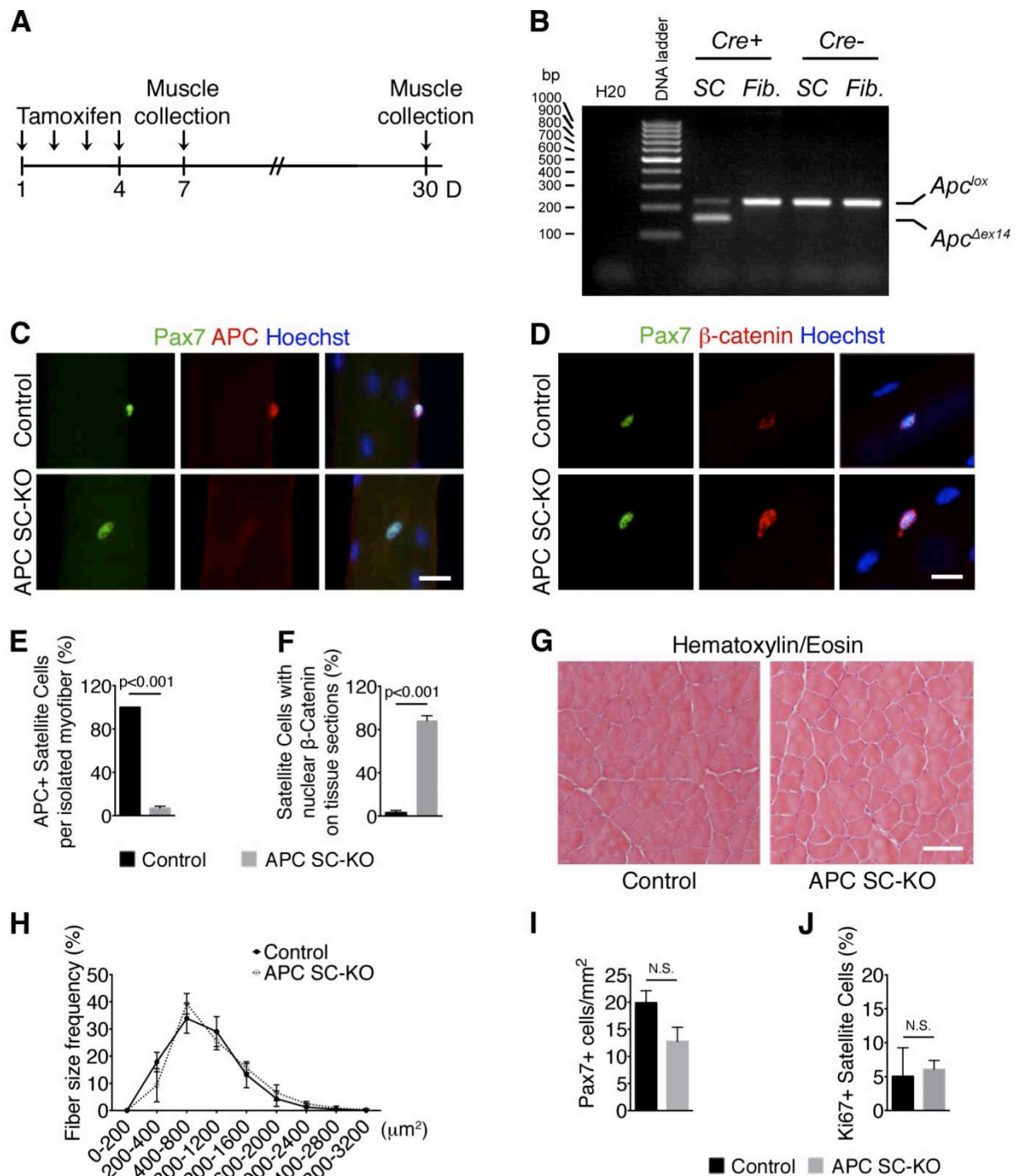


Figure 1. Conditional APC gene disruption in the adult satellite cells does not affect skeletal muscle tissue integrity. (A) Schematic representation of TM regimen and muscle collection for control (*Pax7^{CreER}*) and APC SC-KO (*Pax7^{CreER};Apc^{lox/lox}*) mice. (B) PCR of gDNA extracted from FACS-sorted satellite cells (SC) and fibroblasts (Fib.) of TM-treated APC-floxed mice showing the accumulation of the *Apc^{Δex14}* band in satellite cells of mice that also express *Pax7^{CreER}*. (C and D) Immunostaining on single EDL myofibers isolated 3 d after TM treatment. APC immunostaining (C) demonstrates efficient loss of APC expression in satellite cells (*Pax7*+) of APC SC-KO mice. β-Catenin immunostaining (D) shows that β-catenin is stabilized after APC knockout. (E and F) Quantification of the percentage of APC+ satellite cells on isolated EDL myofibers and the percentage of satellite cells with nuclear β-catenin on TA cryosections. Targeted APC gene disruption is efficient in vivo. (G) Hematoxylin and eosin staining on uninjured TA cryosections 30 d after TM treatment shows that tissue integrity is not altered after APC gene inactivation. (H) Distribution of myofibers cross-sectional area (CSA) shows no significant difference between uninjured TAs of control and APC SC-KO mice 30 d after TM treatment. (I and J) Quantification of the total number of satellite cells/mm² (I) and of the proportion of ki67+ proliferating satellite cells (J) reveal that muscle stem cell quiescence is not perturbed upon APC loss. Bars: (C and D) 10 μm; (G) 50 μm. Nuclei are stained with Hoechst. Error bars indicate SEM. N.S., not significant (P > 0.05).

sence of APC protein (Fig. 1 C) and the nuclear accumulation of β-catenin protein (Fig. 1 D) in satellite cells of APC SC-KO extensor digitorum longus (EDL) single myofibers, 1 wk after the first TM injection. Efficient APC genetic disruption was observed in the vast majority of satellite cells after induction

of Cre activity both on isolated myofibers (Fig. 1 E) and on tissue sections (Fig. 1 F).

We did not observe any alterations of skeletal muscles gross anatomy 1 mo after TM treatment. Uninjured tibialis anterior (TA) muscles of APC SC-KO mice appeared undistinguishable

from controls at the histological level (Fig. 1 G), and muscle fiber size remained constant (Fig. 1 H). APC loss did not lead satellite cells to leave their quiescent state, since both control and APC SC-KO TA muscles exhibited similar numbers of sublamellar Pax7+ satellite cells (Fig. 1 I) and a very low proportion of Ki67+ cycling satellite cells (Fig. 1 J). Collectively, our observations indicate that APC gene disruption does not result in muscle satellite cell exit from quiescence or in their malignant transformation.

Conditional APC gene disruption in satellite cells results in complete failure of muscle regeneration

To determine if APC mutant satellite cells can support injury-induced myogenesis, we injured TA muscles by cardiotoxin injection (Chang et al., 1972; Fig. 2 A). The early satellite cell-dependent events of regenerative myogenesis were abrogated after APC loss, as indicated by the total absence of accumulating Pax7+ progenitors (Fig. 2 B) and of newly formed myofibers expressing embryonic myosin heavy chains (e-MyHC; Fig. 2 C) 4 d after injury. 2 wk after injury, control muscles were fully regenerated and composed of functional myofibers ($1,629 \pm 278$ regenerated myofibers/mm²), whereas APC SC-KO muscles dramatically failed to regenerate (9 ± 7 regenerated myofibers/mm²; Fig. 2 D), with the remaining tissue accounting for less than half the contralateral uninjured muscle weight (Fig. 2 E). Hematoxylin and eosin staining at different time points after CTX injection (ranging from 2 d to 28 d after injury) confirmed the inability of APC SC-KO muscle to regenerate (Fig. S1). In APC SC-KO mice, muscle tissue was replaced by a scar tissue composed of Tcf4+ fibroblasts (Fig. 2, F and G) and a Collagen Type I matrix (Fig. 2, H and I). To rule out the possibility that the excessive Tcf4+ cells derived from mutant satellite cells that lost their identity, we performed regeneration assays in mice bearing the double-reporter Z/EG lineage tracing allele (Novak et al., 2000). In these mice, Cre activity results in the permanent expression of the EGFP in targeted cells and their descendants. In control conditions, all regenerated myofibers derived from the Pax7 lineage, whereas APC SC-KO muscles did not contain EGFP+ cells (Fig. 2 K). Furthermore, we did not detect any Pax7+ cells in APC SC-KO TAs 14 d after injury (Fig. 2 L), indicating that adult-specific APC mutant satellite cells cannot self-renew and repopulate the niche (Fig. 2 J). Thus, APC expression by satellite cells is required for injury-induced myogenesis.

APC is required for satellite cell survival

To determine whether the observed phenotype was cell-intrinsic or depended on the muscle microenvironment, we tried unsuccessfully to grow in vitro satellite cell-derived primary myoblasts isolated from APC SC-KO muscles using a widely used protocol that routinely works in our hands (Fig. 3 A). We then isolated single myofibers with their associated satellite cells from EDL muscle and plated them on Matrigel. In these conditions, satellite cells leave their niche and migrate away from the fibers to generate myogenic colonies. Compared with controls, APC-inactivated satellite cells were defective in expansion and failed to establish myogenic colonies (Fig. 3, B and C). To identify the cellular events involved in this process, we studied satellite cell behavior in their niche at the surface of isolated single myofibers in “floating” culture conditions (Fig. 3 D). We observed that mutant satellite cells did not incorporate BrdU and did not divide after 24 h and 30 h of culture (Fig. 3, E and

F, respectively). As a consequence, while the number of myofiber-associated satellite cells was not different between control and APC SC-KO myofibers directly after isolation, APC mutant satellite cells were unable to amplify and give rise to Pax7+ cells clusters (Fig. 3 G). More specifically, we observed that satellite cells of APC SC-KO myofibers expressed the active form of Caspase-3 (Fig. 3, H and I), indicating that they were undergoing programmed cell death. Importantly, we did not observe accelerated differentiation (Myogenin+ cells) in APC mutant satellite cells (Fig. 3 J). To test whether cell cycle arrest and programmed cell death are responsible for the regeneration failure of APC SC-KO mice, we performed BrdU incorporation assays after cardiotoxin injury and analyzed satellite cells at the earliest time point in vivo (48 h after injury; Fig. 3 K). We observed that, in contrast to control satellite cells, APC mutant satellite cells did not incorporate BrdU, demonstrating that they do not enter into S phase in vivo (Fig. 3 L). TUNEL staining further revealed an increase in the number of apoptotic cells in APC SC-KO muscles compared with controls (Fig. 3 M). Collectively, our results suggest that APC is necessary for satellite cell survival at the time of exit from quiescence.

To understand the molecular mechanisms underlying the requirement of APC by satellite cells, and because APC SC-KO satellite cells did not grow in vitro, we silenced APC in proliferating wild-type satellite cell-derived primary myoblasts (Fig. S2 A) and analyzed global gene expression 48 h after transfection using Affymetrix mRNA microarrays. APC knockdown led to down-regulation of 337 and up-regulation of 291 transcripts relative to mock-treated cells, with a false discovery rate (FDR) of <5% (Table S2). Differentially expressed genes had enriched gene ontology terms belonging to regulatory pathways associated with nucleotide binding, chromosomes, and cell cycle (Table S1). Ingenuity pathway analysis demonstrated enrichment of the programmed cell death pathway along with reduction of the cell cycle, cellular assembly, and DNA replication pathways (Fig. S2 B). Overall, changes in gene expression were consistent with apoptosis of APC-deficient primary myoblasts and indicated a link with impaired cell cycle progression. More specifically, we observed that transcription of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and several factors that associate with PCNA during DNA replication were down-regulated after APC silencing (Fig. S2 C). On single myofibers, quiescent satellite cells do not express PCNA whereas almost all activated satellite cells express high levels of PCNA proteins (Fig. S2 D). APC mutant satellite cells were unable to express PCNA proteins (Fig. S2 E), and in these conditions PCNA silencing on single myofibers impaired satellite cell amplification, similarly to APC silencing (Fig. S2 F).

APC allows satellite cell progression through the cell cycle by dampening canonical Wnt signaling

We next aimed to understand which signaling cascade could explain the observed phenotype. By analyzing our microarray data with the Upstream Regulators tool of the Ingenuity software, we identified WNT3A as one of the pathways activated after APC silencing (Fig. S3 A). Indeed, 23 known canonical Wnt target genes were up-regulated in APC-depleted primary myoblasts (Fig. S3 B). We then determined the activation status of canonical Wnt signaling in satellite cells ex vivo and in vivo. We found that β -catenin was uniquely cytoplasmic (inactive signaling) in quiescent satellite cells and in satellite cells undergoing their

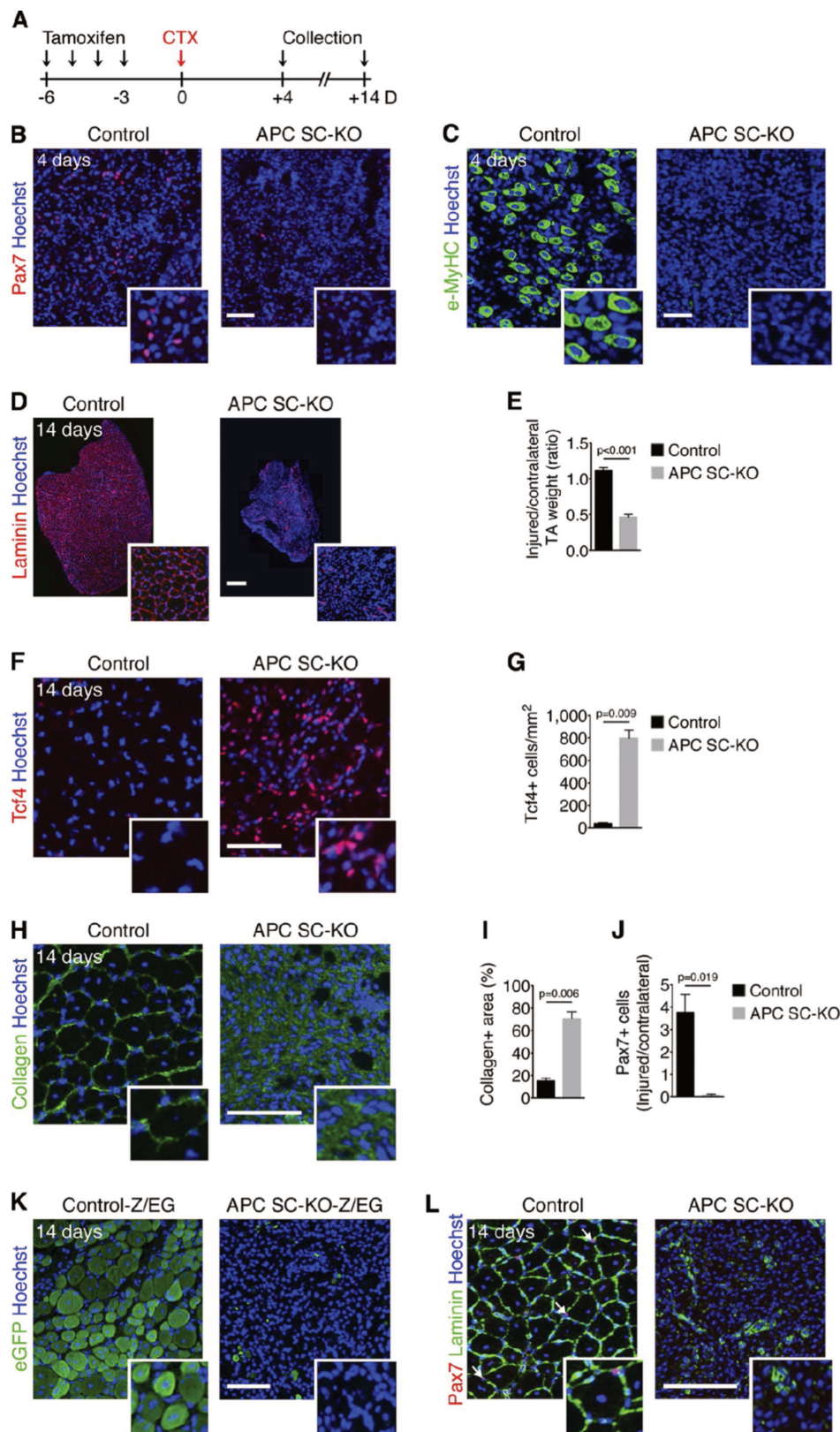


Figure 2. APC is required for adult skeletal muscle regeneration. (A) TM regimen and cardiotoxin (CTX) injury scheme for control and APC SC-KO mice. (B and C) Immunostaining for Pax7 (B) and e-MyHC (C) on TA cryosections 4 d after injury. (D–L) Analysis of TA muscles 14 d after injury reveals that tissue regeneration is defective in APC SC-KO muscles. (D) Whole sections of TA muscles immunostained for Laminin. Immunostaining for Tcf4 (F), type 1 Collagen (H), and Pax7 and Laminin (L) on TA cryosections is shown. Quantification of TA weight 14 d after injury normalized by uninjured TA weight (E), of the number of Tcf4+ cells/mm² (G), of relative Collagen+ area (I), and of sublamellar Pax7+ cells (normalized by Pax7+ cells of uninjured TA; J) is also shown. (K) GFP immunostaining on transverse sections of TAs isolated from Pax7^{CreER};Z/EG (Control-Z/EG) and Pax7^{CreER}APC^{lox/lox};Z/EG (APC SC-KO-Z/EG) 14 d after injury demonstrates that APC-null satellite cells do not give rise to new myofibers, nor trans-differentiate in other cell types. Bars: (B, C, F, H, K, and L) 50 μ m; (D) 200 μ m. Nuclei are stained with Hoechst. Error bars indicate SEM. Inset panels show a 2x enlargement.

first division. However, strong β -catenin nuclear accumulation (active signaling) was detected in the progeny of satellite cells at the time of fate commitment and cell cycle exit (Fig. S3 C). Accordingly, expression of the Wnt reporter allele Axin2^{LacZ} (Lustig et al., 2002) was not detected in uninjured muscles, but strongly marked Myogenin-expressing differentiating satellite cells during muscle regeneration (Fig. S3 D). These data show that Wnt/ β -catenin signaling is inactive during satellite cell qui-

escence, and becomes activated upon myogenic commitment. Thus, our results suggest that APC-depleted satellite cells present unscheduled aberrant activation of canonical Wnt signaling.

To test whether the phenotype of APC mutant cells was a direct consequence of canonical Wnt signaling overactivation, we simultaneously silenced APC and inhibited the Wnt/ β -catenin pathway by combining APC and β -catenin siRNAs in vitro (Fig. 4 A). Using this strategy, we were able to completely ab-

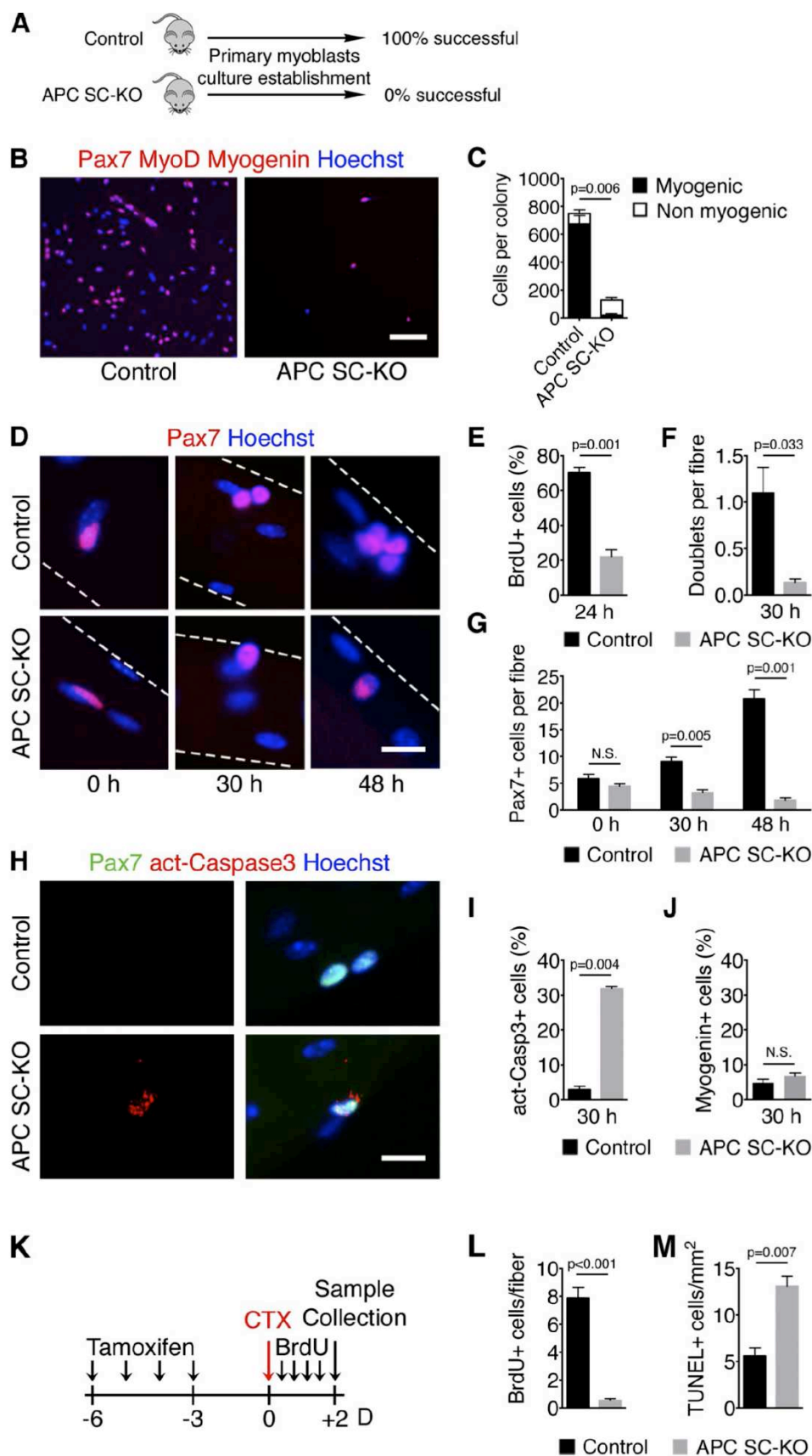


Figure 3. APC-null satellite cells lose their myogenic potential and undergo apoptosis upon activation. (A) Scheme of success ratio in generation of primary myoblasts culture from TM-treated control and APC SC-KO mice. (B) Pax7, MyoD, and Myogenin immunostaining on myogenic colonies obtained from single EDL fibers cultured on Matrigel for 7 d. (C) Quantification of the number of myogenic and nonmyogenic cells per colony obtained in B. P-value refers to the myogenic proportion. (D) Pax7 immunostaining on single EDL fibers isolated and fixed (0 h) or cultured in floating conditions for 30 or 48 h (broken lines indicate the underlying fiber). (E) Quantification of BrdU-incorporating satellite cells on EDL fibers after 24 h of culture. (F) Quantification of satellite cell doublets per fiber after 30 h of culture. (G) Quantification of total number of satellite cells per fiber after 0, 30, and 48 h of culture. (H) Pax7 and activated Caspase3 (act-Casp3) immunostaining on EDL single fibers after 30 h of culture. (I) Quantification of apoptotic satellite cells after 30 h of culture. (J) Quantification of the percentage of satellite cells on EDL fibers expressing Myogenin after 30 h of culture. (K) Schematic representation of the in vivo analysis of satellite cell proliferation and survival upon muscle injury. (L and M) Quantification of BrdU-incorporating satellite cells on regenerating EDL fibers (L) and of apoptotic cells by TUNEL staining on TA sections (M) 2 d after injury. Bars: (B) 100 μ m; (D and H) 10 μ m. Error bars indicate SEM. N.S., not significant ($P > 0.05$).

rogate transcriptional activation of the Wnt target gene Axin2 transcription by concomitant APC and β -catenin silencing (Fig. 4 B). We further observed the rescue of adequate G1-S checkpoint gene expression in APC; β -catenin double-silenced cells compared with cells only transfected with APC-targeting siRNA (Fig. 4 C). Strikingly, while simple APC silencing

blocked BrdU incorporation and decreased the percentage of S-phase cells in proliferating primary myoblasts, silencing of both APC and β -catenin restored normal cell cycle progression (Fig. 4, D and E). In this experimental setup, we observed that the induction of programmed cell death in primary myoblasts after APC silencing requires β -catenin, as quantified by TUNEL

assay (Fig. 4 F). To determine whether β -catenin inactivation could compensate for APC loss in vivo, we conditionally deleted both genes in adult satellite cells. We used the Pax7^{CreERT2} allele to recombine both APC floxed alleles along with one (SC APC-KO; β cat-HET) or two (SC APC-KO; β cat-KO) β -catenin floxed alleles (Brault et al., 2001) in adult mice. Strikingly, cardiotoxin-induced muscle regeneration was completely restored in TA muscles with APC; β -catenin double inactivated satellite cells (Fig. 4 G), as assessed by quantification of satellite cell numbers (Fig. 4 H) and regenerated fiber size (Fig. 4 I) 2 wk after injury. Importantly, recombination of only one β -catenin allele resulted in a partial rescue of APC genetic disruption. In this context, muscle regeneration occurred but satellite cells could not repopulate their niche, and the regenerated myofibers were smaller as compared with single or double inactivated TAs. These data demonstrate that cell cycle arrest and apoptosis after APC inactivation are triggered by β -catenin overactivation. Collectively, these experiments demonstrate that specific levels of canonical Wnt signaling are the major determinant of the observed phenotype in APC-SC-KO mice.

Conclusions

Here we report that APC is absolutely necessary for regenerative myogenesis. We show that APC inactivation in stem cells of a low-turnover tissue results in inhibition of proliferation and programmed cell death. This is in contrast with previous observations of several tissues with high turnover rate, in which APC acts as a tumor suppressor. Interestingly, these constantly renewing tissues have high tumor incidence, and it has been demonstrated, at least in some cases, that tumors derive from residing stem cells (Barker et al., 2009). In these cells, β -catenin hyperactivation after APC loss promotes unscheduled proliferation leading to neoplastic transformation (van de Wetering et al., 2002; Sansom et al., 2007). Importantly, this paradigm cannot be extended to skeletal muscle. Our data supports the evidence that tissue-specific stem cells have different susceptibility to cancer initiation, and suggest that these differences rely on tissue-specific functions of APC and the Wnt/ β -catenin pathway.

Wnt/ β -catenin signaling has previously been associated with skeletal muscle tissue repair. More specifically, regenerating muscle tissue expresses many Wnt ligands, and both the injection of recombinant Wnt3a protein (Brack et al., 2008) or the electroporation of a Wnt3a-expressing plasmid (Le Grand et al., 2009) perturbed the regeneration process by promoting myogenic lineage progression and differentiation. Further, expression of the constitutively active form of β -catenin, specifically in satellite cells, did not affect tissue regeneration, but rather prolonged the regenerative response (Murphy et al., 2014).

We observed that targeted APC gene disruption in satellite cells results in a massive up-regulation of canonical Wnt signaling that leads to complete failure of tissue regeneration. While unexpected, this phenotype is not contradictory with previous work since it is known that Wnt signaling influences self-renewing cells in a dosage-dependent fashion. Notably, Wnt signaling dosage modulates the capacity of embryonic stem cells to differentiate into the three main germ layers in vitro (Kielman et al., 2002) and regulates hematopoiesis in vivo (Luis et al., 2011). In animal models that develop cancer, different mutation types in different members of the Wnt pathway result in different signaling doses associated with specific tumors in susceptible tissues (Fodde and Smits, 2001). APC gene disruption represents the strongest possible activation of canonical Wnt

signaling, as APC controls β -catenin protein stability in the cytoplasm, and also facilitates the repression of Wnt target genes at the chromatin level (Sierra et al., 2006).

Our results clearly indicate that different doses of β -catenin made available for Wnt signaling resulted in different cellular responses and, consequently, in different degrees of tissue regeneration. Full inactivation of canonical Wnt signaling by removal of β -catenin in APC-null satellite cells completely restored muscle tissue regeneration, whereas mild activation of the pathway after genetic disruption of only one allele of β -catenin in APC-null satellite cells resulted in an intermediate regeneration phenotype that can be compared with the minor regeneration defects observed after administration of exogenous Wnt proteins to the muscle tissue (Brack et al., 2008; Le Grand et al., 2009) and to the genetic activation of β -catenin in satellite cells (Murphy et al., 2014).

In this study we provide genetic evidence that, in the early phases of muscle tissue repair, canonical Wnt signaling is dampened by APC in satellite cells to allow their proper cell cycle entry and progression. Clinically, β -catenin or other canonical Wnt signaling regulators can be targeted (Liu et al., 2013) to drive the expansion of human satellite cells or induced pluripotent stem (iPS)-derived myogenic cells for skeletal muscle tissue repair with far-reaching medical impact.

Materials and methods

Mice

Experimental animal protocols were performed in accordance with the guidelines of the French Veterinary Department and approved by the University Paris-Descartes Ethical Committee for Animal Experimentation. All experiments were performed on age- and sex-matched mice, with an equal ratio of male to female mice. Generation and genotyping of the Pax7^{CreERT2}, APC^{flox/flox}, β -catenin^{flox/flox}, Z/EG, and Axin2^{LacZ} lines have been described previously. The Pax7^{CreERT2} allele is a null allele. The Cre-ERT2-IRES-DsRed cassette has been inserted in place of Pax7 exon 1 and 2. The APC^{flox} allele is a conditional null allele. The exon 14 of the APC gene was flanked with loxP sequences. The β -catenin^{flox} allele is a conditional null allele. LoxP sequences were inserted in the β -catenin gene the before exon 2 and after exon 6. The Z/EG allele is a double reporter allele. The Z/EG transgene consists of the strong (pCAGGS) promoter directing expression of a loxP-flanked β -geo (lacZ/neomycin-resistance) fusion gene. Following is the coding sequence of the enhanced GFP. In this configuration, EGFP is expressed after Cre recombinase activity. The Axin2^{LacZ} allele is a null allele. In-frame insertion of a nuclear-localized β -galactosidase (NLS-lacZ) gene into the endogenous Axin2 start codon resulted in deletion of the Axin2 exon 2. The Axin2^{LacZ} mice were a gift from A.A. Chassot (Institut de Biologie Valrose, Nice, France).

Induction of Cre activity and cardiotoxin injury

I.p. injections of tamoxifen from MP Biomedicals at 5 μ l per gram body weight of 20 mg/ml diluted in corn oil were administrated to 2-mo-old mice daily for 4 d before injury. For muscle injury experiments, mice were anaesthetized by i.p. injection of Ketamin-Xylazin (Centravet) at 10 μ l per gram body weight of 80–10 mg/ml diluted in saline. Mouse legs were cleaned with alcohol and tibialis anterior muscles were injected with 35 μ l of cardiotoxin solution (12 μ M, diluted in saline; Latoxan) using an insulin needle (3/10 cc insulin syringe; BD). For in vivo proliferation assays, we used four i.p. injections of BrdU at 5 μ l per gram of body weight of 10 mg/ml diluted in saline.

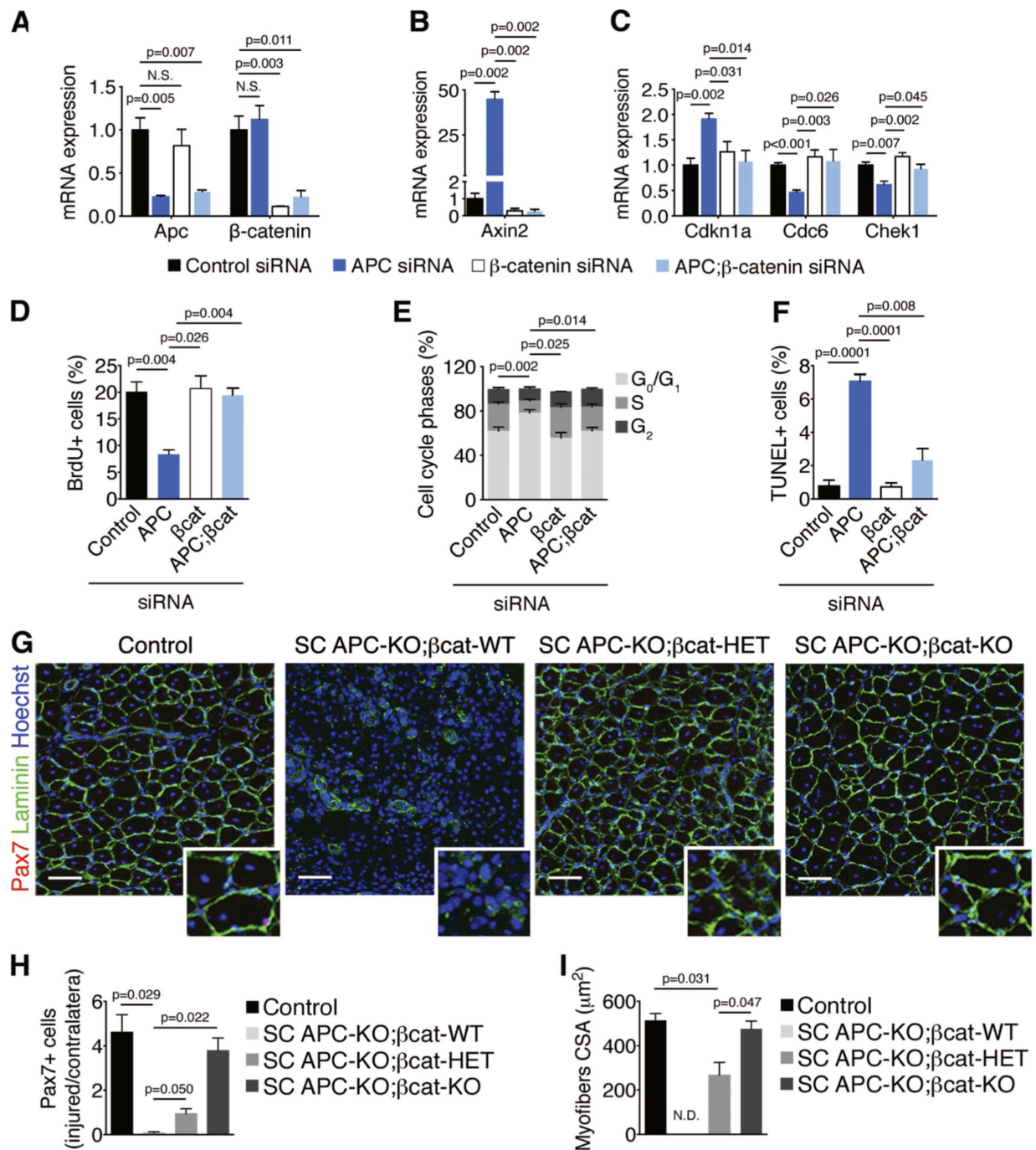


Figure 4. APC controls satellite cell proliferation and survival by dampening Wnt/ β -catenin signaling. (A–C) RT-qPCR analysis of gene expression in proliferating primary myoblasts after siRNA treatment. *Apc* and β -catenin levels (A) show efficient reduction of the transcription of genes targeted by siRNA, whereas *Axin2* levels (B) reveal that Wnt/ β -catenin overactivation is blunted in APC/ β -catenin double silenced cells. *Cdkn1a* induction and concomitant decrease of *cdc6* and *chk1* expression after APC knockdown reflect a G1/S arrest (C). (D) Quantification of BrdU+ primary myoblasts 48 h after siRNA transfection. (E) Distribution of primary myogenic cells in each cell cycle phase assessed by quantification of propidium iodide (PI) incorporation 48 h after siRNA transfection. P-value refers to S phase. (F) Quantification of apoptotic index by TUNEL staining on primary myoblasts 48 h after siRNA transfection. (G) TA cryosections 14 d after injury immunostained for Pax7 and Laminin. Nuclei were stained with Hoechst. Bars, 50 μ m. Inset panels show 2 $\times$ enlargements. (H) Quantification of sublamina Pax7+ cells 14 d after injury (normalized by Pax7+ cells of noninjured TA). (I) Quantification of TA muscle fibers cross-sectional area (CSA) 14 d after injury. N.D., not determined. Error bars indicate SEM.

FACS-mediated cell isolation

Satellite cells were obtained from adult hindlimb muscles after enzymatic digestion followed by FACS purification. In brief, after dissection cells were digested for 1.5 h in digestion solution (2 mg/ml Collagenase A, 2.4 U/ml Dispase II, and 10 μ g/ml DNase I, in HBSS; all from Roche). After digestion, cells were washed with wash buffer (0.2% BSA in HBSS; Gibco) and filtered twice; once with a 100-

μ m strainer and once with a 45- μ m strainer (Corning). Cells were then stained with the following antibodies: rat CD31, rat CD45, rat TER119, rat Ly6A (SCA1), rat CD106 (eBioscience), and rat α 7 integrin (R&D Systems) and sorted using a cell sorter (FACS Aria II; BD). Satellite cells were isolated as CD31^{neg} CD45^{neg} Ter119^{neg} Sca1^{neg} α 7 integrin^{pos}. Fibroblasts were isolated as CD31^{neg} CD45^{neg} Ter119^{neg} Sca1^{pos} α 7 integrin^{neg}. Genomic DNA from satellite cells and

fibroblasts was purified using QUICK-GDNA Microprep (Zymo Research). Sequences of the primers used for genotyping PCR were as follows: APC-Fwd, 5'-CTGTTCTGCAGTATGTTATCA-3'; APC-Rev-Lox, 5'-CTATGAGTCAACACAGGATTA-3'; APC-Rev-Del, 5'-TATAAGGGCTAACAGTCAATA-3'.

Histology and immunohistochemistry

For cryosections, skeletal muscles were embedded in Tissue-Tek O.C.T. Compound (Gentaur), frozen on 2-methylbutane-cooled liquid nitrogen, and processed for cryostat sectioning. 10- μ m sections were collected from the midbelly of muscles. Immunohistochemistry was performed by fixation with 4% PFA/PBS, processing for antigen retrieval with the Antigen Unmasking Solution (Vector) at 95°C for 15 min in a thermostated microwave, permeabilization with 0.2% Triton X-100 in PBS, blocking with 5% heat-inactivated serum/0.2% Triton X-100/1% BSA/PBS, incubation with primary antibody overnight at 4°C, and then incubation with Alexa Fluor secondary antibodies for 1 h at room temperature. Nuclei were counterstained with Hoechst and slides were mounted in fluorescent mounting medium (Dako). Primary antibodies were as follows: mouse β -catenin (BD), goat Collagen Type I (SouthernBiotech), rabbit GFP (Life Technologies), rabbit Ki67 (Abcam), rabbit Laminin (Sigma-Aldrich), mouse MyoD (Dako), mouse embryonic-MyHC (Developmental Studies Hybridoma Bank), mouse Pax7 (DSHB), and rabbit Tcf4 (Cell Signaling Technology). The TUNEL reaction was performed by using the In situ cell death detection kit (Roche) according to the manufacturer's instructions for tissue cryosections.

Single myofibers isolation and primary myoblasts preparation

Single myofibers were isolated from the EDL muscle by Collagenase type I digestion and gentle triturating, as described previously (Le Grand et al., 2009). Isolated myofibers were cultured in suspension for up to 2 d in 6-well plates coated with horse serum to prevent fiber attachment. Alternatively, myofibers were left to adhere to Petri dishes coated with 20% Matrigel (BD) in DMEM (Life Technologies) and cultured for 7 d. Fibers were incubated in plating medium consisting of 15% FBS (Hyclone) and 1% chick embryo extract (Accurate Chemicals) in DMEM. For isolation of primary myoblasts, skeletal muscles of the hindlimbs of 6- to 8-wk-old mice were dissected, with care to take off as much fat and connective tissue as possible. Muscles were transferred to a sterile 6-cm Petri dish on ice, mulched into a smooth pulp, and incubated in CollagenaseB/DispaseII/CaCl₂ solution (respectively, 1.5 U/ml, 2.4 U/ml, and 2 M in DMEM; Roche). After a 15-min incubation at 37°C, the muscle pulp was triturated with heat-polished glass Pasteur pipettes, and this incubation/trituration step was repeated once. Tissue digestion was stopped with the addition of FBS, cells were filtered, washed twice with PBS, and resuspended in growth medium consisting of Ham's F10 (Life Technologies) supplemented with 20% FBS and 2.5 ng/ μ l of basic FGF (R&D systems). After 2 h of preplating in a noncoated 10-cm plate, the medium was transferred onto collagen-coated Petri dishes. Cultures were maintained in growth medium until cells reached 80% confluence. To enrich cell cultures in myoblasts and eliminate contaminating fibroblasts, cell dishes were tapped. Differential adhesion potential allows myoblasts to be detached and replated onto new plates.

RNA interference

Wild-type primary myoblasts were transfected with the following Silencer Select Pre-designed siRNA sequences (Life Technologies): APC, 5'-CAGCUGACCUAGCCCAUAAtt-3' β -catenin, 5'-CACU-UGCAUAAUUAACAAAtt-3'. siRNA transfection was performed using Lipofectamine 2000 and OptiMEM (Life Technologies) according to the manufacturer's protocol.

Immunocytochemistry

Cells were fixed with 4% PFA/PBS, permeabilized with 0.2% Triton X-100/PBS, blocked with 5% heat-inactivated serum/PBS, incubated with primary antibody for at least 1 h, then incubated with Alexa Fluor secondary antibodies for 1 h. Nuclei were counterstained with Hoechst. Primary antibodies are as follows: rabbit APC (Abcam), mouse BrdU (Dako), rabbit activated-Caspase3 (Cell Signaling Technology), rabbit activated β -catenin (Cell Signaling Technology), mouse MyoD (Dako), rabbit Myogenin (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), mouse Pax7 (Developmental Studies Hybridoma Bank), and rabbit PCNA (Bethyl Laboratories, Inc.). Secondary antibodies were conjugated with Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 550 fluorochromes. The TUNEL reaction was performed by using the In situ cell death detection kit (Roche) according to the manufacturer's instructions for adherent cell layers. For cell proliferation studies, cells were incubated for 40 min with culture medium containing 30 μ M BrdU and processed for immunostaining with Pax7 and BrdU antibodies after fixation and treatment with 2N HCl for 20 min.

Image acquisition and quantitative analysis

Image acquisition and image analysis were performed at the Cochin Imaging Facility. Immunofluorescent stainings were analyzed with an Axiovert 200M microscope (Carl Zeiss) with 20 $\times$ magnification equipped with a camera (CoolSNAP HQ) and with an AZ100 microscope (Nikon) with 5 $\times$ magnification equipped with a high-resolution camera (Ds-Ri1; Nikon). Images were acquired at room temperature, the imaging medium used was Fluorescent Mounting Medium (Dako), and the fluorochromes used were Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 546 (Life Technologies). NIS-Element (Nikon), Metamorph (Molecular Devices), and Photoshop software (Adobe) were used for image acquisition and processing. All quantifications were done with ImageJ software.

Quantitative real-time PCR (qPCR)

Total RNA was extracted from either mouse tissue or cultured cells with TRIzol Reagent (Life Technologies) and treated with a DNA-free kit (Life Technologies) to remove any possible DNA contamination. cDNA was synthesized using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) with 500 ng of RNA as input. Gene expression was assessed with a LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche) using LightCycler 480 SYBR green I Master (Roche) with specific primers. Transcript levels were determined by absolute quantification using a 4-point standard curve and relative gene expression was calculated by normalization against 18S and cyclophilin reference genes. Sequences of the primers used for real-time PCR were as follows: 18S-Fwd, 5'-GTAACCCGTTGACCCCAT-3'; 18S-Rev, 5'-CCATCCAATCGCTAGTAGCG-3'; APC-Fwd, 5'-GCAGCTACAGGGAAGTATTGAA-3'; APC-Rev, 5'-TCTCCTGAACGGCTGGATAC-3'; Axin2-Fwd, 5'-AAGAGAAGCGACCCAGTCAA-3'; Axin2-Rev, 5'-CTGCGATGCATCTCTCTCTG-3'; β -catenin-Fwd, 5'-ATGGAGCCGGACAGAAAAGC-3'; β -catenin-Rev, 5'-CTTGCCACTCAGGGAAGGA-3'; Cdc6-Fwd, 5'-CCCGGGATTGTGAAGTAAAA-3'; Cdc6-Rev, 5'-GGAGATAACCGGGGAGTGTT-3'; Cdkn1a-Fwd, 5'-TTGTCGCTGTCTTGCACTCT-3'; Cdkn1a-Rev, 5'-AATCTGTCAGGCTGGTCTGC-3'; Chek1-Fwd, 5'-TCGTGAACGGCTTACTGAACAA-3'; Chek1-Rev, 5'-ACAGCTATCACTGGCTGGT-3'; Cyclophilin-Fwd, 5'-AAGAAGATCACCATTTCCGACT-3'; Cyclophilin-Rev, 5'-TTACAGGACATTGCGAGC-3'; MyH3-Fwd, 5'-AGAGGAGAAGGCCAAAAGG-3'; MyH3-Rev, 5'-CCTTCCAGCTCAAACCTCCAG-3'; Myogenin-Fwd, 5'-GAAAGTGAATGAGGCCTTCG-3'; Myogenin-Rev, 5'-ACGATGGACGTAAGGGAGTG-3'; Pax7-

Fwd, 5'-CTGGATGAGGGCTCAGATGT-3'; Pax7-Rev, 5'-GGTTAGCTCCTGCCTGCTTA-3'.

Microarray and bioinformatics

Total RNA was prepared from primary myoblasts using TRIzol Reagent (Life Technologies). After validation of the RNA quality with Bioanalyzer 2100 (using Agilent RNA6000 nano chip kit; Agilent Technologies), 50 ng of total RNA is reverse transcribed using the Ovation PicoSL WTA System (Nugen). In brief, the resulting double-strand cDNA is used for amplification based on single primer isothermal amplification (SPIA) technology. After purification according to the Nugen protocol, 5 µg of single-stranded DNA is used for generation of Sens Target DNA using Ovation Exon Module kit (Nugen). 2.5 µg of Sens Target DNA are fragmented and biotin labeled using an Encore Biotin Module kit (Nugen). After control of fragmentation using Bioanalyzer 2100, cDNA is then hybridized to GeneChip Mouse Gene 1.0 ST (Affymetrix) at 45°C for 17 h. After overnight hybridization, chips are washed on the fluidic station FS450 according to specific protocols (Affymetrix) and scanned using the GeneChip scanner 3000 7G (Affymetrix). The scanned images are then analyzed with Expression Console software (Affymetrix) to obtain raw data and metrics for Quality Controls. The observations of some of these metrics and the study of the distribution of raw data show no outlier experiments. Affymetrix probe-set data were normalized using the robust multi-array average (RMA) method (Irizarry et al., 2003) using R software (R Development Core Team, 2011). Gene expression levels were compared using one-way ANOVA. Lists of differentially expressed genes are presented in Table S2. Differentially expressed genes ($P < 0.01$, fold change > 1.5) were functionally annotated according to gene ontology terms, and enriched terms were calculated using DAVID (Huang et al., 2009; Table S1). Networks were generated with Ingenuity pathway analysis (Ingenuity Systems, <http://www.ingenuity.com>) using the Upstream Regulators and the Diseases&Functions tools that predict the activation status of signaling cascades and biological processes. The heat map with microarray data were created by using the matrix2png web interface (<http://www.chibi.ubc.ca/matrix2png/bin/matrix2png.cgi>).

Western blot analysis

Cells were lysed in RIPA buffer (Sigma-Aldrich) supplemented with Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche). Equal amounts of proteins were prepared with NuPAGE LDS Sample Buffer and Reducing Agent (Life Technologies), separated on NuPAGE Novex 3–8% Tris-Acetate Gels (Life Technologies), and transferred on nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories, Inc.). After blocking in 5% milk and 0.1% Tween-20/TBS, membranes were incubated with primary antibodies overnight and then with HRP-conjugated secondary antibodies for 1 h. Specific signals were detected with a chemiluminescence system (GE Healthcare). The following primary antibodies were used: rabbit APC (provided by K. Neufeld, University of Kansas, Lawrence, KS) and mouse HSC70 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.).

Flow cytometric analysis for cell cycle

For cell cycle analysis, cells were trypsinized, collected in cold PBS, and fixed in 70% ethanol overnight at 4°C. After washing with PBS, cells were incubated with 50 µg/ml propidium iodide (Sigma-Aldrich), 50 µg/ml RNase A (Roche), and 0.1% Tween-20 in PBS for 15 min and then analyzed using an Accuri C6 flow cytometer (BD). Cell cycle phases were determined by using the cell cycle function of FlowJo software (Tristar).

Statistical analysis

Each histological analysis of adult skeletal muscle was performed on at least four samples per genotype. No randomization or blinding was

used and no animals were excluded from analysis. For cell culture studies, at least three independent experiments were performed in duplicate and at least six random fields were imaged per sample. Data are presented as mean $\pm$ SEM. Differences between groups were tested for statistical significance using an unpaired two-tailed Student's *t* test. $P < 0.05$ was considered statistically significant. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism software.

Online supplemental material

Fig. S1 is a time-course histological analysis of muscle tissue regeneration in control and APC-SC-KO muscles. Fig. S2 illustrates the transcriptome results and the expression of PCNA by satellite cells. Fig. S3 show the up-regulation of canonical Wnt signaling in APC-deficient cells, and the activation of the pathway in satellite cells during muscle regeneration. Table S1 includes the Gene Ontology enrichment results. Table S2 is the list of genes that exhibit changes in expression after APC silencing. Online supplemental material is available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.201501053/DC1>.

Acknowledgments

We thank B. Chazaud, M. Buckingham, M. Rudnicki, P. Gilbert, and T. Cheung for critical reading of the manuscript. The authors greatly acknowledge B. Durel and P. Bourdoncle of the Cochin Imaging Facility. We thank members of the Cochin Institute genomic facility (S. Jacques and F. Dumont) for their technical and bioinformatics assistance. Microarray data have been deposited with the GEO Data Bank under the GSE57898 accession number.

This work was supported by funding from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Centre National de la Recherche Scientifique, the Agence Nationale de Recherche (ANR Blanc, project RPV09108KKA; ANR Jeune Chercheur, project RPV13010KKA), and the Association Française contre les Myopathies. A. Parisi was supported by a fellowship from the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement and a fellowship from the Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer.

The authors declare no competing financial interests.

Submitted: 14 January 2015

Accepted: 15 July 2015

References

- Andreu, P., S. Colnot, C. Godard, S. Gad, P. Chafey, M. Niwa-Kawakita, P. Laurent-Puig, A. Kahn, S. Robine, C. Perret, and B. Romagnolo. 2005. Crypt-restricted proliferation and commitment to the Paneth cell lineage following *Apc* loss in the mouse intestine. *Development*. 132:1443–1451. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.01700>
- Barker, N., R.A. Ridgway, J.H. van Es, M. van de Wetering, H. Begthel, M. van den Born, E. Danenberg, A.R. Clarke, O.J. Sansom, and H. Clevers. 2009. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature*. 457:608–611. <http://dx.doi.org/10.1038/nature07602>
- Brack, A.S., I.M. Conboy, M.J. Conboy, J. Shen, and T.A. Rando. 2008. A temporal switch from notch to Wnt signaling in muscle stem cells is necessary for normal adult myogenesis. *Cell Stem Cell*. 2:50–59. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2007.10.006>
- Brault, V., R. Moore, S. Kutsch, M. Ishibashi, D.H. Rowitch, A.P. McMahon, L. Sommer, O. Boussadia, and R. Kemler. 2001. Inactivation of the β -catenin gene by *Wnt1-Cre*-mediated deletion results in dramatic brain malformation and failure of craniofacial development. *Development*. 128:1253–1264.
- Chang, C.C., S.T. Chuang, C.Y. Lee, and J.W. Wei. 1972. Role of cardiotoxin and phospholipase A in the blockade of nerve conduction and depolarization of skeletal muscle induced by cobra venom. *Br. J. Pharmacol.* 44:752–764. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.1972.tb07313.x>

- Clevers, H., and R. Nusse. 2012. Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell*. 149:1192–1205. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.012>
- Colnot, S., T. Decaens, M. Niwa-Kawakita, C. Godard, G. Hamard, A. Kahn, M. Giovannini, and C. Perret. 2004. Liver-targeted disruption of *Apc* in mice activates β -catenin signaling and leads to hepatocellular carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101:17216–17221. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0404761101>
- Fodde, R., and R. Smits. 2001. Disease model: familial adenomatous polyposis. *Trends Mol. Med.* 7:369–373. [http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4914\(01\)02050-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4914(01)02050-0)
- Fodde, R., R. Smits, and H. Clevers. 2001a. APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 1:55–67. <http://dx.doi.org/10.1038/35094067>
- Fodde, R., J. Kuipers, C. Rosenberg, R. Smits, M. Kielman, C. Gaspar, J.H. van Es, C. Breukel, J. Wiegant, R.H. Giles, and H. Clevers. 2001b. Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat. Cell Biol.* 3:433–438. <http://dx.doi.org/10.1038/35070129>
- Günther, S., J. Kim, S. Kostin, C. Lepper, C.-M. Fan, and T. Braun. 2013. Myf5-positive satellite cells contribute to Pax7-dependent long-term maintenance of adult muscle stem cells. *Cell Stem Cell*. 13:590–601. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2013.07.016>
- Huang, W., B.T. Sherman, and R.A. Lempicki. 2009. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* 4:44–57. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2008.211>
- Irizarry, R.A., B.M. Bolstad, F. Collin, L.M. Cope, B. Hobbs, and T.P. Speed. 2003. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res.* 31:e15. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gng015>
- Kielman, M.F., M. Rindapää, C. Gaspar, N. van Poppel, C. Breukel, S. van Leeuwen, M.M. Taketo, S. Roberts, R. Smits, and R. Fodde. 2002. Apc modulates embryonic stem-cell differentiation by controlling the dosage of β -catenin signaling. *Nat. Genet.* 32:594–605. <http://dx.doi.org/10.1038/ng1045>
- Le Grand, F., A.E. Jones, V. Seale, A. Scimè, and M.A. Rudnicki. 2009. Wnt7a activates the planar cell polarity pathway to drive the symmetric expansion of satellite stem cells. *Cell Stem Cell*. 4:535–547. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2009.03.013>
- Lepper, C., S.J. Conway, and C.-M. Fan. 2009. Adult satellite cells and embryonic muscle progenitors have distinct genetic requirements. *Nature*. 460:627–631. <http://dx.doi.org/10.1038/nature08209>
- Lepper, C., T.A. Partridge, and C.-M. Fan. 2011. An absolute requirement for Pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration. *Development*. 138:3639–3646. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.067595>
- Liu, J., S. Pan, M.H. Hsieh, N. Ng, F. Sun, T. Wang, S. Kasibhatla, A.G. Schuller, A.G. Li, D. Cheng, et al. 2013. Targeting Wnt-driven cancer through the inhibition of Porcupine by LGK974. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 110:20224–20229. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1314239110>
- Luis, T.C., B.A.E. Naber, P.P.C. Roozen, M.H. Brugman, E.F.E. de Haas, M. Ghazvini, W.E. Fibbe, J.J.M. van Dongen, R. Fodde, and F.J.T. Staal. 2011. Canonical wnt signaling regulates hematopoiesis in a dosage-dependent fashion. *Cell Stem Cell*. 9:345–356. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2011.07.017>
- Lustig, B., B. Jerchow, M. Sachs, S. Weiler, T. Pietsch, U. Karsten, M. van de Wetering, H. Clevers, P.M. Schlag, W. Birchmeier, and J. Behrens. 2002. Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. *Mol. Cell Biol.* 22:1184–1193. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.22.4.1184-1193.2002>
- McCartney, B.M., and I.S. Näthke. 2008. Cell regulation by the Apc protein: Apc as master regulator of epithelia. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20:186–193. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2008.02.001>
- Morin, P.J., A.B. Sparks, V. Korinek, N. Barker, H. Clevers, B. Vogelstein, and K.W. Kinzler. 1997. Activation of β -catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in β -catenin or APC. *Science*. 275:1787–1790. <http://dx.doi.org/10.1126/science.275.5307.1787>
- Moseley, J.B., F. Bartolini, K. Okada, Y. Wen, G.G. Gundersen, and B.L. Goode. 2007. Regulated binding of adenomatous polyposis coli protein to actin. *J. Biol. Chem.* 282:12661–12668. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M610615200>
- Murphy, M.M., A.C. Keefe, J.A. Lawson, S.D. Flygare, M. Yandell, and G. Kardon. 2014. Transiently active Wnt/ β -catenin signaling is not required but must be silenced for stem cell function during muscle regeneration. *Stem Cell Rev.* 3:475–488. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.06.019>
- Nelson, S., and I.S. Näthke. 2013. Interactions and functions of the adenomatous polyposis coli (APC) protein at a glance. *J. Cell Sci.* 126:873–877. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.100479>
- Novak, A., C. Guo, W. Yang, A. Nagy, and C.G. Lobe. 2000. Z/EG, a double reporter mouse line that expresses enhanced green fluorescent protein upon Cre-mediated excision. *Genesis*. 28:147–155. [http://dx.doi.org/10.1002/1526-968X\(200011/12\)28:3/4<147::AID-GENE90>3.0.CO;2-G](http://dx.doi.org/10.1002/1526-968X(200011/12)28:3/4<147::AID-GENE90>3.0.CO;2-G)
- R Development Core Team. 2011. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: the R Foundation for Statistical Computing. Available at <http://www.R-project.org/> (accessed July 11, 2005).
- Sansom, O.J., K.R. Reed, A.J. Hayes, H. Ireland, H. Brinkmann, I.P. Newton, E. Batlle, P. Simon-Assmann, H. Clevers, I.S. Näthke, et al. 2004. Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes Dev.* 18:1385–1390. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.287404>
- Sansom, O.J., V.S. Meniel, V. Muncan, T.J. Phesse, J.A. Wilkins, K.R. Reed, J.K. Vass, D. Athineos, H. Clevers, and A.R. Clarke. 2007. Myc deletion rescues Apc deficiency in the small intestine. *Nature*. 446:676–679. <http://dx.doi.org/10.1038/nature05674>
- Seale, P., L.A. Sabourin, A. Girgis-Gabardo, A. Mansouri, P. Gruss, and M.A. Rudnicki. 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)
- Sierra, J., T. Yoshida, C.A. Joazeiro, and K.A. Jones. 2006. The APC tumor suppressor counteracts β -catenin activation and H3K4 methylation at Wnt target genes. *Genes Dev.* 20:586–600. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1385806>
- van de Wetering, M., E. Sancho, C. Verweij, W. de Lau, I. Oving, A. Hurlstone, K. van der Horn, E. Batlle, D. Coudreuse, A.P. Haramis, et al. 2002. The β -catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell*. 111:241–250. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01014-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01014-0)
- Watanabe, T., S. Wang, J. Noritake, K. Sato, M. Fukata, M. Takefuji, M. Nakagawa, N. Izumi, T. Akiyama, and K. Kaibuchi. 2004. Interaction with IQGAP1 links APC to Rac1, Cdc42, and actin filaments during cell polarization and migration. *Dev. Cell*. 7:871–883. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2004.10.017>
- Yin, H., F. Price, and M.A. Rudnicki. 2013. Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol. Rev.* 93:23–67. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00043.2011>

BIBLIOGRAPHIE

- Abad, M., Mosteiro, L., Pantoja, C., Cañamero, M., Rayon, T., Ors, I., Graña, O., Megías, D., Domínguez, O., Martínez, D., et al. (2013). Reprogramming in vivo produces teratomas and iPS cells with totipotency features. *Nature* 502, 340–345.
- Abed, É., Chan, T.F., Delalandre, A., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.-P., and Lajeunesse, D. (2011). R-spondins are newly recognized players in osteoarthritis that regulate Wnt signaling in osteoblasts. *Arthritis Rheum.* 63, 3865–3875.
- Abo, A., and Clevers, H. (2012). Modulating WNT receptor turnover for tissue repair. *Nat. Biotechnol.* 30, 835–836.
- Adamska, M., Billi, A.C., Cheek, S., and Meisler, M.H. (2005). Genetic interaction between Wnt7a and Lrp6 during patterning of dorsal and posterior structures of the mouse limb. *Dev. Dyn.* 233, 368–372.
- Alfaro, L.A.S., Dick, S.A., Siegel, A.L., Anonuevo, A.S., McNagny, K.M., Megeney, L.A., Cornelison, D.D.W., and Rossi, F.M.V. (2011). CD34 promotes satellite cell motility and entry into proliferation to facilitate efficient skeletal muscle regeneration. *Stem Cells Dayt. Ohio* 29, 2030–2041.
- Anakwe, K., Robson, L., Hadley, J., Buxton, P., Church, V., Allen, S., Hartmann, C., Harfe, B., Nohno, T., Brown, A.M.C., et al. (2003). Wnt signalling regulates myogenic differentiation in the developing avian wing. *Development* 130, 3503–3514.
- Andl, T., Reddy, S.T., Gaddapara, T., and Millar, S.E. (2002). WNT Signals Are Required for the Initiation of Hair Follicle Development. *Dev. Cell* 2, 643–653.
- Andreu, P., Peignon, G., Slomianny, C., Taketo, M.M., Colnot, S., Robine, S., Lamarque, D., Laurent-Puig, P., Perret, C., and Romagnolo, B. (2008). A genetic study of the role of the Wnt/ β -catenin signalling in Paneth cell differentiation. *Dev. Biol.* 324, 288–296.

- Apte, U., Singh, S., Zeng, G., Cieply, B., Virji, M.A., Wu, T., and Monga, S.P.S. (2009). Beta-Catenin Activation Promotes Liver Regeneration after Acetaminophen-Induced Injury. *Am. J. Pathol.* *175*, 1056–1065.
- Arnold, L., Henry, A., Poron, F., Baba-Amer, Y., Rooijen, N. van, Plonquet, A., Gherardi, R.K., and Chazaud, B. (2007). Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J. Exp. Med.* *204*, 1057–1069.
- Arsic, N., Zacchigna, S., Zentilin, L., Ramirez-Correa, G., Pattarini, L., Salvi, A., Sinagra, G., and Giacca, M. (2004). Vascular Endothelial Growth Factor Stimulates Skeletal Muscle Regeneration In Vivo. *Mol. Ther.* *10*, 844–854.
- Bae, G.-U., Gaio, U., Yang, Y.-J., Lee, H.-J., Kang, J.-S., and Krauss, R.S. (2008). Regulation of Myoblast Motility and Fusion by the CXCR4-associated Sialomucin, CD164. *J. Biol. Chem.* *283*, 8301–8309.
- Ballou, L.M., and Lin, R.Z. (2008). Rapamycin and mTOR kinase inhibitors. *J. Chem. Biol.* *1*, 27–36.
- Barker, N., van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P.J., et al. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* *449*, 1003–1007.
- Barker, N., Huch, M., Kujala, P., van de Wetering, M., Snippert, H.J., van Es, J.H., Sato, T., Stange, D.E., Begthel, H., van den Born, M., et al. (2010). *Lgr5*+ve Stem Cells Drive Self-Renewal in the Stomach and Build Long-Lived Gastric Units In Vitro. *Cell Stem Cell* *6*, 25–36.
- Behari, J. (2010). The Wnt/ β -catenin signaling pathway in liver biology and disease. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *4*, 745–756.
- Bell, S.M., Schreiner, C.M., Wert, S.E., Mucenski, M.L., Scott, W.J., and Whitsett, J.A. (2008). R-spondin 2 is required for normal laryngeal-tracheal, lung and limb morphogenesis. *Development* *135*, 1049–1058.
- Bellin, R., Capila, I., Lincecum, J., Park, P.W., Reizes, O., and Bernfield, M.R. (2002). Unlocking the secrets of syndecans: Transgenic organisms as a potential key. *Glycoconj. J.* *19*, 295–304.
- Bentzinger, C.F., von Maltzahn, J., Dumont, N.A., Stark, D.A., Wang, Y.X.,

- Nhan, K., Frenette, J., Cornelison, D.D.W., and Rudnicki, M.A. (2014). Wnt7a stimulates myogenic stem cell motility and engraftment resulting in improved muscle strength. *J. Cell Biol.* 205, 97–111.
- Bilić, J., Huang, Y.-L., Davidson, G., Zimmermann, T., Cruciat, C.-M., Bienz, M., and Niehrs, C. (2007). Wnt Induces LRP6 Signalosomes and Promotes Dishevelled-Dependent LRP6 Phosphorylation. *Science* 316, 1619–1622.
 - Binnerts, M.E., Kim, K.-A., Bright, J.M., Patel, S.M., Tran, K., Zhou, M., Leung, J.M., Liu, Y., Lomas, W.E., Dixon, M., et al. (2007). R-Spondin1 regulates Wnt signaling by inhibiting internalization of LRP6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 14700–14705.
 - Blanco-Bose, W.E., Yao, C.C., Kramer, R.H., and Blau, H.M. (2001). Purification of mouse primary myoblasts based on alpha 7 integrin expression. *Exp. Cell Res.* 265, 212–220.
 - Block, M.R., Badowski, C., Millon-Fremillon, A., Bouvard, D., Bouin, A.-P., Faurobert, E., Gerber-Scokaert, D., Planus, E., and Albiges-Rizo, C. (2008). Podosome-type adhesions and focal adhesions, so alike yet so different. *Eur. J. Cell Biol.* 87, 491–506.
 - Bober, E., Franz, T., Arnold, H.H., Gruss, P., and Tremblay, P. (1994). Pax-3 is required for the development of limb muscles: a possible role for the migration of dermomyotomal muscle progenitor cells. *Development* 120, 603–612.
 - Bondesen, B.A., Jones, K.A., Glasgow, W.C., and Pavlath, G.K. (2007). Inhibition of myoblast migration by prostacyclin is associated with enhanced cell fusion. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 21, 3338–3345.
 - Borycki, A.G., Brunk, B., Tajbakhsh, S., Buckingham, M., Chiang, C., and Emerson, C.P. (1999). Sonic hedgehog controls epaxial muscle determination through Myf5 activation. *Development* 126, 4053–4063.
 - Bourke, D.L., and Ontell, M. (1984). Branched myofibers in long-term whole muscle transplants: A quantitative study. *Anat. Rec.* 209, 281–288.
 - Boyden, L.M., Mao, J., Belsky, J., Mitzner, L., Farhi, A., Mitnick, M.A., Wu, D., Insogna, K., and Lifton, R.P. (2002). High Bone Density Due to a

Mutation in LDL-Receptor–Related Protein 5. *N. Engl. J. Med.* 346, 1513–1521.

- Brack, A.S., Conboy, M.J., Roy, S., Lee, M., Kuo, C.J., Keller, C., and Rando, T.A. (2007). Increased Wnt Signaling During Aging Alters Muscle Stem Cell Fate and Increases Fibrosis. *Science* 317, 807–810.
- Brack, A.S., Conboy, I.M., Conboy, M.J., Shen, J., and Rando, T.A. (2008). A temporal switch from notch to Wnt signaling in muscle stem cells is necessary for normal adult myogenesis. *Cell Stem Cell* 2, 50–59.
- Braun, T., and Gautel, M. (2011). Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 349–361.
- Brooke, M.H., and Kaiser, K.K. (1970). Muscle fiber types: how many and what kind? *Arch. Neurol.* 23, 369–379.
- Brückle, N.O., Frank, J., Frank, V., Senderek, J., Akar, A., Koc, E., Rigopoulos, D., van Steensel, M., Zerres, K., and Bergmann, C. (2008). RSPO4 Is the Major Gene in Autosomal-Recessive Anonychia and Mutations Cluster in the Furin-Like Cysteine-Rich Domains of the Wnt Signaling Ligand R-spondin 4. *J. Invest. Dermatol.* 128, 791–796.
- Buckingham, M., and Relaix, F. (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.
- Burn, S.F., Webb, A., Berry, R.L., Davies, J.A., Ferrer-Vaquer, A., Hadjantonakis, A.K., Hastie, N.D., and Hohenstein, P. (2011). Calcium/NFAT signalling promotes early nephrogenesis. *Dev. Biol.* 352, 288–298.
- Butler, A.E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R.A., and Butler, P.C. (2003). β -Cell Deficit and Increased β -Cell Apoptosis in Humans With Type 2 Diabetes. *Diabetes* 52, 102–110.
- Cadigan, K.M., and Nusse, R. (1996). wingless signaling in the *Drosophila* eye and embryonic epidermis. *Development* 122, 2801–2812.
- Cadigan, K.M., and Nusse, R. (1997). Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev.* 11, 3286–3305.
- Cadigan, K.M., and Waterman, M.L. (2012). TCF/LEFs and Wnt Signaling

in the Nucleus. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a007906.

- Cai, C., Yu, Q.C., Jiang, W., Liu, W., Song, W., Yu, H., Zhang, L., Yang, Y., and Zeng, Y.A. (2014). R-spondin1 is a novel hormone mediator for mammary stem cell self-renewal. *Genes Dev.* 28, 2205–2218.
- Carmon, K.S., Gong, X., Lin, Q., Thomas, A., and Liu, Q. (2011). R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/beta-catenin signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 11452–11457.
- Carmon, K.S., Gong, X., Yi, J., Thomas, A., and Liu, Q. (2014). RSPO–LGR4 functions via IQGAP1 to potentiate Wnt signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, E1221–E1229.
- Chadi, S., Buscara, L., Pechoux, C., Costa, J., Laubier, J., Chaboissier, M.-C., Pailhoux, E., Vilotte, J.-L., Chanat, E., and Le Provost, F. (2009). R-spondin1 is required for normal epithelial morphogenesis during mammary gland development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 390, 1040–1043.
- Chargé, S.B.P., and Rudnicki, M.A. (2004). Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol. Rev.* 84, 209–238.
- Chassot, A.A., Gregoire, E.P., Magliano, M., Lavery, R., and Chaboissier, M.C. (2008a). Genetics of Ovarian Differentiation: *Rspo1*, a Major Player. *Sex. Dev.* 2, 219–227.
- Chassot, A.-A., Ranc, F., Gregoire, E.P., Roepers-Gajadien, H.L., Taketo, M.M., Camerino, G., de Rooij, D.G., Schedl, A., and Chaboissier, M.-C. (2008b). Activation of beta-catenin signaling by *Rspo1* controls differentiation of the mammalian ovary. *Hum. Mol. Genet.* 17, 1264–1277.
- Chassot, A.-A., Bradford, S.T., Auguste, A., Gregoire, E.P., Pailhoux, E., Rooij, D.G. de, Schedl, A., and Chaboissier, M.-C. (2012). WNT4 and RSPO1 together are required for cell proliferation in the early mouse gonad. *Development* 139, 4461–4472.
- Chen, B., Dodge, M.E., Tang, W., Lu, J., Ma, Z., Fan, C.-W., Wei, S., Hao, W., Kilgore, J., Williams, N.S., et al. (2009). Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer. *Nat. Chem. Biol.* 5, 100–107.
- Chen, E.H., Grote, E., Mohler, W., and Vignery, A. (2007). Cell–cell fusion.

FEBS Lett. 581, 2181–2193.

- Christov, C., Chrétien, F., Abou-Khalil, R., Bassez, G., Vallet, G., Authier, F.-J., Bassaglia, Y., Shinin, V., Tajbakhsh, S., Chazaud, B., et al. (2007). Muscle satellite cells and endothelial cells: close neighbors and privileged partners. *Mol. Biol. Cell* 18, 1397–1409.
- Conboy, I.M., and Rando, T.A. (2002). The Regulation of Notch Signaling Controls Satellite Cell Activation and Cell Fate Determination in Postnatal Myogenesis. *Dev. Cell* 3, 397–409.
- Cong, F., Schweizer, L., and Varmus, H. (2004). Wnt signals across the plasma membrane to activate the β -catenin pathway by forming oligomers containing its receptors, Frizzled and LRP. *Development* 131, 5103–5115.
- Cossu, G. (1999). Wnt signaling and the activation of myogenesis in mammals. *EMBO J.* 18, 6867–6872.
- Cossu, G., Tajbakhsh, S., and Buckingham, M. (1996). How is myogenesis initiated in the embryo? *Trends Genet.* 12, 218–223.
- Cuilliere-Dartigues, P., El-Bchiri, J., Krimi, A., Buhard, O., Fontanges, P., Fléjou, J.-F., Hamelin, R., and Duval, A. (2006). TCF-4 isoforms absent in TCF-4 mutated MSI-H colorectal cancer cells colocalize with nuclear CtBP and repress TCF-4-mediated transcription. *Oncogene* 25, 4441–4448.
- Dale, R.M., Sisson, B.E., and Topczewski, J. (2009). The Emerging Role of Wnt/PCP Signaling in Organ Formation. *Zebrafish* 6, 9–14.
- Daniels, D.L., and Weis, W.I. (2005). β -catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 364–371.
- Daugherty, R.L., and Gottardi, C.J. (2007). Phospho-regulation of β -Catenin Adhesion and Signaling Functions. *Physiol. Bethesda Md* 22, 303–309.
- Davidson, G., Wu, W., Shen, J., Bilic, J., Fenger, U., Stanek, P., Glinka, A., and Niehrs, C. (2005). Casein kinase 1 γ couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature* 438, 867–872.
- Day, K., Paterson, B., and Yablonka-Reuveni, Z. (2009). A distinct profile of myogenic regulatory factor detection within Pax7⁺ cells at S phase supports a unique role of Myf5 during posthatch chicken myogenesis. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 238, 1001–1009.

- Essers, M.A.G., Vries-Smits, L.M.M. de, Barker, N., Polderman, P.E., Burgering, B.M.T., and Korswagen, H.C. (2005). Functional Interaction Between β -Catenin and FOXO in Oxidative Stress Signaling. *Science* 308, 1181–1184.
- Farup, J., Madaro, L., Puri, P.L., and Mikkelsen, U.R. (2015). Interactions between muscle stem cells, mesenchymal-derived cells and immune cells in muscle homeostasis, regeneration and disease. *Cell Death Dis.* 6, e1830.
- Figeac, N., and Zammit, P.S. (2015). Coordinated action of Axin1 and Axin2 suppresses β -catenin to regulate muscle stem cell function. *Cell. Signal.* 27, 1652–1665.
- Floss, T., Arnold, H.-H., and Braun, T. (1997). A role for FGF-6 in skeletal muscle regeneration. *Genes Dev.* 11, 2040–2051.
- Friedman, M.S., Oyserman, S.M., and Hankenson, K.D. (2009). Wnt11 Promotes Osteoblast Maturation and Mineralization through R-spondin 2. *J. Biol. Chem.* 284, 14117–14125.
- Gill, R., Hitchins, L., Fletcher, F., and Dhoot, G.K. (2010). Sulf1A and HGF regulate satellite-cell growth. *J. Cell Sci.* 123, 1873–1883.
- Glinka, A., Wu, W., Delius, H., Monaghan, A.P., Blumenstock, C., and Niehrs, C. (1998). Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* 391, 357–362.
- Glinka, A., Dolde, C., Kirsch, N., Huang, Y.-L., Kazanskaya, O., Ingelfinger, D., Boutros, M., Cruciat, C.-M., and Niehrs, C. (2011). LGR4 and LGR5 are R-spondin receptors mediating Wnt/ β -catenin and Wnt/PCP signalling. *EMBO Rep.* 12, 1055–1061.
- Gong, X., Carmon, K.S., Lin, Q., Thomas, A., Yi, J., and Liu, Q. (2012). LGR6 Is a High Affinity Receptor of R-Spondins and Potentially Functions as a Tumor Suppressor. *PLoS ONE* 7.
- Griffin, C.A., Kafadar, K.A., and Pavlath, G.K. (2009). MOR23 promotes muscle regeneration and regulates cell adhesion and migration. *Dev. Cell* 17, 649–661.
- Grumolato, L., Liu, G., Mong, P., Mudbhary, R., Biswas, R., Arroyave, R., Vijayakumar, S., Economides, A.N., and Aaronson, S.A. (2010). Canonical and noncanonical Wnts use a common mechanism to activate completely

unrelated coreceptors. *Genes Dev.* 24, 2517–2530.

- Günther, S., Kim, J., Kostin, S., Lepper, C., Fan, C.-M., and Braun, T. (2013). Myf5-positive satellite cells contribute to Pax7-dependent long-term maintenance of adult muscle stem cells. *Cell Stem Cell* 13, 590–601.
- Guo, B.-S., Cheung, K.-K., Yeung, S.S., Zhang, B.-T., and Yeung, E.W. (2012). Electrical Stimulation Influences Satellite Cell Proliferation and Apoptosis in Unloading-Induced Muscle Atrophy in Mice. *PLoS ONE* 7.
- Hamilton, N.B., Attwell, D., and Hall, C.N. (2010). Pericyte-mediated regulation of capillary diameter: a component of neurovascular coupling in health and disease. *Front. Neuroenergetics* 2, 5.
- Han, X.H., Jin, Y.-R., Seto, M., and Yoon, J.K. (2011). A WNT/beta-catenin signaling activator, R-spondin, plays positive regulatory roles during skeletal myogenesis. *J. Biol. Chem.* 286, 10649–10659.
- Han, X.H., Jin, Y.-R., Tan, L., Kosciuk, T., Lee, J.-S., and Yoon, J.K. (2014). Regulation of the Follistatin Gene by RSPO-LGR4 Signaling via Activation of the WNT/ β -Catenin Pathway in Skeletal Myogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 34, 752–764.
- Hardy, D., Besnard, A., Latil, M., Jouvion, G., Briand, D., Thépenier, C., Pascal, Q., Guguin, A., Gayraud-Morel, B., Cavaillon, J.-M., et al. (2016). Comparative Study of Injury Models for Studying Muscle Regeneration in Mice. *PloS One* 11, e0147198.
- Hasty, P., Bradley, A., Morris, J.H., Edmondson, D.G., Venuti, J.M., Olson, E.N., and Klein, W.H. (1993). Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature* 364, 501–506.
- Hausmann, G., Bänziger, C., and Basler, K. (2007). Helping Wingless take flight: how WNT proteins are secreted. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 331–336.
- He, B., Reguart, N., You, L., Mazieres, J., Xu, Z., Lee, A.Y., Mikami, I., McCormick, F., and Jablons, D.M. (2005). Blockade of Wnt-1 signaling induces apoptosis in human colorectal cancer cells containing downstream mutations. *Oncogene* 24, 3054–3058.
- He, L., Lu, N., Dai, Q., Zhao, Y., Zhao, L., Wang, H., Li, Z., You, Q., and Guo, Q. (2013). Wogonin induced G1 cell cycle arrest by regulating Wnt/ β -

catenin signaling pathway and inactivating CDK8 in human colorectal cancer carcinoma cells. *Toxicology* 312, 36–47.

- He, X., Saint-Jeannet, J.-P., Wang, Y., Nathans, J., Dawid, I., and Varmus, H. (1997). A Member of the Frizzled Protein Family Mediating Axis Induction by Wnt-5A. *Science* 275, 1652–1654.
- He, X.C., Zhang, J., Tong, W.-G., Tawfik, O., Ross, J., Scoville, D.H., Tian, Q., Zeng, X., He, X., Wiedemann, L.M., et al. (2004). BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt- β -catenin signaling. *Nat. Genet.* 36, 1117–1121.
- Heller, R.S., Dichmann, D.S., Jensen, J., Miller, C., Wong, G., Madsen, O.D., and Serup, P. (2002). Expression patterns of Wnts, Frizzleds, sFRPs, and misexpression in transgenic mice suggesting a role for Wnts in pancreas and foregut pattern formation. *Dev. Dyn.* 225, 260–270.
- Henderson, B.R. (2002). The ins and outs of APC and beta-catenin nuclear transport. *EMBO Rep.* 3, 834–839.
- van den Heuvel, M., Harryman-Samos, C., Klingensmith, J., Perrimon, N., and Nusse, R. (1993). Mutations in the segment polarity genes wingless and porcupine impair secretion of the wingless protein. *EMBO J.* 12, 5293–5302.
- Hollnagel, A., Grund, C., Franke, W.W., and Arnold, H.-H. (2002). The Cell Adhesion Molecule M-Cadherin Is Not Essential for Muscle Development and Regeneration. *Mol. Cell. Biol.* 22, 4760–4770.
- Hsieh, J.-C., Kodjabachian, L., Rebbert, M.L., Rattner, A., Smallwood, P.M., Samos, C.H., Nusse, R., Dawid, I.B., and Nathans, J. (1999). A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature* 398, 431–436.
- Huch, M., Dorrell, C., Boj, S.F., van Es, J.H., van de Wetering, M., Li, V.S.W., Hamer, K., Sasaki, N., Finegold, M.J., Haft, A., et al. (2013). In vitro expansion of single Lgr5⁺ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature* 494, 247–250.
- Hughes, S.M., and Blau, H.M. (1990). Migration of myoblasts across basal lamina during skeletal muscle development. *Nature* 345, 350–353.
- Hurlstone, A. (2002). NEW EMBO MEMBER'S REVIEW: T-cell factors: turn-ons and turn-offs. *EMBO J.* 21, 2303–2311.

- Hutcheson, D.A., Zhao, J., Merrell, A., Haldar, M., and Kardon, G. (2009). Embryonic and fetal limb myogenic cells are derived from developmentally distinct progenitors and have different requirements for β -catenin. *Genes Dev.* 23, 997–1013.
- Huxley, H., and Hanson, J. (1954). Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature* 173, 973–976.
- Ikeya, M., and Takada, S. (1998). Wnt signaling from the dorsal neural tube is required for the formation of the medial dermomyotome. *Development* 125, 4969–4976.
- Ishitani, T., Kishida, S., Hyodo-Miura, J., Ueno, N., Yasuda, J., Waterman, M., Shibuya, H., Moon, R.T., Ninomiya-Tsuji, J., and Matsumoto, K. (2003). The TAK1-NLK Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade Functions in the Wnt-5a/ Ca^{2+} Pathway To Antagonize Wnt/ β -Catenin Signaling. *Mol. Cell. Biol.* 23, 131–139.
- Jaks, V., Barker, N., Kasper, M., van Es, J.H., Snippert, H.J., Clevers, H., and Toftgård, R. (2008). Lgr5 marks cycling, yet long-lived, hair follicle stem cells. *Nat. Genet.* 40, 1291–1299.
- Janda, C.Y., Waghray, D., Levin, A.M., Thomas, C., and Garcia, K.C. (2012). Structural basis of Wnt recognition by Frizzled. *Science* 337, 59–64.
- Jansen, K.M., and Pavlath, G.K. (2006). Mannose receptor regulates myoblast motility and muscle growth. *J. Cell Biol.* 174, 403–413.
- Jin, Y.-R., Turcotte, T.J., Crocker, A.L., Han, X.H., and Yoon, J.K. (2011). The canonical Wnt signaling activator, R-spondin2, regulates craniofacial patterning and morphogenesis within the branchial arch through ectodermal–mesenchymal interaction. *Dev. Biol.* 352, 1–13.
- Jo, C., Cho, S.-J., and Jo, S.A. (2011). Mitogen-activated Protein Kinase Kinase 1 (MEK1) Stabilizes MyoD through Direct Phosphorylation at Tyrosine 156 During Myogenic Differentiation. *J. Biol. Chem.* 286, 18903–18913.
- Joe, A.W.B., Yi, L., Natarajan, A., Le Grand, F., So, L., Wang, J., Rudnicki, M.A., and Rossi, F.M.V. (2010). Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat. Cell Biol.* 12,

153–163.

- Kalchauer, C., and Ben-Yair, R. (2005). Cell rearrangements during development of the somite and its derivatives. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *15*, 371–380.
- Kamata, T., Katsube, K., Michikawa, M., Yamada, M., Takada, S., and Mizusawa, H. (2004). R-spondin, a novel gene with thrombospondin type 1 domain, was expressed in the dorsal neural tube and affected in Wnts mutants. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Struct. Expr.* *1676*, 51–62.
- Kashimada, K., and Koopman, P. (2010). Sry: the master switch in mammalian sex determination. *Development* *137*, 3921–3930.
- Kasper, M., Jaks, V., Are, A., Bergström, Å., Schwäger, A., Svärd, J., Teglund, S., Barker, N., and Toftgård, R. (2011). Wounding enhances epidermal tumorigenesis by recruiting hair follicle keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 4099–4104.
- Kassir-Duchossoy, L., Giaccone, E., Gayraud-Morel, B., Jory, A., Gomès, D., and Tajbakhsh, S. (2005). Pax3/Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development. *Genes Dev.* *19*, 1426–1431.
- Kazanskaya, O., Glinka, A., del Barco Barrantes, I., Stanek, P., Niehrs, C., and Wu, W. (2004). R-Spondin2 Is a Secreted Activator of Wnt/ β -Catenin Signaling and Is Required for *Xenopus* Myogenesis. *Dev. Cell* *7*, 525–534.
- Kazanskaya, O., Ohkawara, B., Herault, M., Wu, W., Maltry, N., Augustin, H.G., and Niehrs, C. (2008). The Wnt signaling regulator R-spondin 3 promotes angioblast and vascular development. *Development* *135*, 3655–3664.
- Kikuchi, A., Yamamoto, H., Sato, A., and Matsumoto, S. (2011). Chapter 2 - New Insights into the Mechanism of Wnt Signaling Pathway Activation. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, K.W. Jeon, ed. (Academic Press), pp. 21–71.
- Kim, C.-H., Neiswender, H., Baik, E.J., Xiong, W.C., and Mei, L. (2008a). β -Catenin Interacts with MyoD and Regulates Its Transcription Activity. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 2941–2951.
- Kim, D.-H., Sarbassov, D.D., Ali, S.M., King, J.E., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D.M. (2002). mTOR Interacts with

Raptor to Form a Nutrient-Sensitive Complex that Signals to the Cell Growth Machinery. *Cell* 110, 163–175.

- Kim, K.-A., Kakitani, M., Zhao, J., Oshima, T., Tang, T., Binnerts, M., Liu, Y., Boyle, B., Park, E., Emtage, P., et al. (2005). Mitogenic influence of human R-spondin1 on the intestinal epithelium. *Science* 309, 1256–1259.
- Kim, K.-A., Zhao, J., Andarmani, S., Kakitani, M., Oshima, T., Binnerts, M.E., Abo, A., Tomizuka, K., and Funk, W.D. (2006). R-Spondin Proteins: A Novel Link to β -catenin Activation. *Cell Cycle* 5, 23–26.
- Kim, K.-A., Wagle, M., Tran, K., Zhan, X., Dixon, M.A., Liu, S., Gros, D., Korver, W., Yonkovich, S., Tomasevic, N., et al. (2008b). R-Spondin family members regulate the Wnt pathway by a common mechanism. *Mol. Biol. Cell* 19, 2588–2596.
- Kimelman, D., and Xu, W. (2006). β -Catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene* 25, 7482–7491.
- Klein, T.J., Jenny, A., Djiane, A., and Mlodzik, M. (2006). CK1 ϵ /discs overgrown Promotes Both Wnt-Fz/ β -Catenin and Fz/PCP Signaling in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 16, 1337–1343.
- Kohn, A.D., and Moon, R.T. (2005). Wnt and calcium signaling: β -Catenin-independent pathways. *Cell Calcium* 38, 439–446.
- Kollias, H.D., and McDermott, J.C. (2008). Transforming growth factor-beta and myostatin signaling in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 104, 579–587.
- Kong, R.C.K., Shilling, P.J., Lobb, D.K., Gooley, P.R., and Bathgate, R.A.D. (2010). Membrane receptors: Structure and function of the relaxin family peptide receptors. *Mol. Cell. Endocrinol.* 320, 1–15.
- Koopman, P., Gubbay, J., Vivian, N., Goodfellow, P., and Lovell-Badge, R. (1991). Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 351, 117–121.
- Krönke, G., Uderhardt, S., Kim, K.-A., Stock, M., Scholtysek, C., Zaiss, M.M., Surmann-Schmitt, C., Luther, J., Katzenbeisser, J., David, J.-P., et al. (2010). R-spondin 1 protects against inflammatory bone damage during murine arthritis by modulating the Wnt pathway. *Arthritis Rheum.* 62, 2303–2312.

- Kuang, S., Kuroda, K., Le Grand, F., and Rudnicki, M.A. (2007). Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell* 129, 999–1010.
- Kuang, S., Gillespie, M.A., and Rudnicki, M.A. (2008). Niche Regulation of Muscle Satellite Cell Self-Renewal and Differentiation. *Cell Stem Cell* 2, 22–31.
- Köhl, U., Ocalan, M., Timpl, R., Mayne, R., Hay, E., and von der Mark, K. (1984). Role of muscle fibroblasts in the deposition of type-IV collagen in the basal lamina of myotubes. *Differ. Res. Biol. Divers.* 28, 164–172.
- de Lau, W.B.M., Snel, B., and Clevers, H.C. (2012). The R-spondin protein family. *Genome Biol.* 13, 242.
- de Lau, W., Barker, N., Low, T.Y., Koo, B.-K., Li, V.S.W., Teunissen, H., Kujala, P., Haegbarth, A., Peters, P.J., van de Wetering, M., et al. (2011). Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. *Nature* 476, 293–297.
- de Lau, W., Peng, W.C., Gros, P., and Clevers, H. (2014). The R-spondin/Lgr5/Rnf43 module: regulator of Wnt signal strength. *Genes Dev.* 28, 305–316.
- Lee, J.M., Kim, I.S., Kim, H., Lee, J.S., Kim, K., Yim, H.Y., Jeong, J., Kim, J.H., Kim, J.-Y., Lee, H., et al. (2010). ROR α Attenuates Wnt/ β -Catenin Signaling by PKC α -Dependent Phosphorylation in Colon Cancer. *Mol. Cell* 37, 183–195.
- Le Grand, F., Jones, A.E., Seale, V., Scimè, A., and Rudnicki, M.A. (2009). Wnt7a activates the planar cell polarity pathway to drive the symmetric expansion of satellite stem cells. *Cell Stem Cell* 4, 535–547.
- Le Grand, F., Grifone, R., Mourikis, P., Houbron, C., Gigaudo, C., Pujol, J., Maillet, M., Pagès, G., Rudnicki, M., Tajbakhsh, S., et al. (2012). Six1 regulates stem cell repair potential and self-renewal during skeletal muscle regeneration. *J. Cell Biol.* 198, 815–832.
- Li, B., Rhéaume, C., Teng, A., Bilanchone, V., Munguia, J.E., Hu, M., Jessen, S., Piccolo, S., Waterman, M.L., and Dai, X. (2007). Developmental phenotypes and reduced Wnt signaling in mice deficient for pygopus 2. *Genesis* 45, 318–325.

- Li, J.-Y., Chai, B., Zhang, W., Fritze, D.M., Zhang, C., and Mulholland, M.W. (2014). LGR4 and its ligands, R-spondin 1 and R-spondin 3, regulate food intake in the hypothalamus of male rats. *Endocrinology* 155, 429–440.
- Li, S.-J., Yen, T.-Y., Endo, Y., Klauzinska, M., Baljinnyam, B., Macher, B., Callahan, R., and Rubin, J.S. (2009). Loss-of-function point mutations and two-furin domain derivatives provide insights about R-spondin2 structure and function. *Cell. Signal.* 21, 916.
- Lien, W.-H., and Fuchs, E. (2014). Wnt some lose some: transcriptional governance of stem cells by Wnt/ β -catenin signaling. *Genes Dev.* 28, 1517–1532.
- Liu, Z., and Habener, J.F. (2009). Stromal cell-derived factor-1 promotes survival of pancreatic beta cells by the stabilisation of beta-catenin and activation of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2). *Diabetologia* 52, 1589–1598.
- Liu, H., Remedi, M.S., Pappan, K.L., Kwon, G., Rohatgi, N., Marshall, C.A., and McDaniel, M.L. (2009). Glycogen Synthase Kinase-3 and Mammalian Target of Rapamycin Pathways Contribute to DNA Synthesis, Cell Cycle Progression, and Proliferation in Human Islets. *Diabetes* 58, 663–672.
- Liu, J., Pan, S., Hsieh, M.H., Ng, N., Sun, F., Wang, T., Kasibhatla, S., Schuller, A.G., Li, A.G., Cheng, D., et al. (2013). Targeting Wnt-driven cancer through the inhibition of Porcupine by LGK974. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 20224–20229.
- Liu, L., Cheung, T.H., Charville, G.W., and Rando, T.A. (2015). Isolation of skeletal muscle stem cells by fluorescence-activated cell sorting. *Nat. Protoc.* 10, 1612–1624.
- Liu, Y., Rubin, B., Bodine, P.V.N., and Billiard, J. (2008). Wnt5a induces homodimerization and activation of Ror2 receptor tyrosine kinase. *J. Cell. Biochem.* 105, 497–502.
- Longo, K.A., Wright, W.S., Kang, S., Gerin, I., Chiang, S.-H., Lucas, P.C., Opp, M.R., and MacDougald, O.A. (2004). Wnt10b Inhibits Development of White and Brown Adipose Tissues. *J. Biol. Chem.* 279, 35503–35509.
- Lorenz, B., Bohnensack, R., Gamulin, V., Steffen, R., and Müller, W.E.G. (1996). Regulation of motility of cells from marine sponges by calcium ions.

Cell. Signal. 8, 517–524.

- Lüchtenborg, M., Weijnenberg, M.P., Wark, P.A., Saritas, A.M., Roemen, G.M., van Muijen, G.N., de Bruïne, A.P., van den Brandt, P.A., and de Goeij, A.F. (2005). Mutations in APC, CTNNB1 and K-ras genes and expression of hMLH1 in sporadic colorectal carcinomas from the Netherlands Cohort Study. *BMC Cancer* 5, 160.
- Lyu, J., Jho, E., and Lu, W. (2011). Smek promotes histone deacetylation to suppress transcription of Wnt target gene brachyury in pluripotent embryonic stem cells. *Cell Res.* 21, 911–921.
- Maatouk, D.M., Mork, L., Chassot, A.-A., Marie-Christine, C., and Capel, B. (2013). Disruption of mitotic arrest precedes precocious differentiation and transdifferentiation of pregranulosa cells in the perinatal Wnt4 mutant ovary. *Dev. Biol.* 383, 295–306.
- Maltzahn, J. von, Jones, A.E., Parks, R.J., and Rudnicki, M.A. (2013). Pax7 is critical for the normal function of satellite cells in adult skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 16474–16479.
- von Maltzahn, J., Bentzinger, C.F., and Rudnicki, M.A. (2011). Wnt7a/Fzd7 Signalling Directly Activates the Akt/mTOR Anabolic Growth Pathway in Skeletal Muscle. *Nat. Cell Biol.* 14, 186–191.
- von Maltzahn, J., Chang, N.C., Bentzinger, C.F., and Rudnicki, M.A. (2012a). Wnt Signaling in Myogenesis. *Trends Cell Biol.* 22, 602–609.
- von Maltzahn, J., Renaud, J.-M., Parise, G., and Rudnicki, M.A. (2012b). Wnt7a treatment ameliorates muscular dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 20614–20619.
- Mann, C.J., Perdiguero, E., Kharraz, Y., Aguilar, S., Pessina, P., Serrano, A.L., and Muñoz-Cánoves, P. (2011). Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. *Skelet. Muscle* 1, 21.
- Mansouri, A., Stoykova, A., Torres, M., and Gruss, P. (1996). Dysgenesis of cephalic neural crest derivatives in Pax7^{-/-} mutant mice. *Development* 122, 831–838.
- Mao, B., Wu, W., Davidson, G., Marhold, J., Li, M., Mechler, B.M., Delius, H., Hoppe, D., Stannek, P., Walter, C., et al. (2002). Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/ β -catenin signalling. *Nature* 417, 664–

667.

- Mao, J., Wang, J., Liu, B., Pan, W., Farr III, G.H., Flynn, C., Yuan, H., Takada, S., Kimelman, D., Li, L., et al. (2001). Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-5 Binds to Axin and Regulates the Canonical Wnt Signaling Pathway. *Mol. Cell* 7, 801–809.
- Matsumura, K., Tomé, F.M., Ionasescu, V., Ervasti, J.M., Anderson, R.D., Romero, N.B., Simon, D., Récan, D., Kaplan, J.C., and Fardeau, M. (1993). Deficiency of dystrophin-associated proteins in Duchenne muscular dystrophy patients lacking COOH-terminal domains of dystrophin. *J. Clin. Invest.* 92, 866–871.
- Mauro, A. (1961). Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9, 493–495.
- McKinnell, I.W., Ishibashi, J., Le Grand, F., Punch, V.G.J., Addicks, G.C., Greenblatt, J.F., Dilworth, F.J., and Rudnicki, M.A. (2008). Pax7 activates myogenic genes by recruitment of a histone methyltransferase complex. *Nat. Cell Biol.* 10, 77–84.
- McLennan, I.S. (1996). Degenerating and regenerating skeletal muscles contain several subpopulations of macrophages with distinct spatial and temporal distributions. *J. Anat.* 188, 17–28.
- Millay, D.P., O'Rourke, J.R., Sutherland, L.B., Bezprozvannaya, S., Shelton, J.M., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2013). Myomaker: A membrane activator of myoblast fusion and muscle formation. *Nature* 499, 301–305.
- Miller, J.R. (2002). The Wnts. *Genome Biol.* 3, reviews3001.1–reviews3001.15.
- Miyazaki, M., and Esser, K.A. (2009). Cellular mechanisms regulating protein synthesis and skeletal muscle hypertrophy in animals. *J. Appl. Physiol.* 106, 1367–1373.
- Molkentin, J.D., and Olson, E.N. (1996). Defining the regulatory networks for muscle development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6, 445–453.
- Monkley, S.J., Delaney, S.J., Pennisi, D.J., Christiansen, J.H., and Wainwright, B.J. (1996). Targeted disruption of the Wnt2 gene results in placental defects. *Development* 122, 3343–3353.
- Montalvo-Ortiz, B.L., Castillo-Pichardo, L., Hernández, E., Humphries-

- Bickley, T., De la Mota-Peynado, A., Cubano, L.A., Vlaar, C.P., and Dharmawardhane, S. (2012). Characterization of EHOp-016, novel small molecule inhibitor of Rac GTPase. *J. Biol. Chem.* 287, 13228–13238.
- Mori, H., Inoki, K., Opland, D., Münzberg, H., Villanueva, E.C., Faouzi, M., Ikenoue, T., Kwiatkowski, D.J., MacDougald, O.A., Myers, M.G., et al. (2009). Critical roles for the TSC-mTOR pathway in β -cell function. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 297, E1013–E1022.
 - Mosimann, C., Hausmann, G., and Basler, K. (2009). β -Catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 276–286.
 - Murphy, M.M., Keefe, A.C., Lawson, J.A., Flygare, S.D., Yandell, M., and Kardon, G. (2014). Transiently Active Wnt/ β -Catenin Signaling Is Not Required but Must Be Silenced for Stem Cell Function during Muscle Regeneration. *Stem Cell Rep.* 3, 475–488.
 - Musarò, A. (2014). The Basis of Muscle Regeneration, The Basis of Muscle Regeneration. *Adv. Biol. Adv. Biol.* 2014, 2014, e612471.
 - Mustata, R.C., Van Loy, T., Lefort, A., Libert, F., Strollo, S., Vassart, G., and Garcia, M.-I. (2011). Lgr4 is required for Paneth cell differentiation and maintenance of intestinal stem cells ex vivo. *EMBO Rep.* 12, 558–564.
 - Nagase, M., and Fujita, T. (2013). Role of Rac1–mineralocorticoid-receptor signalling in renal and cardiac disease. *Nat. Rev. Nephrol.* 9, 86–98.
 - Nam, J.-S., Turcotte, T.J., Smith, P.F., Choi, S., and Yoon, J.K. (2006). Mouse Cristin/R-spondin Family Proteins Are Novel Ligands for the Frizzled 8 and LRP6 Receptors and Activate β -Catenin-dependent Gene Expression. *J. Biol. Chem.* 281, 13247–13257.
 - Nam, J.-S., Turcotte, T.J., and Yoon, J.K. (2007a). Dynamic expression of R-spondin family genes in mouse development. *Gene Expr. Patterns* 7, 306–312.
 - Nam, J.-S., Park, E., Turcotte, T.J., Palencia, S., Zhan, X., Lee, J., Yun, K., Funk, W.D., and Yoon, J.K. (2007b). Mouse R-spondin2 is required for apical ectodermal ridge maintenance in the hindlimb. *Dev. Biol.* 311, 124–135.
 - Naujok, O., Lentjes, J., Diekmann, U., Davenport, C., and Lenzen, S. (2014).

Cytotoxicity and activation of the Wnt/beta-catenin pathway in mouse embryonic stem cells treated with four GSK3 inhibitors. *BMC Res. Notes* 7, 273.

- Niehrs, C. (2012). The complex world of WNT receptor signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 767–779.
- Nusse, R., and Varmus, H.E. (1982). Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 31, 99–109.
- Ohkawara, B., Glinka, A., and Niehrs, C. (2011). Rspo3 Binds Syndecan 4 and Induces Wnt/PCP Signaling via Clathrin-Mediated Endocytosis to Promote Morphogenesis. *Dev. Cell* 20, 303–314.
- Ohlendieck, K., and Campbell, K.P. (1991). Dystrophin-associated proteins are greatly reduced in skeletal muscle from mdx mice. *J. Cell Biol.* 115, 1685–1694.
- Oka, D., Yamashita, S., Tomioka, T., Nakanishi, Y., Kato, H., Kaminishi, M., and Ushijima, T. (2009). The presence of aberrant DNA methylation in noncancerous esophageal mucosae in association with smoking history. *Cancer* 115, 3412–3426.
- Okumura, N., Nakamura, T., Kay, E.P., Nakahara, M., Kinoshita, S., and Koizumi, N. (2014). R-spondin1 regulates cell proliferation of corneal endothelial cells via the Wnt3a/ β -catenin pathway. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 55, 6861–6869.
- Olguin, H.C., Yang, Z., Tapscott, S.J., and Olwin, B.B. (2007). Reciprocal inhibition between Pax7 and muscle regulatory factors modulates myogenic cell fate determination. *J. Cell Biol.* 177, 769–779.
- Ono, Y., Boldrin, L., Knopp, P., Morgan, J.E., and Zammit, P.S. (2010). Muscle satellite cells are a functionally heterogeneous population in both somite-derived and branchiomic muscles. *Dev. Biol.* 337, 29–41.
- Ono, Y., Masuda, S., Nam, H., Benezra, R., Miyagoe-Suzuki, Y., and Takeda, S. (2012). Slow-dividing satellite cells retain long-term self-renewal ability in adult muscle. *J Cell Sci* 125, 1309–1317.
- Ootani, A., Li, X., Sangiorgi, E., Ho, Q.T., Ueno, H., Toda, S., Sugihara, H., Fujimoto, K., Weissman, I.L., Capecchi, M.R., et al. (2009). Sustained in

vitro intestinal epithelial culture within a Wnt-dependent stem cell niche. *Nat. Med.* *15*, 701–706.

- Ornatsky, O.I., Andreucci, J.J., and McDermott, J.C. (1997). A Dominant-Negative Form of Transcription Factor MEF2 Inhibits Myogenesis. *J. Biol. Chem.* *272*, 33271–33278.
- Otto, A., Schmidt, C., Luke, G., Allen, S., Valasek, P., Muntoni, F., Lawrence-Watt, D., and Patel, K. (2008). Canonical Wnt signalling induces satellite-cell proliferation during adult skeletal muscle regeneration. *J. Cell Sci.* *121*, 2939–2950.
- Padykula, H.A., and Gauthier, G.F. (1970). The Ultrastructure of the Neuromuscular Junctions of Mammalian Red, White, and Intermediate Skeletal Muscle Fibers. *J. Cell Biol.* *46*, 27–41.
- Parisi, A., Lacour, F., Giordani, L., Colnot, S., Maire, P., and Le Grand, F. (2015). APC is required for muscle stem cell proliferation and skeletal muscle tissue repair. *J. Cell Biol.* *210*, 717–726.
- Parker, D.S., Ni, Y.Y., Chang, J.L., Li, J., and Cadigan, K.M. (2008). Wingless Signaling Induces Widespread Chromatin Remodeling of Target Loci. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 1815–1828.
- Parma, P., Radi, O., Vidal, V., Chaboissier, M.C., Dellambra, E., Valentini, S., Guerra, L., Schedl, A., and Camerino, G. (2006). R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nat. Genet.* *38*, 1304–1309.
- Pastoret, C., and Sebillé, A. (1993). Further aspects of muscular dystrophy in mdx mice. *Neuromuscul. Disord.* *3*, 471–475.
- Peifer, M., Rauskolb, C., Williams, M., Riggelman, B., and Wieschaus, E. (1991). The segment polarity gene armadillo interacts with the wingless signaling pathway in both embryonic and adult pattern formation. *Development* *111*, 1029–1043.
- Pfeiffer, S., Ricardo, S., Manneville, J.-B., Alexandre, C., and Vincent, J.-P. (2002). Producing Cells Retain and Recycle Wingless in *Drosophila* Embryos. *Curr. Biol.* *12*, 957–962.
- Piao, S., Lee, S.-H., Kim, H., Yum, S., Stamos, J.L., Xu, Y., Lee, S.-J., Lee, J., Oh, S., Han, J.-K., et al. (2008). Direct Inhibition of GSK3 β by the

Phosphorylated Cytoplasmic Domain of LRP6 in Wnt/ β -Catenin Signaling. *PLoS ONE* 3.

- Pinto, D., and Clevers, H. (2005). Wnt control of stem cells and differentiation in the intestinal epithelium. *Exp. Cell Res.* 306, 357–363.
- Pinto, D., Gregorieff, A., Begthel, H., and Clevers, H. (2003). Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev.* 17, 1709–1713.
- Polakis, P. (2007). The many ways of Wnt in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 17, 45–51.
- Polesskaya, A., Seale, P., and Rudnicki, M.A. (2003). Wnt signaling induces the myogenic specification of resident CD45⁺ adult stem cells during muscle regeneration. *Cell* 113, 841–852.
- Poole, K.J.V., Lorenz, M., Evans, G., Rosenbaum, G., Pirani, A., Craig, R., Tobacman, L.S., Lehman, W., and Holmes, K.C. (2006). A comparison of muscle thin filament models obtained from electron microscopy reconstructions and low-angle X-ray fibre diagrams from non-overlap muscle. *J. Struct. Biol.* 155, 273–284.
- Prestwich, T.C., and MacDougald, O.A. (2007). Wnt/ β -catenin signaling in adipogenesis and metabolism. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 612–617.
- Rådegran, G., and Saltin, B. (1998). Muscle blood flow at onset of dynamic exercise in humans. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 274, H314–H322.
- Rattner, A., Hsieh, J.-C., Smallwood, P.M., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Nathans, J. (1997). A family of secreted proteins contains homology to the cysteine-rich ligand-binding domain of frizzled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 2859–2863.
- Reshef, R., Maroto, M., and Lassar, A.B. (1998). Regulation of dorsal somitic cell fates: BMPs and Noggin control the timing and pattern of myogenic regulator expression. *Genes Dev.* 12, 290–303.
- Riggleman, B., Schedl, P., and Wieschaus, E. (1990). Spatial expression of the *Drosophila* segment polarity gene *armadillo* is posttranscriptionally regulated by *wingless*. *Cell* 63, 549–560.
- Roose, J., Molenaar, M., Peterson, J., Hurenkamp, J., Brantjes, H., Moerer, P., van de Wetering, M., Destree, O., and Clevers, H. (1998). The *Xenopus*

Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors. *Nature* 395, 608–612.

- Rowan, A.J., Lamlum, H., Ilyas, M., Wheeler, J., Straub, J., Papadopolou, A., Bicknell, D., Bodmer, W.F., and Tomlinson, I.P.M. (2000). APC mutations in sporadic colorectal tumors: A mutational “hotspot” and interdependence of the “two hits.” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 3352–3357.
- Roy, R.R., Pierotti, D.J., Garfinkel, A., Zhong, H., Baldwin, K.M., and Edgerton, V.R. (2008). Persistence of motor unit and muscle fiber types in the presence of inactivity. *J. Exp. Biol.* 211, 1041–1049.
- Rudolf, A., Schirwis, E., Giordani, L., Parisi, A., Lepper, C., Taketo, M.M., and Le Grand, F. (2016). β -Catenin Activation in Muscle Progenitor Cells Regulates Tissue Repair. *Cell Rep.* 15, 1277–1290.
- Rulifson, I.C., Karnik, S.K., Heiser, P.W., ten Berge, D., Chen, H., Gu, X., Taketo, M.M., Nusse, R., Hebrok, M., and Kim, S.K. (2007). Wnt signaling regulates pancreatic β cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 6247–6252.
- Sabourin, L.A., Girgis-Gabardo, A., Seale, P., Asakura, A., and Rudnicki, M.A. (1999). Reduced Differentiation Potential of Primary MyoD^{-/-} Myogenic Cells Derived from Adult Skeletal Muscle. *J. Cell Biol.* 144, 631–643.
- Sadot, E., Conacci-Sorrell, M., Zhurinsky, J., Shnizer, D., Lando, Z., Zharhary, D., Kam, Z., Ben-Ze’ev, A., and Geiger, B. (2002). Regulation of S33/S37 phosphorylated β -catenin in normal and transformed cells. *J. Cell Sci.* 115, 2771–2780.
- Sartorelli, V., and Caretti, G. (2005). Mechanisms underlying the transcriptional regulation of skeletal myogenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 15, 528–535.
- Sato, A., Yamamoto, H., Sakane, H., Koyama, H., and Kikuchi, A. (2010). Wnt5a regulates distinct signalling pathways by binding to Frizzled2. *EMBO J.* 29, 41–54.
- Sato, T., Vries, R.G., Snippert, H.J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D.E., van Es, J.H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P.J., et al. (2009).

Single Lgr5 stem cells build crypt–villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459, 262–265.

- Scholz, B., Korn, C., Wojtarowicz, J., Mogler, C., Augustin, I., Boutros, M., Niehrs, C., and Augustin, H.G. (2016). Endothelial RSPO3 Controls Vascular Stability and Pruning through Non-canonical WNT/Ca²⁺/NFAT Signaling. *Dev. Cell* 36, 79–93.
- Schwartz, D.R., Wu, R., Kardia, S.L.R., Levin, A.M., Huang, C.-C., Shedden, K.A., Kuick, R., Misek, D.E., Hanash, S.M., Taylor, J.M.G., et al. (2003). Novel Candidate Targets of β -Catenin/T-cell Factor Signaling Identified by Gene Expression Profiling of Ovarian Endometrioid Adenocarcinomas. *Cancer Res.* 63, 2913–2922.
- Seale, P., Sabourin, L.A., Girgis-Gabardo, A., Mansouri, A., Gruss, P., and Rudnicki, M.A. (2000). Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* 102, 777–786.
- Sethi, J.K., and Vidal-Puig, A. (2010). Wnt signalling and the control of cellular metabolism. *Biochem. J.* 427, 1–17.
- Sethi, J.K., and Vidal-Puig, A.J. (2007). Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J. Lipid Res.* 48, 1253–1262.
- Shaikh, L.H., Zhou, J., Teo, A.E.D., Garg, S., Neogi, S.G., Figg, N., Yeo, G.S., Yu, H., Maguire, J.J., Zhao, W., et al. (2015). LGR5 Activates Noncanonical Wnt Signaling and Inhibits Aldosterone Production in the Human Adrenal. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 100, E836–E844.
- Shapiro, L., and Weis, W.I. (2009). Structure and Biochemistry of Cadherins and Catenins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1.
- Sharma, A.R., Choi, B.-S., Park, J.-M., Lee, D.-H., Lee, J.-E., Kim, H.-S., Yoon, J.-K., Song, D.-K., Nam, J.-S., and Lee, S.-S. (2013). Rspo 1 promotes osteoblast differentiation via Wnt signaling pathway. *Indian J. Biochem. Biophys.* 50, 19–25.
- Shiau, S.Y.L., Huang, M.C., and Lee, C.Y. (1976). Mechanism of action of cobra cardiotoxin in the skeletal muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 196, 758–770.
- Shinin, V., Gayraud-Morel, B., Gomès, D., and Tajbakhsh, S. (2006).

Asymmetric division and cosegregation of template DNA strands in adult muscle satellite cells. *Nat. Cell Biol.* 8, 677–682.

- Slusarski, D.C., Corces, V.G., and Moon, R.T. (1997). Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling. *Nature* 390, 410–413.
- Smalley, M.J., Sara, E., Paterson, H., Naylor, S., Cook, D., Jayatilake, H., Fryer, L.G., Hutchinson, L., Fry, M.J., and Dale, T.C. (1999). Interaction of axin and Dvl-2 proteins regulates Dvl-2-stimulated TCF-dependent transcription. *EMBO J.* 18, 2823–2835.
- Snippert, H.J., Haegebarth, A., Kasper, M., Jaks, V., Es, J.H. van, Barker, N., Wetering, M. van de, Born, M. van den, Begthel, H., Vries, R.G., et al. (2010). Lgr6 Marks Stem Cells in the Hair Follicle That Generate All Cell Lineages of the Skin. *Science* 327, 1385–1389.
- Snow, M.H. (1977). Myogenic cell formation in regenerating rat skeletal muscle injured by mincing II. An autoradiographic study. *Anat. Rec.* 188, 201–217.
- Soleimani, V.D., Punch, V.G., Kawabe, Y., Jones, A.E., Palidwor, G.A., Porter, C.J., Cross, J.W., Carvajal, J.J., Kockx, C.E.M., van IJcken, W.F.J., et al. (2012). Transcriptional dominance of Pax7 in adult myogenesis is due to high-affinity recognition of homeodomain motifs. *Dev. Cell* 22, 1208–1220.
- Sonnet, C., Lafuste, P., Arnold, L., Brigitte, M., Poron, F., Authier, F., Chrétien, F., Gherardi, R.K., and Chazaud, B. (2006). Human macrophages rescue myoblasts and myotubes from apoptosis through a set of adhesion molecular systems. *J. Cell Sci.* 119, 2497–2507.
- Staal, F.J.T., Luis, T.C., and Tiemessen, M.M. (2008). WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 581–593.
- Städeli, R., Hoffmans, R., and Basler, K. (2006). Transcription under the Control of Nuclear Arm/β-Catenin. *Curr. Biol.* 16, R378–R385.
- Starr, T.K., Allaei, R., Silverstein, K.A.T., Staggs, R.A., Sarver, A.L., Bergemann, T.L., Gupta, M., O’Sullivan, M.G., Matise, I., Dupuy, A.J., et al. (2009). A Transposon-Based Genetic Screen in Mice Identifies Genes

Altered in Colorectal Cancer. *Science* 323, 1747–1750.

- Strutt, H., Price, M.A., and Strutt, D. (2006). Planar Polarity Is Positively Regulated by Casein Kinase I ϵ in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 16, 1329–1336.
- Stubenvoll, A., Rice, M., Wietelmann, A., Wheeler, M., and Braun, T. (2015). Attenuation of Wnt/ β -catenin activity reverses enhanced generation of cardiomyocytes and cardiac defects caused by the loss of emerin. *Hum. Mol. Genet.* 24, 802–813.
- Sunderland, S., and Ray, L.J. (1950). Denervation changes in mammalian striated muscle. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 13, 159–177.
- Takada, R., Satomi, Y., Kurata, T., Ueno, N., Norioka, S., Kondoh, H., Takao, T., and Takada, S. (2006). Monounsaturated Fatty Acid Modification of Wnt Protein: Its Role in Wnt Secretion. *Dev. Cell* 11, 791–801.
- Tamai, K., Semenov, M., Kato, Y., Spokony, R., Liu, C., Katsuyama, Y., Hess, F., Saint-Jeannet, J.-P., and He, X. (2000). LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* 407, 530–535.
- Tamai, K., Zeng, X., Liu, C., Zhang, X., Harada, Y., Chang, Z., and He, X. (2004). A Mechanism for Wnt Coreceptor Activation. *Mol. Cell* 13, 149–156.
- Tan, X., Behari, J., Cieply, B., Michalopoulos, G.K., and Monga, S.P.S. (2006). Conditional Deletion of β -Catenin Reveals Its Role in Liver Growth and Regeneration. *Gastroenterology* 131, 1561–1572.
- Theodorou, V., Kimm, M.A., Boer, M., Wessels, L., Theelen, W., Jonkers, J., and Hilkens, J. (2007). MMTV insertional mutagenesis identifies genes, gene families and pathways involved in mammary cancer. *Nat. Genet.* 39, 759–769.
- Thorstensen, L., Lind, G.E., Løvig, T., Diep, C.B., Meling, G.I., Rognum, T.O., and Lothe, R.A. (2005). Genetic and Epigenetic Changes of Components Affecting the WNT Pathway in Colorectal Carcinomas Stratified by Microsatellite Instability. *Neoplasia N. Y.* N 7, 99–108.
- Tidball, J.G., and Bertoni, C. (2014). Purloined Mechanisms of Bacterial Immunity Can Cure Muscular Dystrophy. *Cell Metab.* 20, 927–929.
- Tong, W.-G., Wierda, W.G., Lin, E., Kuang, S.-Q., Bekele, B.N., Estrov, Z., Wei, Y., Yang, H., Keating, M.J., and Garcia-Manero, G. (2010). Genome-

wide DNA methylation profiling of chronic lymphocytic leukemia allows identification of epigenetically repressed molecular pathways with clinical impact. *Epigenetics* 5, 499–508.

- Topol, L., Jiang, X., Choi, H., Garrett-Beal, L., Carolan, P.J., and Yang, Y. (2003). Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3–independent β -catenin degradation. *J. Cell Biol.* 162, 899–908.
- Torres, M.A., Yang-Snyder, J.A., Purcell, S.M., DeMarais, A.A., and Moon, R.T. (1996). Activities of the Wnt-1 class of secreted signaling factors are antagonized by the Wnt-5A class and by a dominant negative cadherin in early *Xenopus* development. *J. Cell Biol.* 133, 1123–1137.
- Trenszt, F., Haroun, S., Cloutier, A., Richter, M.V., and Grenier, G. (2010). A muscle resident cell population promotes fibrosis in hindlimb skeletal muscles of mdx mice through the Wnt canonical pathway. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 299, C939–C947.
- Tsivitse, S. (2010). Notch and Wnt Signaling, Physiological Stimuli and Postnatal Myogenesis. *Int. J. Biol. Sci.* 6, 268–281.
- Uezumi, A., Fukada, S., Yamamoto, N., Takeda, S. 'ichi, and Tsuchida, K. (2010). Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat. Cell Biol.* 12, 143–152.
- Urciuolo, A., Quarta, M., Morbidoni, V., Gattazzo, F., Molon, S., Grumati, P., Montemurro, F., Tedesco, F.S., Blaauw, B., Cossu, G., et al. (2013). Collagen VI regulates satellite cell self-renewal and muscle regeneration. *Nat. Commun.* 4, 1964.
- Vainio, S., Heikkilä, M., Kispert, A., Chin, N., and McMahon, A.P. (1999). Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* 397, 405–409.
- Velden, J.L.J. van der, Langen, R.C.J., Kelders, M.C.J.M., Wouters, E.F.M., Janssen-Heininger, Y.M.W., and Schols, A.M.W.J. (2006). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 β activity is sufficient to stimulate myogenic differentiation. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 290, C453–C462.
- Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R.S., and Horwitz, A.R. (2009). Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 778–790.

- Vladar, E.K., Antic, D., and Axelrod, J.D. (2009). Planar Cell Polarity Signaling: The Developing Cell's Compass. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1.
- Welters, H.J., and Kulkarni, R.N. (2008). Wnt signaling: relevance to β -cell biology and diabetes. *Trends Endocrinol. Metab.* 19, 349–355.
- Willert, K., Brown, J.D., Danenberg, E., Duncan, A.W., Weissman, I.L., Reya, T., Yates, J.R., and Nusse, R. (2003). Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 423, 448–452.
- Winkel, A., Stricker, S., Tylzanowski, P., Seiffart, V., Mundlos, S., Gross, G., and Hoffmann, A. (2008). Wnt-ligand-dependent interaction of TAK1 (TGF- β -activated kinase-1) with the receptor tyrosine kinase Ror2 modulates canonical Wnt-signalling. *Cell. Signal.* 20, 2134–2144.
- Wong, V.S.C., Yeung, A., Schultz, W., and Brubaker, P.L. (2010). R-spondin-1 Is a Novel β -Cell Growth Factor and Insulin Secretagogue. *J. Biol. Chem.* 285, 21292–21302.
- Wood, W.M., Etemad, S., Yamamoto, M., and Goldhamer, D.J. (2013). MyoD-expressing progenitors are essential for skeletal myogenesis and satellite cell development. *Dev. Biol.* 384.
- Wozniak, A.C., and Anderson, J.E. (2007). Nitric oxide-dependence of satellite stem cell activation and quiescence on normal skeletal muscle fibers. *Dev. Dyn.* 236, 240–250.
- Wu, R., Li, H., Zhai, L., Zou, X., Meng, J., Zhong, R., Li, C., Wang, H., Zhang, Y., and Zhu, D. (2015). MicroRNA-431 accelerates muscle regeneration and ameliorates muscular dystrophy by targeting Pax7 in mice. *Nat. Commun.* 6, 7713.
- Xu, K., Xu, Y., Rajashankar, K.R., Robev, D., and Nikolov, D.B. (2013). Crystal Structures of Lgr4 and its complex with R-spondin1. *Struct. Lond. Engl.* 1993 21, 1683–1689.
- Xu, Q., Wang, Y., Dabdoub, A., Smallwood, P.M., Williams, J., Woods, C., Kelley, M.W., Jiang, L., Tasman, W., Zhang, K., et al. (2004). Vascular Development in the Retina and Inner Ear: Control by Norrin and Frizzled-4, a High-Affinity Ligand-Receptor Pair. *Cell* 116, 883–895.
- Yamada, S., Pokutta, S., Drees, F., Weis, W.I., and Nelson, W.J. (2005).

Deconstructing the Cadherin-Catenin-Actin Complex. *Cell* 123, 889–901.

- Yamada, W., Nagao, K., Horikoshi, K., Fujikura, A., Ikeda, E., Inagaki, Y., Kakitani, M., Tomizuka, K., Miyazaki, H., Suda, T., et al. (2009). Craniofacial malformation in R-spondin2 knockout mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 381, 453–458.
- Yin, H., Price, F., and Rudnicki, M.A. (2013). Satellite Cells and the Muscle Stem Cell Niche. *Physiol. Rev.* 93, 23–67.
- Yoon, J.K., and Lee, J.-S. (2012). Cellular signaling and biological functions of R-spondins. *Cell. Signal.* 24, 369–377.
- Zebisch, M., Xu, Y., Krastev, C., MacDonald, B.T., Chen, M., Gilbert, R.J.C., He, X., and Jones, E.Y. (2013). Structural and molecular basis of ZNRF3/RNF43 transmembrane ubiquitin ligase inhibition by the Wnt agonist R-spondin. *Nat. Commun.* 4.
- Zeng, X., Tamai, K., Doble, B., Li, S., Huang, H., Habas, R., Okamura, H., Woodgett, J., and He, X. (2005). A dual-kinase mechanism for Wnt coreceptor phosphorylation and activation. *Nature* 438, 873–877.
- Zeng, X., Huang, H., Tamai, K., Zhang, X., Harada, Y., Yokota, C., Almeida, K., Wang, J., Doble, B., Woodgett, J., et al. (2008). Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions. *Development* 135, 367–375.
- Zhang, C., Li, Y., Wu, Y., Wang, L., Wang, X., and Du, J. (2013). Interleukin-6/Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) Pathway Is Essential for Macrophage Infiltration and Myoblast Proliferation during Muscle Regeneration. *J. Biol. Chem.* 288, 1489–1499.
- Zhang, K., Sha, J., and Harter, M.L. (2010). Activation of Cdc6 by MyoD is associated with the expansion of quiescent myogenic satellite cells. *J. Cell Biol.* 188, 39–48.
- Zhao, J., de Vera, J., Narushima, S., Beck, E.X., Palencia, S., Shinkawa, P., Kim, K., Liu, Y., Levy, M.D., Berg, D.J., et al. (2007). R-spondin1, A Novel Intestinitrophic Mitogen, Ameliorates Experimental Colitis in Mice. *Gastroenterology* 132, 1331–1343.

