

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE Science – Technologie – Santé

FACULTE des Sciences et Techniques

Unité de Génétique Moléculaire Animale

UMR 1061 INRA/Université de Limoges

Thèse n°802008

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Biologie, Sciences, Santé

Présentée et soutenue le **17 décembre 2008** par :

Aymeric AUDFRAY

**La protéine-*O*-fucosyltransférase 1 (Pofut1) :
Caractérisation fonctionnelle et régulation de la voie
de signalisation de Notch au cours de la myogenèse.**

Directeurs de thèse : Pr Abderrahman MAFTAH et Dr Agnès GERMOT

Jury :

Rapporteurs : **Christelle BRETON**, Professeur, Université Grenoble 1
Serge A. LEIBOVITCH, Directeur de Recherche INSERM, Montpellier

Examineurs : **Véronique BLANQUET**, Professeur, Université de Limoges
Muriel GRAMMONT, Chargé de Recherche CNRS, Clermont-Ferrand 1
Agnès GERMOT, Maître de conférences, Université de Limoges
Abderrahman MAFTAH, Professeur, Université de Limoges

Résumé :

La myogenèse du muscle squelettique est un processus complexe dont certaines étapes sont régulées par la voie de signalisation de Notch. Chez les Mammifères, la présence de *O*-fucosylglycannes sur la partie extracellulaire des récepteurs Notch influence l'activation de la voie de signalisation. Leur synthèse débute par l'action de la *O*-fucosyltransférase Pofut1. Au cours de ce travail de thèse, nous avons mis en évidence, par mutagenèse dirigée, l'implication du site conservé de *N*-glycosylation N⁶⁵ pour l'intégrité structurale de Pofut1. Ceci constitue un nouvel exemple de l'influence de la *N*-glycosylation dans le repliement des glycoprotéines. Des analyses combinant l'utilisation de la lignée de cellules myoblastiques C2C12 et le suivi de l'expression des gènes de la myogenèse, constructeurs des *O*-fucosylglycannes et des acteurs de la voie de Notch, par PCR quantitative en temps réel et à haut débit, nous ont permis de proposer un modèle décrivant le fonctionnement de la voie de signalisation de Notch durant la différenciation myogénique. Ce modèle met en évidence le rôle majeur de plusieurs acteurs de cette voie de signalisation comme Dll1, Notch3, Lfng et Pofut1. Il constitue un point de départ nécessaire aux analyses de la sur- et sous-expression de Pofut1 lors de la différenciation myogénique. Dans cette perspective, nous avons construit une souche de cellules C2C12 surexprimant Pofut1. A terme, les études sur les modifications de l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse des *O*-fucosylglycannes nous permettront de connaître plus précisément, les mécanismes moléculaires qui orchestrent la voie de signalisation de Notch dans le processus de myogenèse.

Abstract :

Skeletal myogenesis is a complex process in which some steps are regulated by Notch signaling pathway. In mammals, the presence of *O*-fucosylglycans on the extracellular domain of Notch receptors influences the activation of signalling pathway. Pofut1 is an *O*-fucosyltransferase that initiates *O*-fucosylglycans synthesis. During this thesis work, we have identified, by site-directed mutagenesis, the involvement of the conserved *N*-glycosylation site at position 65, N⁶⁵, in Pofut1 structural integrity. This is an additional example of the influence of *N*-glycosylation in glycoprotein folding. Analysis using myogenic C2C12 cell line, and real-time quantitative PCR allowed us to study expression of genes involved in myogenesis, Notch signaling and *O*-fucosylglycans synthesis. We consequently suggest a model which defines the mechanism of Notch signaling during myogenic differentiation. This model highlights the essential role of several actors of this signalling pathway including Dll1, Notch3, Lfng and Pofut1. It constitutes a necessary starting point for further studies concerning Pofut1 over- and down-expression, during myogenic differentiation. Therefore, we created a C2C12 cell line over-expressing Pofut1. Ultimately, studies on expression modifications of genes implicated in *O*-fucosylglycan biosynthesis will enable us to more precisely understand molecular mechanisms that orchestrate Notch signalling in the process of myogenesis.

Remerciements

Ces trois années de thèse représentent, avant tout, un investissement personnel conséquent, cependant, ce travail n'aurait en aucun cas pu aboutir sans l'aide et le soutien de mon entourage. Je souhaite donc, avec ces quelques lignes, remercier l'ensemble des gens qui ont contribué directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

Je souhaite tout d'abord adresser un grand merci à mes deux directeurs de thèse, Agnès GERMOT et Abdou MAFTAH pour m'avoir, dans un premier temps accueilli au sein du laboratoire et ensuite encadré et formé tout au long de ces trois années. Je vous remercie donc de tout mon cœur, de m'avoir accordé votre confiance à la réalisation de ce projet de recherche. Nos discussions, nos oppositions, nos joies, nos moments de doutes,...ont été pour moi une source d'enrichissement immense.

Je tiens aussi à remercier mon jury de thèse pour avoir accepté de juger ce travail. Les rapporteurs, Christelle BRETON et Serge LEIBOVITCH ainsi que les examinateurs Muriel GRAMMONT et Véronique BLANQUET.

Merci également à l'ensemble des membres du laboratoire, je ne vais pas citer tout le monde, mais j'estime que vous avez grandement contribué à mon insertion, ma formation, et à mon envie de venir tous les jours au travail. Je vous remercie surtout de m'avoir supporté chaque jour de ces trois années. Je tiens à adresser un merci particulier aux enseignants qui m'ont aidé tout au long des heures d'enseignement effectuées dans le contexte du monitorat, aux personnes ayant contribué à ma formation scientifique et à tous ceux que je considère maintenant comme des amis plus que comme des relations professionnelles.

Je ne serais pas là aujourd'hui sans la contribution des membres de ma famille, et en particulier mes parents qui m'ont donné les armes et les valeurs nécessaires pour affronter la vie. J'espère qu'ils sont aussi fiers de moi que j'ai d'estime pour eux.

Enfin, ces dernières lignes sont pour Valy, qui me supporte maintenant depuis plus de sept ans. Ton soutien, ta compréhension, ta confiance en moi, ton amour sont pour moi une source de bonheur et de bien être quotidienne.

Merci à tous.

Publications et Communications

Publications :

Audfray A., Loriol C., Dupuy F., Germot A. and Maftah A., (2007), The two N-glycans present on bovine Pofut1 are differently involved in its solubility and activity, *FEBS journal*, **274**, 1202-1211

Audfray A., Maftah A., Germot A., Towards a Molecular Mechanism for Notch Signaling Pathway during Myogenic Differentiation of C2C12, en préparation.

Communications écrites :

Audfray A., Loriol C., Dupuy F., Germot A. and Maftah A., The Presence of Glycan at First N-glycosylation Site Prevent Pofut1 Aggregation, *Benzon Symposium n°54: "Glycosylation: Opportunities in Drug Development"*, Copenhagen, June 11-14th, 2007

Audfray A., Germot A. et Maftah A., Un rôle pour les O-fucosylglycannes dans la myogenèse ? *Journée de l'IFR GEIST*, Limoges, septembre 2007

Janot M., Audfray A., Germot A., Dupuy F. and Maftah A., Transcriptional profiling of *Mus musculus* glyco-genes during muscle cell differentiation, *GLYCODEV2007*, Lille, December 9-13th, 2007

Audfray A., Maftah A., Germot A., La culture de cellules animales: Un modèle indispensable à la compréhension des processus biologiques, *Séminaire de la pluridisciplinarité*, Ecole doctorale Science-Technologie-Santé, Limoges, Juin 2008

Communication orale :

Audfray A., Rôle des O-fucosylglycannes portés par Notch dans le processus de myogenèse, Séminaire des Thésards du département de Génétique Animale de l'INRA, Avril 2007, Jouy-en-Josas (France)

Liste des abréviations

Actb: Actine β	Dner: Delta/Notch-like EGF repeats containing
ADN: Acide Désoxyribonucléique	Dox: Doxycycline
ADNc: Acide Désoxyribonucléique complémentaire	DSL: Delta/Serrate/Lag-2
ARN: Acide Ribonucléique	dl: Dishevelled
Asn: Asparagine	ECD: Notch Extracellular Domain
Ax: Abruptex	EGF: Epidermal Growth Factor
BCA: Bicinchoninic Acid	ERAD: ER-associated degradation pathway
bHLH: basic Helix-Loop-Helix	ES: Embryonic Stem
BMP: Bone Morphogenic Factor	FGF: Fibroblast Growth Factor
CCF: Cellule Compétente à la Fusion	FGFR: Fibroblast Growth Factor Receptor
CDG: Congenital Disorder of Glycosylation	FKRP: Fukutin related protein
Cdkn: Cyclin-dependent Kinase inhibitor	Fuc: Fucose
CF: Cellule Fondatrice	Fzd: Frizzled
CHO: Chinese Hamster Ovary	Gal: Galactose
CMP: Cytidine Monophosphate	GalT: Galactosyltransférase
CMV: Cytomegalovirus	Gapdh: Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
CNX: Calnexine	GDF: Growth Differentiation Factor
CRD: Cystein Rich Domain	GDP: Guanidine diphosphate
CRT: Calréticuline	GFP: Green Fluorescent Protein
CSL: CBF-1/Su(H)/Lag-1	GlcNAc: N-acétylglucosamine
Ct: Cycle threshold	GM: Growth Medium
C2C12: lignée myoblastique murine	Gmd: GDP-mannose-4,6-déshydratase
Des: Desmine	GMP: Guanidine monophosphate
DGC: Dystroglycane	G6pdx: Glucose-6-phosphate dehydrogenase
Dll: Delta-like	HAT: Histone Acetylase
Dlk: Delta-like homologue	HDAC: Histone Deacetylase
DM: Differentiation Medium	Hes: Hairy/Enhancer of Split
DMEM: Dubelcco's Modified Eagle's Medium	HGF: Hepatocyte Growth Factor

IGF: Insulin-like Growth Factor
Lbx1: Ladybird homebox 1
Lfng: Lunatic Fringe
LNR: Lin12/Notch Repeat
luc: luciférase
Maml1: Mastermind-like 1
Man: Mannose
Mef: Myocyte Enhancer Factor
Mfng: Manic Fringe
MNF: Myocyte Nuclear Factor
MRF: Myogenic Regulatory Factor
Msx: Muscle-segment homeobox
MyHC: Myosin Heavy Chain
Myog: Myogénine
NCAM: Neural Cell Adhesion Molecule
Ndkn: Nucleoside Diphosphate Kinase
NeuAc: Acide Neuraminique (Acide sialique)
NFATC: Nuclear Factor of Activated T-cells
NICD: Notch Intracellular Domain
NRR: Notch Negative Regulatory Region
OGT: O-glucosyltransférase
p.c.: *post-coïtum*
PCR: Polymerase Chain Reaction
PEST: Proline, Glutamate, Sérine, Thréonine
Pofut1: protéine-O-fucosyltransférase
POMT: Protéine-O-Mannosyltransférase
PSM: Presomitic Mesoderm
Raldh: Retinaldehyde dehydrogenase
RAM: RBPj Associate Molecule
RE: Reticulum Endoplasmique
Rfng: Radical Fringe
RT-PCR: Real-time Polymerase Chain Reaction
rtTA: reverse-tetracycline controlled transactivator
Ser: Sérine
SF: Scatter Factor
SOP: Sensory Organ Precursor
SRF: Serum Response Factor
Shh: Sonic Hedgehog
ShRNA: Short hairpin Ribonucleic Acid
SiaT: Sialyltransférase
spl: split
TACE: TNF α Converting Enzyme
TAD: Notch Transactivation Domain
Tbp: TATA box binding protein
Tcea1: Transcription elongation factor A1
TGF: Transforming Growth Factor
Thr: Thréonine
TLDA: TaqMan Low Density Array
TSR: Trombospondin type 1 repeat
ub: Ubiquitine
UDP: Uridine diphosphate
uPA: Urokinase Plasminogen Activator
VCAM: Vascular Cell Adhesion Molecule
Wnt: Wingless
wt: Wild Type
Xyl: Xylose

Sommaire

Avant-propos	6
Exposé bibliographique	10
LA MYOGENESE DU MUSCLE SQUELETTIQUE DU SOMITE A LA FIBRE MUSCULAIRE CONTRACTILE	8
I- La formation des somites	14
II- Axialisation dorso-ventrale	16
III- Formation du myotome	17
IV- Migration des précurseurs cellulaires des muscles	18
V- Détermination myogénique	20
VI- Prolifération des myoblastes	21
VII- Différenciation des myoblastes	22
1) <i>Déroulement de la différenciation</i>	22
2) <i>Gènes impliqués dans la différenciation</i>	23
- Arrêt de la prolifération et levée de l'inhibition de la différenciation	23
- L'activation du programme myogénique	24
- L'effet des contacts cellulaires	26
VIII- Fusion des myoblastes	27
IX- Myogenèse primaire et secondaire	31
X- Fibres lentes et rapides	31
XI- Les cellules satellites	32
1) <i>Origine embryonnaire des cellules satellites</i>	33
2) <i>Marqueurs moléculaires</i>	34
3) <i>Activation des cellules satellites</i>	34
LA VOIE DE SIGNALISATION DE NOTCH FONCTIONNEMENT ET IMPLICATION DANS LA MYOGENESE	37
I- Structure du récepteur Notch	37
1) <i>Le récepteur Notch est un hétérodimère</i>	38
2) <i>Domaine extracellulaire (ECD)</i>	38
3) <i>Domaine intracellulaire (NICD)</i>	39
II- Conservation de Notch chez différents taxons	40
1) <i>Notch est présent chez tous les métazoaires</i>	40
2) <i>Conservation structurale</i>	42
III- Fonctionnement de la voie de signalisation de Notch	43
1) <i>Interaction entre Notch et ses ligands DSL</i>	44
- Diversité des ligands de Notch	44
- Domaines structuraux impliqués dans l'interaction Notch/ligands	46
- Interaction de Notch avec Delta ou Serrate/Jagged	47
2) <i>Conséquences de cette interaction : les clivages protéolytiques</i>	47
3) <i>Les partenaires cytoplasmiques de NICD</i>	48

4) Dans le noyau, interaction avec les protéines de la famille CSL	49
5) Gènes cibles du complexe activé par NICD	50
IV- Rôles de la voie de signalisation de Notch	51
1) Inhibition latérale	51
2) Création d'une « frontière » entre deux types cellulaires	52
3) Création de deux lignées à partir d'une cellule mère	53
V- Implication de la voie de signalisation de Notch dans la myogenèse	54
1) La voie de signalisation de Notch à la base de l'horloge moléculaire dans la somitogenèse	55
2) Le maintien des progéniteurs myogéniques	56
3) La voie de signalisation de Notch et les cellules satellites	57
-Présence des cellules satellites	57
-Activation des cellules satellites	58
4) Mécanisme de l'inhibition de la différenciation des myoblastes	59
LA GLYCOSYLATION,	
UNE MODIFICATION ESSENTIELLE DES PROTEINES	61
I- La N-glycosylation	64
1) Biosynthèse des N-glycannes	64
2) Diversité des N-glycannes	65
3) Rôle des N-glycannes	67
-Dans la conformation des protéines	68
- Protection des N-glycoprotéines vis-à-vis de la protéolyse	70
- L'adressage subcellulaire des protéines	70
-Importance des N-glycannes pour les interactions protéine-protéine	70
4) Importance de la N-glycosylation au niveau de l'organisme : les CDGs	72
II- La O-glycosylation : Considérations générales	73
1) La O-mannosylation de l' α -dystroglycane	74
2) La O-glycosylation des motifs EGF-like	75
III- La O-fucosylation	76
1) La O-fucosylation des domaines TSRs	77
-L'enzyme Pofut2	78
-L'enzyme β 3GTL	78
-Rôle de la O-fucosylation des TSRs	79
2) La O-fucosylation des domaines EGF-like	79
IV- Biosynthèse des O-fucosylglycannes portés par les EGF-like	81
1) La Protéine-O-fucosyltransférase 1	81
2) La protéine Fringe	87
3) La protéine β 1,4-Galactosyltransférase 1	88
4) La protéine α 2,3-Sialyltransférase	88
V- Rôle des O-fucosylglycannes portés par les EGF-like	88
1) La protéine uPA (Urokinase-type plasminogen activator)	89
2) La protéine Cripto	89
3) Le récepteur Notch	90
4) Elimination ou ajout d'un site de O-fucosylation de Notch	91

Résultats-Discussion	93
ETUDE STRUCTURE/FONCTION DE LA PROTEINE POFUT	94
I- Publication 1	94
II- Résultats complémentaires	96
1) <i>Cinétique d'apparition de la protéine Pofut1</i>	96
2) <i>Mutagenèse de la forme b de Pofut1</i>	97
III- Conclusion	99
VOIE DE SIGNALISATION DE NOTCH DANS LA DIFFERENCIATION MYOGENIQUE	100
I- Construction de la carte TLDA « Myo-96-souris »	101
II- Mise au point de l'utilisation des TLDA : choix des gènes de référence	102
III- Publication 2	103
MODIFICATION DE L'EXPRESSION DE POFUT1 DANS LES CELLULES C2C12	125
I- Surexpression transitoire du gène <i>Pofut1</i>	125
1) <i>Vecteur utilisé</i>	125
2) <i>Surexpression de Pofut1 murine dans les cellules COS-1</i>	126
3) <i>Mise au point d'un protocole de transfection adapté aux cellules C2C12</i>	127
-Utilisation de la nucléofection	127
-Lipofection	128
4) <i>Effet de la surexpression de Pofut1 sur le déroulement de la myogenèse</i>	129
-Au niveau phénotypique	129
-Au niveau de l'expression des MRFs	129
II- Etablissement de lignées stables <i>Pofut1</i>	131
1) <i>Système utilisé</i>	131
2) <i>Etablissement de la lignée Rev-Tet-On</i>	133
3) <i>Etablissement de la lignée Rev-Tet-On-Pofut1</i>	135
III- Sous-expression du gène <i>Pofut1</i>	137
1) <i>Vecteur de shRNA</i>	137
2) <i>Observation phénotypique</i>	137
IV- Matériels et Méthodes	139
Conclusion	142
Bibliographie	146

Avant-propos

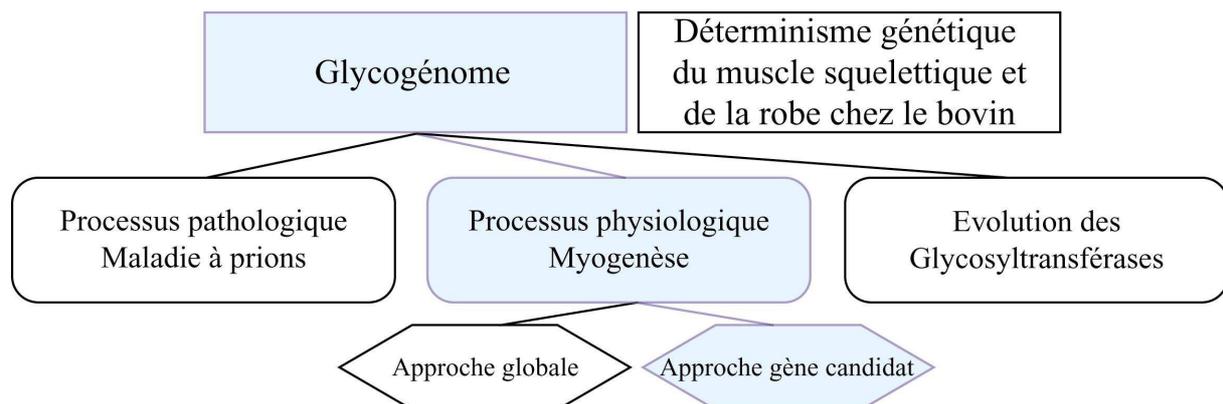
Au sein du département de génétique animale de l'INRA, l'Unité de Génétique Moléculaire Animale porte un intérêt particulier à la recherche des déterminants génétiques conditionnant le développement musculaire. La compréhension des mécanismes qui régulent la myogenèse pourrait s'avérer primordiale pour une future étude de la variabilité génétique déterminant la masse musculaire chez les animaux de rente. Ainsi, nous nous intéressons aux mécanismes moléculaires qui orchestrent les étapes de prolifération et de différenciation de la cellule musculaire. Ces études sur des mécanismes fondamentaux du développement présentent aussi, à moyen ou à plus long terme, plusieurs autres intérêts y compris dans le domaine de la recherche biomédicale. Les connaissances sur le déroulement de la myogenèse pourraient permettre la mise au point de thérapies concernant les maladies liées aux muscles squelettiques comme les dystrophies ou les myopathies. De plus, les cellules souches musculaires, responsables de la formation (développement embryonnaire et fœtal, croissance) et de la régénération (vie adulte) des muscles, représentent un espoir convaincant pour les thérapies cellulaires des dégénérescences musculaires et cardiaques.

Au cours du développement des vertébrés, certaines cellules somitiques vont se spécialiser en myoblastes puis se différencier progressivement en fibres musculaires. Cette différenciation est initiée et régulée par un réseau complexe de protéines. Certaines d'entre elles sont glycosylées. Plusieurs données bibliographiques récentes soulignent l'importance fonctionnelle des glycoprotéines (Smalheiser *et al.*, 1998) et des protéoglycannes (Papy-Garcia *et al.*, 2002) dans les processus myogéniques et la physiologie du muscle squelettique (Cieniewski-Bernard *et al.*, 2005). Certaines pathologies neuromusculaires humaines sont notamment dues à des mutations dans des gènes codant des glycosyltransférases (De Bernabe *et al.*, 2003).

Les structures saccharidiques ont pu accéder en 1988 au rang qui leur était dû, grâce à l'avènement d'une nouvelle discipline scientifique baptisée « Glycobiologie » par Rademacher, Parekh et Dwek. La Glycobiologie est donc une discipline récente alliant les fondements de la biochimie et de la biologie moléculaire des glucides. Son but est de décoder le sens de ce troisième alphabet des sucres, qui s'ajoute à celui des protéines et des acides

nucléiques. La structure, la (bio)synthèse et le rôle d'un grand nombre de glycannes ont aujourd'hui pu être définis dans des processus biologiques aussi variés allant de la fécondation chez les mammifères à l'intégrité des parois de certaines bactéries (peptidoglycannes), en passant par la structure des tissus chez les végétaux (cellulose, pectine,...). Etant donnée l'importance de ces molécules dans le monde vivant, leur étude revêt aujourd'hui un intérêt économique et un nombre conséquent d'entreprises de biotechnologies spécialisées dans la glycobiochimie ont vu le jour (synthèse de vaccins dirigés contre des oligosaccharides, mise au point de thérapies contre des protéines de la glycosylation, synthèse de biopolymères d'origine oligosaccharidique,...). Cependant, l'étude des glucides demeure très complexe (« I would say that glycoproteomics is at least an order of magnitude more difficult than proteomics », Anne Dell, Pr. de Biochimie des carbohydrates à l'Imperial College de Londres) et les travaux les concernant sont encore loin d'être achevés.

L'unité de génétique moléculaire animale (UGMA, www.umr1061.unilim.fr) est une unité mixte de recherche dont les tutelles sont l'université de Limoges et l'INRA. Son objectif scientifique principal est d'approfondir la connaissance du génome bovin et de son fonctionnement pour mieux comprendre comment la variabilité génétique contrôle la variabilité phénotypique de certains caractères d'intérêt agronomique. Son activité de recherche s'articule autour de deux grands axes : l'étude du glycogénome et sa contribution dans des processus physiologiques (différenciation musculaire) et pathologiques (maladies à prions), et l'étude du déterminisme génétique des caractéristiques du muscle et de la coloration de la robe chez les bovins (cf. Organigramme).



Organisation des équipes de recherche dans la thématique « Glycogénome » Unité de Génétique Moléculaire Animale

Mon travail de thèse s'inscrit dans la thématique « Glycogénome », qui compte une dizaine de statutaires qui se sont intéressés depuis quelques années à la caractérisation des gènes bovins de glycosyltransférases (Barreaud *et al.*, 2000 ; Javaud *et al.*, 2000 ; Loriol *et*

al., 2006), à l'étude des relations structure-fonction des enzymes codées par ces gènes (Dupuy *et al.*, 1999 ; Holmes *et al.*, 2000 ; Dupuy *et al.*, 2004 ; Loriol *et al.*, 2007), à l'évolution de ces enzymes dans le règne animal (Saunier *et al.*, 2001 ; Dupuy *et al.*, 2002 ; Javaud *et al.*, 2003 ; Petit *et al.*, 2006 ; Harduin-Lepers *et al.*, 2008) mais aussi, depuis peu, aux rôles de ces gènes dans certains processus développementaux comme la myogenèse ou pathologiques tels que les maladies à Prion (Barret *et al.*, 2005 ; Ermonval *et al.*, 2008).

En octobre 2005, j'ai rejoint l'équipe qui, au sein de cette thématique, étudie l'implication des glycannes et donc des gènes responsables de leur synthèse, dans le processus de myogenèse. Cette équipe composée de quatre statutaires utilise deux approches complémentaires pour répondre de manière optimale à ses objectifs. Une approche globale qui s'appuie sur l'utilisation d'outils technologiques à haut débit et qui consiste à examiner simultanément l'expression de 375 gènes de la glycosylation au cours de la différenciation de la cellule musculaire. Cette stratégie est conduite afin de révéler de nouveaux gènes pertinents à étudier plus en détail dans le processus de myogenèse. Une seconde approche dite « gène candidat », qui s'appuie sur les données de la littérature et les résultats de l'approche globale, cible les gènes qui contrôlent la glycosylation du récepteur Notch.

Les chercheurs impliqués dans la thématique « Glycogénome » se sont beaucoup intéressés par le passé aux fucosyltransférases et deux d'entre elles, Pofut1 et Pofut2, ont particulièrement retenue leur attention. L'enzyme Pofut1 est le point de départ essentiel de la synthèse des *O*-fucosylglycannes trouvés en abondance sur les récepteurs Notch, connus pour leurs implications dans l'inhibition du processus de myogenèse. Très peu de choses étaient connues, à l'époque, sur la deuxième enzyme, Pofut2. C'est ainsi que l'étude des deux gènes *Pofut1* et *Pofut2* a été entreprise, avec l'idée future de comprendre leur (possible) implication dans la myogenèse.

Mon projet de thèse s'est inscrit dans la continuité du travail de Céline Loriol dont la thèse, publiée en 2006, a été consacrée à l'identification, la caractérisation (organisation génomique, expressions spatio-temporelle,...) et à l'évolution (analyse phylogénétique) des gènes bovins *Pofut1* et *Pofut2*. Par la création et la maîtrise de nombreux outils (culture de cellules de mammifères, construction plasmidique, anticorps anti-Pofut1, ...), sa contribution scientifique a aussi permis d'initier plusieurs études fonctionnelles sur l'enzyme Pofut1 (étude structure-fonction, rôle lors du processus de myogenèse) qui ont servi de socle à mon travail de thèse.

D'un point de vue général, l'objectif de ma thèse a été de contribuer à l'étude du rôle des *O*-fucosylglycannes lors du processus de myogenèse, au travers de la voie de signalisation

de Notch. Afin de répondre de façon optimale à cet objectif, ma thèse peut se décliner en trois parties.

1- Caractérisation fonctionnelle de Pofut1 responsable de la biosynthèse des *O*-fucosylglycannes portés par les motifs EGF-like.

L'étude des caractéristiques des gènes et des protéines responsables de la synthèse des *O*-fucosylglycannes est un élément essentiel dans la compréhension des mécanismes de régulation de la voie de signalisation de Notch. Céline Loriol a déjà caractérisé les gènes bovins codant la protéine Pofut1. L'étape suivante, qui constitue la première partie de ce manuscrit, est l'étude du fonctionnement enzymatique de Pofut1 avec un intérêt tout particulier pour sa *N*-glycosylation.

2- Analyse de la voie de signalisation de Notch au cours du processus de myogenèse.

La voie de signalisation de Notch impliquée dans la myogenèse fait intervenir de nombreux acteurs plus ou moins bien décrits dans la littérature. De plus, quelques données bibliographiques contradictoires rendent l'influence de cette voie difficile à analyser dans ce contexte développemental. Cette partie de mon travail est en quelque sorte une mise à jour de la voie de signalisation de Notch au cours du processus de myogenèse. Pour aboutir à ce résultat, j'ai analysé l'expression des acteurs de la voie de signalisation de Notch, notamment des enzymes constructrices des *O*-fucosylglycannes, et des marqueurs myogéniques (soit un total de 90 gènes), au cours de la différenciation des myoblastes de la lignée murine C2C12, en prêtant une attention toute particulière aux deux types cellulaires que sont les myotubes et les cellules de réserve.

3- Conséquences de la modification des *O*-fucosylglycannes sur la myogenèse.

Une fois la voie de signalisation de Notch analysée dans un contexte de myogenèse « normale », il convient de modifier l'expression des gènes constructeurs des *O*-fucosylglycannes. Dans cette troisième partie, l'expression de *Pofut1* est modifiée dans la lignée de cellules C2C12 afin d'examiner l'effet de ces changements sur les acteurs de la voie de signalisation de Notch et sur le déroulement du programme myogénique.

Exposé bibliographique

La myogenèse du muscle squelettique

Du somite à la fibre musculaire contractile

Le corps humain comprend plus de 640 muscles qui représentent en moyenne 40% du poids sec du corps. Chez les vertébrés, il en existe trois grands types qui se distinguent par leurs caractéristiques développementales, structurales et fonctionnelles : le muscle squelettique, le muscle lisse et le muscle cardiaque. Afin de s'accorder au mieux aux objectifs de cette thèse, ce manuscrit fera référence uniquement au muscle squelettique, qui, relié au système nerveux central et associé aux os du squelette, permet par sa contraction, la motricité.

La myogenèse du muscle squelettique est un processus complexe qui se caractérise par un enchaînement d'évènements cellulaires incluant, entre autres, des étapes de détermination, de prolifération et de différenciation (Figure 1). Ces processus sont observables, à différents niveaux de complexité, de la méduse à l'être humain, et plusieurs espèces modèles sont plus particulièrement étudiées. Les principales connaissances sur le sujet sont issues d'études sur la drosophile, le poisson zèbre, le xénope, le poulet et la souris que ce soit par une observation du processus « sauvage » ou grâce au génie génétique qui a permis de générer de nombreux mutants. Des résultats complémentaires ont aussi été obtenus grâce à l'utilisation de cellules en culture que l'on peut séparer en deux types : les cellules fraîchement isolées et utilisées en cultures primaires et les lignées cellulaires immortalisées. Leur utilisation présente deux intérêts majeurs, tout d'abord elle permet de s'affranchir des questions de bioéthiques posées par l'expérimentation animale, ensuite, elle simplifie l'étude de processus souvent trop complexes pour être étudiés dans leur globalité. Cependant, cette dernière caractéristique introduit un certain biais dans les résultats puisque le modèle cellulaire isolé s'éloigne quelque peu du processus *in vivo*. Les lignées cellulaires myoblastiques, issues de muscle squelettique, les plus utilisées sont la lignée murine C2C12 et les lignées de rat L6 et L8.

Cet exposé bibliographique se focalise sur la myogenèse squelettique chez les vertébrés, et plus particulièrement sur l'étude du processus myogénique chez les mammifères dont l'organisme modèle principal est la souris. Les données exposées comprennent également les résultats obtenus grâce aux cultures de cellules (cultures primaires et lignées établies). Bien sûr le modèle murin n'est pas exclusif et les résultats majeurs amenés par l'étude d'autres espèces sont aussi considérés.

Le processus myogénique peut être subdivisé en de nombreux mécanismes moléculaires et cellulaires. Ceux-ci peuvent quelque peu varier en fonction du type de muscles en formation, la myogenèse des muscles des membres étant la plus complexe du fait de l'éloignement entre le site où naissent les précurseurs myogéniques et la localisation finale des cellules musculaires matures. Afin de couvrir le maximum de mécanismes importants dans la myogenèse, sans pour autant surcharger ce manuscrit, cet exposé sera plus particulièrement centré sur la myogenèse des muscles des membres.

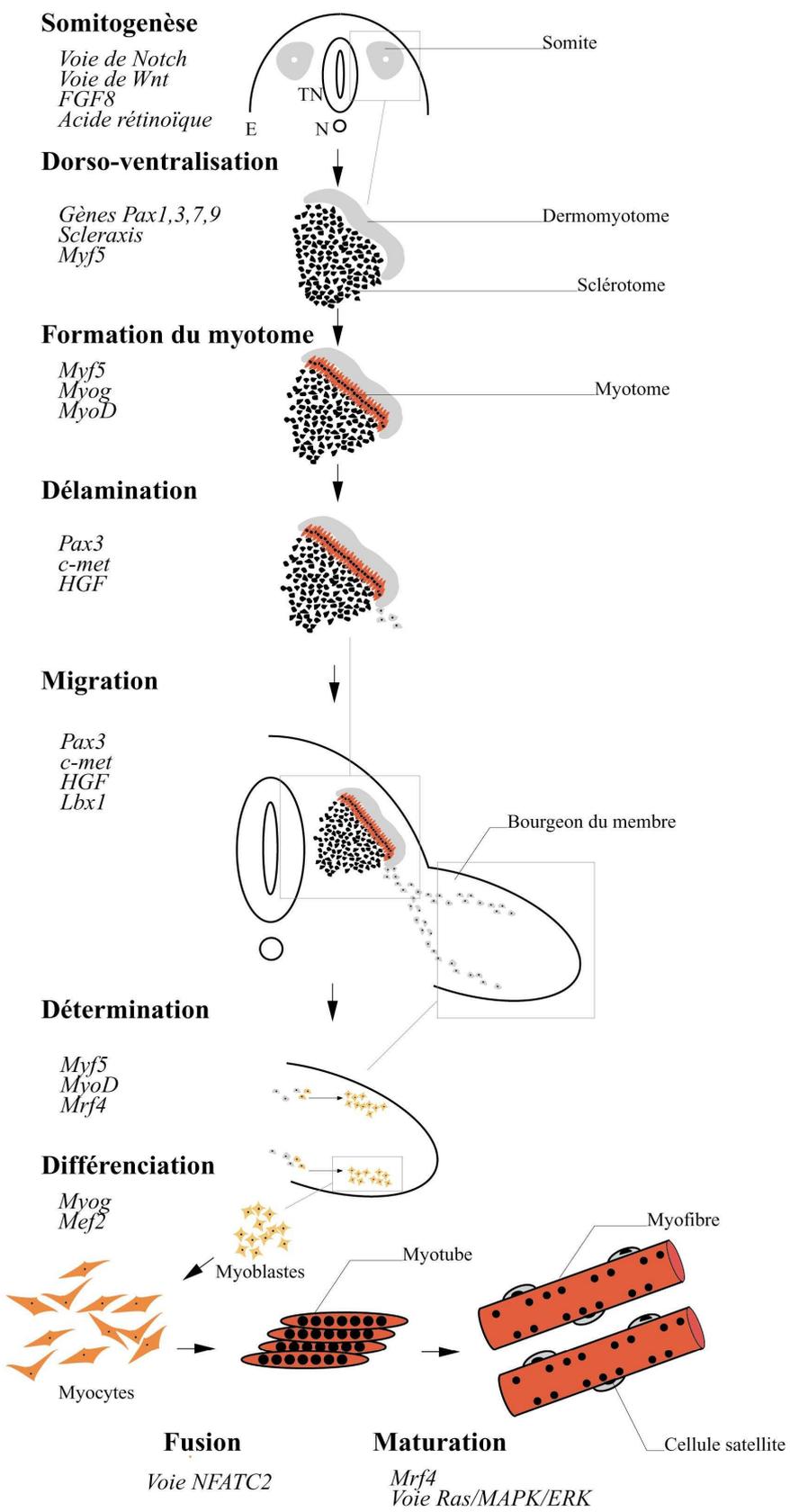


Fig.1 : La myogenèse du muscle squelettique du membre chez les vertébrés. Cette figure montre les différentes étapes qui mènent à la formation de fibres musculaires contractiles à partir des cellules somitiques. Les embryons de souris correspondant à ces différents stades de la myogenèse sont montrés sur la gauche. Les gènes et voies de signalisation majoritairement impliqués dans les divers stades de la myogenèse sont indiqués en italique. E : Ectoderme, N : Notocorde, TN : Tube Neural.

I- La formation des somites

Il est maintenant largement admis que tous les muscles squelettiques chez les vertébrés, à l'exception des muscles du crâne et du visage, dérivent de précurseurs présents dans les somites (Christ et Ordahl, 1995). Chez un embryon de vertébré, le somite est une structure épithéliale, transitoire, de forme sphérique qui entoure une cavité appelée somitocœle. Les somites sont délimités par une couche très dense de matrice extracellulaire qui les sépare des structures adjacentes que sont le tube neural, la notocorde, l'ectoderme et le mésoderme latéral (Figure 2). Ils proviennent de la segmentation du mésoderme paraxial et se développent de chaque côté du tube neural et de la notocorde suivant un axe antéro-postérieur, de sorte que le somite formé le plus précocement se trouve du côté de la tête de l'embryon.

En 1976, le modèle « clock and wavefront » a été proposé pour expliquer la régulation spatiale et temporelle de la somitogenèse (Cooke et Zeeman, 1976). Dans le mésoderme présomitique, l'horloge moléculaire (« clock ») est rythmée par l'oscillation spatio-temporelle de l'expression de gènes de la famille des *Hes*, de *Lfng* (voir plus bas pour plus de détails), de *Axin2* (Aulehla *et al.*, 2003) et de *Ndkn1* (Ishikawa *et al.*, 2004), les deux derniers étant des inhibiteurs de la voie de signalisation des Wnts (Figure 3). Une étude sur des embryons de souris a pu montrer que l'activation de la voie de signalisation de Notch, impliquée dans la somitogenèse, était sous le contrôle de la voie des Wnts (Aulehla *et al.*, 2003). Ces oscillations dues à l'activation et l'inhibition successives des voies de signalisation de Notch et des Wnts permettent en quelque sorte au mésoderme présomitique de préparer sa segmentation.

L'horloge moléculaire est un mécanisme crucial pour la formation des somites ; cependant il ne permet pas, à lui seul, d'expliquer la segmentation du mésoderme présomitique. Un deuxième processus appelé « wavefront » est nécessaire à la somitogenèse. Trois acteurs majeurs de ce processus sont exprimés selon des gradients spécifiques le long du mésoderme présomitique.

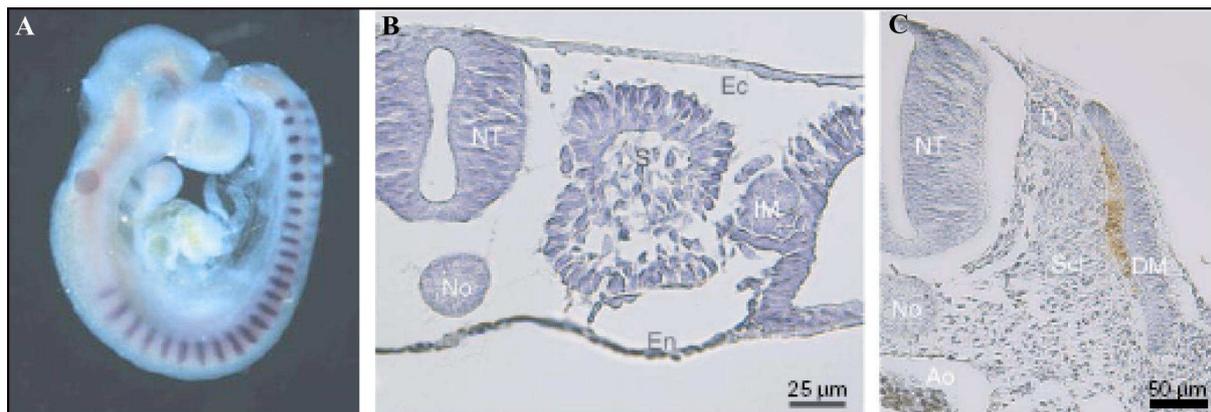


Fig.2 : Le somite, origine des précurseurs cellulaires impliqués dans la myogenèse.

(A) Hybridation *in situ* sur un embryon entier de souris âgé de 9,5 jours post-coïtum (p.c.) avec une sonde dirigée contre le gène *Uncx1.1*. Ce gène est exprimé dans la région caudale du somite mais pas dans le mésoderme présomitique (Gridley, 2006). (B) Coupe transversale d'embryon de poulet illustrant le caractère épithélial du somite (juste après sa formation) ainsi que les tissus qui l'entourent. NT : Tube Neural ; S : Somitocœle ; Ec : Ectoderme ; En : Endoderme ; IM : Mésoderme Intermédiaire. (C) Coupe transversale d'un embryon de poulet illustrant la dissociation du somite en différents tissus soumis à des « destins » différents. D : ganglion dorsal ; Ao : Aorte dorsale ; Scl : Sclérotome ; DM : Dermomyotome. L'immunomarquage (marron) contre la Desmine met en évidence le myotome. (D'après Kalcheim et Ben-Yair, 2005)

Les gènes *FGF8* et *Wnt3a* sont exprimés dans le mésoderme présomitique selon un gradient décroissant qui débute dans la partie caudale pour se terminer au « front de détermination ». Au-delà de ce front, le mésoderme présomitique se segmente pour former les somites (Dubrulle *et al.*, 2001, Aulehla *et al.*, 2003). L'acide rétinoïque joue aussi un rôle primordial dans la segmentation du mésoderme présomitique puisque le gène codant l'enzyme responsable de sa synthèse est exprimé selon un gradient inverse de celui de *FGF8* (il part des somites déjà formés). Ce gradient d'acide rétinoïque aurait par conséquent un effet antagoniste à *FGF8* (Diez del Corral *et al.*, 2003) (Figure 3).

Pour résumer, le front d'ondes créé par ces gradients définit une zone limite où le mésoderme va se segmenter alors qu'en parallèle, les oscillations spatio-temporelles de l'horloge moléculaire permettent de spécifier l'emplacement et la taille du futur somite au sein du mésoderme présomitique. En 2007, l'équipe d'Olivier Pourquié, du Stowers Institute for Medical Research à Kansas City (E.U.), a démontré le lien entre les deux mécanismes puisque les oscillations normalement observées pour les acteurs des voies de Notch et des Wnts sont absentes chez les embryons de souris pour lesquels le récepteur à *FGF8*, *Fgfr1*, est muté (Wahl *et al.*, 2007).

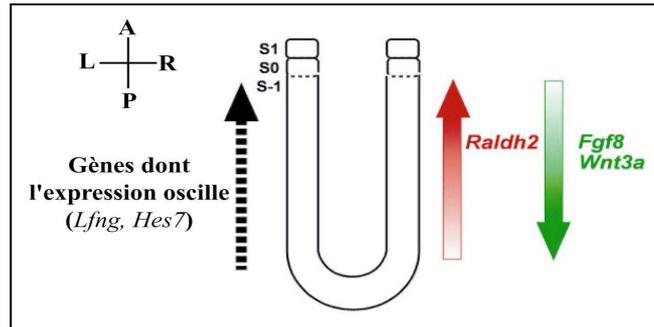


Fig.3 : Voies de signalisation majeures régulant la somitogenèse. La périodicité de la formation des somites est orchestrée par un oscillateur moléculaire appelé l'horloge de segmentation. Les gènes impliqués dans ce mécanisme (*Lfng* et *Hes7*) présentent une expression cyclique dans le mésoderme présomitique qui progresse selon la direction postéro-antérieure (flèche noire en pointillés). Le signal périodique généré par l'horloge est converti en somites régulièrement espacés par un mécanisme de positionnement qui implique un gradient d'expression postéro-antérieur décroissant de *Fgf8* et *Wnt3a* (flèche verte). Ce gradient nécessaire au bon positionnement des limites somitiques est affiné par un gradient inverse d'acide rétinoïque (indiqué par l'expression du gène *Raldh2*, flèche rouge). S1 : Somite formé le plus récemment ; S0 : Somite en formation ; S-1 : Région du mésoderme présomitique où un somite va se former. (D'après Gridley, 2006)

II- Axialisation dorso-ventrale des somites

Peu de temps après la formation des somites, plusieurs signaux provenant des tissus environnants vont entraîner leur compartimentation. Ces transformations, au sein des somites néoformés, sont dues à l'intégration de signaux positifs et négatifs provenant du tube neural, de la notocorde, de l'ectoderme dorsal et du mésoderme latéral. Ils impliquent les protéines Wnts, FGFs, IGFs, Shh, TGFs et BMPs (voir thèse Céline Loriol, 2006). En partie ventrale, le somite va former le sclérotome (Figures 1 et 2), composé de cellules mésenchymateuses, qui donnera la colonne vertébrale, les côtes, les tendons et les méninges. Le sclérotome peut être identifié par les marqueurs moléculaires *Pax1*, *Pax9* et *Scleraxis* (Cossu *et al.*, 1996). La partie dorsale du somite, le dermomyotome, demeure une structure épithéliale qui comme son nom l'indique, héberge les précurseurs cellulaires du derme et des muscles (Buckingham *et al.*, 2003). Le dermomyotome peut être caractérisé par des marqueurs comme *Pax3* (Williams & Ordahl, 1994) et *Pax7* (Jostes *et al.*, 1990). A ce stade, on note l'apparition de l'expression de *Myf5* dans la partie épaxiale du dermomyotome de l'embryon de souris (Ott *et al.*, 1991). Il est intéressant de noter que chez les embryons d'oiseaux, c'est *MyoD* qui est exprimé en lieu et place de *Myf5* (Pownall et Emerson, 1992).

III- Formation du myotome :

Très tôt après l'apparition du dermomyotome (chez la souris vers 8,75 jours p.c.), des cellules se décrochent des extrémités du dermomyotome et migrent en dessous de ce dernier pour former un nouveau tissu : le myotome (Figures 1 et 2). Il se compose de cellules musculaires mononucléées et différenciées appelées myocytes qui expriment certains marqueurs du muscle comme la Desmine (Kaehn *et al.*, 1988) (Figure 4).

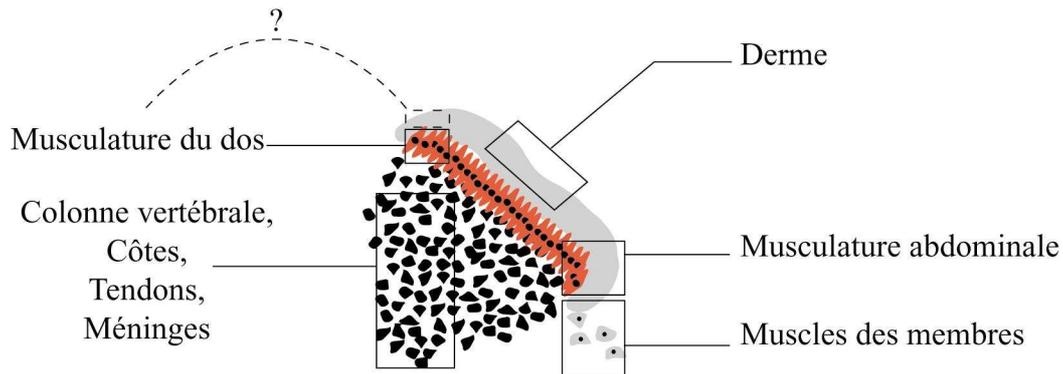


Fig.4 : Spécification des cellules somatique chez les mammifères. Le dermomyotome (gris), le myotome (rouge) et le sclérotome (noir) sont issus de la spécification des cellules des somites. Ils donneront naissance aux muscles et aux structures indiqués sur la figure. L'origine des muscles du dos est aujourd'hui controversée.

Le myotome peut donc être considéré comme le premier muscle squelettique observable au cours du développement. Sa formation dépend de l'expression de *Myf5*, elle-même sous le contrôle de *Shh* (Borycki *et al.*, 1999). Ensuite, au cours de leur différenciation, les cellules du myotome vont aussi exprimer les gènes *Myog* puis *MyoD* (Ott *et al.*, 1991). Il y a 20 ans, on le présentait comme le précurseur de tous les muscles squelettiques (lire Ordahl et Le Douarin, 1992, par exemple). Le rôle du myotome est actuellement très discuté. Selon le modèle actuel, le myotome médian produit les muscles épaxiaux qui donneront la musculature du dos (Christ et Ordahl, 1995 ; Brand-Saberi *et al.*, 1996a), alors que le myotome latéral ainsi que la portion latérale du dermomyotome vont donner des muscles hypaxiaux (Spörle *et al.*, 1996) qui produiront les futurs muscles abdominaux. Les muscles des membres sont aussi considérés comme des muscles hypaxiaux mais ils présentent une situation assez spéciale puisqu'ils dérivent non plus du myotome latéral mais uniquement du dermomyotome latéral. Ce dernier se désagrège et libère des cellules individuelles, non différenciées, capables de proliférer, qui vont migrer vers les bourgeons des membres (Williams et Ordahl, 1994). Cependant, le modèle actuel commence à être discuté et certains auteurs considèrent que la

musculature du dos proviendrait de précurseurs cellulaires présents dans la partie épaxiale du dermomyotome (Biressi *et al.*, 2007 ; Shih *et al.*, 2008) et non pas du myotome médian.

IV- Migration des précurseurs cellulaires des muscles :

Lors du développement des vertébrés, alors que les somites continuent leur transformation, les membres vont commencer à se former par l'apparition des bourgeons. Le problème qui se pose alors, est que les précurseurs cellulaires qui formeront les muscles se situent dans le dermomyotome tandis que les muscles doivent être mis en place au sein des membres. Les cellules présentes au sein de l'épithélium du dermomyotome vont donc devoir se détacher puis migrer vers le site des bourgeons des membres (Figure 5).

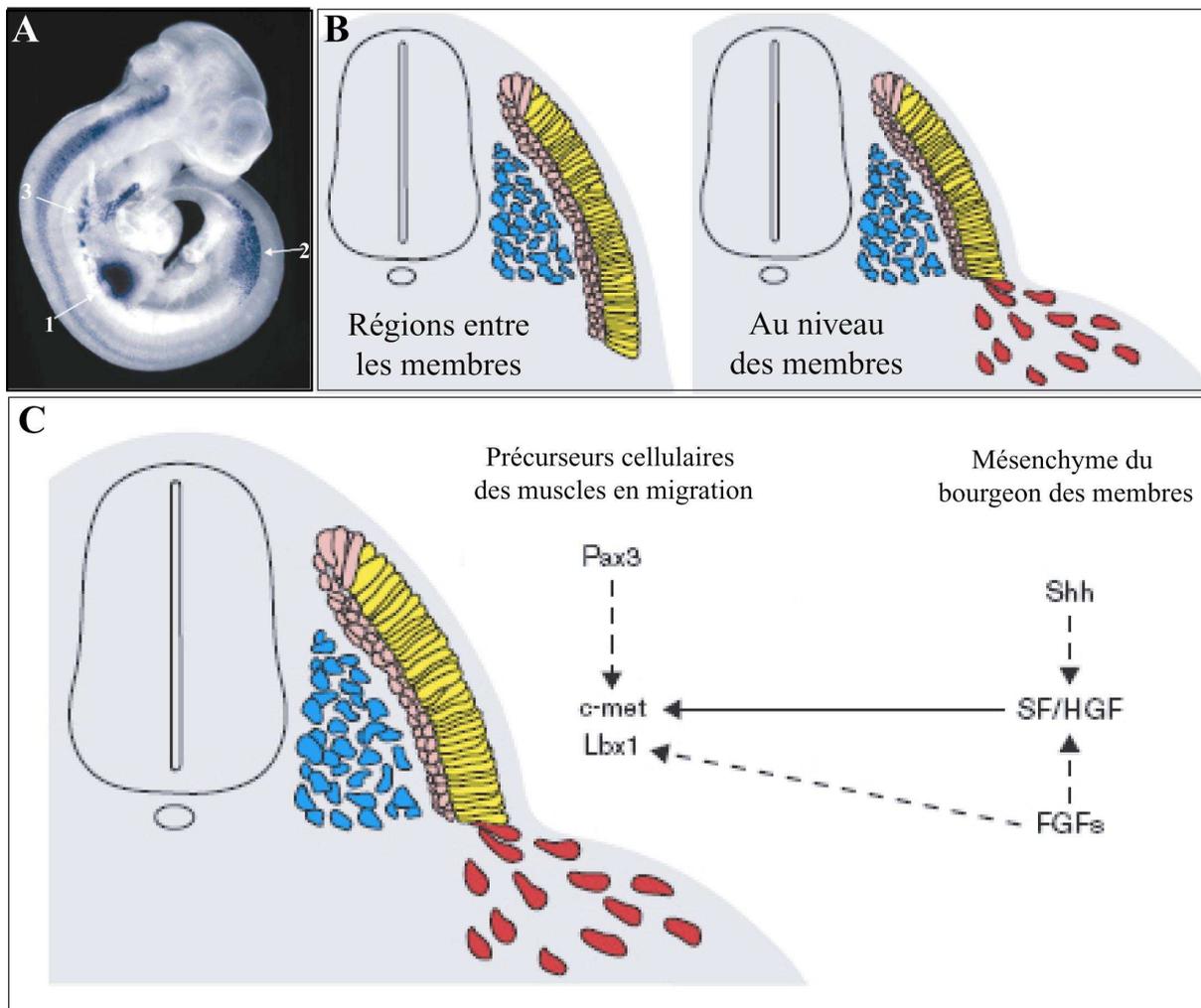


Fig.5 : Dégénération et migration des cellules à l'origine des muscles des membres. (A) Les précurseurs myogéniques en migration sont visualisés (bleu) dans un embryon de souris de 10,5 jours p.c. par hybridation *in situ* avec une sonde dirigée contre le gène

Lbx1, un facteur de transcription utilisé comme marqueur des cellules en migration. Les cellules se sont décrochées au niveau des membres antérieurs (flèche 1) et postérieurs (flèche 2). La flèche 3 indique un flux de cellules en migration qui part du somite et sera à l'origine des muscles de la langue. *Lbx1* est aussi exprimé dans la moelle épinière. (B) Au niveau des membres, les précurseurs cellulaires des muscles des membres (rouge) se détachent du dermomyotome (jaune) latéral et sont capables de migrer à des distances éloignées. (C) Diagramme schématique de la hiérarchie génétique qui contrôle le développement des précurseurs myogéniques en migration. *Pax3* contrôle, directement ou indirectement, l'expression des gènes *c-met* et *Lbx1*. SF/HGF produit par le mésenchyme du membre contrôle l'activité de *c-met*. La production de SF/HGF est sous le contrôle de FGFs et de la protéine Shh, secrétés par les tissus environnants. (D'après Birchmeier et Brohmann, 2000)

Dans le cas des somites situés à proximité des membres, les précurseurs myogéniques Pax3/Pax7-positifs vont se décrocher du dermomyotome hypaxial. Ce processus a lieu grâce à l'expression du gène *c-met*, qui code un récepteur à activité tyrosine kinase (Dietrich *et al.*, 1999). Son ligand SF/HGF (Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor) a été caractérisé comme un facteur qui induit la dissociation de cellules épithéliales en culture. Il est exprimé par le mésenchyme présent au niveau des bourgeons des membres (Birchmeier et Gherardi, 1998). Contrairement aux mutations dans le gène *Pax3*, les mutants *c-met* et *SF/HGF* ne présentent pas de défaut dans la formation du dermomyotome, par contre les précurseurs cellulaires qui doivent normalement migrer, restent à proximité des somites, accolés au dermomyotome. Ceci a pour conséquence l'absence complète de muscles au niveau des membres, du diaphragme et de la langue (tous les muscles impliquant une migration des précurseurs myogéniques) (Bladt *et al.*, 1995). Ces études ont permis de considérer le gène *c-met* comme l'acteur principal de la délamination et de la migration des cellules jusqu'aux sites de myogenèse.

Parmi les précurseurs myogéniques Pax3/Pax7-positifs présents dans le dermomyotome, certains expriment très tôt le gène *Lbx1*, un facteur de transcription comportant un homéodomaine. Il existe une corrélation entre les cellules qui expriment ce gène et les cellules qui migrent pour former, par la suite, les masses musculaires des membres (Jagla *et al.*, 1995). De plus, l'expression de *Lbx1* est induite avant la délamination des cellules, maintenue pendant la migration puis dérégulée quand les cellules se différencient (Mennerich *et al.*, 1998). Dans les embryons de souris mutés sur le gène *Lbx1*, les précurseurs migrants se forment et se décrochent du dermomyotome hypaxial mais migrent de façon anormale (Shäfer et Braun, 1999). L'expression simultanée de *c-met* et *Lbx1* définit donc une population de cellules capables de migrer depuis le dermomyotome jusqu'à un site éloigné de sa position initiale (Figure 5).

V- Détermination myogénique

La découverte des facteurs myogéniques de la famille MyoD représente une avancée remarquable dans la recherche sur les processus qui régissent la myogenèse (voir thèse Céline Loriol, 2006, pour les caractéristiques structurales et les cinétiques d'expression chez l'embryon de souris). Chez les mammifères, on trouve quatre MRF, « Myogenic Regulation Factors » : Myf5, MyoD, Myogénine (Myog) et Myf6. Ces protéines, qui appartiennent à la super-famille des facteurs de transcription à domaine bHLH (basic-Helix-Loop-Helix), présentent deux caractéristiques très importantes et spécifiques: elles sont présentes uniquement dans les cellules du muscle squelettique et surtout elles sont toutes capables, avec des degrés d'efficacité qui leur sont propres, d'initier le processus myogénique après transfection dans un autre type cellulaire (Weintraub *et al.*, 1991).

Chez la souris, *Myf5* est le premier gène de cette famille à être exprimé ; on le détecte dans le dermomyotome épaxial puis dans le myotome. L'expression précoce de *Myf5*, bien avant que la différenciation des cellules ne soit phénotypiquement visible, a permis de lui attribuer un rôle dans la détermination des précurseurs myogéniques (Ott *et al.*, 1991). La détermination myogénique des cellules qui formeront les muscles des membres n'intervient cependant qu'une fois les bourgeons des membres atteints où les précurseurs myogéniques Lbx1/c-met-positifs commencent à exprimer simultanément *MyoD* et *Myf5* (Tajbakhsh et Buckingham, 1994). L'expression de ces deux gènes est sous le contrôle des signaux émis par les tissus environnants. Étonnamment, l'inactivation d'un des gènes, *Myf5* ou *MyoD*, n'entraîne, à première vue, aucun défaut dans le développement du muscle, ce qui démontre un degré de redondance dans la fonction associés à ces deux gènes. Cependant, après des recherches plus poussées, il apparaît que les souris *Myf5*^{-/-} présentent de légers défauts dans la musculature du tronc alors que les souris *MyoD*^{-/-} montrent un développement retardé des muscles des membres. Ceci démontre que les fonctions de *Myf5* et de *MyoD* peuvent être redondantes dans certains tissus (muscles des membres) et spécifiques dans d'autres (formation des muscles épaxiaux) (Braun *et al.*, 1992 ; Rudnicki *et al.*, 1992 ; Berkes et Tapscott, 2005). Par contre, le KO simultané des deux gènes entraîne l'absence totale de muscles squelettiques et de myoblastes dans les embryons de souris. La présence d'au moins un des facteurs, *MyoD* ou *Myf5*, est donc nécessaire pour que les cellules somitiques multipotentes s'engagent dans la voie myogénique (Rudnicki *et al.*, 1993). On a, par conséquent, attribué à ces deux facteurs un rôle de détermination myogénique. Une étude

supplémentaire, menée avec une série allélique de trois mutants *Myf5*, a récemment révélé que Mrf4 (d'habitude assigné à un rôle dans la maturation des myotubes en fibres musculaires contractiles, voir plus bas) est aussi impliqué dans les évènements de détermination myogénique (Kassar-Duchossoy *et al.*, 2004).

VI- Prolifération des myoblastes

Au cours de la myogenèse, les cellules somitiques vont subir une spécialisation qui sera à l'origine de fibres musculaires fonctionnelles. Cependant, le nombre de cellules présentes dans les somites n'est pas suffisant pour assurer la formation de tous les muscles du corps. Après leur délamination du dermomyotome et leur migration jusqu'aux bourgeons des membres, les précurseurs des cellules musculaires vont devoir se multiplier et ainsi générer un nombre suffisant de cellules musculaires, on parle d'étape de prolifération. On trouve peu de données sur l'étude, *in vivo*, du phénomène de prolifération des cellules myoblastiques. De ce fait, de nombreux éléments ont uniquement pu être mis en évidence, *in vitro*, grâce à des cellules en culture.

Pax3 est directement ou indirectement par l'activation du gène *c-met*, nécessaire au maintien des cellules dans une phase proliférative (Buckingham *et al.*, 2003). Un facteur à homéodomaine, Msx1 (muscle-segment homeobox 1), est présent dans les précurseurs cellulaires des muscles en cours de migration et présente la capacité de garder des myoblastes en culture dans un état prolifératif (Houselstein *et al.*, 1999). Sa sur-expression, dans des cellules musculaires différenciées, entraîne même leur « dédifférenciation » et un retour à l'état prolifératif (Odelberg *et al.*, 2000). Les deux facteurs de transcription Pax3 et Msx1 ont donc des rôles clés dans la prolifération des myoblastes mais on connaît peu de choses sur les gènes qu'ils activent et donc sur les changements cellulaires qu'ils induisent. Un autre facteur important, le « Serum Response Factor » (SRF), s'ajoute aux deux premiers, sa fonction principale est l'induction de gènes impliqués dans la prolifération et le cycle cellulaire (Chai et Tarnawski, 2002).

Plusieurs membres de la famille des FGFs, dont les plus étudiés dans le cadre de la myogenèse sont FGF2 (Clegg *et al.*, 1987 ; Olwin *et al.*, 1994a), FGF4 et FGF6 (Armand *et al.*, 2006), sont impliqués dans la prolifération des myoblastes (Brand-Saberi *et al.*, 1999). On suppose que les voies de signalisation impliquant les FGFs (voir Ornitz et Itoh, 2001, pour revue) initient cette prolifération (Edom-Vovard *et al.*, 2001). En effet, il a été montré, *in*

in vitro, sur des cellules myoblastiques, que la réduction du niveau d'expression des FGFs provoque la sortie du cycle cellulaire, l'augmentation de l'expression des MRFs et la différenciation terminale des cellules (Olson, 1992).

Le traitement de lignées cellulaires de muscles squelettiques et de cellules primaires musculaires par les TGF β s inhibe, de façon dose-dépendante, l'expression de tous les principaux marqueurs de la différenciation myogénique, et stimule la prolifération des cellules (Florini *et al.*, 1991 ; Lorient, 2006). Les TGF β s sont aussi capables de maintenir les myoblastes dérivés de culture primaire dans un état prolifératif et indifférencié (Brand-Saberi et Christ, 1999). Enfin, l'un des acteurs essentiels du processus de prolifération est le récepteur Notch dont l'implication sera détaillée plus loin (voir page 59).

Parmi les gènes impliqués dans la prolifération des myoblastes, certains sont aussi capables d'induire la différenciation, c'est le cas des récepteurs à FGFs, FGFR1 (Templeton et Hauschka, 1992) et FGFR4 (Marics *et al.*, 2002). La balance entre la prolifération et la différenciation est très fragile et nous montre à quel point les deux processus sont liés dans le cas de la myogenèse.

VII- Différenciation des myoblastes

1) Déroulement de la différenciation :

La différenciation des myoblastes représente une étape majeure dans le déroulement de la myogenèse. Après une phase très active de prolifération, les myoblastes sortent du cycle cellulaire puis s'alignent pour préparer la fusion en myotubes multinucléés. Enfin, les myotubes vont subir une étape de maturation pour donner des fibres musculaires fonctionnelles (Figure 1). Lors de l'embryogenèse, la différenciation des cellules musculaires se déroule en deux phases : on parle de myogenèse primaire et secondaire. Au cours de la première phase (environ 11 jours p.c.), les précurseurs myogéniques (appelés myoblastes embryonnaires) qui ont migré du dermomyotome vers les membres commencent à se différencier en fibres musculaires multinucléées appelées « fibres primaires ». La myogenèse secondaire apparaît entre 14,5 et 17,5 jours p.c. et implique la fusion des myoblastes fœtaux entre eux, formant ainsi des fibres secondaires (en général plus petites et entourant les fibres primaires) (Duxson *et al.*, 1989) et/ou avec des fibres primaires préexistantes (Evans *et al.*, 1994 ; Dunlison *et al.*, 1999 ; Biressi *et al.*, 2007) (Figure 6).

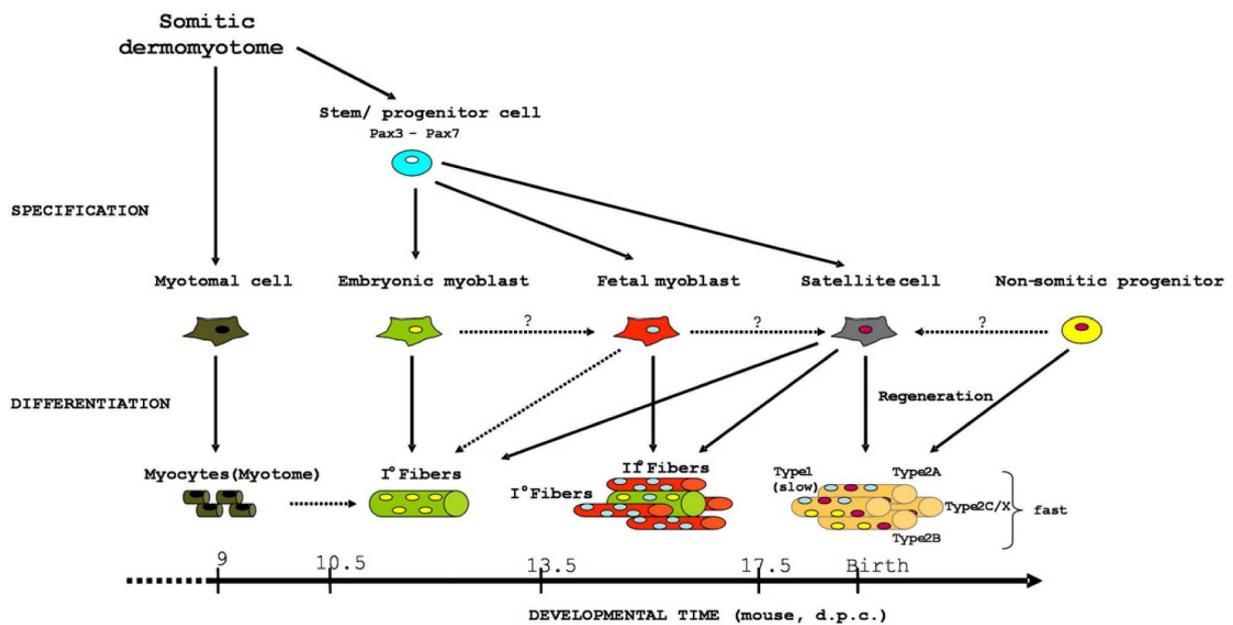


Fig.6 : Devenir des précurseurs cellulaires des muscles squelettiques. Les cellules du myotome proviennent du dermomyotome somitique. Il est actuellement admis, sans preuve formelle, qu'après différenciation, les myocytes issus du myotome seront ensuite intégrés aux fibres musculaires épaxiales. Les cellules positives pour Pax3 et Pax7 sont à l'origine de tous les autres précurseurs des cellules musculaires (myoblastes embryonnaires, fœtaux et cellules satellites). Les myoblastes embryonnaires et fœtaux formeront des fibres primaires et secondaires, respectivement. Les cellules satellites apparaissent à la fin de la gestation et sont responsables de la croissance et de la régénération post-natale du muscle. D'autres précurseurs non somitiques sont impliqués dans la régénération du muscle mais leur rôle dans des conditions non pathologiques reste peu exploré. (D'après Biressi *et al.*, 2007)

2) Gènes impliqués dans la différenciation :

Les myoblastes en prolifération expriment déjà *Myf5* et *MyoD*. Ils sont déjà destinés à devenir des cellules musculaires, cependant un certain nombre d'autres signaux se doivent d'être intégrés pour amorcer le processus de différenciation myogénique. Ce dernier résulte d'un équilibre très fin entre arrêt de la prolifération, arrêt de l'inhibition de la différenciation et activation de l'expression des gènes myogéniques primaires (codant des facteurs de transcription) induisant ensuite l'expression des gènes structuraux et fonctionnels de la cellule musculaire.

- Arrêt de la prolifération et levée de l'inhibition de la différenciation :

La réception des signaux provenant des tissus environnants va tout d'abord moduler l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire, comme en témoigne l'augmentation de l'expression des gènes *Cdkn1a* (p21) et *Cdkn1c* (p57) (Kitzmann et Fernandez, 2001),

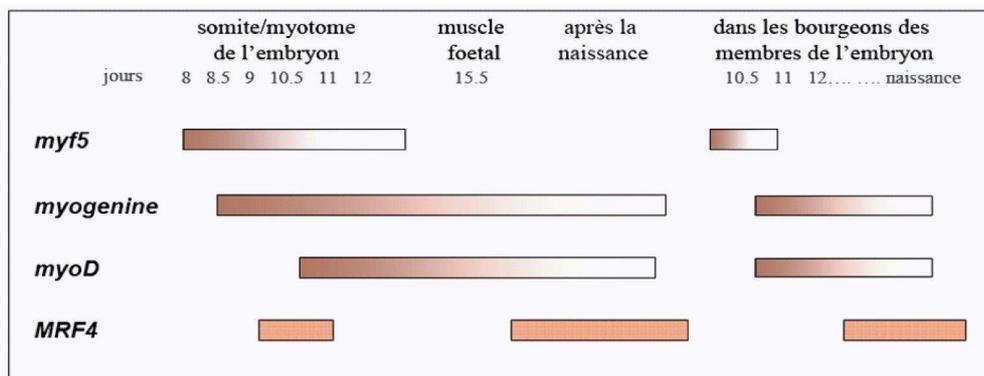
signant l'arrêt de la prolifération des myoblastes. Découvert en 1997, le gène *Gdf8* qui code la Myostatine, une protéine de la famille des TGF β , est impliqué dans l'inhibition de la prolifération et de la différenciation des myoblastes (Joulia-Ekaza et Cabello, 2006). En effet, certaines mutations de ce gène entraînent une forte hausse de la masse musculaire chez le bovin (Grobet *et al.*, 1998), la souris (McPherron *et al.*, 1997) et même chez l'Homme (Schuelke *et al.*, 2004), preuve d'un dérèglement sévère dans le fonctionnement normal du processus de différenciation myogénique. Plusieurs gènes exercent aussi une inhibition sur la différenciation, l'un des exemples les plus étudiés est celui de la famille *Six*. La sous-expression, *in vivo*, de *Six1* dans des embryons de poulet peut induire l'expression de gènes spécifiques du muscle (Heanue *et al.*, 1999 ; Kawakami *et al.*, 2000). La voie de signalisation de Notch joue aussi un rôle conséquent dans l'engagement des cellules myogéniques dans le processus de différenciation (voir page 59).

-L'activation du programme myogénique :

L'activation du programme de différenciation myogénique se caractérise par l'apparition de protéines structurales et fonctionnelles, spécifiques du muscle comme la Créatine-kinase (MCK), le récepteur à l'acétylcholine (AChR), la Desmine et les différentes Myosines (Yun et Wold, 1996). L'expression de ces protéines est co-régulée, soit directement soit indirectement, par les protéines de la famille des Mrfs (*MyoD*, *Myf5*, *Myog*, *Myf6* ou *Mrf4*), des co-activateurs des Mrfs comme E47 et E12 (facteurs à domaine HLH favorisant l'action des Mrfs en formant des hétérodimères avec ces derniers, voir Loriol, 2006), et des protéines appartenant à la famille des régulateurs à domaine MADS, les *Mef2* (*Mef2a*, *b*, *c* et *d*, voir Loriol, 2006). Alors que les gènes *Myf5* et *MyoD* sont exprimés très tôt au cours du développement (voir page 20), les facteurs de transcription *Myog* et *Mef2* sont absents jusqu'à l'induction de la différenciation, puis leur expression augmente considérablement au cours du processus. Leur présence simultanée va permettre l'activation de l'expression des gènes spécifiques des muscles et ainsi initier la différenciation terminale des myoblastes (Yun et Wold, 1996). Les souris KO pour le gène de la Myogénine montrent une réduction drastique du nombre de fibres musculaires. Il semble que les myotubes soient remplacés par des myoblastes ce qui permet d'affirmer que la Myogénine est nécessaire à la différenciation des myoblastes en myotubes (Nabeshima *et al.*, 1993). Le dernier Mrf, *Myf6*, a été moins étudié. Des données sur son expression *in vivo* et dans des cultures cellulaires ont soulevé l'idée de son rôle dans la maturation des myocytes (Bober *et al.*, 1991). Les mutants *Myf6* de souris présentent en effet de légères baisses d'expression de certains marqueurs musculaires

comme celui de la chaîne lourde de la Myosine embryonnaire dans les fibres rapides. On retrouve aussi quelques défauts dans les fibres secondaires. Cependant, il faut bien noter que le phénotype de ces souris est très modéré par rapport à celui des mutants *Myog*. L'un des faits majeurs des mutants *Myf6* est la baisse très importante du niveau d'expression de *Myf5* (Arnold et Braun, 1996). Un rôle beaucoup plus précoce que celui démontré jusqu'alors a été récemment confirmé. Il a été observé que du muscle squelettique était présent dans les souris KO pour *Myf5* et *MyoD*, à condition que l'expression de *Myf6* ne soit pas compromise (Kassar-Duchaussoy *et al.*, 2004). *Myf6* participe donc lui aussi à la détermination des myoblastes (Figure 7).

A



B

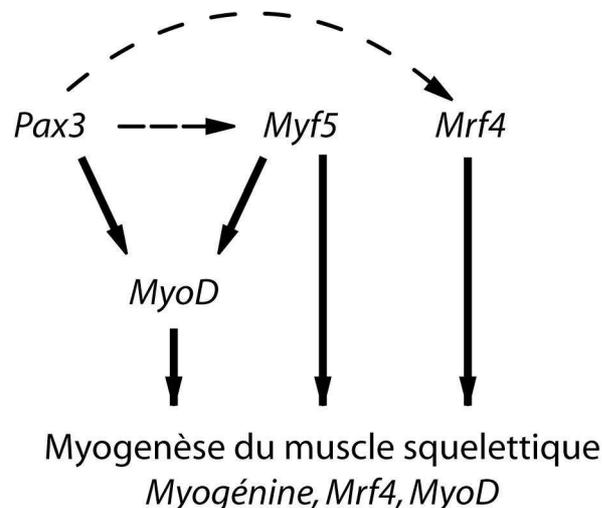


Fig.7 : Expression et hiérarchie génétique des facteurs clés du processus myogénique.

(A) Représentation schématique de l'expression des gènes myogéniques de la famille *MyoD* au cours du développement musculaire chez la souris. Ces données résultent d'expériences d'hybridation *in situ* sur des embryons de souris et montrent l'expression temporelle des transcrits dans les somites et les bourgeons des membres. (D'après Buckingham, 1992 ; Loriol, 2006). (B) *Pax3*, *Myf5* et *Mrf4* agissent en amont de *MyoD* pour la myogénèse dans le tronc et dans les membres. *Mrf4* peut activer la myogénèse embryonnaire mais pas foétale, même en absence de *Myf5* et *MyoD*. *MyoD* peut initialement être activé par *Myf5* et *Mrf4*, et plus tard par *Pax3*. *Myf5*, *MyoD* et *Mrf4* sont les gènes de la détermination. Les flèches indiquent des relations génétiques mais pas nécessairement des interactions directes entre protéines. (D'après Kassar-Duchossoy *et al.*, 2004)

- L'effet des contacts cellulaires :

Pour se différencier, les cellules musculaires sont soumises à un phénomène appelé « l'effet de communauté ». Cela signifie qu'une cellule peut entamer le processus de différenciation et ainsi former un tissu, uniquement si elle se trouve en présence d'un nombre suffisant de cellules du même type (Gurdon *et al.*, 1993). Chez la souris, des expériences consistant à cultiver des cellules du mésoderme paraxial présomitique et somitique montrent qu'elles formeront un tissu musculaire complètement différencié uniquement avec un minimum de départ de 30-40 cellules du même type (Cossu *et al.*, 1995). Cet effet de communauté est lié à la sécrétion de FGFs (pas encore formellement identifiés chez les mammifères) qui, présents au-delà d'un certain seuil de concentration, lèvent l'inhibition de la différenciation (Marics *et al.*, 2002). Les contacts cellulaires entre les myoblastes sont aussi nécessaires à l'activation de la différenciation myogénique (Krauss *et al.*, 2005). Plusieurs classes de protéines d'adhésion sont impliquées dans la régulation de la différenciation myogénique, les plus documentées font partie de la famille des Cadhérines et de la superfamille des Immunoglobulines.

Parmi les Cadhérines, la N-Cadhérine est exprimée des somites nouvellement formés aux fibres musculaires innervées en passant par les myoblastes en fusion (Cifuentes-Diaz *et al.*, 1994 ; Linask *et al.*, 1998). Des anticorps qui neutralisent ces protéines inhibent la différenciation de nombreuses cellules musculaires en culture (George-Weinstein *et al.*, 1997 ; Charrasse *et al.*, 2002). La M-Cadhérine est, quant à elle, spécifique du muscle squelettique. Elle est retrouvée dans les masses musculaires au cours de leur différenciation (Donalies *et al.*, 1991). Certains peptides capables de bloquer l'action de la M-Cadhérine ou des ARNi inhibent la production de protéines structurales spécifiques du muscle dans des cultures de myoblastes L6 de rat (Zeschnigk *et al.*, 1995).

Dans la superfamille des Immunoglobulines, la protéine NCAM (neural cell adhesion molecule) participe à la fusion des myoblastes. Chez la souris, les ARNm du gène *Ncam* sont exprimés dans les somites, et tout au long de la myogenèse des isoformes spécifiques montrent des changements dans leur niveau d'expression (Lyons *et al.*, 1992). La surexpression de certaines isoformes dans les myoblastes de la lignée murine C2 entraîne la sortie du cycle cellulaire, amplifie l'activité créatine-kinase et augmente le taux de fusion des myoblastes (Dickson *et al.*, 1990). La *O*-glycosylation de ces NCAMs a aussi son importance puisque ses *O*-glycannes régulent positivement la fusion des myoblastes, *in vitro*, alors que la polysialylation sur des chaînes *N*-glycanniques spécifiques est connue pour augmenter la répulsion entre les membranes et empêcher ainsi les contacts cellulaires (Johnson *et al.*,

2005). Dans la famille des Immunoglobulines, on trouve également trois protéines associées à la surface des cellules musculaires en différenciation : CDO (aussi appelé CDON), BOC et la Néogénine. Leur profil d'expression au cours de la myogenèse est très similaire. Elles sont exprimées dans les somites, le dermomyotome, le myotome et dans les muscles en développement, mais sont absentes des fibres musculaires matures (Kang *et al.*, 1998 ; Mulieri *et al.*, 2000 ; Kang *et al.*, 2002 ; Mulieri *et al.*, 2002 ; Kang *et al.*, 2004). Leur surexpression dans des lignées cellulaires myoblastiques accélère et amplifie la formation des myotubes (Kang *et al.*, 2003). Ces trois protéines forment un complexe transmembranaire dont la composante extracellulaire est BOC alors que CDO et la Néogénine jouent aussi un rôle de signalisation intracellulaire (Kang *et al.*, 2002). Ces protéines ne sont pas des protéines d'adhésion mais elles se comportent comme un récepteur capable d'activer certains facteurs à domaine bHLH et de la famille NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cell). Ces derniers sont déjà connus pour jouer un rôle dans la migration et la croissance des axones (Graef *et al.*, 2003), ainsi que dans plusieurs étapes de la myogenèse incluant la fusion des myoblastes (Horsley et Pavlath, 2002).

VIII- Fusion des myoblastes :

L'activation du processus de différenciation myogénique va entraîner de profonds changements morphologiques au sein des futures cellules musculaires qui auront comme conséquence la formation des fibres musculaires fonctionnelles. Différents mécanismes entrent en jeu : l'attraction et l'adhésion des myoblastes entre eux, leur allongement et leur fusion. Ce processus aboutit à la formation des myotubes multinucléés (Krauss *et al.*, 2005).

Chez les vertébrés, la quasi-totalité des données acquises sur la fusion des myoblastes a été obtenue à partir de cultures cellulaires dans lesquelles la fusion peut être synchronisée (Wakelam *et al.*, 1985). Ces études *in vitro* ont permis de montrer l'implication de plusieurs classes de protéines. On sait depuis longtemps que certaines protéines de surface comme des lectines (ConcanavalineA, Sandra *et al.*, 1977 ; Wheat germ Agglutinine, Muroya *et al.*, 1994) sont impliquées dans la fusion des myoblastes. De nombreuses autres protéines ont ensuite été identifiées ; elles sont listées avec leurs fonctions associées dans la figure 8 (Abmayr *et al.*, 2003 ; Horsley et Pavlath, 2004). De récentes études *in vitro* sur la fusion de myoblastes de mammifères ont démontré l'existence de deux étapes de fusion : d'abord la fusion de deux myoblastes pour former un myotube naissant puis d'autres fusions impliquant ce myotube et

d'autres myoblastes (Horsley et Pavlath, 2004). Il est cependant très difficile de valider ces données *in vivo*, chez les vertébrés, car le processus de fusion est asynchrone et donc difficilement analysable. Par contre, des espèces dont l'organisation cellulaire est plus simple ont permis de résoudre certains de ces problèmes.

A

Molécules	Expression durant la myogenèse	Fonction/Activité proposée	Référence
<i>Protéine membranaire</i>			
ADAM12	Mb	Métalloprotéase	Yagami-Hirosima et al., 1995
Cavéoline3	Mb, NMt, MMt	?	Galbiati et al., 1999
VLA4 (Intégrine $\alpha 4$)	NMt, MMt	Alignement par interaction avec VCAM-1	Rosen et al., 1992
VCAM1	Mb, NMt, MMt	Alignement par interaction avec VLA-4	Rosen et al., 1992
Intégrine b1	Mb	Récepteur pour matrice extracellulaire	Schwander et al., 2003
T-type Ca^{2+} channels	Mb, NMt, MMt	Induction de l'influx de Ca^{2+} intracellulaire	Bijlenga et al., 2000
GRP94	Mb, NMt	Interactions à la surface cellulaire	Gorza and Vitadello, 2000
<i>Facteur extracellulaire/sécrété</i>			
Ca^{2+}	N/A	Régulation de l'activité de rotéines extracellulaire, Activation de voies de signalisation intracellulaires	Przybylski et al., 1994
Cathepsine B	Mb, NMt, MMt	Protéase	Jane et al., 2002
ILL-4	NMt	Recrutement des myoblastes	Horseley et al., 2003
PGE_1	?	?	Rossi et al., 1989
$PGF_{2\alpha}$	Mt	Activation de la voie NFATC2	Horseley and Pavlath, 2003
<i>Protéine intracellulaire</i>			
Calmoduline	Mb, NMt, MMt	Réarrangement du cytosquelette, activation de voies de signalisation	Bar-Sagi and Prives, 1983
Calpaïne	Mb, NMt, MMt	Destabilisation du sarcolème par protéase	Schollmeyer, 1986
FKHR	Mb, NMt, MMt	Régulation de l'expression de gènes	Bois and Grosveld, 2003
Calpastatine	Mb	Inhibition de la Calpaïne	Temm-Grove et al., 1999
NFATC2	Mb, NMt, MMt	Régulation de l'expression de gènes dans lesmyotubes naissants	Horseley et al., 2001

B

Fusion des myoblastes

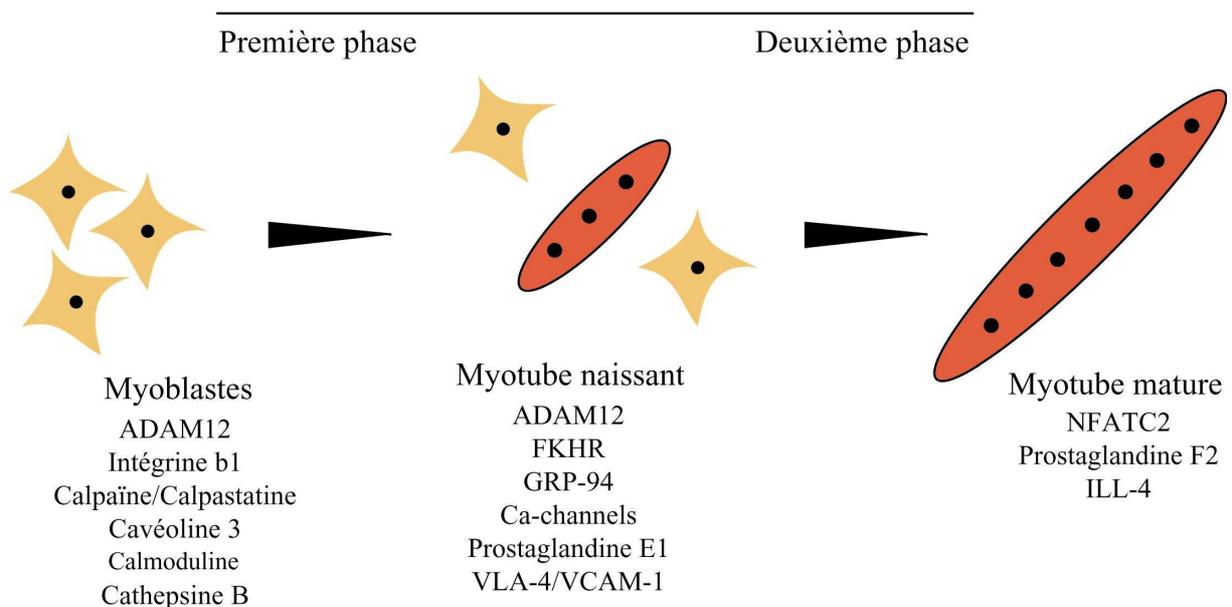
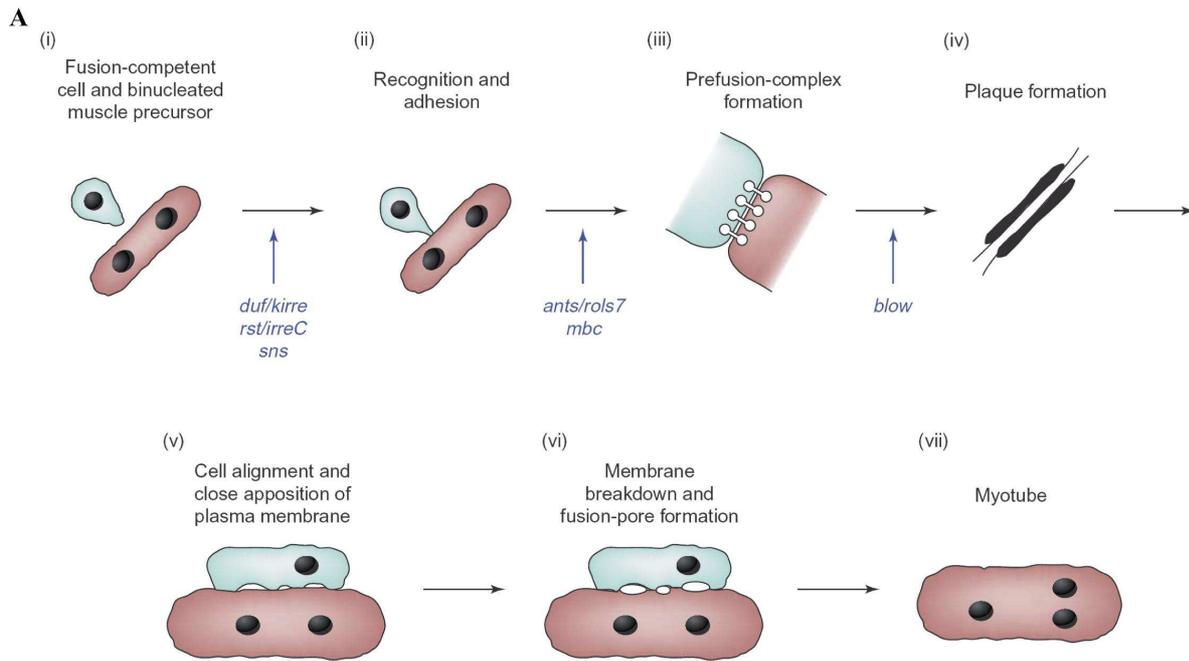


Fig.8 : Processus de fusion des myoblastes chez les mammifères. (A) Molécules régulant la fusion des myoblastes murins. Mb : myoblaste ; NMt : myotube naissant ; MMt :

myotube mature. (B) La fusion des myoblastes se déroule en deux phases (i) des myoblastes fusionnent d'abord entre eux pour former un myotube naissant comportant un nombre limité de noyaux, (ii) les myotubes naissants fusionnent avec de nouveaux myoblastes. (D'après Horsley et Pavlath, 2004)

L'organisme le mieux adapté pour l'étude de la fusion des myoblastes est la drosophile. Sa musculature somatique exerce les mêmes fonctions que les muscles squelettiques des vertébrés et les changements cellulaires observés lors du processus de fusion sont morphologiquement similaires (Dworak et Sink, 2002 ; Chen et Olson, 2004).

Sur la base de leur comportement différent durant la fusion, deux types de myoblastes ont été mis en évidence chez la drosophile. Ces deux types cellulaires sont spécifiés par la voie de signalisation de Notch et le processus d'« inhibition latérale » qu'elle induit, (voir page 51). On distingue les cellules « fondatrices du muscle » (CF) et les cellules « compétentes à la fusion » (CCF) (Chen et Olson, 2004). Initialement, une CF fusionne avec une ou deux CCF pour former un précurseur musculaire bi- ou trinuécléé (Bate, 1990). Ensuite, la fusion de ce précurseur musculaire avec d'autres CCF aboutit à la formation de myotubes multinuécléés (Bate, 1990). Les données accumulées sur la fusion des myoblastes chez la drosophile sont résumées sur la figure 9. Cependant, chez les mammifères, les protéines homologues à celles impliquées dans la fusion des myoblastes de drosophile ne sont pas encore établies sur le plan fonctionnel (Horsley et Pavlath, 2004). Seul un facteur de transcription, NFATC2, a pour l'instant été découvert chez les deux espèces. Son activité est dépendante du calcium et demeure nécessaire pour la croissance du muscle. Il représente un espoir thérapeutique pour les traitements après une blessure ou pour combler le manque de masse musculaire dû à l'âge ou à la maladie (Pavlath et Horsley, 2003).



B

Protein	Localization	Structure	Vertebrate homolog
Transmembrane receptors			
Dumbfounded (or Kin of irregular chiasm C)	FC	Ig domains; TM; APD; PDZ-binding motif	DM-GRASP/BEN/SC1
Roughest (or Irregular chiasm C)	FC, FCC	Ig domains; TM; APD; PDZ binding motif	DM-GRASP/BEN/SC1
Sticks and stones	FCC	Ig domains; fibronectin type-III domain; TM; target sites for kinases	nephrin
Hibris	FCC	Ig domains; fibronectin type-III domain; TM; target sites for kinases	nephrin
Intracellular proteins			
Antisocial (or Rolling pebbles)	FC	Lipolytic-enzyme signature sequence; ATP- and GTP-binding site; ankyrin repeats; TPR; coiled-coil domain	mants
Loner	FC	IQ motif; Sec7 domain; PH domain; coiled-coil domain	ARF-GEP ₁₀₀
Myoblast city	FC, FCC	SH3 domain; Crk binding sites; Docker domain	Dock180
DCrk	Mesoderm	SH2 and SH3 domains	CRK-II and CRKL
Drac1 and Drac2	Mesoderm	GTPase	Rac
dARF6	Ubiquitous	GTPase	ARF6
D-Titin	FC, FCC	Ig domains; fibronectin type-III domains; PEVK domain	Titin
Paramyosin	Mesoderm	Coiled-coil domains	Unknown
Blown fuse	FC, FCC	PH domain	Unknown

Fig.9 : Le processus de fusion des myoblastes chez la drosophile. (A) Evénements cellulaires impliqués dans la fusion des myoblastes. i) Une cellule compétente pour la fusion, CCF (bleu) étend des filopodes jusqu'au précurseur musculaire binucléé (violet). ii) La CCF reconnaît et s'attache au précurseur. iii) Des vésicules se forment par paires (complexe de préfusion) le long des membranes des deux cellules. iv) Une plaque dense aux électrons se forme le long des membranes. v) Les cellules s'alignent. vi) Les membranes se « cassent », ce qui s'accompagne de la formation de pores de fusion. vii) Un myotube multinucléé est formé. Les gènes en bleu s'expriment à différentes étapes de la fusion des myoblastes. (B) Protéines impliquées dans la fusion des myoblastes chez la drosophile et leurs homologues chez les vertébrés. APD : domaine d'autophosphorylation ; ARF : facteur d'ADP-ribosylation ; FC : cellules fondatrices ; FCC : cellules compétentes pour la fusion ; GEP : guanine-nucleotide-exchange protein ; Ig : Immunoglobuline ; PH : domaine homologue à la Pleckstrine ; SH : domaine homologue à Src ; TM : domaine transmembranaire ; TPR : répétition tétratricopeptide. (D'après Chen et Olson, 2004)

IX- Myogenèse primaire et secondaire :

Toutes les fibres musculaires sont produites à partir de la fusion des cellules myogéniques dérivant des précurseurs Pax3/Pax7-positifs (Figure 6). Cependant, la formation des fibres chez les vertébrés est un processus multiphasique qui implique deux vagues de différenciation successives. Durant la myogenèse primaire (11 jours p.c. chez la souris), les fibres sont générées par la fusion des myoblastes embryonnaires (Kelly et Zacks, 1969) ; elles sont constituées d'un petit nombre de myotubes qui augmentent progressivement de taille et acquièrent leur forme ronde observable en section transversale. Lors de la phase plus tardive (16 jours p.c.), les fibres secondaires, formées par les myoblastes fœtaux, naissent initialement à l'endroit où les fibres primaires commencent à être innervées (Duxson *et al.*, 1989). Les myotubes secondaires restent d'abord attachés aux fibres primaires puis s'allongent ensuite et deviennent des fibres indépendantes de taille plus petite que les fibres primaires (Kelly et Zacks, 1969) (Figure 6). Les fibres primaires et secondaires diffèrent par l'expression d'isoformes de chaîne lourde de Myosine (MyHC). D'autres gènes comme ceux codant la créatine kinase, l'énolase β et la PkC θ (une protéine kinase impliquée dans plusieurs processus de prolifération et de différenciation) sont exprimés différemment dans les deux types de fibres (Barbieri *et al.*, 1990; Zappelli *et al.*, 1996 ; Ferrari *et al.*, 1997). Il a aussi été démontré que Myf5, MyoD et Mrf4 peuvent indépendamment initier le programme myogénique durant la myogenèse primaire alors que seuls Myf5 ou MyoD peuvent remplir ce rôle lors de la myogenèse secondaire (Kasar-Duchossoy *et al.*, 2004 ; Biressi *et al.*, 2007).

X- Fibres lentes et rapides :

Les muscles des mammifères sont composés de deux types de fibres ayant des propriétés de contraction propres (vitesse et durée de contraction liée à l'activité ATPasique) et des formes de myosine différentes. On distingue les fibres lentes caractérisées par la présence de chaînes lourdes de Myosine de type I et une forte densité mitochondriale ce qui induit un métabolisme majoritairement oxydatif. Les fibres rapides expriment les chaînes lourdes de Myosine de type IIa, IIx et IIb. Les fibres présentant des Myosines de type IIb montrent une densité mitochondriale amoindrie et donc un métabolisme principalement glycolytique (Booth et Thomason, 1991 ; Casas *et al.*, 2008). En général, chez les mammifères, les fibres primaires sont programmées pour un « phénotype lent » alors que les

fibres secondaires vont adopter un « phénotype rapide » (Zhang et McLennan, 1998 ; Wigmore et Evans, 2002). Cependant, lors d'exercices physiques ou en cas de pathologies, on observe des transitions entre fibres lentes et rapides (Olson et Williams, 2000). Les mécanismes moléculaires régulant ces phases tardives du développement du muscle restent encore relativement inexplorés. Toutefois, des voies de signalisation et des facteurs de transcription impliqués dans ces phénotypes lent et rapide commencent à être élucidés. Il a été proposé qu'une voie de signalisation dépendante du calcium et activée par la Calcineurine, agissant par l'intermédiaire du facteur de transcription NFAT, jouait un rôle majeur dans l'expression des gènes définissant le phénotype lent (Olson et Williams, 2000). La voie de signalisation Ras/MAPK/ERK est un autre médiateur important de l'activation des gènes spécifiques des muscles lents (Murgia *et al.*, 2000). Ces changements adaptatifs au sein des muscles impliquent des processus de réarrangements moléculaires et cellulaires qui font intervenir les cellules satellites (voir le chapitre suivant) (Martins *et al.*, 2006).

XI- Les cellules satellites :

Après la naissance, les muscles squelettiques, en plus de leur croissance naturelle, sont sujets à de nombreux stress liés à l'exercice physique et aux éventuelles blessures. Ceci requiert une source renouvelable de cellules capables de réparer les fibres endommagées ou d'augmenter la masse musculaire lors du développement post-natal. Depuis leur découverte en 1961, ces cellules ont fait l'objet d'un grand nombre d'études, en forte augmentation ces dernières années ; on les appelle cellules satellites ou cellules souches du muscle squelettique (Mauro, 1961). Les cellules satellites sont situées à la périphérie des fibres musculaires, entre la lame basale et le sarcolemme, ce qui constitue un emplacement optimal à leur fonction (Figure 10). Elles représentent entre 2 et 5 % des noyaux d'une fibre musculaire mature (Figeac *et al.*, 2007). Elles montrent des caractéristiques morphologiques, développementales et moléculaires qui leur sont propres. Initialement quiescentes, leur potentiel prolifératif et leur capacité à se différencier donnent de grands espoirs aux thérapies cellulaires visant à réparer les muscles en cas de maladies comme les dystrophies musculaires (Chen et Goldhamer, 2003). De nouvelles approches de purification, soit par préparation de fibres isolées (Collins *et al.*, 2005), soit par cytométrie en flux à partir de souris *Pax3^{GFP/+}* (Montarras *et al.*, 2005) ont prouvé que les cellules satellites étaient la source majeure de précurseurs myogéniques nécessaires à la régénération du muscle post-natal. Les autres

précurseurs proviendraient des cellules souches mésoangioblastiques dérivées des vaisseaux sanguins et également dépendantes de l'expression de Pax3 (Minasi *et al.*, 2002) (Figure 6).

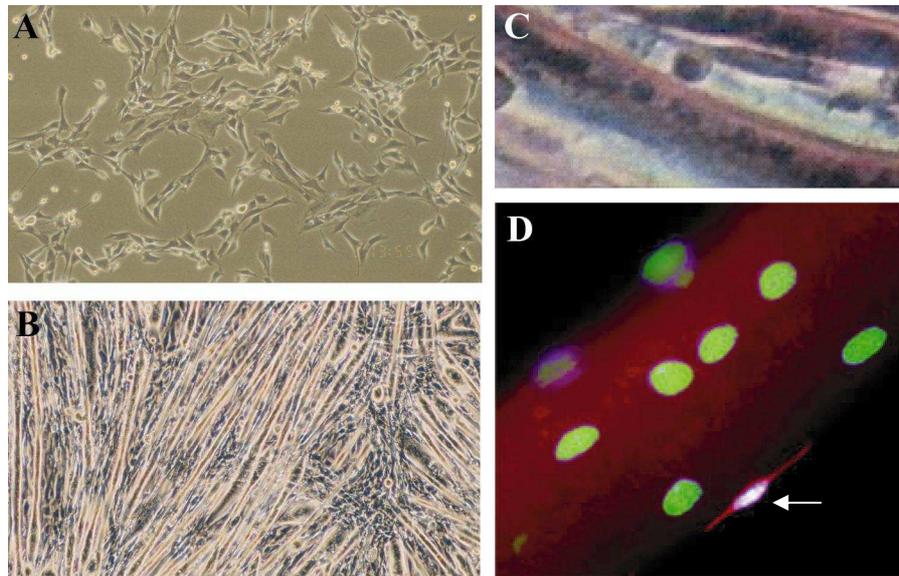


Fig. 10 : Observation microscopique de différentes sortes de cellules musculaires.

Cellules de la lignée C2C12 en culture, (A) en prolifération (myoblastes) et (B) en différenciation (myotubes et cellules de réserve) (x100). (C) Grossissement (x400) d'un myotube d'une culture de cellules C2C12 : la coloration à l'hématoxyline et à l'éosine permet de mettre en évidence la multinucléation des cellules musculaires différenciées. (D) Fibre musculaire (noyaux verts) isolée à partir d'un muscle : la cellule coloré en rouge et blanc représente une cellule satellite (flèche blanche).

1) Origine embryonnaire des cellules satellites :

Les cellules satellites apparaissent dès la fin de l'embryogenèse, aux environs de 16 jours p.c. chez la souris (Bischoff, 1997). Des expériences récentes de greffe de dermomyotome de caille sur des embryons de poulet ont permis de déterminer l'origine précise des cellules satellites des différents muscles présents dans un organisme. Les cellules satellites du tronc proviennent des cellules Pax3/Pax7-positives présentes dans le dermomyotome central (Gros *et al.*, 2005) alors que celles des membres dérivent des cellules précurseurs Pax3-positives du muscle qui migrent du dermomyotome hypaxial (Schienda *et al.*, 2006).

2) Marqueurs moléculaires :

On considère souvent que les cellules satellites constituent une population homogène de progéniteurs musculaires (Bischoff, 1997). Elles sont caractérisées par l'expression de Pax7 (Seale *et al.*, 2000) ; ce marqueur est d'ailleurs utilisé pour localiser les cellules satellites chez de nombreuses espèces allant du poisson à l'être humain (Figeac *et al.*, 2007). Dans la même famille, Pax3 est exprimé par les cellules satellites dans tous les muscles à quelques exceptions près, comme par exemple dans les muscles du bas de la jambe où le gène cesse d'être transcrit (Relaix *et al.*, 2006). D'autres marqueurs ont été identifiés comme c-met (Cornelison et Wold, 1997), Myocyte Nuclear Factor (MNF ; Hawke et Garry, 2001), M-Cadherin (Irintchev *et al.*, 1994), VCAM1 (Rosen *et al.*, 1992), NCAM (Illa *et al.*, 1992), CD34 (un marqueur des cellules souches hématopoïétiques ; Beauchamp *et al.*, 2000) et des protéoglycannes à héparane sulfate, syndecans 3 et 4 (Cornelison *et al.*, 2001). Cependant, plusieurs études ont soulevé l'hypothèse qu'il existerait plusieurs sous-populations de cellules satellites. Par exemple, l'expression de certains marqueurs cités précédemment comme CD34, la M-Cadhérine ou même Myf5 montre une certaine hétérogénéité dans les populations de cellules satellites issues de fibres fraîchement isolées (Beauchamp *et al.*, 2000). Récemment, en 2007, une étude vient de montrer que parmi les cellules satellites Pax7-positives, on peut distinguer deux sous-populations en se basant sur l'expression du gène Myf5. Les cellules satellites constituent donc une population hétérogène composée de cellules souches (Myf5-négatives, environ 10 %) et de progéniteurs myogéniques déjà déterminés (Myf5-positifs, 90 %) (Kuang *et al.*, 2007).

3) Activation des cellules satellites :

La quiescence des cellules satellites est assurée par un certain nombre de facteurs comme MNF β (Myocyte Nuclear factor β) (Garry *et al.*, 2000), la Myostatine (McCroskery *et al.*, 2003) ou Msx1 (qui, de façon intéressante, est aussi impliqué dans la régulation négative de la différenciation des myoblastes) (Houzelstein *et al.*, 1999) comme en témoigne la disparition de leur expression dans des cellules satellites en prolifération.

Il existe plusieurs signaux capables d'activer des cellules satellites (Le Grand et Rudnicky, 2007). Parmi les plus détaillés, on trouve le stress lié à l'étirement ou à la blessure d'un muscle qui induit la synthèse d'oxyde nitrique. Cette molécule induit la libération dans le milieu extracellulaire de deux protéines capables d'activer les cellules satellites : SF/HGF

(dont le récepteur est c-met) (Wozniak et Anderson, 2007) et la Follistatine (un antagoniste de la Myostatine) (Pisconti *et al.*, 2006). Des facteurs de croissance sécrétés par le microenvironnement des fibres musculaires sont aussi des stimuli importants ; les FGFs sont capables d'induire la cascade de signalisation Ras/MAPK/ERK nécessaire à l'activation des cellules satellites (Jones *et al.*, 2005).

Une fois activées, les cellules satellites vont migrer en dehors de la lame basale (ré)entrer dans le cycle cellulaire puis coexprimer Pax7 et MyoD (Figure 11). Les « descendants » de ces cellules activées, les myoblastes squelettiques, vont effectuer plusieurs cycles de division et dans la plupart des myoblastes, l'expression de Pax7 va chuter entraînant l'expression de la Myogénine et donc la différenciation en myotubes puis la fusion avec les fibres préexistantes (Le Grand et Rudnicky, 2007). Une fraction de ces myoblastes va cependant maintenir l'expression de Pax7, perdre l'expression des facteurs myogéniques et quitter le cycle cellulaire (Olguin et Olwin, 2004 ; Zammit *et al.*, 2004). Ces cellules Pax7-positives et MyoD-négatives sont supposées assurer la fonction de renouvellement des cellules satellites (Collins *et al.*, 2005). Dans l'étude qui démontre l'existence de deux sous-populations de cellules satellites, les auteurs démontrent que celles qui n'expriment pas Myf5 sont capables de se diviser de façon asymétrique pour donner une cellule-fille Myf5-positif destinée à se différencier et une cellule-fille « souche » Myf5-négative capable d'assurer le renouvellement des cellules satellites (Kuang *et al.*, 2007). Ce mécanisme permet au muscle de se régénérer tout en lui permettant de garder son potentiel de régénération.

Lors de la différenciation des cellules de la lignée C2C12 (Figure 10), on observe un taux de fusion d'environ 50% ce qui signifie que la moitié des noyaux de la population cellulaire n'est pas contenu dans les myotubes. Ces cellules mononuclées partagent de nombreuses caractéristiques avec les cellules satellites comme le fait d'être quiescentes et de pouvoir ré-entrer dans le cycle cellulaire pour se multiplier puis se différencier en myotubes. Ces cellules sont appelées cellules de réserve et constituent un modèle d'étude pour les cellules satellites (Yoshida *et al.*, 1998).

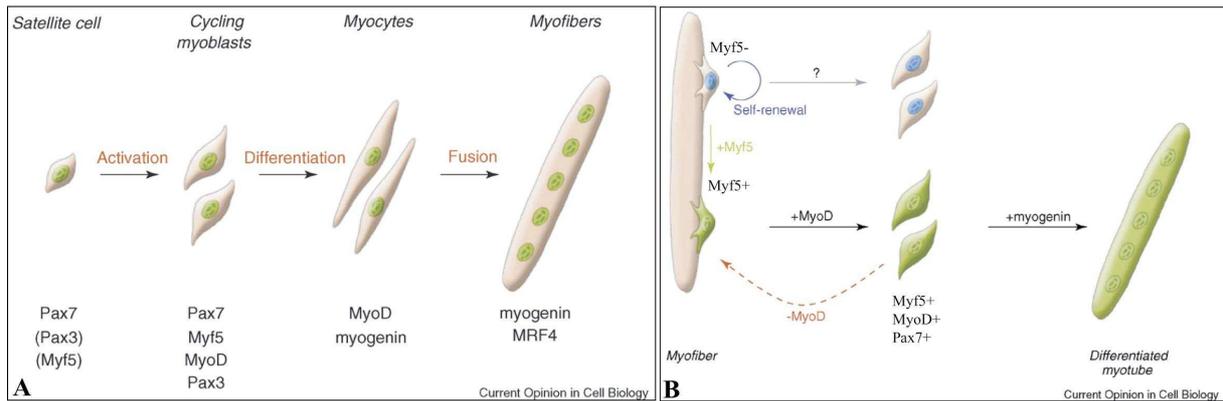


Fig.11 : La régénération des fibres musculaires chez les vertébrés. (A) Représentation schématique de la myogenèse chez l'adulte. Des cellules satellites quiescentes du muscle squelettique peuvent être activées par des stimuli provenant des fibres musculaires ou de leur microenvironnement. Les myoblastes squelettiques en prolifération expriment les facteurs Pax7 et Pax3 ainsi que les facteurs de régulation myogéniques Myf5 et MyoD. Les myoblastes perdent ensuite l'expression de Pax7, Pax3 et Myf5. Des myocytes Myogénine-positifs se différencient, s'alignent, et fusionnent pour former les nouvelles fibres musculaires. Mrf4 est ensuite nécessaire pour l'augmentation de la taille des nouvelles fibres. (B) Le renouvellement des cellules satellites. Durant la régénération des fibres musculaires, les cellules satellites souches (Myf5⁻) peuvent se diviser de façon asymétrique pour engendrer une cellule-fille pouvant se renouveler (flèche bleue, Myf5⁻) et une cellule-fille destinée à se différencier (flèche verte, Myf5⁺). La cellule Myf5⁺ activée quitte sa niche sous la lame basale et se divise. Les myoblastes Myf5⁺ servent principalement à la différenciation et donc à former de nouvelles fibres. Certains myoblastes activés peuvent aussi sous-exprimer MyoD et revenir à un état quiescent (flèche rouge). Il est supposé que les cellules satellites souches Myf5⁻ pourraient aussi être capables de donner des précurseurs participant à la régénération des fibres musculaires (flèche grise). (D'après Kuang *et al.*, 2007)

La Voie de signalisation de Notch :

Fonctionnement et implication dans la myogenèse

La voie de signalisation du récepteur Notch a été découverte grâce à des études génétiques menées chez la drosophile, et son nom (notch en anglais signifiant entaille, échancrure) provient de l'effet de certains allèles de ce gène qui engendrent des ailes échancrées chez les mouches hétérozygotes (Dexter, 1914). Les drosophiles mutées sur le gène *Notch* présentent un phénotype « neurogénique ». En effet, la mutation induit un nombre anormalement élevé de neurones, formés aux dépens des cellules de l'épiderme. Ces premières observations ont suggéré que le gène *Notch* était impliqué dans le devenir des cellules. Le clonage du gène a été effectué en 1985 et depuis, le récepteur Notch est l'une des protéines les plus étudiées à travers le monde. Pour preuve, en août 2008, une recherche utilisant les mots-clés « Notch signaling 2008 » dans la base de données PubMed donne plus de 400 entrées.

I- Structure du récepteur Notch :

Le récepteur Notch est une protéine transmembranaire de type I (un seul domaine transmembranaire) dont les parties extracellulaire et intracellulaire constituent deux entités fonctionnelles et structurales, radicalement distinctes (Figure 12). La véritable activité biologique est assurée par la partie intracellulaire (facteur de transcription), NICD pour « Notch intracellulair domain » alors que la partie extracellulaire, ECD pour « extracellulair domain », exerce une régulation très fine sur cette activité.

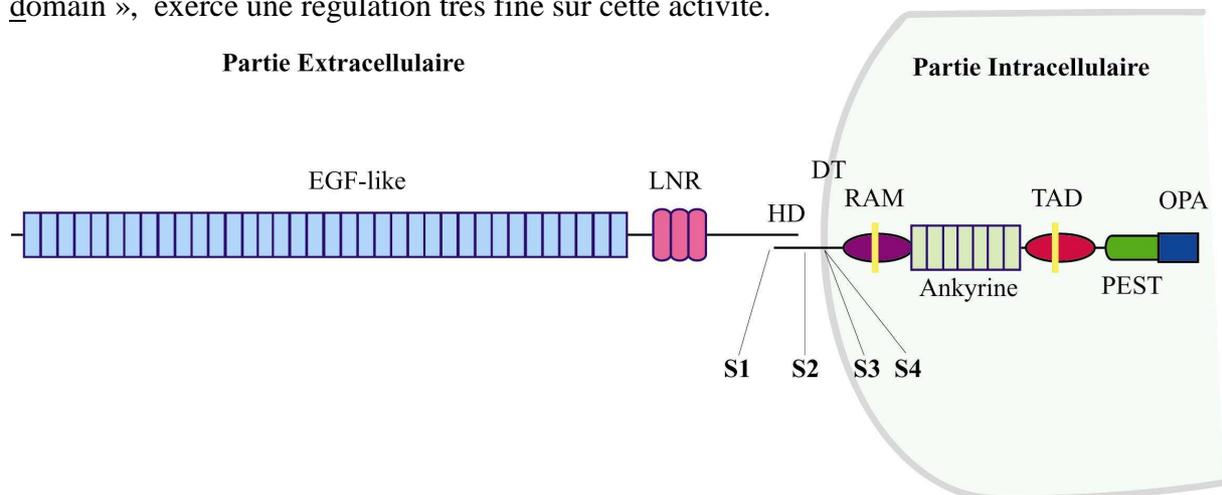


Fig.12 : Représentation schématique de la protéine Notch. Chez la drosophile, la partie extracellulaire de Notch se compose de 36 répétitions EGF-like, une région riche en cystéine appelée motifs LNR, un domaine d'hétérodimérisation (HD) où les deux segments de Notch sont liés de façon non covalente. Dans sa partie intracellulaire, Notch comporte une région appelée RAM suivie par des répétitions ankyrine ; cette région est nécessaire à l'interaction avec l'activateur CSL. On trouve aussi un domaine de transactivation (TAD), une séquence PEST impliquée dans le renouvellement de la protéine et une séquence OPA capable d'amplifier l'activité transcriptionnelle de Notch. Les traits verticaux jaunes représentent des signaux de localisation nucléaire et S1 à S4, les sites séquentiels de protéolyse indispensables à la transduction du signal.

1) Le récepteur Notch est un hétérodimère :

Le récepteur Notch est synthétisé sous la forme d'un précurseur d'environ 320 kDa. Le site S1 (de séquence RQRR) est clivé constitutivement par une Convertase de type Furine dans le trans-Golgi. Les parties extra- (environ 220 kDa) et intracellulaires (entre 80 et 100 kDa) sont ensuite exportées vers la membrane plasmique par les voies de sécrétion sous la forme d'un complexe hétérodimérique (Figure 12). Cette structure est nécessaire à l'activité de Notch chez les mammifères (Blaumueller *et al.*, 1997 ; Logeat *et al.*, 1998). Chez la drosophile, Notch semble être présent majoritairement sous sa forme non clivée (Kidd et Lieber, 2002). Plusieurs études démontrent cependant que la forme hétérodimérique demeure la forme active bien qu'elle soit présente en moindre quantité (Rand *et al.*, 2000). La résolution récente de la structure 3D de cette partie de Notch a permis de préciser la nature de la liaison entre les parties intra- et extracellulaires : elle est non covalente (Gordon *et al.*, 2007) et calcium-dépendante (Rand *et al.*, 2000). Le récepteur Notch comporte trois autres sites de clivage protéolytique, leurs localisations et leurs fonctions seront discutées plus tard dans ce manuscrit (voir page 47).

2) Domaine Extracellulaire (ECD) :

Chez la drosophile, le domaine extracellulaire de Notch est principalement constitué de 36 répétitions du motif EGF-like. Chaque motif EGF-like (Figure 13) est composé de 30 à 40 acides aminés parmi lesquels on trouve 6 cystéines. Pour assurer leurs fonctions, les domaines EGF-like doivent être correctement repliés, la première cystéine formant un pont disulfure avec la troisième, la deuxième avec la quatrième et la cinquième avec la sixième (C1-C3, C2-C4 et C5-C6) (Figure 13). Les motifs EGF-like diffèrent des EGFs, principalement par la position de la cystéine 6. On retrouve ces motifs sur plusieurs protéines extracellulaires ou transmembranaires comme certaines laminines, intégrines et des facteurs

de coagulation (Wouters *et al.*, 2005). Ils sont impliqués dans les mécanismes d'interaction moléculaire qui permettent aux protéines qui les portent d'assurer leur fonction. Certains motifs EGF-like (ce n'est pas le cas des EGFs) peuvent contenir des séquences consensus de glycosylation et ainsi être modifiés par des glycanes (Harris et Spellman, 1993) qui vont alors moduler leur fonction, ce qui a été démontré dans le cas de Notch (Haines et Irvine, 2003). La relation entre la glycosylation de Notch et son activité sera largement exposée dans le chapitre « glycosylation » (voir page 81).

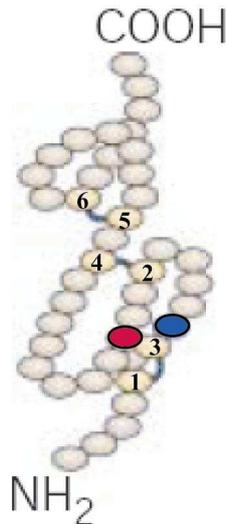


Fig.13 : Les motifs EGF-like : repliement spécifique et sites de O-glycosylation. Les numéros représentent les six cystéines conservées. En rouge, le site de O-glycosylation et en bleu le site de O-fucosylation. (D'après Haines et Irvine, 2003)

La partie extracellulaire de Notch est aussi constituée d'une zone appelée NRR (Negative regulatory region) qui comporte trois répétitions LNR (pour Lin12/Notch repeats) d'environ 40 acides aminés chacune et une partie C-terminale d'une centaine d'acides aminés. Cette région permet de garantir l'intégrité structurale du récepteur Notch en évitant qu'il soit clivé par la métalloprotéase (voir page 47) en absence de liaison avec son ligand (Sanchez-Irizarry *et al.*, 2004).

3) **Domaine Intracellulaire (NICD) :**

La partie intracellulaire se compose d'un domaine RAM (RBPj Associate Molecule, environ 100 acides aminés) suivi de motifs appelés répétitions Ankyrine et d'un domaine TAD (Domaine de trans-activation). Cette région est nécessaire à l'interaction entre Notch et certains de ses partenaires comme les membres de la famille CSL (CBF-1 chez les vertébrés/Su(H) chez la drosophile/Lag-1 chez *C. elegans*) (Wilson et Kovall, 2006) ou la

protéine cytoplasmique Deltex (Matsuno *et al.*, 1995). On trouve aussi dans cette région deux signaux de localisation nucléaire ; ils sont situés de part et d'autre des répétitions Ankyrine (Kurooka *et al.*, 1998). La partie intracellulaire se termine par un domaine PEST (proline, glutamate, sérine, thréonine), impliqué dans la dégradation de Notch et une séquence OPA (séquence riche en glutamine) qui amplifierait l'activation transcriptionnelle des gènes cibles de la partie intracellulaire de Notch.

II- Conservation de Notch chez différents taxons :

1) Notch est présent chez tous les métazoaires :

La voie de signalisation de Notch est présente chez tous les organismes constitués de plusieurs types de cellules différenciées. Il est cependant intéressant de noter que les gènes impliqués dans la voie de signalisation de Notch n'ont pas été retrouvés dans le génome d'*Arabidopsis thaliana*, ce qui montre que les animaux et les végétaux ont répondu de manière différente aux problèmes posés par l'organisation multicellulaire (Wigge et Weigel, 2001).

On retrouve le gène *Notch* chez tous les métazoaires (Figure 14). Parmi ceux dont l'organisation cellulaire est la plus simple, un gène apparenté à *Notch* est déjà présent chez l'éponge *Oscarella carmella* (Porifera, Demospongiae) ainsi que celui codant pour un ligand de Notch, *Delta* (Nichols *et al.*, 2006). Une équipe de l'Université de Munich a pu clairement démontrer que la voie de signalisation de Notch était fonctionnelle chez un cnidaire, *Hydra vulgaris* (Käsbauer *et al.*, 2006).

Le nématode *Caenorhabditis elegans*, qui a permis de comprendre de nombreux processus liés à la l'organisation pluricellulaire, possède deux gènes, *Lin-12* et *Glp-1*, codant des homologues de la protéine Notch, ceux-ci pouvant se substituer fonctionnellement (Greenwald, 1994). Ces gènes sont issus d'un événement de duplication récent, probablement propre au genre *Caenorhabditis*. Paradoxalement, chez les Arthropodes, la drosophile et l'araignée *Cupiennius salei* (Stollewerk, 2002), normalement considérées comme des espèces plus complexes, ne comportent qu'un seul gène *Notch* dans leurs génomes.

Chez la majorité des espèces animales, le récepteur Notch est codé par un gène unique. Néanmoins, les vertébrés à mâchoires (Gnathostomes) possèdent, pour certains, 4 gènes *Notch* que l'on appelle habituellement *Notch1*, *2*, *3* et *4* le gène *Notch4* étant la conséquence

d'une duplication de l'ancêtre de *Notch3* chez les mammifères. Ces gènes sont en partie le résultat des 2 cycles de duplication massive du génome (appelé 2R hypothesis) qui se sont produits entre l'émergence des Urochordés et l'apparition des Gnathostomes (Kasahara *et al.*, 2007) Cependant, certaines disparités sont à noter comme par exemple, chez le poisson zèbre, *Danio rerio*, où deux gènes *Notch1*, *a* et *b* (Kortschak *et al.*, 2001), un *Notch5* orthologue de *Notch3* et un gène *Notch6* orthologue de *Notch2* très différents des autres *Notch* ont été identifiés (Bierkamp et Campos-Ortega, 1993).

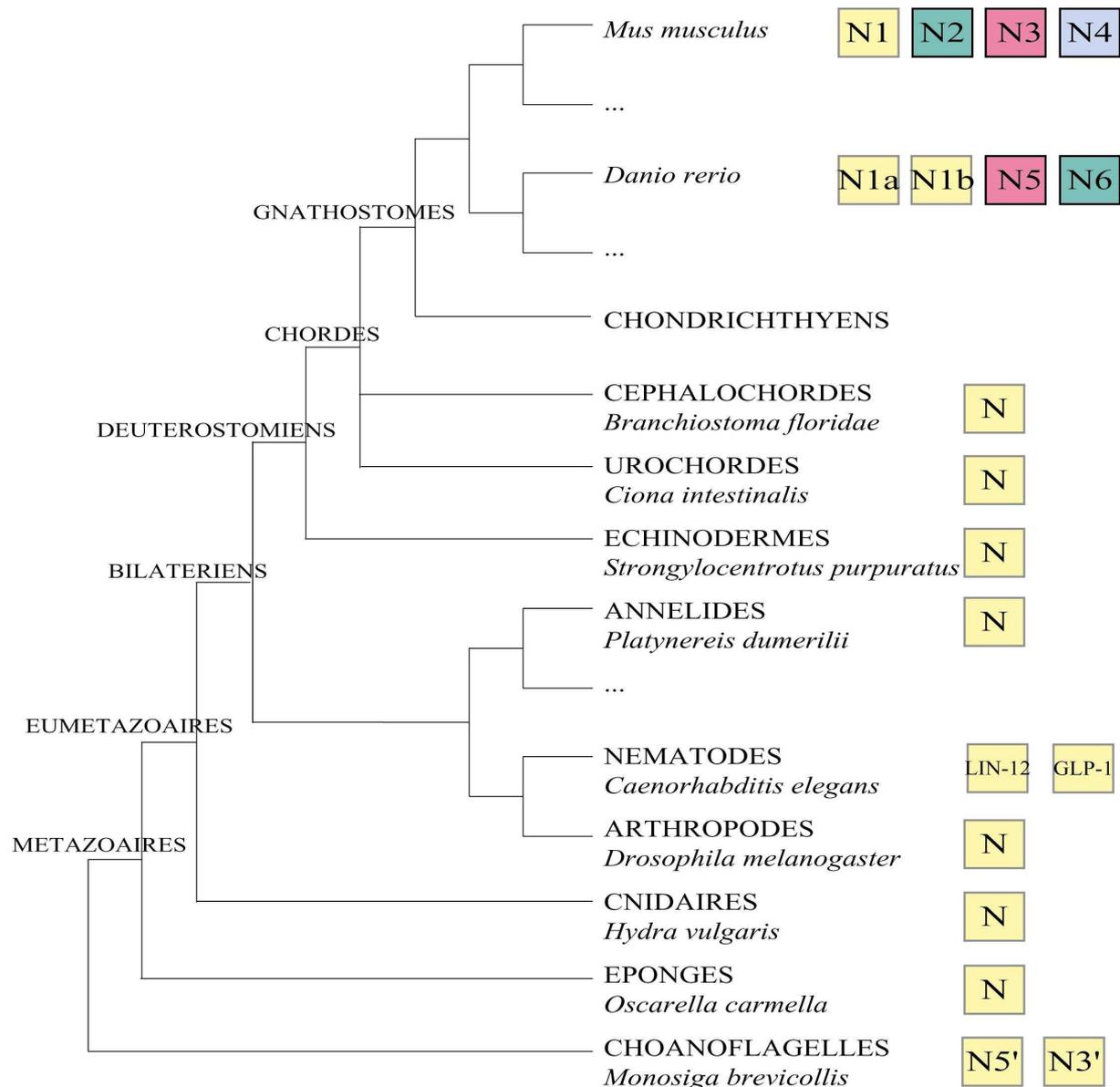


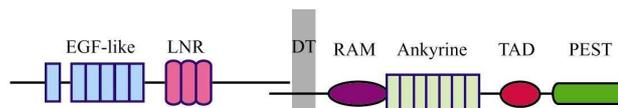
Fig. 14 : Distribution des gènes codant les récepteurs Notch chez les Métazoaires et leur groupe-frère, les choanoflagellés. Les couleurs désignent les relations d'orthologie entre les gènes *Notch*. (D'après Blaumueller et Artavanis-Tsakonas, 1997 ; Kortschak *et al.*, 2001 ; Delsuc *et al.*, 2006 ; Shalchian-Tabrizi *et al.*, 2008)

2) Conservation structurale :

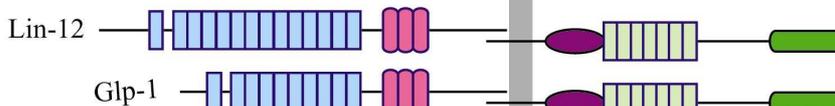
D'un point de vue structural (Figure 15), la différence la plus apparente entre les récepteurs Notch présents chez les différents métazoaires se situe au niveau du nombre de répétition d'EGF-like dans la partie extracellulaire. Les autres motifs, comme la séquence PEST, sont remarquablement conservés au cours de l'évolution (Fleming, 1998).

Le nombre d'EGF-like varie de 5 (chez l'hydre) à 36 (chez la drosophile et la souris). La comparaison des séquences d'acides aminés montre qu'en général, les EGF-like, dont la position dans la séquence peptidique est évolutivement conservée chez différentes espèces, se ressemblent plus que les EGF-like présents sur un même récepteur Notch. Les protéines Notch des vertébrés comportant moins de 36 EGF-like ont sûrement subi des délétions qui ont entraîné des modifications dans l'activité et la spécificité cellulaire du récepteur (Fleming, 1998). Il est intéressant de noter que 2 EGF-like, aux positions 11 et 12, présentent des séquences très conservées. Ces EGF-like ont un rôle crucial dans la fonctionnalité du récepteur Notch (Fleming, 1998).

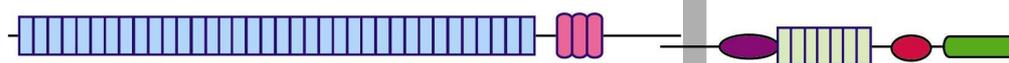
Chez l'hydre :



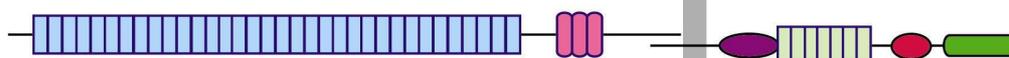
Chez le nématode :



Chez la drosophile :



Chez l'oursin :



Chez la souris :

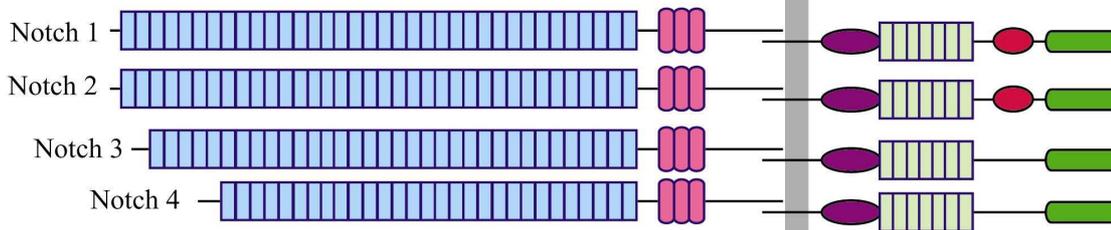


Fig.15 : Membres représentatifs de la famille des récepteurs Notch. La seule véritable différence entre les protéines Notch se situe au niveau du nombre d'EGF-like présents dans la partie extracellulaire. Les motifs fonctionnels sont relativement bien conservés. Les récepteurs Notch3 et Notch4 ne comportent pas de séquence TAD. Il a été montré que la séquence OPA était présente sur la protéine Notch1 chez la souris et chez la drosophile, mais aucune donnée n'est disponible concernant les autres espèces, cette séquence n'a donc pas été schématisée sur la figure.

III- Fonctionnement de la voie de signalisation de Notch :

La voie de signalisation de Notch est l'une des voies fondamentales qui régule le développement et l'homéostasie des tissus chez l'organisme adulte. Les mécanismes moléculaires responsables de son activation sont résumés dans la figure 16. L'activation des gènes cibles par la partie intracellulaire de Notch est soumise à de nombreuses régulations qui peuvent avoir lieu dans l'espace extracellulaire (interaction récepteur/ligand, figure 16A), au niveau du clivage membranaire (16B), dans le cytoplasme (16C) et dans le noyau (16D).

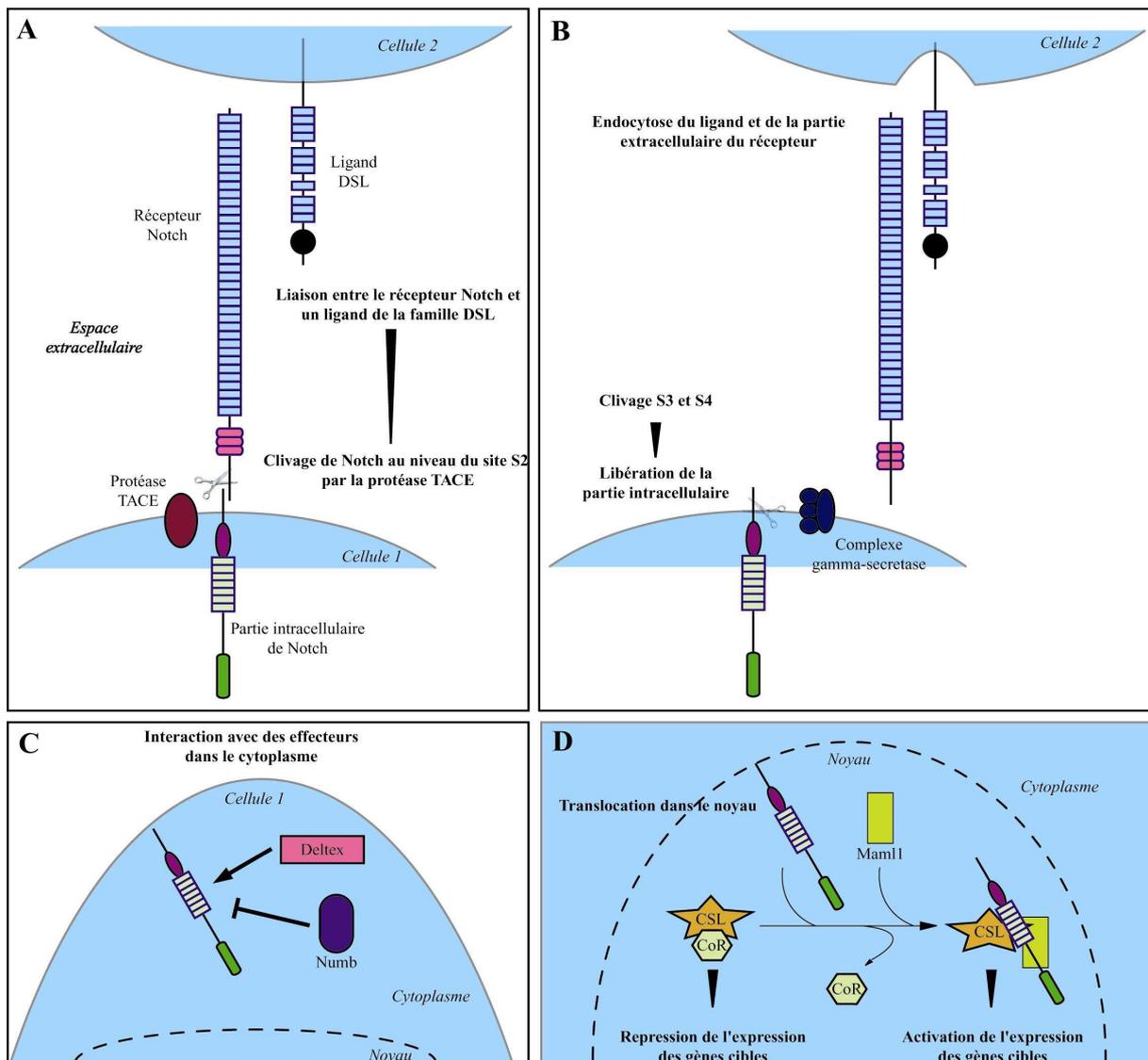


Fig. 16 : Mécanismes moléculaires nécessaires à l'activation de la voie de signalisation de Notch. On peut modéliser ces mécanismes de la manière suivante : (A) La partie extracellulaire de Notch inhibe les événements terminaux de protéolyse (S2, S3 et S4). Seule la liaison entre cette partie et les ligands de Notch peut neutraliser le domaine extracellulaire permettant la protéolyse du site S2 (Kadesch, 2000). (B) Ceci entraîne l'endocytose du ligand et de la partie extracellulaire de Notch, mécanisme nécessaire aux clivages S3 et S4. (C) La partie intracellulaire est ensuite libérée dans le cytoplasme où elle peut interagir principalement avec Deltex et Numb. (D) Elle va ensuite être

transloquée dans le noyau où sa liaison avec plusieurs co-facteurs dont les protéines de la famille CSL et Maml1 va permettre l'activation de l'expression de gènes cibles.

1) Interaction entre le récepteur Notch et ses ligands DSL :

L'interaction entre Notch et l'un de ses ligands (détaillée plus bas) entraîne un changement conformationnel du récepteur qui expose le site de clivage S2 et active ainsi la voie de signalisation (Gordon *et al.*, 2007) (Figures 12 et 16A). Cependant, les détails moléculaires du processus sont encore à caractériser (Fiùza et Arias, 2007). Ces interactions peuvent se faire en *cis* (ligand et récepteur portés par la même cellule) et/ou en *trans* (ligand et récepteur portés par deux cellules voisines) et il est clair que les concentrations relatives de ligands et de récepteurs sont un élément important qui détermine si les interactions vont se faire en *cis* ou en *trans* (Glittenberg *et al.*, 2006).

- Diversité des ligands de Notch :

Les ligands de Notch sont également des protéines transmembranaires. Ils sont caractérisés par la présence d'un domaine DSL (pour Delta, Serrate, Lag-2) de 45 acides aminés, supposé essentiel pour leur interaction avec Notch (Muskavitch *et al.*, 1994). Comme dans le cas du récepteur Notch, le domaine extracellulaire des ligands contient un nombre variable de répétitions EGF-like (Bettenhausen *et al.*, 1995 ; Lindsell *et al.*, 1995). Certains de ces EGF-like peuvent être *O*-glycosylés, mais l'influence de ces modifications n'a pas été démontrée (Panin *et al.*, 2002). La famille des ligands DSL se subdivise en deux classes : Delta et Serrate chez la drosophile et leurs homologues Delta-like (Dll) et Jagged chez les mammifères, en fonction de la présence ou non d'un domaine riche en cystéine (CR) (Figure 17) (Bray, 2006). De plus, il existe un plus grand nombre de motifs EGF-like au sein de la partie extracellulaire de Serrate/Jagged qu'au sein de celle de Delta. Chez la drosophile, on compte un ligand de chaque classe, Delta et Serrate, alors que les mammifères possèdent au moins trois Delta-like (Dll1, 3 et 4) et deux Jagged (Jagged1 et 2). A l'exception de Dll3, tous les ligands sont capables d'interagir avec la partie extracellulaire d'un ou plusieurs récepteurs Notch et ainsi d'activer la voie de signalisation (Fiùza et Arias, 2007). Le cas du ligand Dll3, dont certaines mutations provoquent des dysostoses spondylocostales, est un peu plus compliqué. Il est structurellement divergent par rapport aux autres ligands de la famille Delta, avec seulement 36% d'homologie avec Dll1 chez la souris (Dunwoodie *et al.*, 1997). De plus, il a été montré que Dll3 n'était capable d'activer aucun des 4 récepteurs Notch et que son rôle

serait plutôt d'atténuer, sûrement par compétition, l'effet activateur des autres ligands (Ladi *et al.*, 2005).

Chez les mammifères, on trouve deux autres protéines transmembranaires partageant des homologies de séquences avec les ligands DSL et comportant notamment plusieurs motifs EGF-like. Cependant, elles se distinguent des ligands Delta et Jagged par plusieurs aspects. La protéine Dlk1 (Delta-like 1 homolog) est connue pour participer à plusieurs processus de différenciation incluant l'adipogenèse ou l'hématopoïèse (Bauer *et al.*, 1998) et les souris mutées sur le gène *Dlk1* présentent des défauts de croissance et une apparition prématurée des tissus graisseux (Moon *et al.*, 2002). Il existe plusieurs isoformes protéiques dont certaines pouvant être secrétées (Laborda, 2000). Contrairement à la plupart des autres ligands, c'est un inhibiteur de la voie de signalisation de Notch (Baladron *et al.*, 2005). Une hypothèse sur son fonctionnement est que les formes secrétées de Dlk1 entrent en compétition avec les ligands DSL et inhibent la voie de signalisation de Notch ce qui constitue une forme supplémentaire de régulation de certains processus de différenciation. On trouve aussi la protéine transmembranaire Dner (delta/notch-like EGF repeat containing), présente uniquement dans les neurones et capable d'activer la transcription des gènes cibles de Notch (Eiraku *et al.*, 2005).

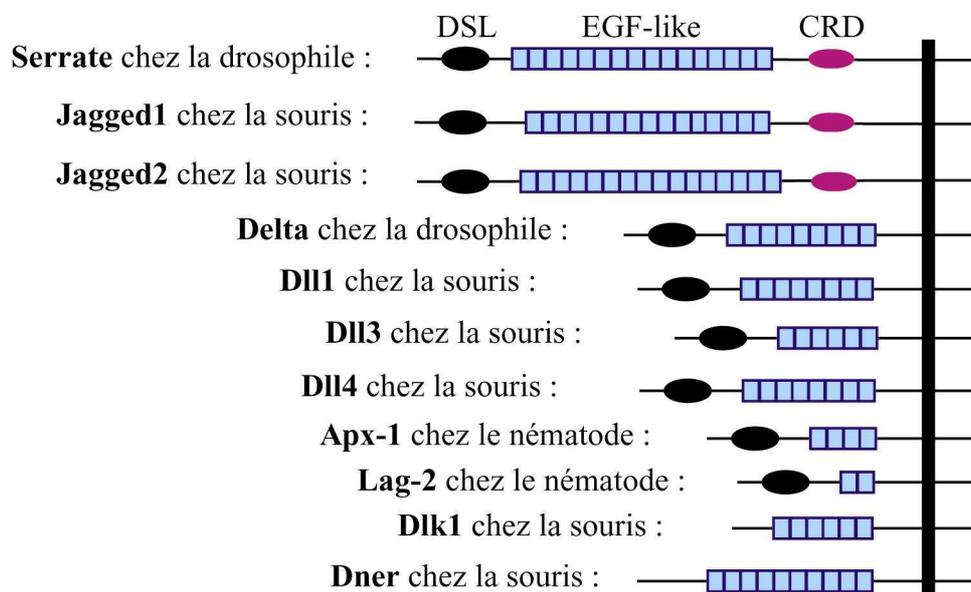


Fig.17 : Structure des ligands du récepteur Notch.

DSL : domaine Delta Serrate Lag-2 ; CRD : domaine riche en cystéine.

-Domaines structuraux impliqués dans l'interaction Notch/ligands :

Chez la drosophile, la liaison entre Notch et ses ligands a été démontrée d'abord par l'agrégation de cellules de drosophile S2 en culture (Fehon *et al.*, 1990). Par cette méthode, 2 des 36 EGF-like de Notch (EGF-like 11 et 12) se sont révélés nécessaires et suffisants pour assurer la liaison entre les deux protéines (Rebay *et al.*, 1991). Ce résultat a été confirmé *in vivo* par la réalisation de mutants chez la souris dont les EGF-like 8 à 12 de la protéine Notch1 ont été délétés. Les embryons mutants meurent en milieu de gestation et leur phénotype est similaire à celui des mutants KO pour le gène *Notch1* (Ge *et al.*, 2008). Un deuxième domaine fonctionnel, constitué des EGF-like 24 à 29, a été identifié, chez la drosophile, par une classe de mutations faux-sens appelée Abruptex (Ax) (de Celis et Bray, 2000). Ces mutations provoquent toutes une substitution d'acide aminé dans les EGF-like 24, 25, 27 et 29 et entraînent des phénotypes opposés à ceux observés lors d'une réduction de l'activation de la voie de signalisation de Notch. Par exemple, lors de la formation des organes sensoriels et la différenciation des veines, les allèles N^{Ax} sont associés à la perte de ces structures alors qu'un allèle perte-de-fonction de Notch entraîne la formation d'un surplus d'organes sensoriels et de tissu veineux (de Celis et Garcia-Bellido, 1994). Il a été démontré que le domaine Abruptex interagissait avec Notch lui-même, au niveau de son site de liaison avec et ses ligands (Pei et Baker, 2008). L'hypothèse la plus probable est que ce domaine entre en compétition avec les ligands de Notch, diminuant de ce fait l'activation de Notch par ses ligands, ce qui explique comment des mutations sur ce site entraînent une augmentation de l'activation de la voie de signalisation de Notch. Une autre étude a montré que les EGF-like 1 à 9 et 25 à 36 participent à la liaison optimale de Notch à ses deux ligands, Delta et Jagged (Xu *et al.*, 2005). Cette même étude indique que l'état de glycosylation de certains EGF-like joue aussi un rôle fondamental dans cette interaction (voir page 81). Un allèle mutant de Notch, appelé *split* (*spl*) a également été identifié. Il se caractérise par la substitution I578T au sein de l'EGF-like 14 ce qui introduit un nouveau site de *O*-fucosylation et entraîne une augmentation de l'activité de Notch dans certains tissus (Li *et al.*, 2003), bien que, *in vitro*, il n'y ait aucun effet de la mutation *spl* sur l'interaction entre avec Delta ou avec le domaine Abruptex (Pei et Baker, 2008)

En ce qui concerne les ligands, une étude utilisant des cellules en culture, montre que l'expression d'une région de Delta (ou de Serrate) contenant la partie *N*-terminale jusqu'au domaine DSL (donc ne comprenant pas les motifs EGF-like) était nécessaire et suffisante à l'agrégation de ces cellules avec des cellules exprimant le récepteur Notch (Fleming, 1998 ;

Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999). Peu d'informations sont actuellement disponibles sur le rôle des EGF-like portés par les ligands de Notch.

- Interaction de Notch avec Delta ou Serrate/Jagged :

L'existence de différents types de ligands (Delta et Jagged/Serrate) soulève plusieurs questions concernant la distribution cellulaire de ces protéines : ces ligands sont-ils exprimés à la surface des mêmes cellules ? Les interactions Jagged/Serrate-Notch et Delta-Notch ont-elles le même effet sur la voie de signalisation de Notch ? Plusieurs études, commencées chez la drosophile, apportent quelques éléments de réponse. Lorsque les deux ligands présentent un profil d'expression spatial identique, leur effet sur la voie de signalisation de Notch est dépendante d'un autre facteur : la protéine Fringe (Fleming, 1997 ; Haltiwanger et Stanley, 2002). Il a été montré que Fringe inhibait l'activation de la voie de Notch par Serrate et stimulait celle activée par Delta, chez la drosophile et chez les mammifères (Panin *et al.*, 1997 ; Haltiwanger et Stanley, 2002). Chez ces derniers, le problème est encore plus complexe de part la présence de plusieurs paralogues pour chaque type de ligands. Des études, *in vitro*, ont montré que les ligands Jagged1, Jagged2 et Dll1 sont tous capables d'activer la voie de signalisation de Notch (Lindsell *et al.*, 1995 ; Luo *et al.*, 1997 ; Jarriault *et al.*, 1998). Actuellement, les différentes combinaisons ligand/récepteur possibles ne sont pas précisément décrites et les réponses spécifiques qu'elles pourraient engendrer restent inconnues (Vasyutina *et al.*, 2007).

Les données accumulées sur les interactions Notch/ligands ont permis de mieux comprendre ce mécanisme, cependant, il demeure certaines incertitudes. Il apparaît que l'activation de la voie de Notch par ses ligands dépend de la proportion de l'un et de l'autre du fait des interactions possibles en *cis* qui n'activent pas la voie de signalisation (Jacobsen *et al.*, 1998). Pour schématiser, si la surface membranaire d'une cellule présente le même nombre de protéines Delta et de protéines Notch, ces derniers vont tous interagir en *cis* et aucun Delta ne sera disponible pour une interaction en *trans* (Heitzler et Simpson, 1994). Ce paramètre de « quantité » rend les études sur le sujet encore plus compliquées.

2) Conséquences de cette interaction : les clivages protéolytiques

Suite à l'interaction Notch/ligand, le clivage du site S2 est catalysé, chez la drosophile, par la métalloprotéase transmembranaire Kuzbanian et chez les mammifères par son orthologue la protéase ADAM 10, mais également par la protéase ADAM 17 (aussi appelée

TACE pour « TNF α -converting enzyme ») (Brou *et al.*, 2000). Le site S2 (Figures 12 et 16) se trouvant 13 acides aminés en amont du domaine transmembranaire (côté extracellulaire), son clivage ne permet pas directement la libération de la partie intracellulaire de Notch mais permet l'endocytose, par la cellule émettrice (porteuse du ligand), du ligand et de la partie extracellulaire de Notch. Ce processus va induire deux nouvelles protéolyses au sein de la cellule réceptrice (porteuse de Notch). Les sites S3 et S4 (distant du site S3 d'une dizaine d'acides aminés) (Okochi *et al.*, 2002) vont être clivés par un complexe γ -sécrétase (complexe protéique très étudié car il clive aussi le précurseur de la protéine amyloïde impliquée dans la maladie d'Alzheimer) dont l'activité protéolytique est assurée par la Préséniline (De Strooper *et al.*, 1999).

3) Les partenaires cytoplasmiques de NICD :

Une fois libérée dans le cytoplasme, la partie intracellulaire de Notch va interagir avec plusieurs partenaires qui vont moduler son activité (Figure 16C). Chez la drosophile et les mammifères, la protéine cytoplasmique Numb interagit avec le domaine intracellulaire de Notch ce qui a pour conséquence d'inhiber sa fonction. Les mécanismes de cette inhibition restent méconnus mais l'hypothèse la plus probable est que Numb active Itch (un membre de la famille Nedd4 des Ubiquitines ligases) qui provoque son ubiquitination, et donc sa dégradation, réduisant ainsi son effet de facteur de transcription (Hansson *et al.*, 2004). Nous verrons plus loin que Numb joue un rôle clef dans l'activation des cellules satellites lors de la myogenèse post-natale (voir page 57). L'effecteur cytoplasmique le plus connu de Notch activé est la protéine Deltex. Chez la drosophile, le gène *Deltex* code un activateur de la voie de signalisation de Notch qui interagit directement avec les domaines Ankyrine de sa partie intracellulaire (Matsuno *et al.*, 1995). Chez les mammifères, la situation est plus délicate avec la présence de 3 homologues de Deltex (Deltex1, 2 et 3) (Kishi *et al.*, 2001). De plus, les principales études sur les protéines Deltex 1-3 l'ont présenté comme un inhibiteur de la voie de signalisation de Notch (Sestan *et al.*, 1999 ; Izon *et al.*, 2002). Finalement, la partie intracellulaire va être transloquée dans le noyau. Comme elle ne comporte pas de domaine de liaison à l'ADN, elle va interagir avec plusieurs protéines nucléaires afin d'assurer son activité transcriptionnelle.

4) Dans le noyau, interaction avec les protéines de la famille CSL :

Les protéines de la famille CSL (pour CBF-1 chez les mammifères, Su(H) chez la drosophile et Lag-1 chez *C.elegans*) sont des facteurs de transcription qui contiennent un domaine unique de liaison à l'ADN de forte affinité pour la séquence YRTGDGAD (Tun *et al.*, 1994). Chez les métazoaires, elles constituent les partenaires nucléaires de la voie de signalisation de Notch les plus importants et les plus étudiés (Lai, 2002). Les premières études sur CBF-1, réalisées dans des cultures cellulaires, ont montré qu'il fonctionnait comme un répresseur transcriptionnel (Dou *et al.*, 1994). Il a été démontré que la translocation de la partie intracellulaire de Notch dans le noyau puis sa liaison avec CBF-1 convertissait ce dernier en activateur de la transcription (Hsieh *et al.*, 1996). Depuis, les données accumulées sur le sujet ont permis de caractériser un complexe de répression transcriptionnelle (Figure 18), composé de CBF-1 et de plusieurs co-répresseurs étonnamment différents entre la drosophile et les mammifères (voir Lai, 2002 pour revue), et un complexe d'activation transcriptionnelle identique chez les deux espèces, incluant principalement CBF-1, la partie intracellulaire de Notch, la protéine nucléaire Maml1 (Kitagawa *et al.*, 2001) ainsi que p300, une histone acétylase (Oswald *et al.*, 2001).

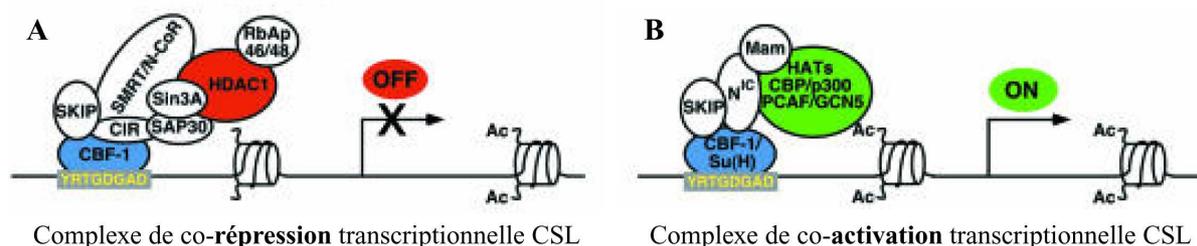


Fig.18 : Complexe de répression et d'activation CBF-1 permettant la régulation des gènes cibles de la voie de signalisation de Notch chez les vertébrés. Le complexe de co-répression (A) comporte une activité histone-désacétylase (HDAC, en rouge) et inversement, celui de co-activation (B) une activité histone-acétylase (HAT, en vert). La protéine CBF-1 (bleu) se lie avec une forte affinité à la séquence consensus YRTGDGAD. La liaison entre le domaine intracellulaire de Notch (N^{IC}) et CBF-1 permet à ce dernier de recruter des partenaires pour former le complexe de co-activation. (D'après Lai, 2002)

Il est maintenant bien établi que la voie de signalisation de Notch utilise les protéines de la famille CSL comme co-activateur, cependant plusieurs études réalisées dans le contexte de la myogenèse révèlent un mécanisme de signalisation indépendant de ces facteurs (voir page 59).

5) Gènes cibles du complexe activé par NICD :

Les gènes dont la transcription est activée par la voie de signalisation de Notch appartiennent à la famille *Hairy* et *E(spl)* (Enhancer of split), découverts dans un premier temps chez la drosophile (Tietze *et al.*, 1992). On distingue désormais deux sous-familles, *Hes* et *Hey* – anciennement *Herp* - (Leimeister *et al.*, 1999 ; Iso *et al.*, 2003 ; Fischer et Gessler, 2007), présentes chez la drosophile et les mammifères. Ces gènes codent tous des répresseurs transcriptionnels à domaine bHLH. Leur mode d'action est résumé sur la figure 19. Chez la souris, on trouve sept *Hes* (*Hes1-7*) et trois *Hey* (*Hey1, 2, L*) (Fischer et Gessler, 2007). Les protéines *Hes* se lient aux séquences d'ADN d'une boîte dérivée de la boîte E (TGGCACGTG(C/T)(C/T)A) et de la boîte N (CACNAG). Elles peuvent recruter les co-répresseurs TLE1 à 4 (homologues de Groucho chez la drosophile) par leur térapeptide C-terminal WRPW (Iso *et al.*, 2003). Parmi les *Hes*, seuls *Hes1*, *Hes5* et *Hes7* peuvent être transcrits suite à l'activation de la voie de Notch (Ohtsuka *et al.*, 1999 ; Bessho *et al.*, 2001) alors que tous les membres de la famille *Hey* sont des effecteurs de cette voie de signalisation (Nakagawa *et al.*, 2000).

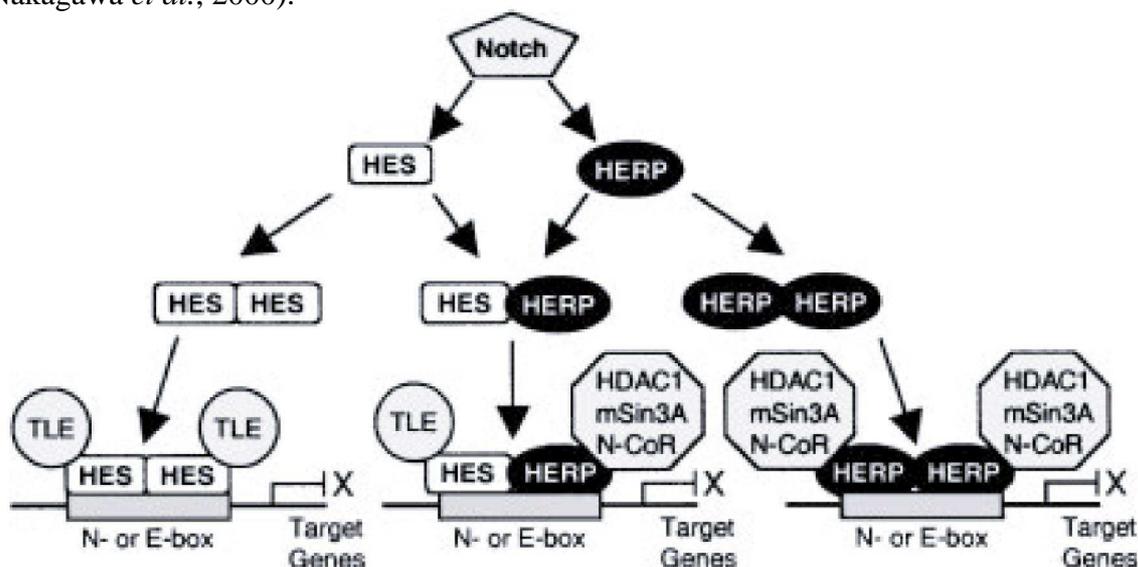


Fig.19 : Coopération entre les protéines Hes et Hey (Herp) dans la voie de signalisation de Notch. Suite à l'activation de Notch, l'expression de Hes et de Hey peut être induite. Dans les tissus où seul Hes ou Hey est exprimé, des homodimères se fixent aux promoteurs des gènes cibles. Hes recrute TLE grâce à son motif WRPW alors que Hey recrute un complexe de répression comportant une activité histone-désacétylase. Dans les tissus où Hes et Hey sont co-exprimés, l'hétérodimère Hes/Hey devient le complexe prédominant. L'hétérodimère présente une affinité plus forte pour l'ADN que les homodimères ce qui implique qu'une concentration inférieure est nécessaire à la répression des gènes cibles. Ce modèle se base sur des études principalement effectuées sur *Hes1* et *Hey2*. Du fait des fortes similitudes observées au sein des sous-familles de protéines Hes et Hey, ce modèle est valable pour l'homme, la souris et la drosophile. (d'après Iso *et al.*, 2003)

Les protéines Hes et Hey sont exprimées dans de nombreux tissus et remplissent des rôles importants au cours de l'ontogenèse d'un organisme, participant au développement du système nerveux, des lymphocytes, du système cardiovasculaire,... Il serait trop long de vouloir tous les présenter. C'est pourquoi seuls les Hes et Hey capables de s'associer avec des facteurs de transcription essentiels au bon déroulement de la myogenèse, comme MyoD, E47 ou Id feront l'objet d'une attention particulière (voir page 59) (Fischer et Gessler, 2007).

IV- Rôles de la voie de signalisation de Notch :

1) Inhibition latérale

Le modèle classique de l'inhibition latérale explique comment une cellule peut être sélectionnée parmi un groupe de précurseurs équivalents pour ensuite se différencier. L'un des exemples les plus étudiés est le cas de la sélection des précurseurs cellulaires des soies sensorielles chez la drosophile. Chaque précurseur cellulaire se développe à partir d'un groupe de cellules « pro-neurales ». Au départ, toutes les cellules pro-neurales expriment le(s) ligand(s) et le(s) récepteur(s) de la voie de signalisation de Notch ; chaque cellule a donc la capacité d'activer la voie de Notch chez ses voisines. Cependant, il suffit d'une subtile différence entre deux cellules pour que la voie de Notch de l'une d'entre-elles soit activée à un niveau légèrement supérieur à celui de sa voisine (Figure 20, cellules bleues). Il s'ensuit une boucle d'auto-régulation due à la partie intracellulaire de Notch qui va inhiber dans cette cellule l'expression de Delta ce qui va empêcher l'activation de la voie de Notch dans la cellule voisine (cellule jaune) (Bray, 1998). A l'inverse l'expression de *Delta* dans la cellule jaune, est maintenue par une boucle d'auto-activation (Hansson *et al.*, 2004).

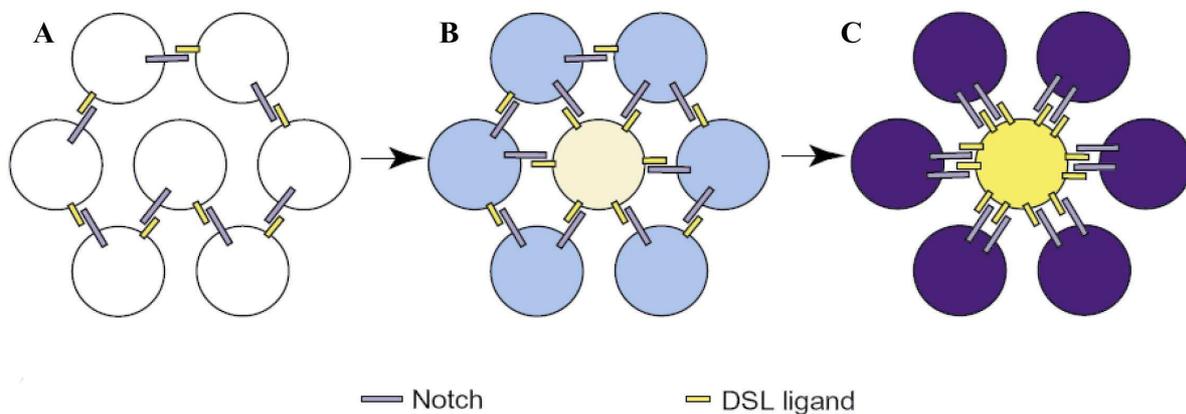


Fig.20 : L'inhibition latérale. La voie de signalisation de Notch amplifie de faibles différences entre deux populations de cellules grossièrement équivalentes. Les cellules dont l'activité de Notch est la plus forte sont schématisées en bleu. (A) Progression de cellules compétentes à la différenciation (blanches) dans le processus d'inhibition latérale. (B) Par une boucle de rétro-inhibition, une légère différence dans l'expression des ligands DSL ou de Notch (cellule beige) va entraîner la spécification des cellules. (C) Les cellules qui comportent un niveau élevé de Notch et dont la voie de signalisation de Notch est activée (violette) ne se différencient pas contrairement à celles qui exprime fortement Delta (jaune). (D'après Hansson *et al.*, 2004)

2) Création d'une « frontière » entre deux types cellulaires

Le rôle de la voie de signalisation de Notch dans l'établissement d'une limite entre deux types cellulaires a été démontré pour la formation d'une frontière dorso-ventrale dans l'ébauche d'aile, le disque imaginal de la drosophile (Figure 21) (Fleming *et al.*, 1997). Ici, Notch est activé uniquement dans les cellules qui se trouvent à l'interface entre deux champs de cellules (le champ du côté dorsal et le champ du côté ventral) ce qui permet de conserver les deux populations distinctes, d'où le terme « frontière ». Les cellules formant cette frontière acquièrent les caractéristiques d'un « centre organisateur », responsable de la croissance et du développement de l'aile selon l'axe dorso-ventral. Les cellules dorsales expriment Serrate alors que les cellules ventrales expriment Delta. Le mécanisme est dirigé par la protéine Fringe qui est présente uniquement dans les cellules dorsales. L'action de Fringe permet d'inhiber l'activation de Notch par Serrate alors qu'elle permet cette activation par Delta. Dans ces conditions là, la voie de signalisation de Notch peut être activée uniquement lorsqu'une cellule dorsale est adjacente à une cellule ventrale. En effet, une cellule dorsale ne peut activer une autre cellule dorsale car lorsque Fringe est présent, l'activation de Notch par Serrate est inhibée et une cellule ventrale ne peut activer une autre cellule ventrale car en absence de Fringe, l'activation de Notch par Delta est inhibée. Les cellules situées à l'interface, où la voie de signalisation de Notch est activée, vont permettre d'organiser et de synchroniser le développement dorsal et ventral de l'aile.

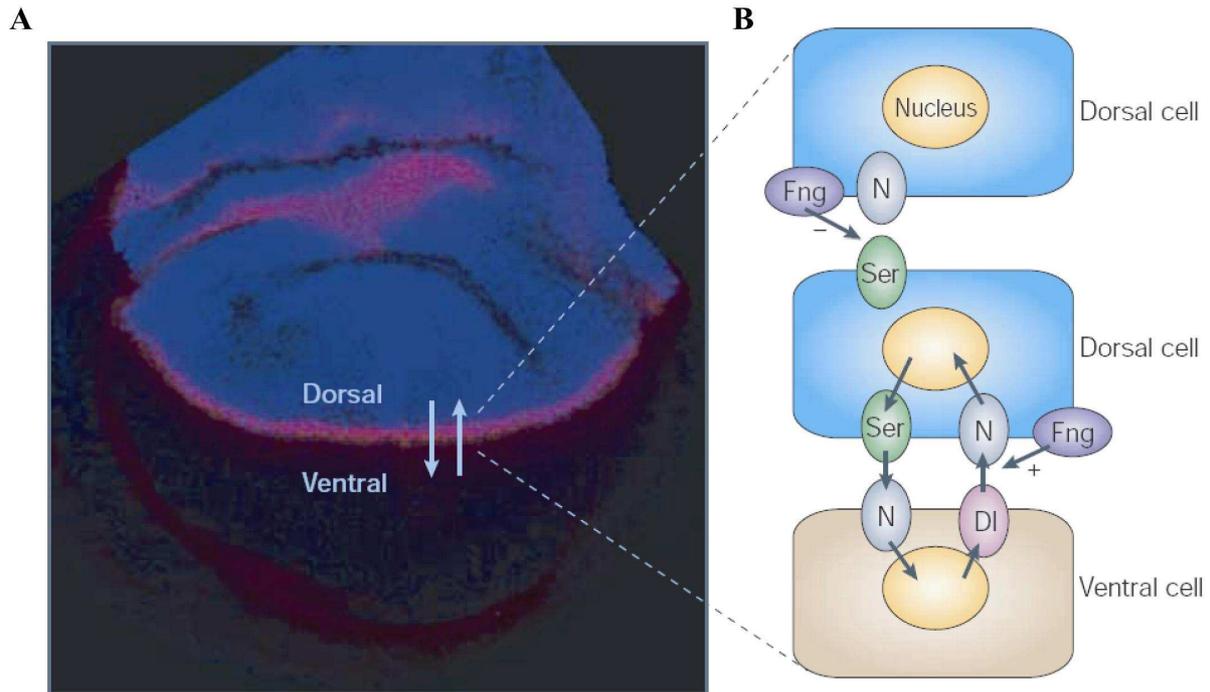


Fig.21 : Création de frontières. La voie de signalisation de Notch est activée à la frontière entre deux populations de cellules différentes. (A) L'image confocale montre le disque imaginal de l'aile, tissu précurseur de l'aile. L'activation de Notch est symbolisée par le marquage rose ; le marquage bleu permet de visualiser les cellules du côté dorsal. (B) Les cellules dorsales (bleu) sont caractérisées par l'expression de Fringe et Serrate alors que les cellules ventrales (marron) expriment Delta. Le rôle de Fringe est de permettre l'activation de Notch par Delta tout en inhibant l'activation de Notch par Serrate. Par conséquent, les cellules dorsales ne peuvent en aucun cas activer entre elles la voie de signalisation de Notch dans une autre cellule dorsale. Par contre, la présence de Delta dans les cellules ventrales permet aux deux types cellulaires adjacents (ventral et dorsal) de s'activer mutuellement. Par contre, une cellule ventrale est incapable d'activer une autre cellule ventrale. (D'après Haines et Irvine, 2003)

3) Création de deux lignées à partir d'une cellule mère.

Lors de la myogenèse et la neurogenèse, certains précurseurs cellulaires existent très tard au cours du développement. On en retrouve chez l'adulte comme en témoignent les cellules satellites des fibres musculaires, par exemple. Ceci implique le maintien, lors des différentes étapes de différenciation, d'un petit nombre de cellules capable de jouer le rôle de précurseurs cellulaires. Lors de la division cellulaire, la voie de signalisation de Notch est utilisée pour différencier les deux cellules filles qui n'auront pas du tout le même devenir

cellulaire. Par exemple, le précurseur cellulaire de la soie (sensille trichoïde) chez la drosophile donne au final quatre cellules appelées : la tige, la chaussette, la cellule gliale et le neurone (Jan et Jan, 1993). A chaque division cellulaire, Notch va être activé dans une seule des deux cellules filles (Figure 22) pour former à l'arrivée quatre cellules qui constitueront la soie. L'inactivation de Notch est assurée par la présence de l'inhibiteur Numb. Ce dernier est ségrégué dans une seule des deux cellules filles et malgré la présence des ligands et du récepteur dans chacune des cellules, la voie de Notch n'est pas opérationnelle dans la cellule contenant Numb permettant l'apparition de cellules non neuronales nécessaires au développement de la soie (d'après Bray, 1998). En l'absence de récepteur Notch, ce sont seulement des neurones qui sont formés.

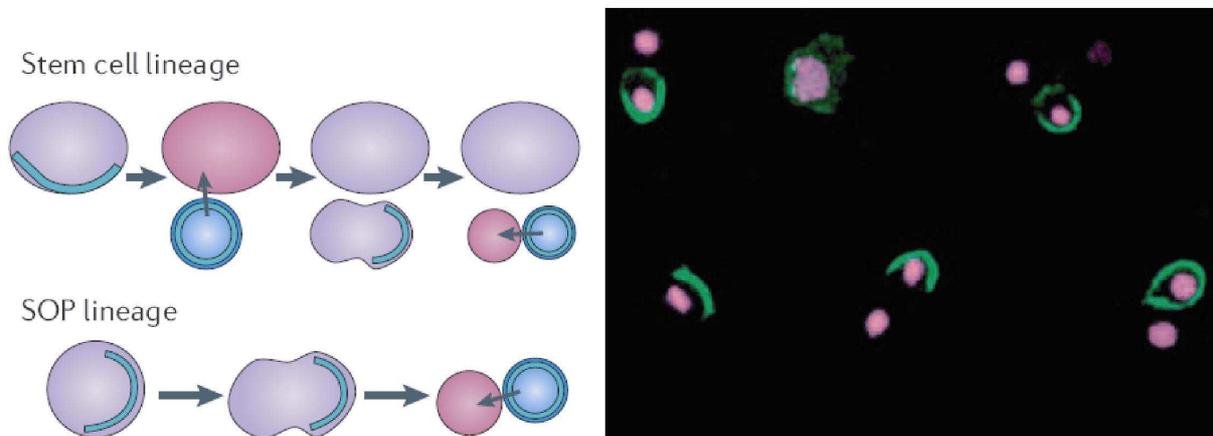


Fig.22 : Le lignage cellulaire. La signalisation de Notch entre deux cellules filles est dépendante de l'héritage asymétrique d'un inhibiteur de Notch : la protéine Numb. Les deux schémas montrent la ségrégation du régulateur (en bleu) dans une seule des deux cellules filles lors de la division de cellules souches (en haut) et dans le cas de précurseurs cellulaires des organes sensoriels (SOP, en bas) chez la drosophile. Les fines flèches noires indiquent le « sens d'activation » de la voie de Notch, les cellules roses étant les cellules où Notch est le plus fortement activé. L'image confocale montre la distribution asymétrique de Numb (en vert ; les noyaux sont colorés en rose) dans des cellules en division (SOP). (D'après Bray, 2006)

V- Implication de la voie de signalisation de Notch dans la myogenèse :

Les études chez la drosophile ainsi que les défauts de somitogenèse observés pour le KO de Notch1 chez la souris (Conlon *et al.*, 1995) ont très vite soulevé l'hypothèse de l'implication de la voie de signalisation de Notch dans le processus de myogenèse chez les mammifères. Cette partie décrit de quelle manière la voie de signalisation de Notch intervient dans plusieurs étapes clés nécessaires au bon déroulement de la myogenèse.

1) La voie de signalisation de Notch à la base de l'horloge moléculaire dans la somitogenèse.

La somitogenèse ayant déjà été traitée dans ce manuscrit (voir page 14), les précisions apportées ici sont complémentaires et concerneront les acteurs de la voie de signalisation de Notch. Les souris générées avec des mutations dans les gènes *Notch1*, *Dll1* et *3*, *RBP-J* et *Lfng*, démontrent l'implication certaine de ces acteurs de la voie de signalisation de Notch dans la somitogenèse. Le gène *c-hairy1*, découvert chez le poulet (Palmeirim *et al.*, 1997), est fortement exprimé dans le mésoderme présomitique (PSM) où sa quantité d'ARNm oscille de façon cyclique avec une période qui correspond au temps de formation d'un somite (90 min chez le poulet). L'horloge moléculaire responsable de la segmentation du PSM est donc liée à l'expression du gène *c-hairy1* qui code une protéine bHLH de la famille des « Hairy and Enhancer of Split (HES) » (Palmeirim *et al.*, 1997). Chez l'embryon de souris, l'expression de *Hes1*, orthologue de *c-hairy1* et dont la transcription est activée par la voie de Notch, obéit aux mêmes oscillations dans le PSM (Jouve *et al.*, 2000), cependant, les souris KO pour ce gène ne présentent aucun défaut de somitogenèse (Ishibashi *et al.*, 1995). En 2001, un nouveau paralogue de *Hes1* est découvert, il est appelé *Hes7*. Ces deux facteurs (*Hes1* et *Hes7*) présentent des structures, des activités transcriptionnelles et des profils d'expression très similaires (Bessho *et al.*, 2001a) : l'ARNm et la protéine issus du gène *Hes7* oscillent aussi dans le PSM (Bessho *et al.*, 2001b). En parallèle, l'expression de *Lfng*, un modulateur de la voie de Notch (Yang *et al.*, 2005), présente elle aussi des oscillations temporelles et spatiales dans le PSM (Forsberg *et al.*, 1998). Les oscillations de *Hes7* et *Lfng* sont dues à une boucle de régulation négative exercée par la protéine *Hes7* sur les gènes *Hes7* et *Lfng* (Bessho *et al.*, 2001b), et le temps de demi-vie de la protéine *Hes7* est un paramètre clé du bon fonctionnement de l'horloge moléculaire (Zeiser *et al.*, 2008). La figure 23 résume le fonctionnement de la voie de signalisation de Notch ainsi que son interaction avec celle des Wnts dans les cellules du mésoderme présomitique.

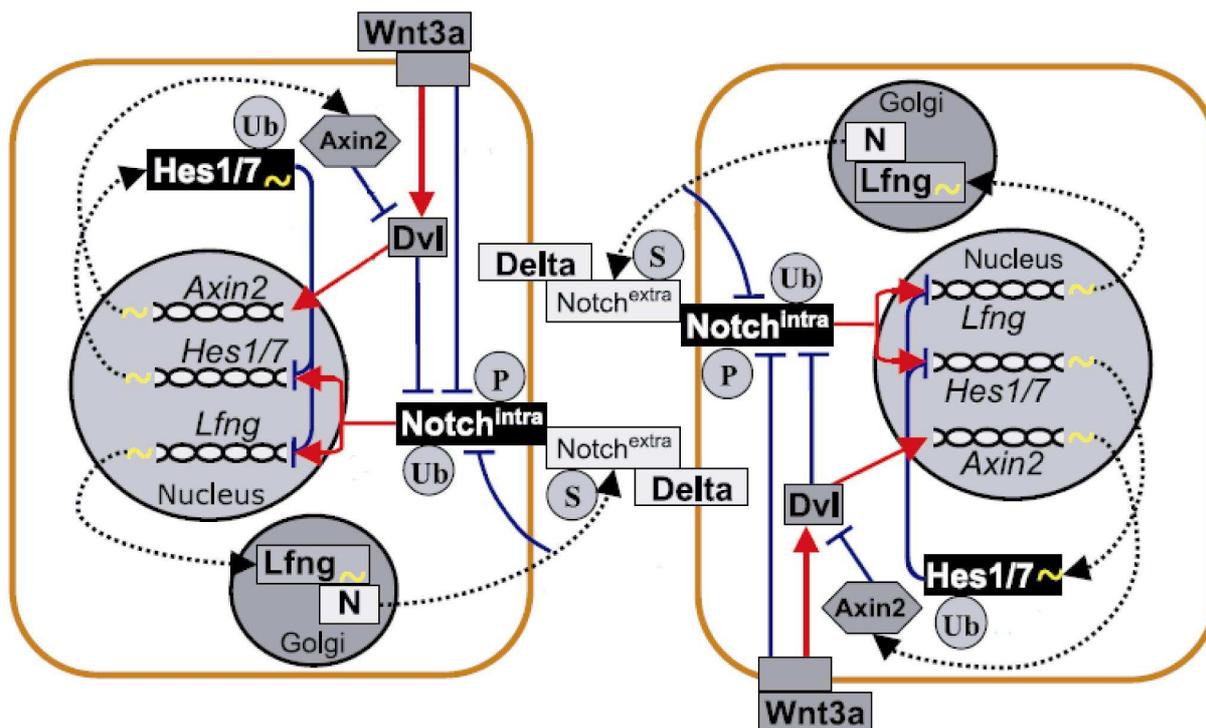


Fig. 23 : La voie de signalisation de Notch lors de la somitogenèse chez les vertébrés. Le mécanisme de l'horloge moléculaire est basé sur plusieurs boucles d'autorégulation qui aboutissent à l'inactivation périodique de la voie de signalisation de Notch qui va entraîner la segmentation du mésoderme paraxial et la formation des somites. Les flèches rouges signifient « activation de l'expression » et les bleues « inhibition de l'expression ». Les flèches en pointillés bleus représentent un retard dû à la transcription, la traduction, la modification post-traductionnelle, la translocation ou le renouvellement des protéines. Les annotations Ub, P et S représentent les modifications post-traductionnelles ; elles correspondent respectivement à l'ubiquitination, la phosphorylation et la O-glycosylation. Le N dans le Golgi désigne la protéine Notch. Dvl : Dishevelled (d'après Rida *et al.*, 2004).

2) Le maintien des progéniteurs myogéniques :

Lors du développement, l'expression spatiale et temporelle de plusieurs récepteurs Notch et de leurs ligands suggère que la voie de signalisation de Notch est importante dans le devenir des précurseurs myogéniques. Des transcrits *Dll1*, *Notch2* et *Notch3* ont été retrouvés dans des zones de bourgeons des membres où l'on retrouve habituellement les précurseurs myogéniques (Beckers *et al.*, 1999 ; Vasyutina *et al.*, 2007). Des analyses génétiques récentes ont démontré le rôle de *Dll1* et de *CBF-1* dans le maintien de la population de progéniteurs cellulaires qui formeront par la suite les muscles (Schuster-Gossler *et al.*, 2007 ; Vasyutina *et al.*, 2007a). La réalisation de ces études a bénéficié de l'utilisation d'une mutation *CBF-1* conditionnelle et d'un allèle *Dll1* hypomorphe, deux approches qui ont permis de passer outre la létalité due aux mutations de composants de la voie de signalisation de Notch. Ces deux

constructions ont abouti à deux phénotypes très similaires : une différenciation extensive et incontrôlée des progéniteurs myogéniques qui aboutit à l'augmentation de la population de myoblastes différenciés exprimant *MyoD* et *Myog* au dépend des progéniteurs myogéniques exprimant *Pax3* (Figure 24). Étonnamment, aucune différence concernant l'expression de *Myf5* n'a été détectée. En résumé, la différenciation prématurée des progéniteurs cellulaires des muscles des souris mutantes CBF-1 et *Dll1* a entraîné une absence de progéniteurs cellulaires des muscles nécessaires à la formation des futures fibres musculaires. La voie de signalisation de Notch est donc nécessaire au maintien des progéniteurs cellulaires des muscles dans un stade indifférencié.

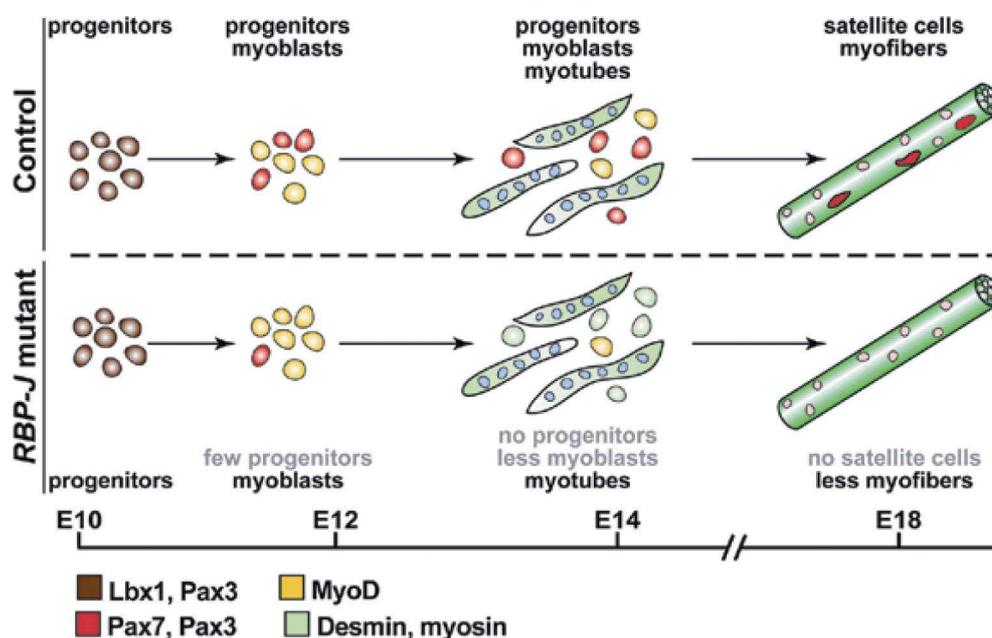


Fig. 24 : Rôle de la voie de signalisation de Notch durant la myogenèse. CBF-1 est nécessaire au maintien du bon nombre de progéniteurs cellulaires des muscles durant l'embryogenèse et à la génération des cellules satellites durant le développement fœtal. La figure est une représentation schématisée du phénotype observé lors de la formation des muscles squelettiques chez le mutant conditionnel de souris CBF-1/RBP-J. Dans les souris témoin (en haut), les cellules Pax3/Pax7-positives (en rouge) sont plus nombreuses que dans les souris mutées (en bas) où elles sont remplacées par des myoblastes. Au moment du développement fœtal, on ne trouve ni progéniteurs ni cellules satellites dans les souris mutées. Le même phénotype est observé dans les souris portant une mutation hypomorphe sur *Dll1*. (D'après Vasyutina *et al.*, 2007b)

3) La voie de signalisation de Notch et les cellules satellites :

-Présence des cellules satellites :

Au cours du développement fœtal, les progéniteurs cellulaires des muscles sont à l'origine des cellules satellites (Biresi *et al.*, 2007). A la naissance des embryons chez les

mutants *CBF-1* cités ci-dessus, la différenciation précoce et intensive de certains précurseurs myogéniques entraîne une déficience en myoblastes qui aboutit à une faible quantité de muscles squelettiques formés. Des analyses par microscopie électronique et par la mesure de l'expression de *Pax7* montrent que les fibres qui composent ces muscles sont dépourvues de cellules satellites (Figure 24), expliquant la faible quantité de muscles observée. L'activation de la voie de signalisation de Notch permet donc la présence des cellules satellites responsables de la croissance et de la régénération des muscles squelettiques (Vasyutina *et al.*, 2007b).

-Activation des cellules satellites :

Les mécanismes moléculaires contrôlant la myogenèse post-natale, caractérisée par l'activation des cellules satellites, leur prolifération, la détermination des cellules-filles et enfin la différenciation des myoblastes, sont complexes et impliquent de nombreux facteurs. La voie de signalisation de Notch est essentielle à la myogenèse post-natale (Luo *et al.*, 2005). Une étude utilisant un système d'explant de myofibres qui mime la blessure d'un muscle, *in vivo*, décrit une augmentation de l'expression de *Dll1* 24h après la blessure. De façon intéressante, *Dll1* est exprimé dans les cellules satellites activées mais aussi dans les fibres intactes adjacentes aux fibres endommagées. L'augmentation de l'expression de *Dll1* s'accompagne de l'apparition de la forme activée de Notch. Dans cette phase précoce, l'activation de la voie de signalisation de Notch induit la prolifération et l'expansion des cellules satellites filles. Une baisse de l'activité de la voie de signalisation de Notch est ensuite nécessaire à la fusion des myoblastes et il semble que cette baisse d'activité soit due à l'inhibiteur Numb (Conboy et Rando, 2002).

Le nombre total de cellules satellites dans le muscle squelettique adulte demeure relativement constant malgré la répétition des blessures et des régénérations. L'un des modèles qui explique le renouvellement des cellules satellites est basé sur la division asymétrique (Conboy et Rando, 2002). Une division asymétrique de la cellule satellite activée répartie de façon inégale la protéine Numb dans les deux cellules filles. La cellule fille qui contient beaucoup de protéine Numb se différencie (inhibition de la voie de signalisation de Notch), à l'inverse, celle ayant une faible concentration de Numb active la voie de signalisation de Notch et par conséquent n'engage pas le processus de différenciation (voir page 48) (Shinin *et al.*, 2007). Ces données sont confortées par une étude parue en 2006, qui montre que l'inhibition de la voie de signalisation de Notch, par surexpression de Numb ou par ajout de l'agent chimique DAPT (qui inhibe l'activité de la γ -secrétase), au cours de la

différenciation des cellules C2.7, entraîne une hypertrophie des myotubes due à l'augmentation du nombre de cellules différenciées capables de fusionner. Ceci implique que l'activation de la voie de signalisation de Notch permet de maintenir une sous-population de cellules de réserve dans un état indifférencié (Kitzmann *et al.*, 2006).

De nouvelles données sur la (ré)génération des fibres musculaires par les cellules satellites ont montré que la différenciation des cellules satellites (ou plus exactement la différenciation des descendantes des cellules satellites) était due à l'inactivation de la voie de signalisation de Notch et à l'activation simultanée de la voie de signalisation des Wnts. Il a été montré que la signalisation par les Wnts agissait directement sur les descendantes des cellules satellites et entraînait une transition de l'état prolifératif vers la phase de différenciation. La balance entre les deux voies de signalisation est observable grâce à la GSK3 β (Glycogen Synthase Kinase 3 β) qui est maintenue active par la voie de signalisation de Notch et inactive par la voie de signalisation des Wnts (Brack *et al.*, 2008).

4) Mécanisme de l'inhibition de la différenciation des myoblastes.

L'étude de la voie de signalisation de Notch chez différents mutants et dans des cultures de cellules myogéniques de mammifères a permis de « décortiquer » le mécanisme d'action spécifique de cette signalisation au cours de la différenciation des myoblastes. Le mécanisme moléculaire de la voie de signalisation de Notch présente des spécificités dans le contexte de la myogenèse.

Tout d'abord, les analyses précises des phénotypes des mutants *Notch* et *Su(H)* chez la drosophile montrent que le phénotype *Notch* est plus grave que celui observé chez les mutants *Su(H)*. On remarque notamment une augmentation du nombre de précurseurs myogéniques uniquement dans les mutants *Notch* (Rusconi et Corbin, 1998). Ceci signifie que la voie de signalisation de Notch dépendante des facteurs CSL n'assure pas toutes les fonctions du récepteur Notch. Chez les mammifères, des études sur la lignée de cellules C2C12 ont permis de décrire deux mécanismes moléculaires à l'origine de la régulation de la différenciation des myoblastes : un mécanisme dépendant de CBF-1 et un mécanisme indépendant de CBF-1. Il a en effet été démontré que l'activation de la voie de signalisation de Notch utilisant CBF-1 entraînait, dans l'heure, une hausse de l'expression de *Hes1* qui à son tour inhibait l'expression de *MyoD* bloquant ainsi le processus myogénique (Kuroda *et al.*, 1999). En plus de leur fonction inhibitrice (liaison aux séquences N- et E-box dans le promoteur des gènes cibles), les protéines de la famille Hes, Hes1 et 2, sont capables, par un effet direct, de réduire

l'activité transcriptionnelle de *MyoD* en empêchant sa liaison à E47 (Ordentlich *et al.*, 1998). Certaines études font aussi état d'une interaction entre les facteurs Hey1 ou Hey2 et MyoD, ce qui implique la séquestration de MyoD et donc son inactivation (Sun *et al.*, 2001). Cependant, des expériences avec un récepteur Notch muté, qui ne comporte pas de séquence de liaison à CBF-1, ont montré que la différenciation des myoblastes pouvait être bloquée sans recours à la protéine CBF-1. De façon intéressante, cette voie indépendante de CBF-1 qui entraîne à terme la suppression de la différenciation myoblastique n'affecte pas l'expression de *MyoD*, mais provoque la sous-expression de gènes comme la *Myog* ou la *Myosine* (Shawber *et al.*, 1996). L'une des hypothèses les plus étayées propose une interaction directe entre la partie intracellulaire de Notch et le facteur de transcription Mef2c ce qui bloque le site de liaison de ce dernier à l'ADN, empêchant la transcription de gènes cibles, nécessaire à la différenciation des myoblastes (Wilson-Rawls *et al.*, 1999). Une seconde hypothèse repose sur les connaissances acquises à propos de l'interaction entre Notch et Deltex. Celle-ci serait en effet capable à terme d'inhiber l'action de facteurs de transcription ubiquitaires à HLH comme E47 et ainsi empêcher la différenciation des cellules myoblastiques C2C12 (Ordentlich *et al.*, 1998).

En définitive, les données acquises sur le sujet démontrent clairement que les myoblastes fortement exposés à l'activation de la voie de signalisation de Notch ne sortent pas du cycle cellulaire et présentent une fusion myoblastique très faible (Vasyutina *et al.*, 2007b). La voie de signalisation de Notch indépendante de la protéine CBF-1 a été mise en évidence uniquement dans des cellules myoblastiques. La question est de savoir si ce mécanisme est extrapolable à d'autres types cellulaires ou s'il est spécifique des cellules myoblastiques et du processus de différenciation myogénique.

La Glycosylation

Une modification essentielle des protéines

La glycobiologie s'intéresse à la compréhension de la structure, la chimie, la biosynthèse et la fonction biologique des glycannes. Ces derniers constituent l'une des 4 familles de macromolécules de la cellule avec les protéines, les acides nucléiques et les lipides. Ce sont les biopolymères naturels les plus abondants et les plus diversifiés dans la nature (Otsubo et Marth, 2006). Ils comprennent des oligosaccharides (chaînes courtes de monosaccharides) et des chaînes plus complexes contenues dans les glycoprotéines, les glycolipides et les protéoglycannes (Zhao *et al.*, 2008). Ils sont majoritairement localisés à la surface des cellules, dans la matrice extracellulaire mais aussi dans plusieurs organites comme l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique (RE), le lysosome et aussi le noyau (Zhao *et al.*, 2008). La glycosylation correspond à la liaison d'un monosaccharide ou d'une chaîne glycanique à une protéine ou à un lipide. Elle est assurée par une machinerie complexe et coordonnée qui implique plusieurs types de protéines dont les glycosyltransférases, les glycosidases ou les lectines (Kooyk et Rabinovitch, 2008). Parmi les nombreuses modifications post-traductionnelles des protéines, la glycosylation est la plus commune. On pense qu'environ la moitié des protéines d'une cellule est glycosylée (Zhao *et al.*, 2008). Chez les mammifères, les gènes qui codent des protéines impliquées dans la machinerie de glycosylation représentent de 1 à 2 % du génome. A ce jour, une recherche utilisant le mot clef « glycosyltransferase » donne 232 résultats dans la banque de donnée « Mouse Genome Informatics » (MGI, <http://www.informatics.jax.org>). L'expression de ces enzymes est fortement régulée selon le métabolisme cellulaire, les changements environnementaux, l'âge ou le tissu (Kooyk et Rabinovitch, 2008).

La glycosylation est une source de diversité des glycoprotéines. Le même squelette protéique peut être conjugué avec des structures glycaniques différentes formant ainsi des glycoformes. Cette diversité s'explique par les unités monosaccharidiques qui les composent et les liaisons qui lient 2 sucres consécutifs. Chaque monosaccharide comporte 3 ou 4 sites d'attachement avec un autre monosaccharide, ce qui permet la formation de structures linéaires ou ramifiées, et ces liaisons peuvent exister selon l'anométrie α ou β (Figure 25). Les glycannes possèdent donc une diversité structurale bien plus étendue que les autres macromolécules comme les protéines ou les acides nucléiques. En théorie, les 9

monosaccharides de base que l'on retrouve chez l'Homme peuvent être assemblés en plus de 15 millions de tétrasaccharides différents (Dove, 2001). Comparativement, 9 acides aminés ne peuvent former que 362 880 peptides différents. En réalité, les variations du glycome (ensemble des structures glycaniques chez un organisme) sont estimées, chez un mammifère, à quelques milliers de structures potentielles qui s'ajoutent à la diversité déjà créée par le protéome (Kooyk et Rabinovitch, 2008).

Au cours de la dernière décennie, les efforts de recherche en glycobiochimie ont permis l'étude de nombreuses enzymes impliquées dans des fonctions biologiques telles que l'adhésion cellulaire, l'activation de récepteurs, la transduction de signal, le trafic intracellulaire et l'endocytose (Vigerust et Sheperd, 2007). La glycosylation des protéines, qui sera le sujet de cette partie, se décline en deux catégories selon la nature de la liaison chimique entre les sucres et la protéine. On parle de *N*-glycosylation lorsque les sucres sont attachés à l'azote de la fonction amide d'une asparagine, et de *O*-glycosylation lorsque les sucres sont reliés à la fonction alcool d'une sérine ou d'une thréonine. La *C*-mannosylation est une autre forme de glycosylation, beaucoup plus rare, où un mannose est lié au carbone 2 du groupement indole d'un tryptophane (Hofsteenge *et al.*, 1994).

		PROTEIN AND LIPID ACCEPTORS							SACCHARIDE ACCEPTORS								
		Ser/Thr (O-glycans, O-GlcNAc, glycosaminoglycans)	Asn (N-glycans)	hLys (Collagen-like domains)	Trp (RNase 2, IL-12, properdin)	Tyr (Glycogenin)	Cer (Glycolipids)	PI (GPI anchors)	Fucose	Galactose	N-Acetylgalactosamine	Glucose	N-Acetylglucosamine	Glucuronic acid	Mannose	Sialic acid	Xylose
DONORS		△	○	□	●	■	◇	○	□	●	■	◇	○	◇	○	☆	
GDP-△	α1	-	-	-	-	-	-	-	α1-2	-	-	α1-3 α1-4 α1-6	-	-	-	-	
UDP-○	-	-	β1	-	-	β1	-	-	α1-3 α1-4 β1-3	β1-3	β1-4	β1-3 β1-4	-	-	-	β1-4	
UDP-□	α1	-	-	-	-	-	-	-	α1-3 β1-3 β1-4	α1-3 α1-6	-	β1-4	β1-4	-	-	-	
UDP-●	β1	β1	-	-	α1	β1	-	β1-3	α1-2	-	α1-2 α1-3	-	-	α1-3	-	-	
UDP-■	β1	*	-	-	-	-	α1	β1-3	β1-3 β1-6	β1-6	-	α1-6 α1-4	α1-4 β1-4	β1-2	-	-	
UDP-◇	-	-	-	-	-	-	-	-	β1-3 β1-4	β1-3	-	β1-3 β1-4	-	-	-	-	
GDP-○	α1	-	-	α1	-	-	-	-	-	-	-	α1-4 β1-4	-	α1-2 α1-3 α1-6	-	-	
CMP-◇	-	-	-	-	-	-	-	-	α2-3 α2-6	α2-6	-	-	-	-	α2-8	-	
UDP-☆	β1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	α1-3	-	-	-	-	α1-3	

Fig. 26 : La biosynthèse des nucléotide-sucre dans le cytoplasme. Toutes les étapes intermédiaires ne sont pas montrées sur le schéma. Les monosaccharides entourés proviennent de l'alimentation ou résultent d'un processus de dégradation de macromolécules. Les étoiles indiquent les étapes qui nécessitent de l'ATP. Contrairement aux autres nucléotide-sucre, la synthèse du CMP-NeuAc se déroule dans le noyau. Les nucléotide-sucre nouvellement synthétisés doivent ensuite être acheminés vers le RE et/ou le Golgi par des transporteurs spécifiques. (D'après Wopereis *et al.*, 2006)

I- La *N*-glycosylation

La *N*-glycosylation concerne la plupart des glycoprotéines (Vijay, 1998). Les *N*-glycannes sont présents aussi bien chez les organismes unicellulaires (Levures, Trypanosomes, etc.) que chez les organismes pluricellulaires (Plantes, Insectes, Mammifères, etc.) (Spiro, 2002). Chez les Eucaryotes, c'est un processus métabolique hautement conservé indispensable au bon fonctionnement des cellules (Kukuruzinska et Lennon-Hopkins, 1999), et donc à la viabilité des organismes. Ainsi, un défaut dans la machinerie de *N*-glycosylation peut conduire, chez l'Homme par exemple, à un syndrome de type CDG (Congenital Disorder of Glycosylation) qui, en fonction du gène touché, peut entraîner des retards mentaux et développementaux, des problèmes gastro-intestinaux ou immunitaires graves (Freeze et Aebi, 2005).

1) Biosynthèse des *N*-glycannes :

La *N*-glycosylation des protéines se déroule dans deux compartiments cellulaires distincts : d'abord dans le réticulum endoplasmique rugueux (RER) puis dans l'appareil de Golgi. Dans le RER, un précurseur oligosaccharidique ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) est assemblé sur un transporteur lipidique, le dolicholpyrophosphate, puis transféré sur un résidu asparagine de la chaîne peptidique naissante (Burda et Aebi, 1999) (voir thèse Lorient, 2006 pour détails). La séquence consensus de *N*-glycosylation, au sein de la protéine naissante, est de type Asn-X-Ser/Thr où X est un acide aminé autre que la proline (Gavel et Heijne, 1990). La seconde phase du processus de glycosylation commence dès le transfert du précurseur glycanique. L'oligosaccharide transféré perdra les deux premiers glucoses puis, de manière réversible, le troisième glucose. Dans le RE et l'appareil de Golgi, cinq mannoses sont ensuite retirés et plusieurs GlcNAc, galactose, acide sialique et fucose peuvent être ajoutés.

2) Diversité des *N*-glycannes :

La structure du *N*-glycanne, produit final de la voie de biosynthèse, ne dépend pas de la séquence de la protéine mais d'un nombre variable d'autres facteurs comme la disponibilité des substrats et des enzymes qui varie en fonction de différentes conditions physiologiques, telles que la croissance et la différenciation cellulaire (Geyer et Geyer, 2006). De plus, certaines enzymes sont en compétition pour le même substrat au niveau des points d'embranchement des différentes voies de biosynthèse. En fonction de l'abondance, de l'affinité, de la localisation, la glycosyltransférase dominante peut favoriser la synthèse de tel ou tel glycane lorsque la protéine est adressée au Golgi (Freeze et Aebi, 2005).

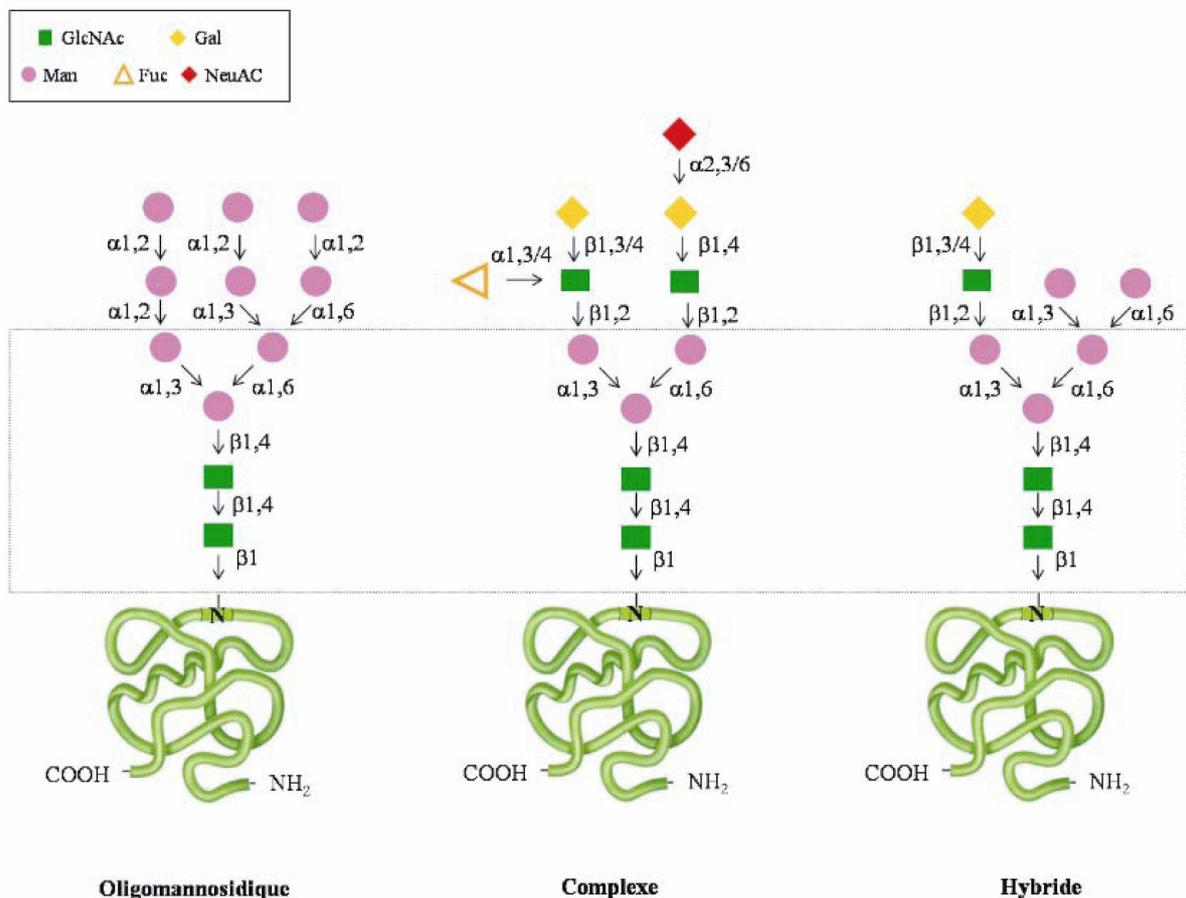


Fig. 27 : Les trois classes principales de *N*-glycannes. Les *N*-glycannes de type oligomannosidique sont typiques des glycoprotéines résidentes du RE alors que les *N*-glycannes hybrides et complexes traduisent une progression plus profonde dans l'appareil de Golgi et les voies de sécrétion. La diversité des glycannes est dictée par le type de monosaccharides assemblés (GlcNAc, Man, Fuc, NeuAc,...) et le type de liaison formée (anométrie α et β ; carbone impliqué dans la liaison). Ces deux contraintes sont liées aux spécificités des glycosyltransférases. La partie encadrée correspond au cœur

pentasaccharidique ($\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$) commun à tous les *N*-glycannes. (D'après Loriol, 2006)

A raison de leur voie de biosynthèse, initialement commune, tous les *N*-glycannes partagent le noyau pentasaccharidique ($\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-N-Asn}$). Selon leur future localisation et donc selon leur structure, on peut classer les *N*-glycannes en trois classes (Figure 27). Les *N*-glycannes oligomannosidiques qui comportent seulement 2 GlcNAc et un nombre variable de Mannose (de 2 à 9 résidus). Les *N*-glycannes de type complexe possèdent un noyau dont les deux mannoses de la fourche sont allongés par un GlcNAc lié en $\beta 1,2$ ce qui permet par la suite le greffage d'un nombre variable de Gal, Fuc, NeuAc,... Les *N*-glycannes complexes peuvent être tri-, tétra- (Mammifères, Plantes, Insectes), voire penta-antennés (Oiseaux, poissons osseux) (Sakamoto *et al.*, 2000). Enfin, les *N*-glycannes de type hybride combinent les propriétés des classes oligomannosidiques et complexes. La figure 28 montre les principales caractéristiques de la structure des *N*-glycannes complexes chez différents organismes.

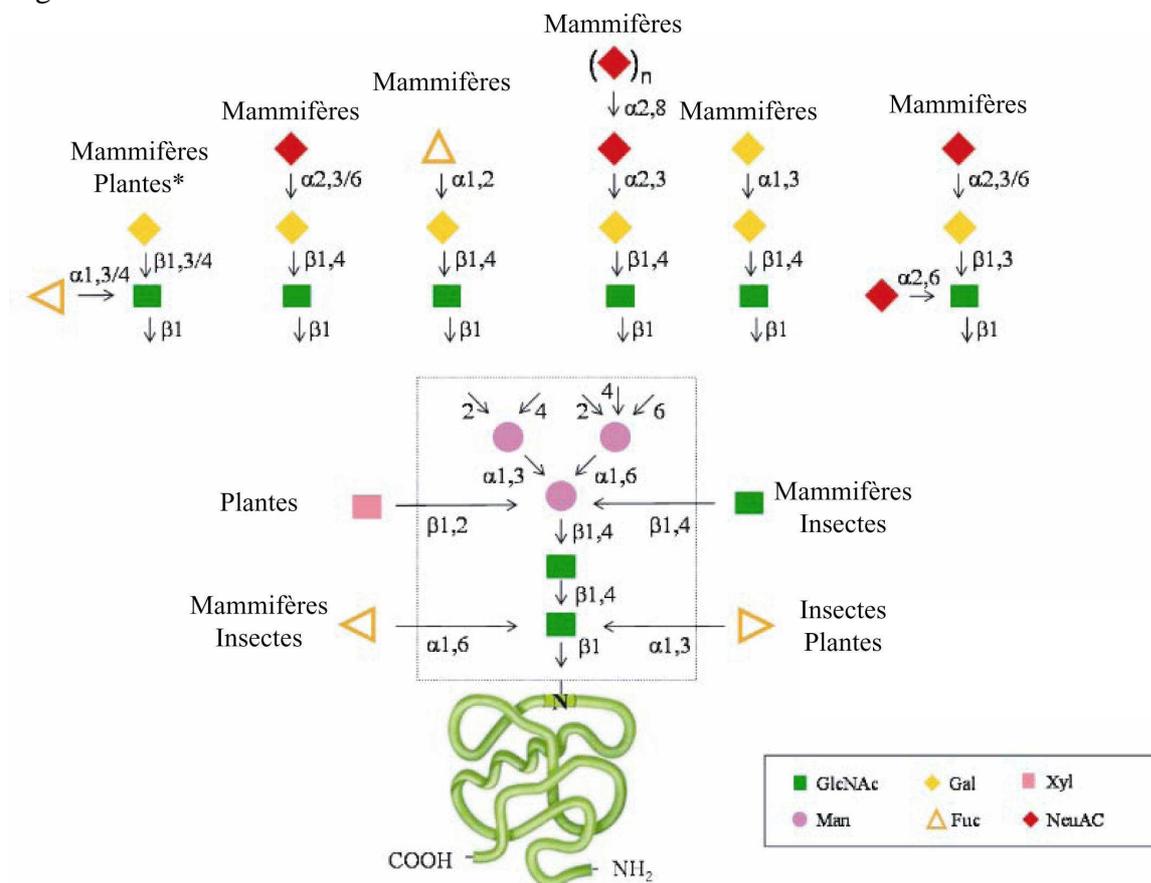


Fig. 28 : La diversité des *N*-glycannes chez différents taxons. La structure des *N*-glycannes complexes est différente en fonction de l'état cellulaire (quiescent, prolifératif, en différenciation,...), de la nature du tissu et de l'espèce considérée. Les levures et les champignons filamenteux ne produisent que des *N*-glycannes de type oligomannosidique. * Les plantes ne possèdent pas les enzymes nécessaires au greffage du fucose en $\alpha 1,3$ sur ce GlcNAc. (D'après Loriol, 2006)

3) Rôle des *N*-glycannes

Les *N*-glycannes présents sur les protéines localisées dans le RE sont homogènes et relativement simples. A l'inverse, les modifications apportées par les étapes terminales de glycosylation dans l'appareil de Golgi leur apportent une grande diversité structurale. Ce changement structural s'accompagne d'un changement de la fonction des *N*-glycannes (Helenius et Aebi, 2001). Dans la voie de sécrétion précoce, les *N*-glycannes jouent tous un rôle commun dans le repliement et le contrôle qualité des glycoprotéines qui les portent (Figure 29). Les glycosyltransférases golgiennes vont préparer les glycoprotéines à assumer de nouvelles fonctions qui se feront principalement par l'intermédiaire d'interactions sucre-protéine à la surface des cellules (Figure 29).

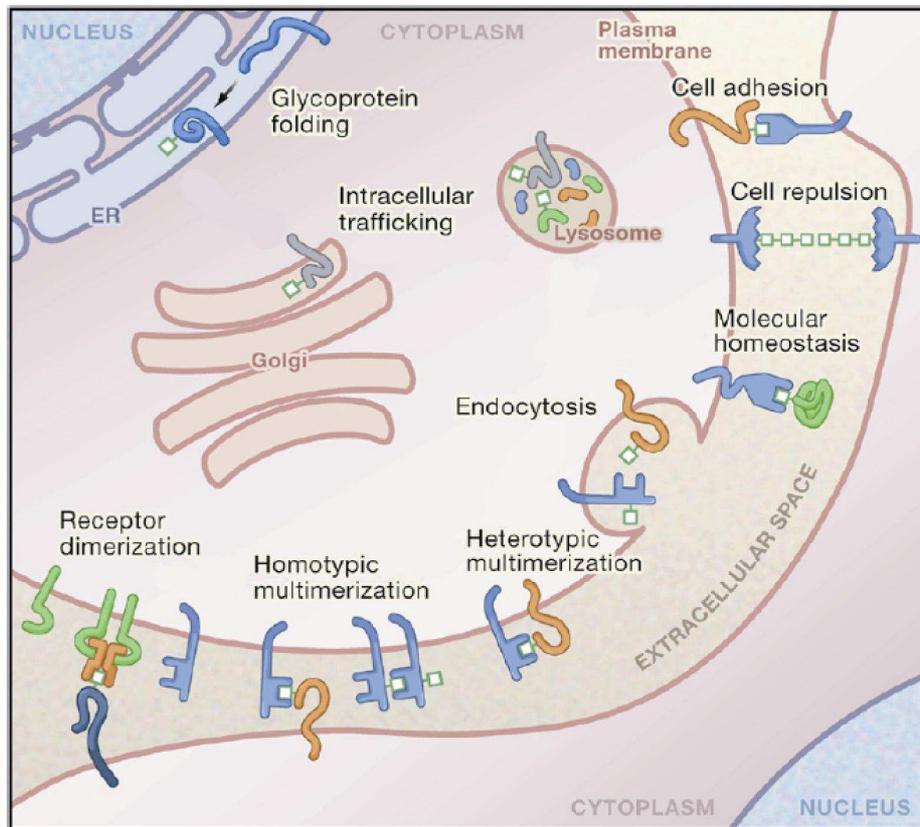


Fig. 29 : Le rôle des *N*-glycannes dans la vie d'une protéine. Les *N*-glycannes (représentés par un carré blanc) produits dans la voie de sécrétion participent à plusieurs mécanismes de régulation cellulaire ; ils agissent dès la synthèse de la protéine dans le RE jusqu'au lieu où celle-ci doit exercer sa fonction. (D'après Otshubo et Marth, 2006)

-Dans la conformation des protéines.

D'un point de vue chronologique, le premier rôle des *N*-glycannes est de permettre le repliement optimal des glycopeptides nouvellement synthétisés dans le RE (Paulson, 1989). Cette adaptation des eucaryotes permet aux cellules de produire et de sécréter des protéines plus grosses et plus complexes. Cette fonction explique aussi pourquoi l'ajout de *N*-glycannes se déroule très tôt dans le RE, c'est-à-dire avant que le processus de repliement ne commence (Helenius et Aebi, 2001). Lorsque la glycosylation est inhibée, le premier effet observé est l'apparition de protéines mal repliées, agrégées et non fonctionnelles (Helenius, 1994). Des études de repliement *in vitro* utilisant une version glycosylée et une version non glycosylée de la même protéine confirme que les chaînes oligosaccharidiques ont une influence positive sur le processus de repliement (Imperiali *et al.*, 1999). Cependant, les *N*-glycannes peuvent, une fois le processus de repliement achevé, être retirés de la glycoprotéine sans effet majeur sur la conformation de cette dernière (Wormald et Dwek, 1999). La simple présence de chaînes oligosaccharidiques au sein d'une protéine permet d'en augmenter la solubilité. On considère aussi que l'encombrement stérique causé par les *N*-glycannes peut jouer un rôle dans le repliement de la protéine. L'effet le plus important des glycannes sur le repliement des protéines est cependant indirect et fait intervenir un système cyclique de protéines chaperonnes présentes dans le RE de la quasi-totalité des cellules eucaryotes (Parodi *et al.*, 2000) (Figure 30). Les *N*-glycannes servent en réalité de « ticket d'admission » pour ce cycle. Plus d'un tiers des protéines nouvellement synthétisées sont transloquées dans le RE et la plupart d'entre elles vont être glycosylées (Nakatsukasa et Brodsky, 2008). La Calnexine CNX (membranaire) et la Calréticuline CRT (soluble) sont deux lectines homologues qui se lient à toutes les *N*-glycoprotéines nouvellement synthétisées (Ou *et al.*, 1993). Les deux lectines interagissent avec les chaînes oligosaccharidiques ($\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) après que ces dernières aient été dépourvues de leurs deux glucoses terminaux par les glucosidases I et II (Hammond *et al.*, 1994). S'il existe un site de *N*-glycosylation dans les 50 premiers acides aminés de la glycoprotéine naissante, l'interaction avec les lectines débute de façon co-translationnelle (Molinari, 2000). La glucosidase II va ensuite enlever le troisième glucose de façon stochastique (c.à.d. sans prêter attention à l'état de conformation de la protéine) et ainsi libérer celle-ci des lectines. Les protéines mal conformées vont être reglycosylées par la glucosyltransférase, qui reconnaît spécifiquement les protéines mal conformées ou sous la forme de « globule fondu » (Caramelo *et al.*, 2003), ce qui permet une nouvelle liaison avec la CNX ou la CRT. Cependant, les protéines mal repliées dans le RE ne peuvent rester

indéfiniment dans le cycle CNX/CRT et une sorte de « chronomètre de repliement » va les sortir du cycle et induire leur destruction. Ce rôle est assuré par la RE-endomannosidase I qui coupe un résidu mannose du glycanne ce qui réduit l'affinité de la protéine vis-à-vis des deux lectines (Jakob *et al.*, 1998). Par contre, comme pour le cas de la glucosidase, l'RE-endomannosidase I coupe aussi le mannose des protéines bien repliées. Ainsi, l'oligosaccharide contenant la structure Man₈ ne suffit pas à lui seul à entraîner la dégradation de la protéine. La protéine EDEM (ER-degradation enhancing α -mannosidase-like protein) est une lectine spécifique de l'oligosaccharide contenant la structure Man₈. Elle est nécessaire à la dégradation des glycoprotéines mal repliées (Hosokawa *et al.*, 2001). Cette lectine est l'accepteur terminal des glycoprotéines mal repliées libérées par le cycle CNX/CRT (Oda *et al.*, 2003). Son interaction avec la protéine mal repliée représente le signal qui dirigera cette dernière vers le système ERAD (ER-associated degradation pathway). Cependant, cette hypothèse manque encore de données moléculaires puisque la protéine EDEM reconnaît aussi les oligosaccharides contenant Man₈ qui sont portés par des protéines correctement repliées (Hirsch *et al.*, 2004). Des résultats récemment obtenus montrent que la protéine EDEM aurait elle aussi une activité endomannosidase, ces données permettront sûrement de définir précisément les mécanismes mis en jeu lors de ce processus (Nakatsukasa et Brodsky, 2008).

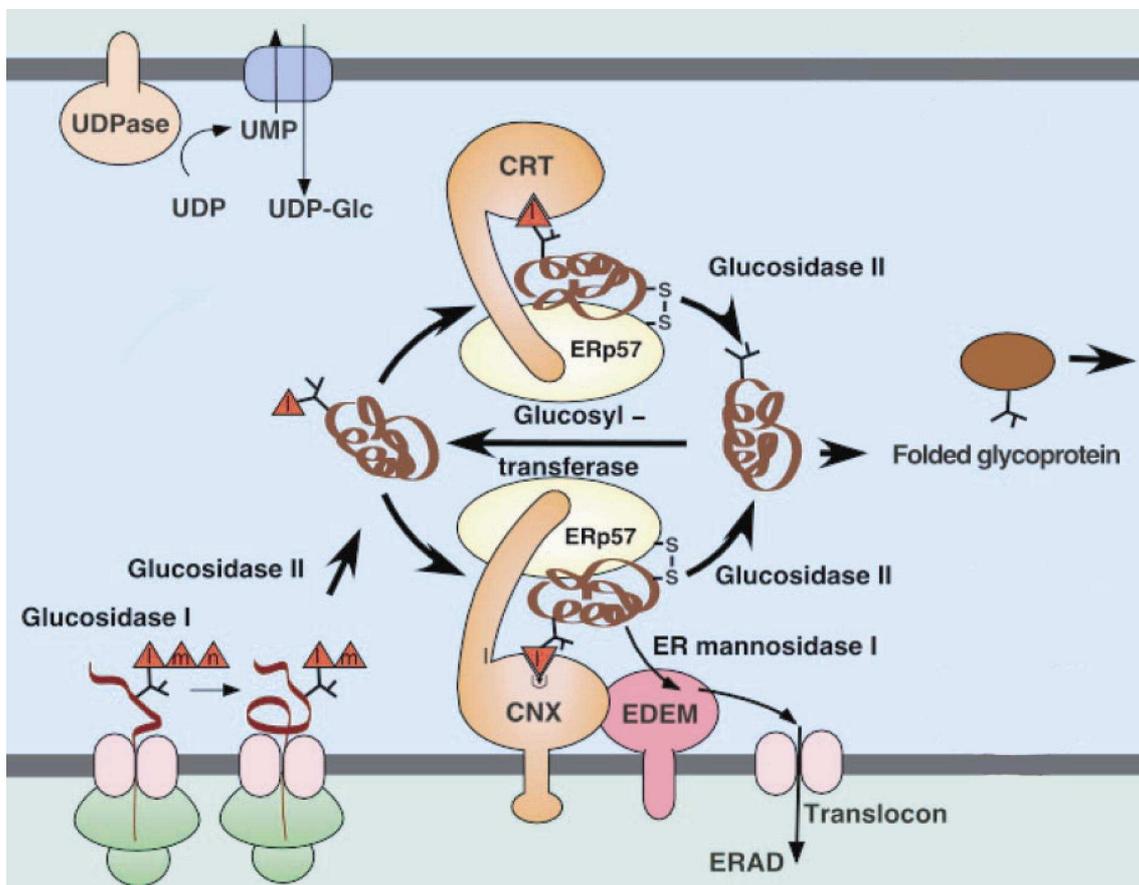


Fig. 30 : Rôle des *N*-glycannes lors du repliement des protéines : Le cycle Calnexine/Calréticuline. Les protéines nouvellement synthétisées sont transloquées dans le RE par la protéine Sec61. Quand deux des trois glucoses du *N*-glycanne de la chaîne glycopeptidique naissante ont été retirés par les glucosidases I et II, la glycoprotéine se lie à la Calnexine (CNX) et/ou à la Calréticuline (CRT). La protéine est ensuite exposée à ERp57 (aussi appelée PDI pour protein disulfide isomerase), une thiol-oxydoréductase, qui forme un complexe avec les lectines. Si la glycoprotéine comporte des cystéines, la formation de ponts disulfures est alors catalysée par ERp57. Le troisième glucose est ensuite coupé par la glucosidase II ce qui implique la dissociation du complexe. L'un des mannoses du *N*-glycanne de la glycoprotéine va être coupé par l'enzyme RE-*endo*mannosidase I. L'épitope restant (Man8GlcNAc2) constitue un signal (reconnu par la lectine EDEM) pour l'hydrolyse de la glycoprotéine mal repliée, par le système cytosolique ERAD (ER-associated degradation). Cet oligosaccharide est en effet nécessaire pour la translocation rétrograde (assurée par Sec61) des *N*-glycoprotéines du RE vers le cytoplasme (Plempner et Wolf, 1999). Les glycoprotéines normalement repliées sont orientées vers l'appareil de Golgi. (D'après Helenies et Aebi, 2001 ; Lorient, 2006)

- Protection des *N*-glycoprotéines vis-à-vis de la protéolyse :

Les sites de *N*-glycosylation sont souvent situés dans des régions peptidiques organisées en feuillets β et très exposées aux protéases. Les *N*-glycannes, de par l'encombrement stérique qu'ils occasionnent, protègent ces régions de la protéolyse (Kundra et Kornfeld, 1999), notamment durant le transport des glycoprotéines depuis le RE jusqu'à leur destination finale (Wormald et Dwek, 1999). La glycosylation est, par conséquent, un facteur influençant la durée de demi-vie des glycoprotéines.

- L'adressage subcellulaire des protéines :

Ce rôle des *N*-glycannes est observé dans le transport sélectif des hydrolases lysosomales du *trans*-Golgi vers les endosomes et les lysosomes (Kornfeld, 1990). L'évènement clé se déroule dans le compartiment *cis*-golgien où une enzyme, l'« UDP-GlcNAc-lysosomal-enzyme *N*-acetylglucosamine-1-phosphotransférase », modifie spécifiquement les *N*-glycannes des hydrolases lysosomales en ajoutant un GlcNAc-phosphate au résidu mannose terminal. Ce complexe composé de plusieurs sous-unités reconnaît les enzymes lysosomales parmi les autres glycoprotéines grâce à leur conformation spécifique, l'interaction nécessite des résidus lysines espacés à la surface de la protéine et demande une grande surface de contact entre les deux structures (Nishikawa *et al.*, 1999). Après élimination du GlcNAc, le mannose-6-phosphate restant est reconnu, dans le réseau *trans*-golgien, par deux lectines membranaires : le récepteur à mannose-6-phosphate dimérique, dépendant d'un cation (CD-MPR) et le récepteur à mannose-6-phosphate multifonctionnel, indépendant d'un cation, facteur de croissance de type Insuline-like (IGF-II/CIMPR). Le rôle de ces récepteurs est de séquestrer les enzymes lysosomales grâce à

leur entité glucidique, dans un compartiment du réseau *trans*-golgien et de les escorter vers les lysosomes (Helenius et Aebi, 2001).

-Importance des *N*-glycannes pour les interactions protéine-protéine :

Plusieurs autres contributions peuvent être apportées par les *N*-glycannes aux protéines qui les portent. J'ai choisi d'en présenter deux exemples significatifs qui symbolisent l'effet que peut avoir la *N*-glycosylation sur les fonctions biologiques des molécules d'adhésion cellulaire comme les intégrines (Zhao *et al.*, 2008).

Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires impliqués dans le processus d'adhésion cellulaire. Ils sont constitués de deux sous-unités, α et β . Les extrémités *N*-terminales des deux sous-unités s'associent pour former le domaine de liaison à la matrice extracellulaire. Les segments *C*-terminaux traversent la membrane plasmique et interagissent avec le cytosquelette et des molécules de signalisation (Zhao *et al.*, 2008). Un nombre croissant de preuves indique que la présence de *N*-glycannes appropriés module la fonctionnalité des intégrines (Gu et Taniguchi, 2004). Tout d'abord, le traitement de l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ avec de la PNGase F (qui coupe les *N*-glycannes entre le GlcNAc et l'asparagine) empêche sa liaison avec la fibronectine, protéine soluble multiadhésive de la matrice extracellulaire (Zheng *et al.*, 1994). Dans une autre étude, il a été montré que les *N*-glycannes portés par la sous-unité α_5 étaient essentiels pour l'hétérodimérisation des deux sous-unités, pour leur expression à la surface de la cellule, mais aussi à leur fonction biologique (Isaji *et al.*, 2006). L'expression des intégrines à la surface des cellules ainsi que leur activation sont dépendantes de la liaison entre les intégrines et certaines Galectines, ce qui sous-entend que la composition des glycannes portés par les intégrines a un rôle primordial (Zhao *et al.*, 2008). La fucosylation de l'intégrine $\alpha_3\beta_1$ joue aussi un rôle dans la fonction des intégrines. Dans des fibroblastes embryonnaires *Fut8*^{-/-}, il a été montré que la signalisation relayée par cette intégrine était réduite, ce qui indique que le fucose en α 1,6 sur le GlcNAc proximal du cœur pentasaccharidique est impliqué dans cette fonction (Zhao *et al.*, 2006). La figure 31 montre différents cas d'interactions protéine-protéine pouvant être soit favorisées soit déstabilisées par la présence d'une chaîne oligosaccharidique.

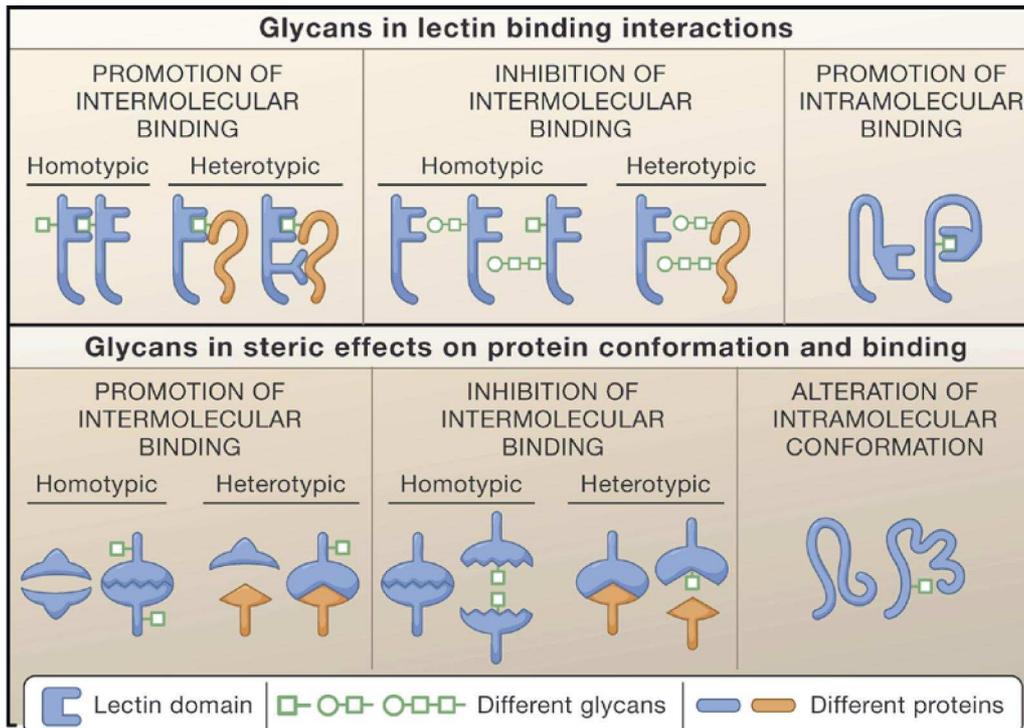


Fig. 31 : Les *N*-glycannes peuvent moduler les interactions moléculaires. Cette figure illustre les liaisons de type lectine et les mécanismes stériques qui contrôlent les interactions protéine-protéine. Ces dernières peuvent être intra- ou/et intermoléculaires, entre deux protéines de même type (homotypie) ou de types différents (hétérotypie). (D'après Ohtsubo et Marth, 2006)

4) Importance de la *N*-glycosylation au niveau de l'organisme : les CDGs

Un certain nombre de maladies sont associées à des déficiences ou défauts dans le métabolisme des glycoprotéines. Chez l'Homme, les CDG (Congenital Disorder of Glycosylation) représentent un groupe de maladies innées affectant le processus de *N*-glycosylation (Freeze et Aebi, 2005). Dès la découverte des premiers déficits enzymatiques, les glycobiologistes ont proposé une classification tenant compte des grandes étapes de la biosynthèse des différents types de glycannes. Ainsi, si ces maladies sont la conséquence de mutations au niveau de gènes qui contrôlent la biosynthèse ou le transfert du précurseur oligosaccharidique, on parle de CDG de type I, et si ce sont des gènes dont les produits assurent la maturation des *N*-glycoprotéines, on parle de CDG de type II (Dennis *et al.*, 1999). Pour l'instant, 12 CDG de type I et 6 CDG de type II ont été identifiés (Freeze et Aebi, 2005). Bien que la présentation clinique varie d'un type de CDG à l'autre, une atteinte neurologique sévère associée à un retard mental et à une hypotonie axiale est présente le plus souvent, à laquelle peuvent s'associer des atteintes multiviscérales graves (Jaeken et Matthijs, 2007).

II- La *O*-glycosylation : Considérations générales.

Contrairement aux *N*-glycannes, les *O*-glycannes présentent des structures très diverses et ne possèdent pas de cœur saccharidique commun. Tandis que la *N*-glycosylation débute par l'assemblage d'un oligosaccharide dans le RER qui sera ensuite transféré en bloc sur la protéine naissante, la *O*-glycosylation se fait par les additions séquentielles de monosaccharides sur un acide aminé hydroxylé (sérine ou thréonine) d'une protéine. Elle est initiée dans la lumière du RER et se poursuit dans les compartiments de l'appareil de Golgi. Il n'existe pas, à la différence de la PNGase F pour les *N*-glycannes, d'endoglycosidases permettant la libération de *O*-glycannes intacts. Cependant, des méthodes chimiques de déglycosylation ont été développées afin de générer des informations structurales sur les *O*-glycannes. Elles ont permis l'étude des altérations des structures, causées par les dysfonctionnements des enzymes responsables de leur synthèse et les pathologies associées (Wopereis *et al.*, 2006). Actuellement, on trouve sept CDGs concernant des défauts dans la biosynthèse des *O*-glycosylglycannes (Jaeken et Matthijs, 2007). Les 7 principaux types de *O*-glycannes sont présentés dans le tableau 1. Ils sont classés en fonction du premier sucre attaché à la chaîne peptidique.

Type of O-linked glycan	Structure and peptide linkage	Glycoprotein
Mucin-type	(R)-GalNAc α 1-Ser/Thr	Secreted + plasma membrane
GAG	(R)-GlcA β 1-3Gal β 1-3Gal β 1-4Xyl β 1-Ser	Proteoglycans
O-linked GlcNAc	GlcNAc β 1-Ser/Thr	Nuclear and cytoplasmic
O-linked Gal	Glc α 1-2 \pm Gal β 1-O-Lys	Collagens
O-linked Man	NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-Ser/Thr	α -Dystroglycan
O-linked Glc	Xyl α 1-3Xyl α 1-3 \pm Glc β 1-Ser	EGF protein domains
O-linked Fuc	NeuAc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-3 \pm Fuc α 1-Ser/Thr	EGF protein domains
	Glc β 1-3Fuc α 1-Ser/Thr	TSR repeats

Tableau 1 : Les différents types de *O*-glycannes chez les mammifères. (D'après Wopereis *et al.*, 2006).

Pour la plupart des types de *O*-glycosylation, aucune séquence peptidique consensus spécifique du premier sucre ajouté n'a encore été découverte. Cependant, deux exceptions demeurent, pour la *O*-fucosylation et la *O*-glucosylation (voir plus bas, Shao *et al.*, 2003). Dans ce manuscrit, seuls les types de *O*-glycannes directement associés aux glycoprotéines musculaires, c'est-à-dire les *O*-mannosylglycannes et ceux impliqués indirectement dans le processus de myogenèse, notamment par l'intermédiaire de la voie de Notch, les *O*-glucosyl- et *O*-fucosylglycannes, seront présentés.

1) La *O*-mannosylation de l' α -dystroglycane

Le dystroglycane joue un rôle important dans le complexe glycoprotéine/dystrophine (DGC) du muscle squelettique car il assure la liaison entre la dystrophine et la matrice extracellulaire (Figure 32A). Une déficience dans la plupart des protéines de ce complexe entraîne une forme plus ou moins grave de dystrophie musculaire (Blake *et al.*, 2002). Au sein du DGC, l' α -dystroglycane fonctionne comme un récepteur de grande affinité pour plusieurs ligands extracellulaires comme la laminine, le perlecan, l'agrine et la neurexine (Ibraghimov-Beskrovnaya *et al.*, 1992). La masse moléculaire prédite de l' α -dystroglycane est de 72 kDa, alors que la masse apparente en SDS-PAGE est supérieure à 120 kDa, ceci étant dû à une glycosylation conséquente (Ervasti et Campbell, 1993). De plus, la masse apparente varie en fonction du type de tissu (156 kDa dans le muscle squelettique de mammifères, 140 kDa dans le muscle cardiaque et 120 kDa dans le cerveau) ce qui suggère des différences tissulaires de glycosylation (Ibraghimov-Beskrovnaya *et al.*, 1992). Récemment, il a été montré que certaines dystrophies musculaires étaient dues à des défauts de glycosylation de l' α -dystroglycane ; ces maladies portent le nom de dystroglycanopathies (Muntoni *et al.*, 2004). A ce jour, six gènes responsables de dystroglycanopathies ont été identifiés : *POMT1*, *POMT2*, *POMGnT1*, *Fukutin*, *FKRP* (Fukutin-related protein) et *Large* (Muntoni *et al.*, 2004) (Figure 32B). Le mécanisme moléculaire responsable de ces dystrophies musculaires implique une hypoglycosylation de l' α -dystroglycane, qui est révélée par la perte d'immunoréactivité à deux anticorps (IIH5 et VIA4₁) qui reconnaissent la forme correctement glycosylée et fonctionnelle. La forme hypoglycosylée ne présente plus les mêmes caractéristiques de liaison vis-à-vis de ses ligands ce qui déstabilise les interactions entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire (Moore et Hewitt, 2008). Le mécanisme moléculaire précis reste toutefois non résolu à ce jour. Bien que des structures de type mucine Gal β 1,3GalNAc α 1-O-Ser/Thr soient présentes sur l' α -dystroglycane, les *O*-mannosylglycannes de type NeuAc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc β 1,2Man α 1-O-Ser/Thr, identifiés par plusieurs études de spectrométrie de masse, ont attiré plus d'attention (Chiba *et al.*, 1997). La raison de cet intérêt est le lien qui a très vite été fait entre les mutations dans les gènes responsables des dystroglycanopathies et les structures glycaniques. *POMT1*, *POMT2* et *POMGnT1* sont les glycosyltransférases responsables de la synthèse du disaccharide constituant les *O*-mannosylglycannes de l' α -dystroglycane (Moore et Hewitt, 2008). Les enzymes responsables de l'ajout du galactose et de l'acide sialique n'ont pas encore été identifiées même si la protéine *Large* est un candidat sérieux en tant que galactosyltransférase

(Grewal *et al.*, 2001). Les gènes *Fukutin* et *FKRP* présentent quelques homologies avec les glycosyltransférases mais leurs fonctions exactes n'ont pas encore été démontrées (Martin, 2005). Les *O*-mannosylglycannes de l' α -dystroglycane comportent de nombreuses similitudes (monosaccharides ajoutés, types de liaison formée, fonction des chaînes oligosaccharidiques) avec les *O*-fucosylglycannes portés par les motifs EGF-like (voir page 79).

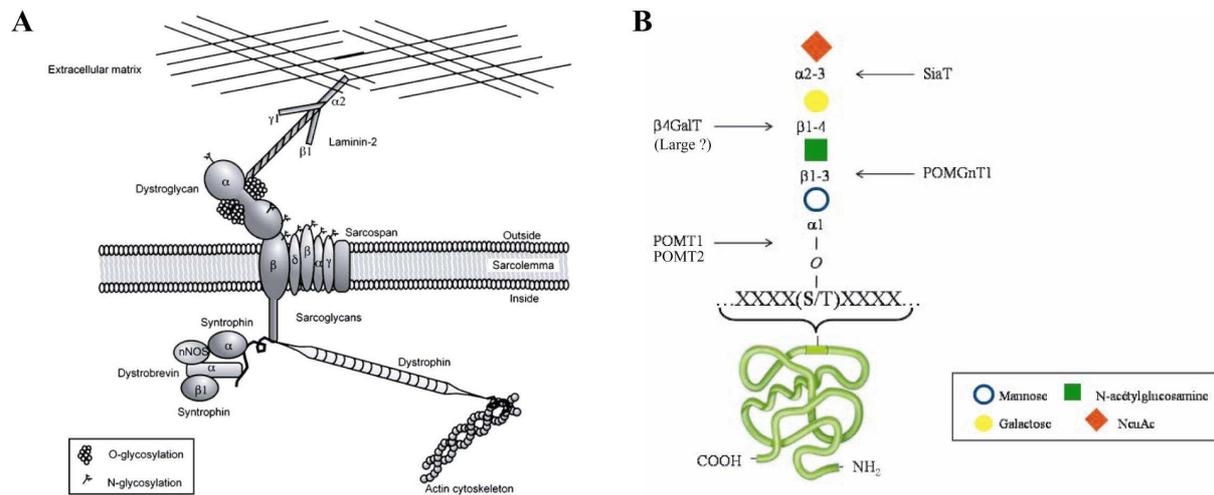


Fig. 32 : Représentation du complexe glycoprotéine/dystrophine (DGC). (A) Le DGC relie la matrice extracellulaire aux microfilaments d'actine du cytosquelette. Le schéma souligne la glycosylation du dystroglycane et de ses partenaires (d'après Moore and Hewitt, 2008). (B) La sous-unité α du dystroglycane porte des *O*-glycannes très caractéristiques. POMT1 et POMT2 sont des *O*-mannosyltransférases qui catalysent le transfert du premier sucre, le mannose, sur une sérine ou une thréonine de l' α -dystroglycane. POMGnT1 est une *N*-acétylglucosaminyltransférase qui catalyse le transfert du *N*-acétylglucosamine sur le mannose. La protéine Large présente des homologies de séquence avec les galactosyltransférases mais aucune preuve directe n'a encore pu montrer qu'elle catalysait le transfert du galactose, la sialyltransférase n'a toujours pas été identifiée. Aucun motif consensus n'a été caractérisé pour l'ajout du mannose. (D'après Loriol, 2006, Moore et Hewitt, 2008)

2) La *O*-glucosylation des motifs EGF-like.

La *O*-glucosylation est une modification rare des protéines. Elle a été retrouvée uniquement sur les motifs EGF-like de quelques protéines comme les facteurs de coagulation VII et IX, la protéine Z, le récepteur Notch et son ligand Delta, et la Thrombospondine (Shao *et al.*, 2002). La présence de *O*-glucosylglycannes sur certains des nombreux motifs EGF-like de la protéine Notch (Figure 33) ont permis de définir une séquence consensus de type $C^1-X-S-X-P-C^2$ (où C^1 et C^2 sont les deux premières cystéines conservées du motif EGF-like) (Moloney *et al.*, 2000). La réalisation de tests d'activité *O*-glucosyltransférase utilisant des motifs EGF-like comme accepteurs a mis en évidence la présence de ce type d'enzymes dans

plusieurs types cellulaires (cellules CHO, HeLa, SF-9, S2, HD11, NIH3T3) et dans plusieurs tissus (cœur, foie, poumon, muscle, rein, rate, cerveau) (Shao *et al.*, 2002). Ce n'est que très récemment qu'un gène appelé *Rumi* a été isolé chez la drosophile. Il code une protéine soluble, localisée dans le réticulum endoplasmique, comportant un domaine CAP10 (domaine impliqué dans la formation de la capsule et la virulence de *Cryptococcus neoformans*, Chang et Kwon-Chung, 1999) et une activité *O*-glucosyltransférase vis-à-vis des motifs EGF-like (Acar *et al.*, 2008). Les auteurs ont généré des mutants *Rumi* chez la drosophile, leur phénotype ressemble fortement à celui des mutants *Notch*. Ils proposent que l'absence de *O*-glucosylglycannes sur Notch entraîne des défauts de repliement de celui-ci et donc un dysfonctionnement de sa voie de signalisation. Les deux autres enzymes, la β -D-glucoside α -1,3-D-xylosyltransférase (Omichi *et al.*, 1997) et la α -1,3-xyloside α -1,3-xylosyltransférase (Minamida *et al.*, 1996), responsables de l'allongement du *O*-glucosylglycanne de type Xyla1,3Xyla1,3Glc β 1-*O*-Ser avaient été identifiées auparavant. La première a même pu être purifiée à partir de foie bovin et caractérisée biochimiquement (Ishimizu *et al.*, 2007).

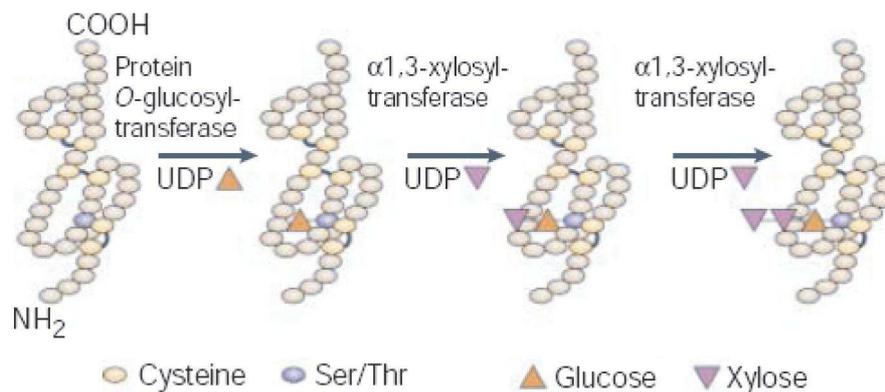


Fig. 33 : Additions séquentielles des monosaccharides qui composent les *O*-glucosylglycannes portés par certains domaines EGF-like. Dans les cellules CHO, un *O*-glucosylglycanne de ce type a été retrouvé sur Notch1. L'ajout de chaque sucre ne peut se faire que sur un EGF-like correctement replié. (D'après Haines et Irvine, 2003)

III- La *O*-fucosylation :

Le L-fucose est un composant habituel de nombreux *N*- et *O*-glycannes de glycoprotéines et de glycolipides, en particulier chez les mammifères. Deux caractéristiques structurales le distinguent des autres hexoses retrouvés dans le monde vivant. Tout d'abord, il ne comporte pas de fonction alcool sur son carbone 6 et de plus, il fait partie des monosaccharides de configuration L (Becker et Lowe, 2003). Le fucose chez les mammifères est le plus souvent situé en position terminale dans les structures glycaniques. La

fucosylation comme les autres modifications terminales des glycanes, peut conférer des propriétés fonctionnelles uniques aux oligosaccharides. Pour cette raison, ce type de glycosylation est souvent finement régulée au cours d'évènements cellulaires majeurs tels que la fécondation, l'adhésion ou l'apoptose (Staudacher *et al.*, 1999). Cependant, plusieurs glycosyltransférases sont capables de greffer un monosaccharide directement sur le fucose (Moloney et Haltiwanger, 1999), ce dernier occupant alors une position non terminale. Ces enzymes font partie des voies de biosynthèse des *O*-fucosylglycanes, où le fucose est attaché de façon covalente à la fonction alcool d'une sérine ou d'une thréonine. La *O*-fucosylation, qui demeure une modification peu commune des protéines, a été découverte sur deux domaines protéiques extracellulaires : les répétitions EGF-like et les répétitions TSR (Thrombospondin type 1 Repeat).

1) La *O*-fucosylation des domaines TSRs :

Les répétitions TSR sont des modules indépendants d'environ 60 acides aminés et qui comprennent six cystéines formant trois ponts disulfures selon un repliement spécifique (la première cystéine forme un pont disulfure avec la cinquième, la deuxième avec la sixième et la troisième avec la quatrième) (Figure 34A). Le génome humain code environ 100 protéines contenant des domaines TSRs. Elles sont impliquées dans de nombreuses fonctions biologiques incluant la régulation du système de coagulation par la protéolyse, l'inhibition de l'angiogenèse et l'allongement des axones (Tucker, 2004). Au sein des TSRs, deux modifications post-traductionnelles sont décrites : la *C*-mannosylation et la *O*-fucosylation (Hofsteenge *et al.*, 2001). Une étude récente a montré que la *C*-mannosylation amplifiait une voie de signalisation induite par les lipopolysaccharides dans les macrophages (Muroi *et al.*, 2007). C'est en 1975 que fut montrée, pour la première fois, par chromatographie et spectrométrie de masse à partir de l'urine humaine (Hallgren *et al.*, 1975) l'existence d'un *O*-fucosylglycane (que l'on sait maintenant porté par les domaines TSR), de structure Glc β 1,3Fuc α 1-O-Ser. Plus récemment, le même type de structure a été retrouvé dans les cellules CHO (Moloney *et al.*, 1997). C'est l'enzyme Pofut2 qui greffe le fucose sur la sérine ou la thréonine du motif consensus WX₅C¹X₂₋₃(S/T)C²X₂G du domaine TSR, où C¹ et C² représentent la première et la deuxième cystéine conservées (Hofsteenge *et al.*, 2001 ; Luo *et al.*, 2006) (Figure 34). Le domaine TSR fucosylé peut ensuite être allongé par une β 1,3-glucosyltransférase, appelée β 3GTL (Kozma *et al.*, 2006), pour donner le *O*-fucosylglycane complet Glc β 1,3-Fuc α 1-O-Ser/Thr (Figure 34B).

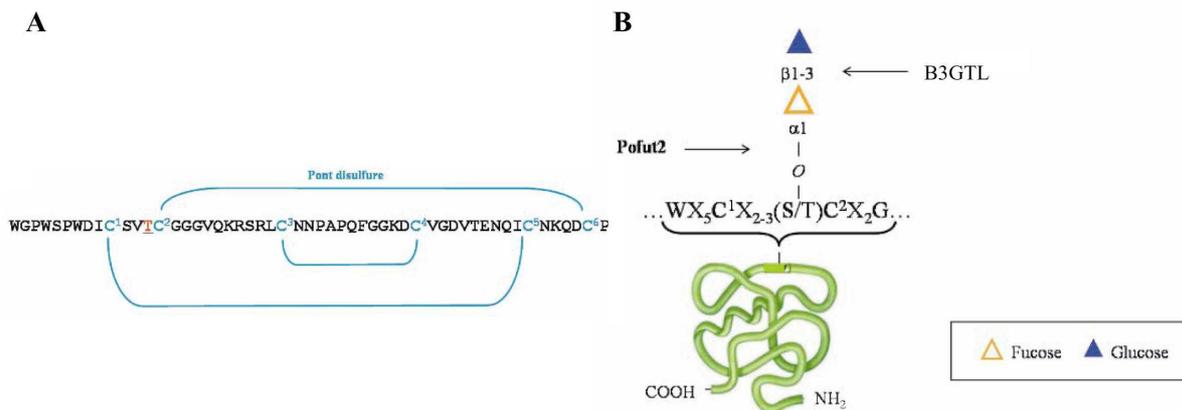


Fig. 34 : Structure du O-fucosylglycane porté par les domaines TSRs.

(A) Séquence peptidique de l'un des domaines TSRs de la Thrombospondine 1 humaine. Le repliement nécessaire à sa fucosylation est dicté par la formation de trois ponts disulfure. (B) Structure du O-fucosylglycane liée à la séquence consensus présente dans les domaines TSRs. (D'après Loriol, 2006)

-L'enzyme Pofut2 :

Pofut2 fut citée pour la première fois dans la littérature, en 2002 par Roos et ses collaborateurs, lors d'une étude globale du génome de la drosophile qui concernait l'identification de gènes codant des enzymes impliquées dans le métabolisme des glycannes fucosylés. Cette étude leur a permis de reconnaître, sur la base d'homologies avec *Pofut1*, ce second gène codant potentiellement une O-fucosyltransférase, appelée *Ofut2* chez la drosophile et *POFUT2* chez l'Homme (Roos *et al.*, 2002). Des analyses phylogénétiques ont montré que ce gène est présent chez de nombreux autres métazoaires et chez certains protozoaires du genre *Plasmodium* et *Cryptosporidium* (Martinez-Duncker *et al.*, 2003 ; Loriol *et al.*, 2006). Le gène humain *POFUT2* se trouve sur le chromosome 21 et pourrait être impliqué dans le syndrome de Down, conséquence phénotypique de la trisomie 21 (Menzel *et al.*, 2004). La caractérisation biochimique de la protéine chez la drosophile indique qu'elle est capable d'ajouter le fucose sur les domaines TSRs correctement repliés mais pas sur les domaines EGF-like et ceci sans aucun besoin de cations divalents, contrairement à de nombreuses fucosyltransférases. Pofut2 est localisée dans le réticulum endoplasmique malgré l'absence de séquence de rétention de type KDEL (Luo *et al.*, 2006).

-L'enzyme β3GTL :

L'enzyme β3GTL a d'abord été identifiée comme une protéine présentant des homologies de séquence avec les β1,3-glycosyltransférases (Heinonen *et al.*, 2003). Puis en

2006, deux équipes indépendantes (Kozma *et al.*, 2006 ; Sato *et al.*, 2006) ont montré que cette protéine était capable de transférer un glucose sur les TSR correctement repliés et fucosylés, afin de former le disaccharide Glc β 1,3-Fuc α 1-O-Thr. L'une de ces études (Kozma *et al.*, 2006) a montré que l'enzyme est très spécifique du substrat donneur (UDP-glucose) et de l'accepteur. En effet, elle est incapable de transférer un autre monosaccharide que le glucose et elle ne peut pas le transférer sur les EGF-like ou des EGF-like fucosylés. L'enzyme comporte un motif DXD nécessaire à son activité catalytique. Enfin, à l'instar de Pofut2, l'activité β 1,3-glucosyltransférase a été retrouvée dans le RE. Très récemment, il a été révélé que les patients atteints du syndrome de Peters Plus (syndrome malformatif récessif associant des anomalies oculaires, un nanisme et un retard mental) présentaient des défauts de glycosylation sur les domaines TSRs de la Properdine, puisque seule la forme *O*-fucosylée de la protéine a été retrouvée en raison de mutations dans le gène *BGALTL* qui s'avère coder la β 1,3-glycosyltransférase (Hess *et al.*, 2008).

-Rôle de la *O*-fucosylation des TSRs :

Le rôle des *O*-fucosylglycannes portés par les domaines TSRs demeure très peu connu. La seule étude réalisée *in vivo* consistait à modifier l'expression du gène *pad-2*, l'orthologue de *Pofut2*, chez *C. elegans*. Les auteurs de cette étude (Menzel *et al.*, 2004) ont montré que la surexpression et l'inhibition de *pad-2* avaient des effets importants sur le développement du nématode (mauvais positionnement des organes comme les muscles ou l'intestin, infertilité, problèmes neuronaux, malformations du corps, difficulté de mouvements) conduisant dans certains cas à l'arrêt total du développement. Il apparaît de plus que la sécrétion des métalloprotéases à domaine TSR, ADAMTS-like-1/Punctin-1 et ADAMTS13, est réduite en cas d'absence de *O*-fucosylation sur certains TSRs (Ricketts *et al.*, 2007 ; Wang *et al.*, 2007). Par contre, l'absence de *O*-fucosylglycannes ne semble pas avoir d'effet sur l'activité protéasique de l'enzyme ADAMTS13 (Ricketts *et al.*, 2007).

2) La *O*-fucosylation des domaines EGF-like :

Les domaines EGF-like (voir page 38) peuvent aussi être porteurs de *O*-fucosylglycannes. La comparaison des domaines EGF-like fucosylés et non fucosylés a permis de déterminer un motif consensus de type C²X_{4,5}(S/T)C³ (où C² et C³ correspondent respectivement à la deuxième et troisième cystéines) nécessaire à cette modification post-traductionnelle (Harris et Spellman, 1993 ; Panin *et al.*, 2002). La figure 35A recense les

protéines qui comportent des *O*-fucosylglycannes (voir Rampal *et al.*, 2007 pour une liste exhaustive). Ces derniers peuvent être de plusieurs types en fonction de la protéine et de l'EGF-like qui les porte. Le monosaccharide de type Fuc1-*O*-Ser/Thr ou les formes allongées en tétrasaccharide de type NeuAc α 2,3/6Gal β 1,4GlcNAc β 1,3Fuc α 1-*O*-Ser/Thr-EGF (Harris et Spellman, 1993) peuvent être rencontrés. Les structures contenant l'acide sialique en α 2,6 n'ont cependant pas été retrouvées depuis leur mise en évidence en 1993. Contrairement aux mammifères, la maturation du *O*-fucosylglycanne au-delà du disaccharide GlcNAc- β 1,3-Fuc α 1-*O*-Ser/Thr n'a pas encore été confirmée chez la drosophile (Haltiwanger et Lowe, 2004). Les enzymes impliquées dans la biosynthèse du tétrasaccharide ont presque toutes été identifiées à l'exception de la (des) sialyltransférase(s) (Figure 35B). Elles seront plus particulièrement décrites dans le paragraphe suivant.

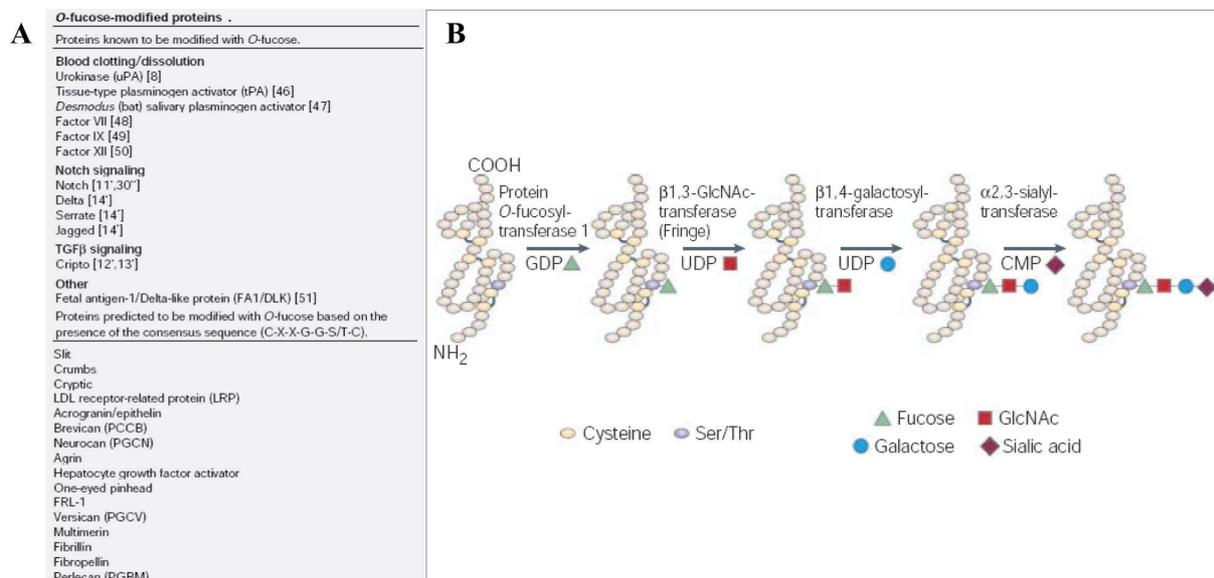


Fig. 35 : Les motifs EGF-like peuvent porter des *O*-fucosylglycannes. (A) Les protéines qui comportent au moins un *O*-fucosylglycanne sont listées ainsi que les protéines dont les motifs EGF-like contiennent la séquence consensus de *O*-fucosylation. Les auteurs ont restreint leur analyse à une séquence consensus moins large que celle habituellement utilisée afin de réduire la liste des protéines possiblement *O*-fucosylées. (D'après Haltiwanger, 2002). (B) Motif EGF-like (basé sur l'EGF-like1 du facteur VII humain) comportant un *O*-fucosylglycanne allongé (tétrasaccharide). Les enzymes connues à ce jour sont chez les mammifères Pofut1, la famille Fringe avec trois paralogues (Lunatic fringe, Manic fringe, Radical fringe) et la β 1,4GalT-1. Elles greffent respectivement le fucose, le *N*-acétylglucosamine et le galactose. Seule l'enzyme greffant l'acide sialique est non connue à ce jour. (D'après Haines et Irvine, 2003)

IV- Biosynthèse des *O*-fucosylglycannes portés par les EGF-like :

1) La Protéine-*O*-fucosyltransférase 1 :

La mise au point d'un test d'activité *O*-fucosyltransférase utilisant le GDP-fucose comme donneur et le premier domaine EGF du facteur de coagulation VII humain, correctement replié, comme accepteur a initié les études sur l'enzyme responsable de l'addition du fucose sur les motifs EGF-like, la GDP-fucose : protéine *O*-fucosyltransférase 1 ou Pofut1 (Wang *et al.*, 1996). Cette enzyme a d'abord été purifiée à partir de cellules CHO sur la base de son affinité avec ses substrats (Wang *et al.*, 1996 ; Wang and Spellman, 1998). Puis le gène *Pofut1* a été cloné, à partir de ces mêmes cellules, en 2001 (Wang *et al.*, 2001). Il a par la suite été précisément caractérisé chez la souris, l'homme et le bovin (Thèse Lorient, 2006), des orthologues existant chez tous les eumétazoaires (Wang *et al.*, 2001 ; Lorient et al., 2006). Chez la souris, une mutation ciblant le gène *Pofut1* entraîne une létalité embryonnaire 9 jours p.c. due à des défauts sévères de somitogenèse, vasculogenèse, cardiogenèse et neurogenèse. Ce phénotype ressemble fortement à celui observé chez les mutants KO pour le gène CBF-1 ou pour les deux gènes codant les présénilines 1 et 2 (protéases nécessaires pour le clivage S2 de Notch suite à son activation par un ligand) (Donoviel *et al.*, 1999) et qui correspond à l'absence de signalisation par les quatre récepteurs Notch chez les mammifères (Shi et Stanley, 2003).

L'enzyme Pofut1 est localisée, à l'instar de Pofut2, dans le réticulum endoplasmique. Des expériences d'immunofluorescence ont permis de clairement démontrer qu'elle était co-localisée avec la calréticuline, protéine chaperonne du RE, et non avec GM130, enzyme résidente de l'appareil de Golgi (Figure 36) (Luo et Haltiwanger, 2005). Ce résultat est en accord avec la présence, dans la séquence protéique de tous les homologues Pofut1, d'un peptide signal, nécessaire à l'entrée de la protéine dans le RE, et d'une séquence KDEL responsable de la rétention de la protéine dans le RE (Luo et Haltiwanger, 2005 ; Okajima *et al.*, 2005). La *N*-glycosylation de la protéine Pofut1 chez la souris, de type oligomannosidique, est aussi un argument en faveur de sa localisation réticulaire (Wang et Spellman, 1998).

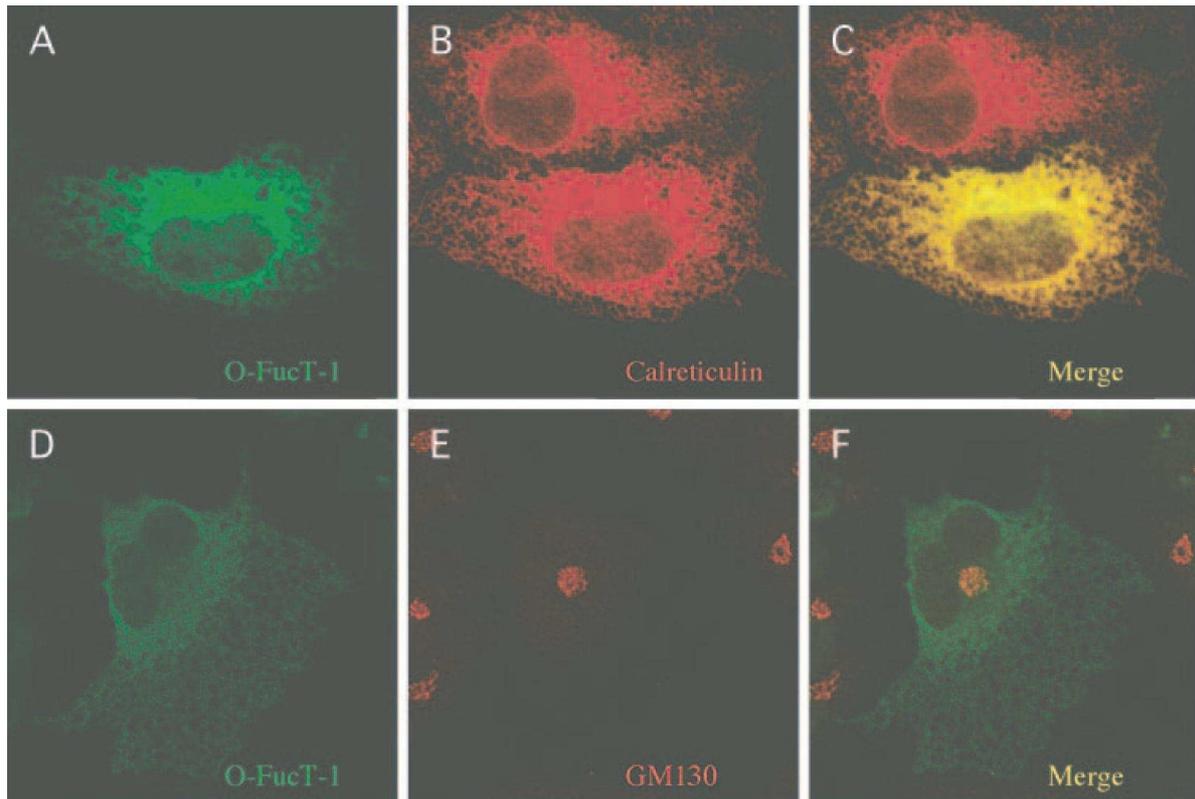


Fig.36 : Localisation sub-cellulaire de la protéine Pofut1. Des cellules COS-1 ont été transfectées transitoirement avec la protéine recombinante Pofut1 comportant une queue poly-histidine (A-F) et marquées avec un anticorps anti-histidine (A, C, D, F, couleur verte). La calréticuline est un marqueur de localisation du RE (couleur rouge, B et C) et la GM130 de l'appareil de Golgi (couleur rouge, E et F). La couleur jaune indique une co-localisation des deux protéines. (D'après Luo and Haltiwanger, 2005).

Cette localisation particulière pose deux questions essentielles et encore non résolues à propos de l'enzyme Pofut1. Tout d'abord, on sait que toutes les fucosyltransférases, Pofut1 incluse, utilisent le GDP-fucose comme substrat donneur. Ce nucléotide-sucré est synthétisé dans le cytoplasme (Figure 26) puis transporté dans l'appareil de Golgi, localisation subcellulaire habituelle des fucosyltransférases, grâce à un transporteur membranaire spécifique (Becker et Lowe, 2003). La localisation réticulaire de Pofut1 implique par conséquent la présence d'un transporteur de GDP-fucose du cytosol vers le RE, qui demeure encore non découvert à ce jour. Deuxièmement, les chercheurs se sont très vite demandés si la présence de Pofut1 dans le RE ne ferait pas de cette protéine une chaperonne qui, en plus de son activité enzymatique, aiderait au repliement de ses protéines cibles.

Chez la drosophile, Ofut1 est nécessaire à plusieurs processus incluant le repliement de Notch dans le RE (Okajima *et al.*, 2005), la liaison entre Notch et ses ligands (Okajima *et al.*, 2003) et l'endocytose de Notch (Sasamura *et al.*, 2007). Ces différentes activités de la

protéine Ofut1 ont permis de construire deux modèles distincts présentés sur la figure 37 qui schématisent le rôle de Ofut1 dans le repliement ou l'adressage correct du récepteur Notch.

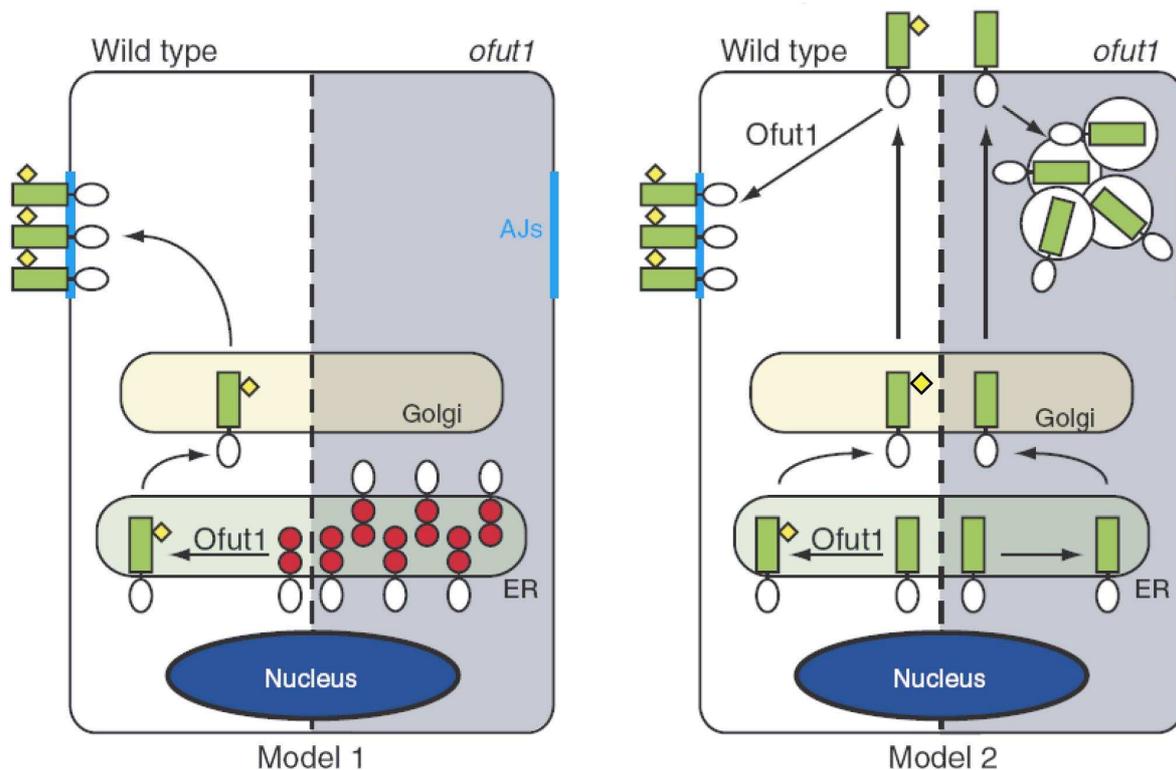


Fig. 37 : *O*-fucosylation de Notch et fonction de Ofut1 chez la drosophile (D'après Vodovar et Schweisguth, 2008). **Modèle 1 :** dans le RE, la protéine Ofut1 permet le repliement et la *O*-fucosylation du récepteur Notch nouvellement synthétisé (rouge et blanc). Notch est ensuite transporté, via l'appareil de Golgi, vers la membrane plasmique et vers les jonctions adhérentes (AJs, cyan). En absence de Ofut1, Notch reste non replié et s'accumule dans le RE. (D'après Okajima *et al.*, 2005). **Modèle-2 :** Après sa *O*-fucosylation par Ofut1, Notch est transporté vers la membrane plasmique après son passage par l'appareil de Golgi. Il est, dans un second temps, transporté vers les jonctions adhérentes par un mécanisme de transcytose. E, absence de Ofut1, Notch est bien transporté vers la membrane plasmique, par contre il est ensuite internalisé et s'accumule dans un compartiment endocytaire non caractérisé. (D'après Sasamura *et al.*, 2007)

Le rôle de la *O*-fucosylation des motifs EGF-like chez la drosophile a été examiné par la réduction de la quantité de protéine Pofut1, en utilisant des ARNi, puis en isolant un mutant *Pofut1* appelé *neurotic* (Okajima et Irvine, 2002 ; Sasamura *et al.*, 2003). Les deux techniques ont abouti à un phénotype sévère ressemblant fortement à celui du mutant *Notch*. Cependant, il a été montré que l'absence de Ofut1 entraînait l'accumulation de Notch dans le RE. Et de façon surprenante, l'apport d'une forme sans activité *O*-fucosyltransférase (mutation R245A dans un domaine très conservé chez les fucosyltransférases et nécessaire à l'interaction avec leur substrat donneur, Martinez-Duncker *et al.*, 2003) permettait de rétablir la localisation membranaire normale de Notch ainsi que sa liaison optimale avec ses ligands. Cette étude

décrit aussi que d'autres protéines, modifiées par des *O*-fucosylglycannes, comme Delta ou Serrate, n'ont pas besoin de Ofut1 pour être correctement localisées (Okajima *et al.*, 2005). Ces résultats sont à l'origine du modèle 1 (Figure 37) dans lequel Ofut1 joue le rôle de chaperonne permettant, sans besoin de son activité *O*-fucosyltransférase, le repliement de la partie extracellulaire du récepteur Notch, entraînant sa localisation correcte à la surface cellulaire et son interaction optimale avec ses ligands.

Le modèle 2 repose, quant à lui, sur deux observations majeures. Tout d'abord, il a été démontré que dans les cellules dépourvues de Ofut1, Notch n'était pas correctement adressé aux jonctions adhérentes mais s'accumulait dans des compartiments intracellulaires ne contenant pas les habituels marqueurs du RE. Par contre une petite quantité de Notch est tout de même présente à la surface des cellules, en dehors des jonctions adhérentes (Sasaki *et al.*, 2007 ; Sasamura *et al.*, 2007). Une autre étude a montré que Ofut1 était nécessaire à l'endocytose de Notch. Dans les cellules dépourvues de Ofut1, des anticorps dirigés contre Notch sont internalisés à un plus faible niveau que dans les cellules sauvages, mais surtout ils ne s'accumulent plus dans les endosomes mais dans des compartiments intracellulaires non caractérisés (Sasamura *et al.*, 2007). De plus, dans les cellules Gmd (mutées sur le gène de la GDP-mannose 4,6-déshydratase, ce qui entraîne l'incapacité de ces cellules à synthétiser le fucose), la quantité de Notch dans ces compartiments est plus faible que dans les cellules dépourvues de Ofut1, ce qui implique, que l'activité chaperonne de Ofut1 permet l'endocytose normale de Notch. Par contre, l'absence de récepteur Notch correctement localisé au niveau des jonctions adhérentes, dans les cellules Gmd, met en évidence un besoin du *O*-fucose pour la transcytose du récepteur vers les jonctions adhérentes. Ce second modèle propose donc une double activité de la protéine Ofut1, elle régulerait le processus d'endocytose de Notch par un mécanisme indépendant de son activité catalytique et dans un deuxième temps, elle permettrait une localisation correcte de Notch, cette fois de façon dépendante de son activité catalytique (Sasaki *et al.*, 2007 ; Sasamura *et al.*, 2007).

Un article paru en 2008 apporte plusieurs éléments de réponse et permet de conforter le premier modèle. Les auteurs ont montré que l'activité *O*-fucosyltransférase de Ofut1 était nécessaire uniquement pour permettre l'activité de Fringe (Okajima *et al.*, 2008). L'absence totale de Ofut1 mène à un phénotype similaire à celui des KO pour le gène *Notch*, mais l'expression de la forme R275A entraîne la viabilité des larves, phénotype similaire à celui du KO pour le gène *Fringe*. Ces données indiquent que l'activité *O*-fucosyltransférase de Ofut1 n'est pas nécessaire à la voie de signalisation de Notch dans l'embryon, ce qui est en accord avec la non-intervention de Fringe dans l'embryogenèse de la drosophile. Lorsque la forme

R275A est exprimée au cours du développement du disque imaginal de l'aile, le phénotype de la larve de drosophile est semblable au KO de *Fringe*. Lors de cette étude, les auteurs ont aussi réexaminé la localisation du récepteur Notch à la surface des cellules en utilisant un protocole différent. Ils confirment que dans les cellules dépourvues de Ofut1, Notch n'est pas présent à la surface des cellules mais qu'il s'accumule effectivement dans le RE.

Après analyse de l'ensemble de ces données, il apparaît clairement que, chez la drosophile, la *O*-fucosylation de Notch est d'abord nécessaire aux événements de signalisation dépendants de *Fringe* et que Ofut1 agit de manière non-catalytique pour permettre au récepteur Notch de sortir du RE. Ofut1 se comporte également comme une chaperonne qui permet le repliement correct de la partie extracellulaire de Notch, comme le propose le modèle 1 (Vodovar et Schweisguth, 2008).

Les mêmes questions se sont évidemment posées dans le cas des mammifères. Plusieurs équipes se sont intéressées aux rôles de Pofut1 dans la voie de signalisation de Notch chez la souris. L'équipe du docteur P. Stanley (Albert Einstein College of Medicine, New York, E-U) a montré que dans les cellules ES qui n'expriment pas Pofut1 (extraites de l'embryon de souris Pofut1^{-/-}), les quatre récepteurs Notch sont correctement localisés à la surface des cellules (Figure 38). Des expériences de cytométrie en flux indique que l'association entre les ligands Delta1/Jagged1 et ces cellules, ainsi que l'activation de la voie de signalisation de Notch qui en découle, sont fortement réduites. Chez les mammifères, la présence de Pofut1 n'est donc pas nécessaire à la localisation correcte des récepteurs Notch mais elle est indispensable au fonctionnement optimal de la voie de signalisation de Notch. Des études réalisées sur les cellules CHO lec-13, déficientes dans la voie de synthèse du GDP-fucose, montrent que la quantité et la localisation des récepteurs Notch sont normales. Par contre, pour ces cellules, la liaison Notch/ligand et la quantité de Notch clivé (conséquence de l'activation de la voie de signalisation activée par Delta1 et Jagged1) sont diminuées. Ces facteurs sont rétablis par l'ajout de fucose exogène (Stahl *et al.*, 2008).

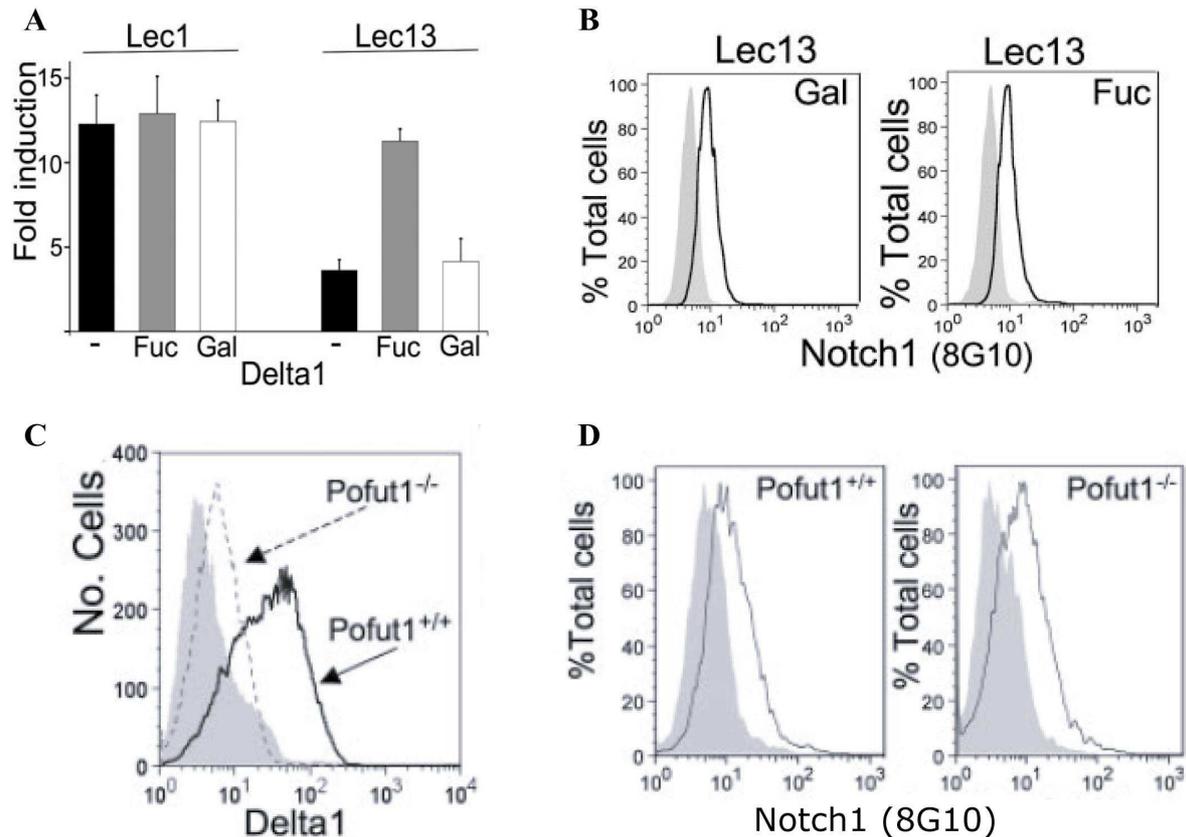


Fig. 38 : Rôle de Pofut1 et du *O*-fucose dans la voie de signalisation de Notch chez les mammifères. (A) Dans les cellules lec13 (déficiences en GDP-fucose), la voie de signalisation de Notch est fortement réduite, le niveau d'activation est rétabli par ajout de fucose exogène ce qui n'est pas le cas avec le galactose. Les données ont été obtenues après transfection, des cellules lec13, par un vecteur contenant un gène rapporteur sous le contrôle d'un promoteur sensible à la partie intracellulaire de Notch. Ces cellules sont ensuite co-cultivées avec des cellules exprimant fortement le ligand Delta1. Des résultats similaires ont été obtenus avec Jagged1. (B) Dans les cellules lec13, Notch est correctement localisé sans effet du fucose exogène. Les cellules sont mises en contact avec un anticorps dirigé contre la partie extracellulaire de Notch et la liaison de cet anticorps à la surface des cellules est analysée par cytométrie en flux. Des résultats similaires ont été obtenus avec les cellules lec1. (C) La liaison de Delta1 avec les cellules ES Pofut1^{-/-} est fortement réduite. Des résultats similaires ont été obtenus avec Jagged1. (D) On ne remarque pas de différence significative en ce qui concerne la localisation de Notch1 à la surface des cellules entre les cellules ES Pofut1^{-/-} et Pofut1^{+/+}. (D'après Stahl *et al.*, 2008)

Chez les mammifères, il semble donc que la situation soit différente de celle de la drosophile : la protéine Pofut1 n'aurait pas d'activité chaperonne pour les récepteurs Notch, par contre la présence du fucose sur leur domaine extracellulaire est nécessaire à la liaison avec leurs ligands et à l'activation de la voie de signalisation. Le *O*-fucose (et sûrement son allongement) serait donc nécessaire à la liaison de Notch avec ses ligands, en aidant à son repliement optimal et/ou en intervenant directement dans l'interaction entre les récepteurs Notch et leurs ligands (Stahl *et al.*, 2008).

Une seconde étude parue la même année, qui étudie la localisation de Notch dans les cellules du mésoderme paraxial lors du développement embryonnaire, décrit des résultats contradictoires. Les auteurs rapportent que dans les cellules des souris KO pour le gène *Pofut1*, Notch1 s'accumule dans le cytoplasme et dans le RE. Cependant, ils ne précisent pas si ceci est dû à l'absence d'activité chaperonne de Pofut1 ou à l'absence du fucose au sein de la partie extracellulaire de Notch1 (Okamura et Saga, 2008).

2) La protéine Fringe :

L'élongation du *O*-fucose en tétrasaccharide débute par l'action des glycosyltransférases de la famille Fringe. Le gène *Fringe* (*Dfng*) a d'abord été découvert chez la drosophile par un crible de mutants pour les gènes impliqués dans la formation de la frontière dorso/ventrale lors du développement de l'aile (voir page 52) (Irvine et Wieschaus, 1994). Il est aussi impliqué dans le développement des yeux et des pattes, ainsi que dans la spécification du devenir cellulaire lors de l'oogenèse (Grammont et Irvine, 2001). Trois homologues ont ensuite été identifiés chez les mammifères: *Lunatic fringe*, *Manic fringe* et *Radical fringe* (Johnston *et al.*, 1997). Chez les vertébrés, les protéines *Lfng* et *Rfng* sont connues pour leur rôle dans certains processus développementaux. Par exemple, les souris mutantes pour le gène *Lfng* présentent un taux de mortalité périnatal plus élevé à cause de la malformation des côtes et les souris qui réussissent à survivre présentent de multiples défauts dus à une mauvaise somitogenèse (malformation de la colonne vertébrale et des côtes, fusion des arcs neuraux, queue plus petite) (Zang et Gridley, 1998). Les expériences de KO sur le gène *Rfng* ont montré que les souris ne présentaient pas de phénotype évident et que le double KO *Lfng/Rfng* avait le même phénotype que le mutant *Lfng* (Zhang *et al.*, 2002). Très peu de données sont actuellement disponibles sur *Mfng* hormis sa structure cristallisée qui a été caractérisée chez la souris (Jinek *et al.*, 2006). Les protéines Fringe sont des β 1,3-*N*-acétylglucosaminyltransférases qui transfèrent un GlcNAc, à partir d'UDP-GlcNAc, sur le *O*-fucose de motifs EGF-like spécifiques (Bruckner *et al.*, 2000 ; Moloney *et al.*, 2000). Toutes les protéines Fringe sont capables de catalyser cette réaction *in vitro* (Moloney *et al.*, 2000 ; Rampal *et al.*, 2005). Cependant, les trois enzymes endogènes présentes dans les cellules CHO n'allongent le *O*-fucose qu'au sein de certains EGF-like, aux positions 12 et 20-31 de la protéine Notch1. Une autre étude a montré que *Manic* et *Lunatic Fringe* ne modifiaient pas les mêmes sites du récepteur Notch2 (Shimizu *et al.*, 2001). Cependant, aucun déterminant protéique, propre à l'une ou l'autre des trois enzymes, n'a pu être mis en

évidence au sein des motifs EGF-like (Shimitzu *et al.*, 2001; Shao *et al.*, 2003; Rampal *et al.*, 2005). Il a également été montré, chez la drosophile et chez les mammifères, que l'expression de Fringe était capable de faire varier la réponse de Notch en fonction du ligand avec lequel il interagissait : l'expression de Fringe potentialise la signalisation par Delta et inhibe celle par Serrate/Jagged (Panin *et al.*, 1997 ; Hicks *et al.*, 2000).

3) La protéine β 1,4-Galactosyltransférase 1 :

L'activité *N*-acétylglucosaminyltransférase, assurée par Fringe, est nécessaire mais pas suffisante pour réguler la voie de signalisation de Notch. L'allongement du *O*-fucosylglycane par la β 1,4-GalT-1 est aussi requis pour permettre à Fringe d'inhiber la voie de signalisation par Jagged1 (Chen *et al.*, 2001). Chez les souris mutées sur ce gène, l'expression d'effecteurs de la voie de signalisation de Notch, comme *Hes5*, et de ligands, comme *Dll1*, est diminuée (Chen *et al.*, 2005).

4) La protéine α 2,3-Sialyltransférase :

Les *O*-fucosylglycannes ont été retrouvés sous la forme de tétrasaccharides terminés par un acide sialique. Cependant, l'enzyme responsable de l'ajout de ce sucre n'a pas encore été identifiée. Chez les mammifères, six α 2,3sialyltransférases ont été découvertes : les β -galactoside α 2,3sialyltransférases (ST3Gal) I à VI. D'après l'analyse de leur spécificité, la ST3Gal IV serait la plus susceptible de modifier les *O*-fucosylglycannes, car son accepteur préférentiel est de type Gal β 1,4GlcNAc-R (Takashima, 2008).

V- Rôle des *O*-fucosylglycannes portés par les EGF-like :

Les *O*-fucosylglycannes liés à certains motifs EGF-like ont été identifiés sur plusieurs protéines nécessaires au bon fonctionnement de la cellule. La littérature scientifique décrit plus particulièrement trois protéines, uPA, Cripto et Notch, pour lesquelles le rôle de ce type de chaînes oligosaccharidiques a été démontré.

1) La protéine uPA (Urokinase-type plasminogen activator) :

Le rôle de la *O*-fucosylation dans la fonction de la protéine uPA a été apporté par des expériences de défucosylation chimique *in vitro* utilisant de l'acide trifluoroacétique. Elles ont montré que la *O*-fucosylation du seul domaine EGF-like de la protéine uPA n'est pas indispensable à l'interaction entre la protéine uPA et son récepteur. La *O*-fucosylation est cependant nécessaire à l'activité mitogène de la protéine uPA dans des cellules Saos-2 (cellules d'ostéosarcome humain) (Rabbani *et al.*, 1992).

2) La protéine Cripto :

Nodal, un membre de la superfamille des TGF- β , joue plusieurs rôles essentiels dans le développement embryonnaire des vertébrés comme la formation du mésoderme et la génération de l'asymétrie droite/gauche (Schier, 2003). Les composants majeurs de la voie de signalisation de Nodal comprennent le ligand soluble Nodal, le récepteur membranaire activine, Smad2 et Smad4, médiateurs de la signalisation, et le facteur de transcription Fast1. Cripto, une glycoprotéine membranaire qui comporte une ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol), est un co-récepteur essentiel à la voie de signalisation de Nodal. Les souris KO pour Cripto ou Nodal présentent des phénotypes extrêmement similaires : une absence de mésoderme embryonnaire et d'endoderme définitif, ce qui provoque une létalité dès 7,5 jours p.c. (Xu *et al.*, 1999). En 2001, il a été montré que la protéine Cripto humaine comportait une séquence consensus de *O*-fucosylation conservée chez tous ses homologues et que la thréonine contenue dans cette séquence était *O*-fucosylée. La mutation de cette thréonine en alanine entraîne la perte de cette *O*-fucosylation et éteint la voie de signalisation de Nodal dans des cellules F9 (cellules de tératocarcinome de souris). Ainsi, la présence du *O*-fucose sur le motif EGF-like de Cripto est nécessaire à l'activation optimale de la voie de signalisation de Nodal (Shieffer *et al.*, 2001). Cependant, des résultats publiés en 2007 contredisent ces derniers. L'étude a commencé avec l'observation que les mutants de souris *Pofut1*^{-/-} ne présentaient pas le même phénotype que les mutants *Cripto*^{-/-}, et mouraient, *in utero*, 9,5 jours p.c. soit deux jours plus tard que les embryons *Cripto*^{-/-}. Les cellules ES *Pofut1*^{-/-} ayant servi à la réalisation des mutants ont permis de montrer que Pofut1 était bien l'enzyme qui *O*-fucosylait Cripto et surtout que la voie de signalisation de Nodal n'était pas inactivée en l'absence de Pofut1 et donc en l'absence de *O*-fucose sur Cripto. Enfin, la substitution de la thréonine 72 du motif EGF-like par une sérine, modifiée elle aussi

par un *O*-fucose, n'entraîne pas le rétablissement de la voie de signalisation de Nodal dans les cellules embryonnaires de rein humain 293T. En conclusion, la thréonine qui porte le fucose, et non le fucose lui-même, est nécessaire à l'activation optimale de la voie de signalisation de Nodal (Shi *et al.*, 2007).

3) Le récepteur Notch :

La plupart des études structurales effectuées sur la glycosylation des récepteurs Notch a été réalisée sur la protéine Notch1, en utilisant des systèmes de surexpression dans des cellules de mammifères, principalement les cellules CHO. Les motifs EGF-like de Notch1 portent plusieurs types de glycanes : *O*-fucosylglycannes, *O*-glucosylglycannes et *N*-glycannes complexes (Stanley, 2007). La figure 39 montre les différents types de glycanes portés par les répétitions EGF-like du récepteur Notch1.

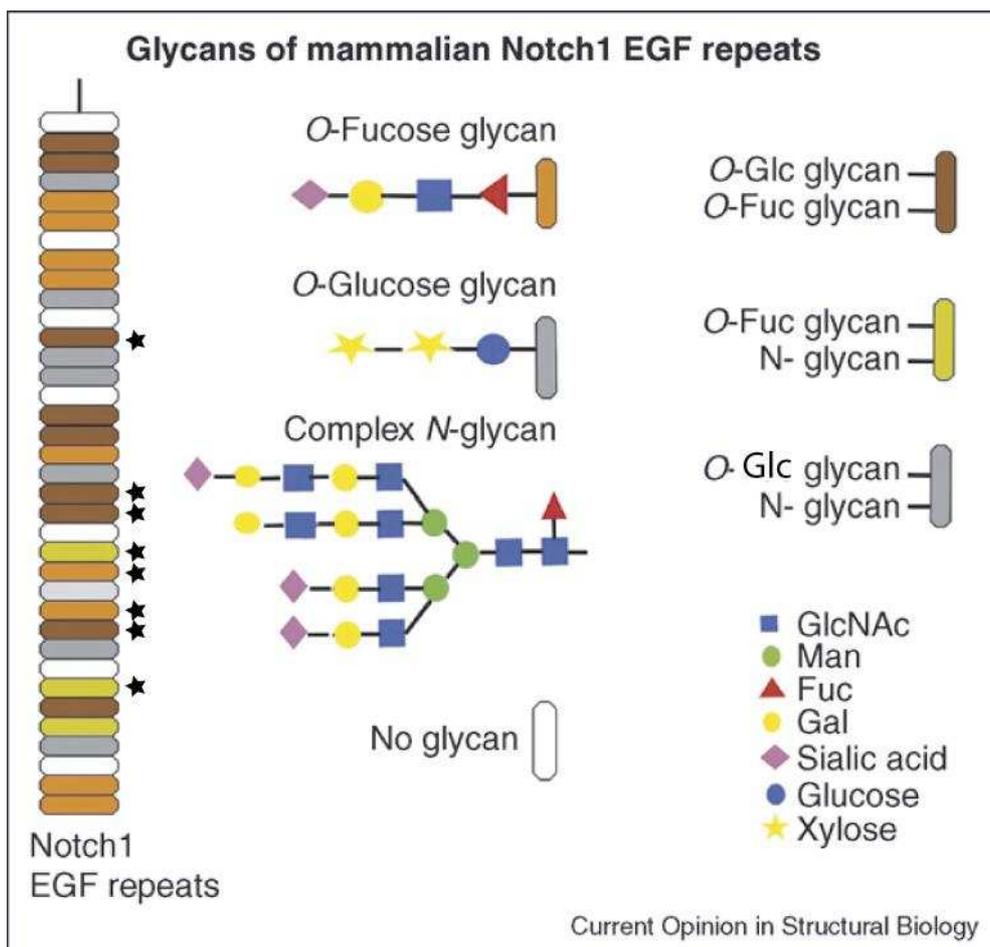


Fig. 39 : Les glycanes portés par Notch1 chez la souris. Les domaines EGF-like du récepteur Notch1 peuvent comporter des sites consensus de *O*-fucosylation et/ou de *O*-glucosylation. Des *N*-glycannes sont aussi présents sur certains sites consensus de *N*-glycosylation. Ces analyses structurales ont été réalisées par surexpression de la partie extracellulaire de Notch1 dans des cellules de mammifères. Le plus grand

O-fucosylglycane observé sur Notch1 est de type NeuAc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc β 1,3Fuca1-*O*-Ser/thr. Il est rencontré sur les domaines EGF-like marqués d'une étoile (Haltiwanger et Lowe, 2004), Contrairement aux structures des *O*-fucosylglycannes retrouvés *in vivo* sur les facteurs de coagulation humain VII et IX, Notch1 ne comporte pas de NeuAc lié au galactose en α 2,6. Le plus grand *O*-glucosylglycane est de type Xyla1,3Xyla1,3Glc β 1-*O*-Ser. (D'après Stanley, 2007)

Une nouveau type de glycosylation a été retrouvé sur certains domaines EGF-like récepteur Notch et de son ligand Delta chez la drosophile. Elle est de type GlcNAc- β -*O*-Thr/Ser (Matsuura *et al.*, 2008). La réaction enzymatique doit se faire dans le RE ou le Golgi et nécessite du Mn²⁺, ce qui exclut l'intervention de OGT (*O*-linked GlcNAc transferase) cytoplasmique. De plus, même si des *O*-GlcNAc transférases ont été identifiées chez les protozoaires, *Dictyostelium discoideum* (Wang *et al.*, 2003) et *Trypanosoma cruzi* (Previato *et al.*, 1998), la liaison aux résidus sérine ou thréonine est sous la forme anomérique α . Les facteurs de coagulation VII et IX, l'activateur du plasminogène, la protéine Z, qui sont des protéines *O*-fucosylées et/ou *O*-glucosylés ne contiennent pas de Thr/Ser capable d'être modifiée par un *O*-GlcNAc, ce qui laisse imaginer que cette modification puisse être spécifiquement dédiée à la régulation de la voie de Notch (Matsuura *et al.*, 2008).

Les différents domaines EGF-like présents au sein de la partie extracellulaire du récepteur Notch ne sont pas tous impliqués au même degré dans l'interaction avec ses ligands et par conséquent dans l'activation de la voie de signalisation. L'état de *O*-glucosylation et plus particulièrement de *O*-fucosylation de ces sites est un facteur qui complexifie un peu plus les mécanismes d'activation de la voie de signalisation de Notch.

4) Elimination ou ajout d'un site de *O*-fucosylation de Notch :

L'un des domaines les plus conservés dans tous les récepteurs Notch, incluant ceux présents chez *C. elegans*, est l'EGF-like à la position 12 (Xu *et al.*, 2005). L'élimination du site de *O*-fucosylation de cet l'EGF-like (mutation 12f) a de profondes conséquences sur la voie de signalisation de Notch. Chez la drosophile, la substitution de la thréonine en alanine génère un récepteur Notch « hyperactif » en réponse à ses ligands, ce qui implique que le *O*-fucosylglycane à cette position inhibe l'activité de Notch en réduisant l'interaction entre Notch et ses deux ligands Delta et Serrate. A l'inverse, les *O*-fucosylglycannes sur les EGF-like 24, 26, 24 et 26 et 31 n'ont aucune influence sur la voie de signalisation de Notch (Lei *et al.*, 2003). Des études *in vitro* ont également montré que l'absence de sites de *O*-fucosylation sur les EGF-like 23-32 entraînait une diminution de 50% de l'interaction de

Notch avec Delta et Serrate (Xu *et al.*, 2005). De façon très surprenante, la mutation 12f chez les mammifères entraîne l'effet inverse et inhibe la voie de signalisation de Notch induite par Delta1 ou Jagged1. L'élimination d'autres sites de *O*-fucosylation conservés chez le récepteur Notch1, sur les EGF-like 26 et 27, a aussi des conséquences importantes. Dans des cellules CHO, l'absence de *O*-fucosylglycannes sur l'EGF-like 26 entraîne une plus forte activation de la voie de signalisation de Notch en réponse à Delta1 et Jagged1, alors que l'inverse se produit pour l'EGF-like à la position 27 (Rampal *et al.*, 2005). Enfin, la réalisation d'un mutant de souris dont la séquence consensus de *O*-fucosylation sur l'EGF-like 12 (site de liaison à ses ligands) du récepteur Notch1 a été modifiée, montre le rôle primordial des *O*-fucosylglycannes dans un modèle *in vivo*. Les souris homozygotes pour cette mutation sont viables mais présentent plusieurs défauts : retard de croissance, problème lors de la maturation des lymphocytes T, etc. Dans les cellules de ces souris, le récepteur Notch se lie moins bien à ses ligands Jagged1 et Delta1 ce qui entraîne des modifications sur l'activation de la voie de signalisation de Notch (Ge et Stanley, 2008).

Résultats-Discussion

Etude structure/fonction de la protéine Pofut1

Après la caractérisation du gène *Pofut1* chez le bovin (Loriol *et al.*, 2006), il nous a semblé opportun de conduire une étude fonctionnelle sur la protéine Pofut1. Une connaissance approfondie de ses spécificités structurales est susceptible d'apporter un éclairage sur l'implication de cette enzyme dans la myogenèse. En 2006, les données de la littérature, essentiellement décrites par l'équipe de R. Haltiwanger (Stony Brook University, Stony Brook, New York, USA), ne concernaient que le fonctionnement enzymatique de la protéine humaine. Les enzymes bovine et murine n'avaient pas encore fait l'objet d'études fonctionnelles.

I- Publication 1 :

Des analyses bioinformatiques nous ont permis d'identifier deux sites potentiels de *N*-glycosylation (N⁶⁵ et N¹⁶³) sur la protéine Pofut1 bovine. Les alignements de séquences réalisés ont étonnamment montré que l'un des deux était très conservé dans le règne animal alors que l'autre n'était présent que chez les mammifères. Ces observations nous ont poussé à (i) démontrer que ces sites potentiels étaient réellement occupés par des glycannes et (ii) à étudier les rôles respectifs des ces deux *N*-glycannes. Nous avons donc substitué, par mutagenèse dirigée, les asparagines présentes dans les sites de *N*-glycosylation de Pofut1, par une leucine ou une glutamine. Nous avons démontré qu'après surexpression dans des cellules COS-1, l'absence de *N*-glycannes à la position 163 n'entraînait qu'une légère perte d'activité *O*-fucosyltransférase alors que la glycosylation du site 65 était cruciale pour la fonctionnalité de l'enzyme. L'absence du *N*-glycane à la position 65 entraîne l'agrégation de Pofut1 ce qui suggère qu'il est nécessaire au repliement optimal de l'enzyme. Ce travail a donné lieu à la publication suivante.

The two *N*-glycans present on bovine Pofut1 are differently involved in its solubility and activity

Loriol*, C., Audfray*, A., Dupuy, F., Germot, A., and Maftah, A.
(*contribution équivalente)

FEBS Journal, 2007, vol 274, 1202-1211

II- Résultats complémentaires :

1) Cinétique d'apparition de la protéine Pofut1 :

Les cellules COS-1 sont des cellules de mammifères (cellules de rein de singe vert africain, *Cercopithecus aethiops*) largement utilisées en biotechnologie pour la surexpression de protéines dans un environnement eucaryote. Dans l'article ci-dessus, nous avons montré que la protéine Pofut1 mutée sur le site de glycosylation N⁶⁵ n'était pas détectée dans les extraits de cellules COS transfectées depuis 48h. Une hypothèse envisagée, et non reportée dans l'article, supposait que la non révélation de protéines Pofut1 dans les extraits cellulaires était due à la dégradation précoce de l'enzyme par des protéases endogènes. Nous avons alors examiné cette hypothèse et procédé à une analyse de la cinétique d'expression de la protéine et ce, dès la transfection de son ADNc dans les cellules COS-1.

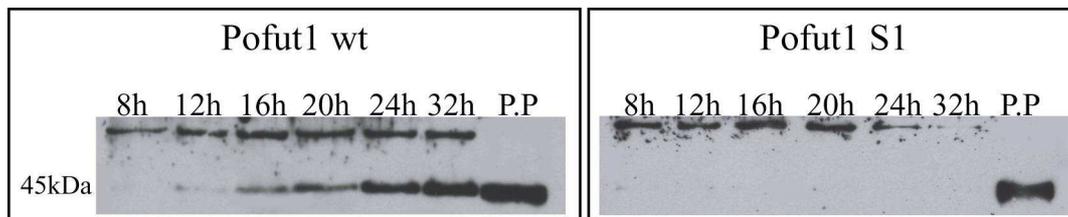


Fig.1 : Cinétique d'apparition de Pofut1 surexprimée dans des cellules COS-1.

Western anti-Pofut1 (45 kDa) montrant l'évolution de la quantité de protéine après transfection (temps 0h) des cellules COS-1 avec le vecteur pcDNA3.1 contenant l'ADNc du gène *Pofut1* bovin sauvage (wt) ou muté sur le site de glycosylation N⁶⁵ (S1). La forme protéique de plus haut poids moléculaire est due à une reconnaissance aspécifique de l'anticorps. P.P : Pofut1 purifiée.

La figure 1 montre la quantité de protéines Pofut1, sauvage (wt) et mutée sur le site N⁶⁵ (S1), présente dans les cellules en fonction du temps après la transfection. La protéine Pofut1 n'est détectée que 8h après la transfection et sa quantité atteint un maximum après 32h ; cette expression est maintenue pendant plus de 48h (résultat non montré). La présence de grandes quantités de Pofut1 dans les cellules COS-1 ne semble avoir aucune incidence sur la prolifération et la viabilité des cellules, ce qui correspond aux observations faites sur l'enzymes Pofut2 (Loriol *et al.*, 2006). A l'inverse, la protéine mutée sur le site S1 n'est visible à aucun moment de la cinétique ce qui implique que son absence n'est pas due à une dégradation protéolytique suivant sa synthèse.

2) Mutagenèse de la forme b de Pofut1 :

Nous avons aussi formulé l'hypothèse que la non-détection de Pofut1 mutée sur le site N⁶⁵ pouvait être liée à la perte de l'activité *O*-fucosyltransférase de l'enzyme mutée. Chez le bovin, notre équipe avait identifié plusieurs variants transcriptionnels de Pofut1 (Figure 2A, Lorient *et al.*, 2006). Le transcrite *Pofut1a* est le seul à coder une protéine, de 45 kDa, présentant une activité *O*-fucosyltransférase (Figure 2A, Lorient *et al.*, 2006). Le transcrite *Pofut1b* code une protéine inactive du fait de l'absence de 40 acides aminés dans son extrémité C-terminale. Nous avons alors analysé la présence des protéines Pofut1b sauvage et mutée sur le site 65, dans les extraits de cellules COS-1 transfectées. Nous avons constaté la même influence du *N*-glycane sur la présence de la protéine dans l'extrait cellulaire et donc le même effet sur l'agrégation de la protéine (Figure 2C). Cette expérience nous permet de conclure que l'agrégation de Pofut1 mutée sur le site N⁶⁵ n'est pas due à la perte d'activité *O*-fucosyltransférase puisque Pofut1b non mutée, qui est inactive (Figure 2B), ne s'agrège pas alors que la même protéine mutée en N⁶⁵ s'agrège.

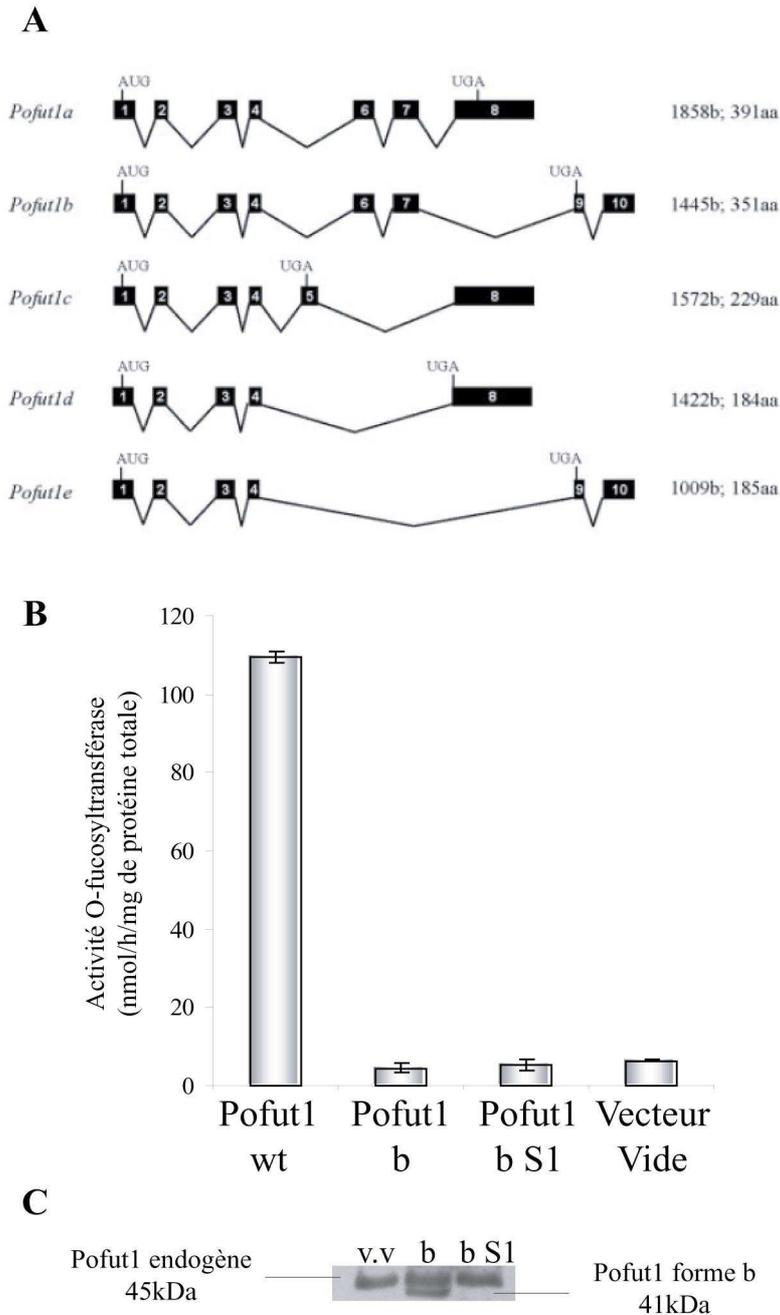


Fig.2 : Effet de l'absence du N-glycane à la position 65 sur la forme Pofut1b.
 (A) Variants transcriptionnels de Pofut1 retrouvés dans les tissus bovins (Loriol *et al.*, 2006). (B) Tests d'activités effectués sur Pofut1a (wt) en comparaison avec la forme codée par *Pofut1b*. Les cellules COS-1 ont été transfectées avec le vecteur pCDNA3.1 contenant les différents ADNc de *Pofut1*. La forme b de Pofut1 n'a aucune activité. wt : wild type, Pofut1a comportant ses deux N-glycannes ; b : forme traduite du variant b de Pofut1 ; b S1 : forme b de Pofut1 dont le site à la position 65 a été muté. (B) Western blot anti-Pofut1 montrant la forme b de Pofut1. Les quantités de protéines déposées sur le gel sont deux fois supérieures (100 µg) à celles utilisées dans les analyses en western blot réalisées pour l'article, à cause du faible signal généré par la forme b (dû à sa faible reconnaissance par l'anticorps ou à sa faible expression), la forme endogène de Pofut1 est de ce fait bien visible. v.v : vecteur vide.

III- Conclusion

L'étude de la relation structure-fonction que nous avons effectuée a permis de mettre en évidence l'importance de la *N*-glycosylation pour la fonction enzymatique de Pofut1. Nos résultats suggèrent un rôle des glycannes dans le repliement correct de l'enzyme. Ils renforcent l'idée que la glycosylation augmente les capacités de solubilité d'une protéine en cours de repliement et permettent aussi de bénéficier du système de chaperonnes Calnexine/Calréticuline, ce qui évite leur agrégation irréversible. Par conséquent, Pofut1 est un nouvel exemple qui confirme que la fonction biologique d'une protéine n'est pas uniquement dictée par sa séquence d'acides aminés ; elle est aussi influencée par ses modifications post-traductionnelles. En ce sens, le profil de glycosylation d'une protéine présente un fort intérêt biotechnologique qui nécessite d'être étudié et reproduit pour la production de protéines recombinantes.

Ces résultats soulèvent également de nouvelles questions, deux d'entre-elles sont évoquées ici :

- (i) Tout d'abord, nous avons montré que la *N*-glycosylation était indispensable à l'activité enzymatique de Pofut1, mais qu'en est-il de son implication dans l'activité chaperonne de la protéine ? Si le repliement de Pofut1 n'est pas assuré, il semble évident que son activité de chaperonne envers le récepteur Notch va être influencée.
- (ii) Ensuite, nous avons montré que le site de *N*-glycosylation à la position 65 est très conservé au sein du règne animal alors que le site à la position 163 l'est beaucoup moins. Les mutants Pofut1 générés dans l'article ci-dessus confirment que la *N*-glycosylation au site 65 est nécessaire à la fonctionnalité de Pofut1. Or ce site de *N*-glycosylation est exceptionnellement absent de la séquence Pofut1 du nématode *Caenorhabditis elegans*. Il serait intéressant de conduire une étude fonctionnelle sur cette protéine et d'analyser les déterminants de son repliement qui sont de toute évidence différents de ceux des enzymes des autres espèces animales.

Voie de signalisation de Notch dans la différenciation myogénique

Afin d'appréhender les implications complexes des gènes constructeurs des *O*-fucosylglycannes portés par Notch, il nous a paru primordial d'examiner la voie de signalisation de Notch pendant les différentes étapes de la myogenèse. La voie de signalisation de Notch présente quelques particularités dans ce contexte (voir exposé bibliographique, page 59). Une étude utilisant les embryons de souris KO pour le gène *Pofut1* a montré que l'absence de *Pofut1* entraînait un dérèglement dans l'expression de plusieurs acteurs de la voie de signalisation de Notch dont *Dll1*, *Dll3*, *Jagged1*, *Notch1*, *Lunatic Fringe* et *Hes5* (Shi et Stanley, 2003). La même étude indique que la Myogénine est également fortement sous-exprimée dans ces embryons. L'hypothèse la plus objective est que ces dérégulations sont dues à plusieurs rétrocontrôles positifs et négatifs auxquels sont soumis certains composants de la voie de signalisation de Notch. A terme, notre ambition est de faire varier l'expression de *Pofut1* dans le contexte de la prolifération et de la différenciation des cellules C2C12, puis d'en étudier les effets sur la voie de signalisation de Notch et sur la myogenèse. Aussi, il était nécessaire de faire un état des lieux préalable sur la participation des différents acteurs de la voie de Notch au processus de myogenèse.

Pour remplir cet objectif, nous avons besoin d'un modèle biologique. L'étude des processus de prolifération et de différenciation myogénique étant très difficile à mener *in vivo*, nous avons choisi de commencer par l'utilisation de cultures cellulaires. Les études préliminaires menées sur des cultures primaires de myoblastes bovins n'ayant pas été concluantes (Loriol, 2006), et ne disposant pas de lignées immortalisées bovines, nous nous sommes orientés vers l'utilisation de la lignée de cellules myoblastiques murines C2C12. En effet, cette lignée est déjà bien caractérisée par la communauté scientifique, elle est facilement disponible et relativement facile d'utilisation. Les principaux résultats obtenus devront être confirmés par l'analyse de cultures de cellules primaires murines et bovines et pourquoi pas, dans le futur, par l'étude du muscle *in vivo*.

Pour étudier les nombreux acteurs intervenant dans la voie de signalisation de Notch, nous avons besoin d'un outil efficace, sensible et dont le débit d'analyse est relativement important. Notre choix s'est porté sur l'analyse transcriptomique en s'appuyant sur la technique de PCR quantitative en temps réel. Nous avons opté pour la technologie des sondes Taqman avec le support TLDA (Taqman low-density array, Applied Biosystems, Foster City,

USA) (Loriol, 2006) pour analyser l'expression des gènes impliqués dans la voie de signalisation de Notch. Cette étude est complétée par des analyses protéiques des acteurs les plus intéressants.

I- Construction de la carte TLDA « Myo-96-souris »

La carte TLDA « Myo-96-souris » que nous avons construite permet d'analyser simultanément l'expression de 96 gènes pour quatre échantillons. La liste des gènes est donnée dans le tableau 1. Nous avons combiné dans cette carte un ensemble de 50 gènes connus pour leur implication dans le processus myogénique, un ensemble de 40 gènes de la voie de signalisation de Notch dont l'expression est, pour la plupart, encore méconnue et 6 gènes de référence. La première catégorie de gènes nous permet de suivre le bon déroulement de la différenciation myogénique des cellules C2C12, alors que l'expression des gènes de la deuxième catégorie nous apporte les informations sur le comportement des acteurs de la voie de signalisation de Notch. A terme, en comparant l'expression de ces deux catégories de gènes au cours de la différenciation de C2C12, surexprimant certains gènes constructeurs des *O*-fucosylglycannes, il sera possible de connaître leur influence sur la voie de Notch et sur la myogenèse.

Fonction du gène	Gènes	Nombre
Myogenèse		50
Facteurs de transcription	Hes6 ; Mef2a ; Mef2b ; Mef2c ; Mef2d ; Myf6 Pax1 ; Pax3	9
Récepteurs	Boc ; Cdon ; Fzd1 ; Fzd3 ; Fzd4 ; Fzd6 Fzd7 Fzd8 ; Fzd10 ; Tdgf1 (Cripto)	9
Protéines extracellulaires	Bmp4 ; Il6st ; Nodal ; Tgfb1 ; Shh ; Wnt1 ; Wnt3a Wnt4 ; Wnt5a ; Wnt6 ; Wnt7a ; Wnt8a	12
Autres	Cdh15 ; Cdkn1a ; Cdkn1c ; Cfc1 ; Col19a1 Csrp3 ; Ctnnb1 ; Ctnnbip1 ; Ctnnb11 ; Des ; Eln Gdf8 ; Nomo1 ; Pitnpb ; Pofut2 ; Sirt1 ; Smad3 Wif1 ; Wisp1 ; Wisp2	20
Voie de signalisation de Notch		40
Facteurs de transcription	Hes1 ; Hes2 ; Hes3 ; Hes5 ; Hes7 ; Hesx1 ; Hey1 Hey2 ; Heyl ; Rbpsuh (CBF-1)	9
Glycosyltransférases	b4galT1 ; Lfng ; Mfng ; Rfng ; Pofut1 ; Siat4c Siat6 ; Siat10	9
Récepteurs	Notch1 ; Notch2 ; Notch3 ; Notch4	4
Ligands	Dlk1 ; Dll1 ; Dll3 ; Dll4 ; Dner ; Jag1 ; Jag2	7
Partenaires de Notch	Akt1s1 ; Atcay ; Dtx1 ; Dtx2 ; Dtx3 ; Ep300 Fbxw7 ; Hbld2 ; Mam11 ; Sbnol ; Wrd12	11
Références	18S ; Actb ; G6pdx ; Gapdh ; Tbp ; Tcea1	6

Tableau 1 : Gènes analysés par la carte TLDA Myo-96-souris.

La carte TLDA « Myo-96-souris » contient également plusieurs acteurs de la voie de signalisation des Wnts (Tableau 1). Cette voie de signalisation est très importante dans le processus de myogenèse (voir page 14). L'expression de certains de ces gènes durant la différenciation myogénique des cellules C2C12 présente des profils très intéressants, ils seront assurément exploités par la suite. Cependant, ces résultats ne seront pas exposés dans ce manuscrit car ils sortent quelque peu du contexte scientifique de ce travail de thèse. L'expression du gène *Pofut2* étant parfaitement inconnue dans le contexte de la myogenèse, il nous a semblé intéressant d'inclure ce gène à cette carte TLDA. Les résultats obtenus montrent que *Pofut2* est exprimé dans les cellules C2C12, mais aucune variation significative n'a été observée.

II- Mise au point de l'utilisation des TLDA : choix des gènes de référence

Lors de la construction de cette carte, une étape importante fut le choix de bons gènes de référence, dont les valeurs d'expression (Ct) permettront de calculer les quantités relatives d'ARNm de nos gènes d'intérêt. Six gènes habituellement utilisés comme références ont été inclus à la TLDA. Il a donc fallu vérifier les variations éventuelles de l'expression de ces six

gènes au cours de la différenciation des cellules C2C12, phase de la myogenèse que nous désirions plus particulièrement cibler (Figure 3). Nous avons observé une variation très forte de l'expression des gènes *Actb* et *G6pdx* (supérieur à un facteur 2). Des variations moindres mais significatives (facteur 2) sont également obtenues pour les gènes *Tcea1* et *Tbp*. Il semble que ces variations traduisent le changement physiologique des cellules au cours du processus myogénique et sont observables généralement après 24h de différenciation. Ainsi, seules deux références présentant de faibles variations ont été choisies pour suivre le processus de différenciation des cellules C2C12 ; il s'agit du gène codant l'ARN ribosomal 18S et le gène *Gapdh*. Ce dernier gène permet d'éviter la critique qui serait liée à la seule utilisation d'un gène (*ADNr18S*) ne codant pas une protéine.

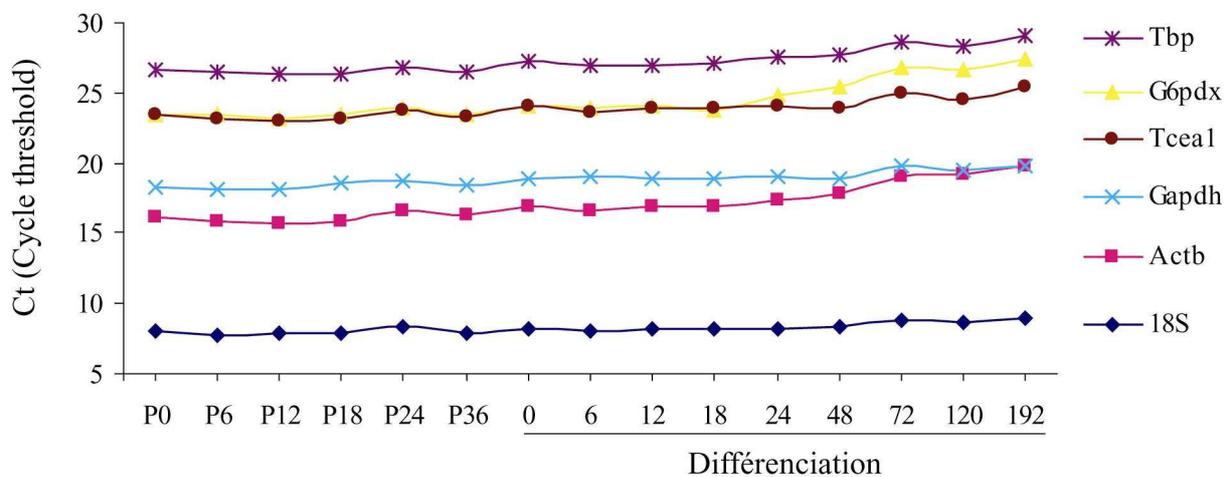


Fig. 3 : Analyse de l'expression des 6 gènes références présents sur la carte TLDA. La mesure du Ct (cycle threshold) indique la quantité d'ARNm de chacun des gènes présents, pendant les phases de prolifération (P) et de différenciation. Les ARNm dont la quantité est stable, 18S et Gapdh, seront utilisés comme références lors du calcul des $\Delta\Delta Ct$.

III- Publication 2 :

L'outil technologique que représente la carte TLDA nous a permis de mener une étude sur l'expression de ces gènes lors de la différenciation myogénique des cellules C2C12. Les résultats obtenus sont consignés dans cette partie sous la forme d'un article en cours de rédaction.

**Towards a Molecular Mechanism for Notch Signaling Pathway
during Myogenic Differentiation of C2C12**

A. Audfray, A. Maftah & A. Germot

Nous travaillons actuellement au laboratoire afin de répondre efficacement à plusieurs questions. Par exemple, l'absence de Notch1 clivé dans les myotubes après 120h de différenciation peut avoir deux explications : i) l'absence de protéine Notch1 à la surface des cellules ou ii) l'absence d'activation de Notch1. Les données sur l'expression de ce gène montrent qu'il est toujours exprimé dans les myotubes et nous feraient pencher pour la deuxième explication. Cependant, nous réalisons actuellement des analyses par western blot en utilisant un anticorps anti-Notch dirigé contre la forme hétérodimérique pour vérifier la présence de la protéine dans les myotubes après 120h de différenciation. Afin d'affiner le modèle présenté sur la figure 6, nous souhaitons également réaliser d'autres analyses en western blot avec des anticorps dirigés contre les protéines Notch2 et Notch3, ceci nous permettra de véritablement connaître la distribution des différentes protéines Notch au sein des sous-populations de cellules présentes lors de la différenciation de la lignée C2C12. De façon plus générale, ces données nous permettront également de vérifier la corrélation entre la quantité de transcrits et la quantité de protéines.

Modification de l'expression de *Pofut1* dans les cellules C2C12

Les analyses, par PCR quantitative et par western blot, ont montré que la protéine Pofut1 était présente de façon constitutive lors du processus de différenciation des cellules C2C12. Les profils d'expression des acteurs de la voie de signalisation de Notch ont aussi été établis dans ce contexte. Mon objectif est, à présent, d'analyser les conséquences de la présence, de l'absence et de la modification de la composition des *O*-fucosylglycannes sur cette voie de signalisation, dans le processus de différenciation myogénique. D'un point de vue pratique, ceci consiste à sur- ou sous-exprimer les gènes qui codent ces enzymes lors de la différenciation des cellules C2C12, puis à analyser, grâce à la technique de PCR quantitative en temps réel, les variations d'expression des composants de la voie de signalisation de Notch ainsi que de ceux de la myogenèse. En comparant ces variations avec celles observées lors de la différenciation « normale » des cellules C2C12, il est possible de définir l'implication des *O*-fucosylglycannes dans la myogenèse. Plusieurs résultats préliminaires ayant montré que l'activité *O*-fucosyltransférase dans les cellules C2C12 était très faible, ceci étant sûrement dû à la faible quantité de protéine Pofut1 présente dans ces cellules, l'essentiel du travail s'est concentré sur la surexpression du gène *Pofut1* qui code l'enzyme indispensable à la synthèse de tous les *O*-fucosylglycannes portés par les EGF-like.

I- Surexpression transitoire du gène *Pofut1* :

1) Vecteur utilisé :

Des études précédentes menées par Céline Lorient (2006) ont permis la construction d'un vecteur d'expression eucaryote contenant la séquence codant une protéine Pofut1 murine fonctionnelle, dont l'activité *O*-fucosyltransférase a été démontrée dans les cellules COS-1 (voir page 126). Ce vecteur est le pcDNA3.1, dans lequel le gène *Pofut1* a été cloné sous le contrôle du promoteur fort pCMV et qui contient son codon stop originel afin d'éviter la synthèse de la queue poly-histidine, présente sur le vecteur et qui abolit l'activité de l'enzyme.

2) Surexpression de Pofut1 murine dans les cellules COS-1.

Afin d'étudier l'effet de la modification de l'expression du gène *Pofut1* sur la différenciation myogénique des cellules de souris C2C12 (voir page 127), nous avons voulu vérifier que la protéine murine surexprimée était fonctionnelle dans nos conditions expérimentales. Nous avons, par conséquent, transfecté des cellules COS-1 par le pcDNA3.1 contenant la séquence bovine ou murine de Pofut1 et mesuré l'activité respective des enzymes (Figure 4).

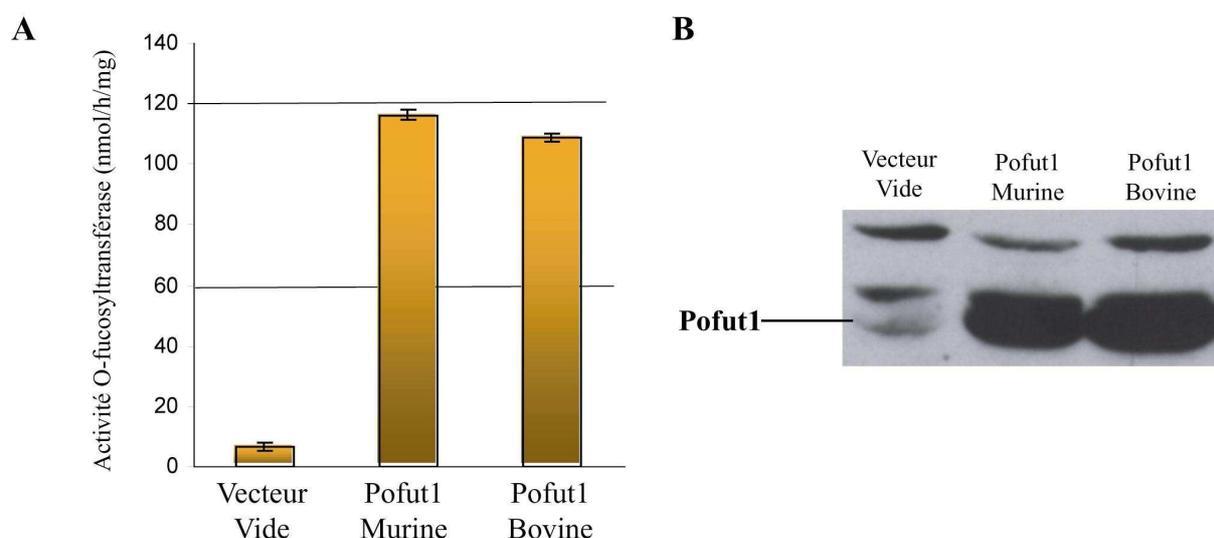


Fig.4 : Surexpression du gène murin et activité de l'enzyme dans les cellules COS-1.

(A) Activités mesurées sur les extraits bruts de cellules COS-1 transfectées par le vecteur pcDNA3.1 contenant les ADNc des gènes *Pofut1* murin ou bovin. (B) Analyse par Western blot de la surexpression des gènes *Pofut1* murin et bovin. La transfection avec un vecteur vide permet de voir la présence (B) et l'activité (A) de la protéine Pofut1 endogène.

L'activité mesurée pour Pofut1 murine ($116 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{mg}^{-1}$) est comparable à celle de l'enzyme bovine (Figure 4). La transfection par les enzymes recombinantes permet d'obtenir une activité 18 fois supérieure à l'activité endogène ($6,5 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{mg}^{-1}$). Ceci nous prouve que l'enzyme qui sera ensuite surexprimée dans les cellules C2C12 a bien une activité enzymatique, du moins dans le contexte des cellules COS-1. Ces résultats sont en accord avec les analyses d'alignement de séquences qui montrent que les formes murines et bovines présentent un fort degré d'homologie (86,9 %).

3) Mise au point d'un protocole de transfection adapté aux cellules C2C12:

Les cellules C2C12 sont réputées pour leur difficulté à être transfectées. Mon premier travail a donc été la mise au point d'un protocole de transfection efficace. L'objectif est de garantir la surexpression du gène *Pofut1* dans les cellules C2C12, suffisamment longtemps pour pouvoir observer son effet sur les événements responsables de la différenciation des myoblastes en myotubes multinucléés. D'après les courbes de fusion des C2C12 réalisées dans des conditions normales (voir page 114), nous avons estimé que cette surexpression devait être conséquente (au moins d'un facteur 10), et si possible constante, jusqu'à au moins 96h de différenciation. Pour mesurer l'expression de *Pofut1*, nous utilisons la technique de PCR quantitative en temps réel dans un premier temps, complétée par la suite par une détection en western blot de la protéine en cas de surexpression. Deux méthodes de transfection ont retenu notre attention ; elles sont comparées dans la partie qui suit.

-Utilisation de la nucléofection :

Ce système utilise la technologie Amaxa (Amaxa, Cologne, Allemagne) qui offre le premier système efficace de transfert non-viral de gènes dans des lignées cellulaires difficiles à transfecter. Elle utilise le principe reconnu de l'électroporation, cependant modifié et amélioré, puisque l'ADN plasmidique est transféré directement dans le noyau des cellules ; on parle donc de nucléoporation. Elle combine certains paramètres électriques spécifiques, fournis par l'appareil « Nucleofector », à une solution de transfection spécifique à chaque type de cellules. La figure 5 montre les résultats obtenus par Mathilde Janot (stage de DEA), donnés ici à titre de comparaison.

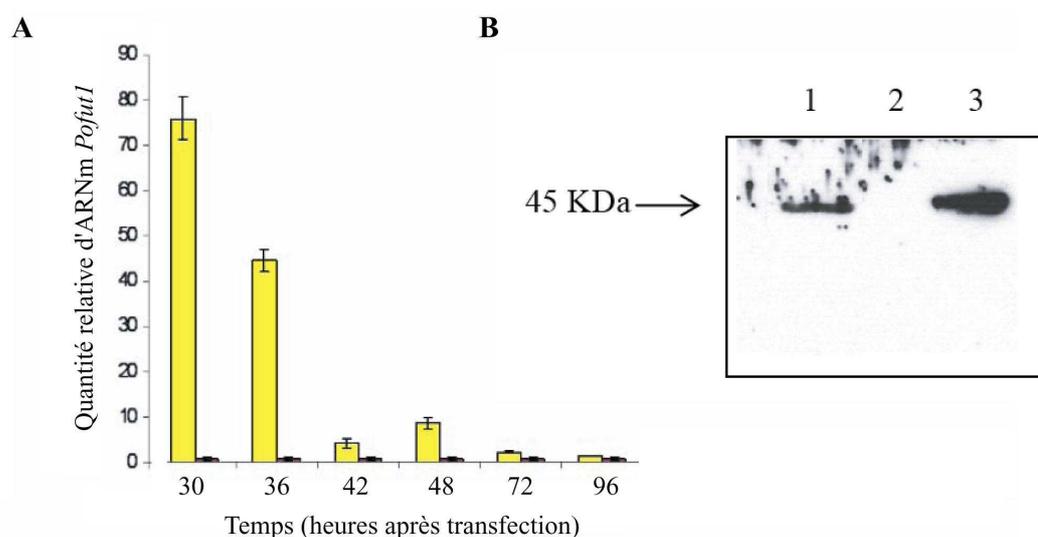


Fig.5 : Modification de l'expression de *Pofut1* dans les C2C12 après nucléofection par le système Amaxa. (A) Analyse par PCR quantitative en temps réel de l'expression de *Pofut1* dans des C2C12 non transfectées (marron) et transfectées avec le vecteur pcDNA3.1-*Pofut1 murin* (jaune). (B) Analyse par western blot anti-Pofut1, 30h après transfection. 1 : C2C12 transfectées par pcDNA3.1-*Pofut1* (50 µg d'extrait brut déposé); 2 : C2C12 non transfectées (50 µg d'extrait brut déposé) ; 3 : Pofut1 recombinante purifiée (100 ng déposé).

Cette technique permet d'obtenir la surexpression de Pofut1 d'un facteur d'ordre 100 et ceci 30h après la transfection. Cependant, le taux relatif d'ARNm *Pofut1* diminue très rapidement pour revenir au niveau endogène des C2C12 à partir de 72h, ce qui est largement en deçà de nos objectifs. Cette diminution rapide s'explique en partie par le fait que lors d'une division cellulaire, une seule des deux cellule-filles va contenir le plasmide, de plus, certains mécanismes de dégradation de l'ADN vont aussi contribuer à cette diminution (Primrose *et al.*, 2001). La reproductibilité de cette technique, dans le cas de la surexpression de *Pofut1* dans les C2C12, ne nous a pas non plus satisfaits. A ceci, s'ajoute le fait qu'elle est délicate à utiliser et très onéreuse (forte mortalité cellulaire donc besoin d'un grand nombre de cellules, nécessité de posséder un appareil et des solutions de transfection spécifiques, manipulation très longue).

-Lipofection :

Une autre technique moins lourde et moins coûteuse a été choisie. Il s'agit d'une transfection qui utilise des agents chimiques pour aider l'ADN à pénétrer dans les cellules. Ce réactif est déjà utilisé en routine dans le laboratoire pour transfecter les cellules COS-1 (voir page 126). Parmi les agents testés, le produit le plus efficace s'est révélé être le FUGENE® 6 (Roche Applied Science, Indianapolis, USA). Pour réaliser la surexpression de Pofut1 pendant la phase de différenciation des C2C12, il était également nécessaire que la transfection soit optimale dans le milieu de différenciation. La figure 6 montre les résultats obtenus avec cet agent de transfection en fonction du type de milieu utilisé.

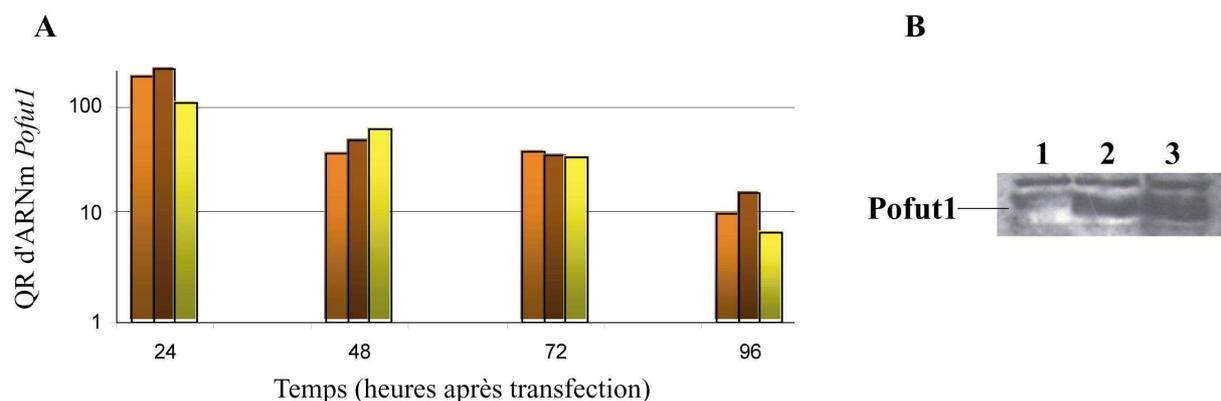


Fig.6 : Modification de l'expression de Pofut1 dans les C2C12 après transfection avec le FUGENE®6. (A) Les trois histogrammes montrent la variation de l'expression de Pofut1 selon trois protocoles qui diffèrent de par le type de milieu de culture utilisé lors de la transfection. En orange, la transfection est réalisée pendant 8h dans du DMEM sans sérum (protocole utilisé pour la transfection des cellules COS-1) ; en marron, elle est réalisée dans du milieu de différenciation (contenant 2 % de sérum de cheval) ; en jaune, elle est réalisée dans du milieu de croissance (contenant 10 % de sérum de veau foetal). QR : Quantité Relative. (B) Western blot montrant la surexpression de Pofut1 dans les cellules C2C12, 48h après la transfection dans du DMEM sans sérum. 1 : C2C12 non transfectées ; 2 : C2C12 transfectées avec le pcDNA3.1 contenant l'ADNc du gène *Pofut1* murin ; 3 : C2C12 transfectées avec le pcDNA3.1 contenant l'ADNc du gène *Pofut1* bovin.

Comme avec la technique de nucléofection, cette méthode permet de surexprimer *Pofut1* d'un facteur d'ordre 100. Par contre, elle permet de maintenir cette expression au dessus d'un facteur 10 au delà de 96h après la transfection, même lorsque celle-ci est réalisée dans le milieu de différenciation. Ce protocole (utilisation du FUGENE®6 et du vecteur pcDNA3.1 dans du milieu de différenciation) remplit donc toutes les caractéristiques requises pour nos expérimentations et est celui utilisé pour la poursuite du travail. Au laboratoire, il a servi à la surexpression de plusieurs autres gènes dans les C2C12.

4) Effet de la surexpression de *Pofut1* sur le déroulement de la différenciation myogénique :

-Au niveau phénotypique :

Aucune différence significative de phénotype n'est observable sur les cellules C2C12 qui surexpriment le gène *Pofut1*. D'après l'observation microscopique, la fusion des myoblastes en myotubes se déroule normalement, le nombre et la taille des myotubes restent inchangés.

-Au niveau de l'expression des marqueurs myogéniques :

L'expression des facteurs de régulation myogéniques (MRFs) atteste du déroulement normal de la myogenèse. La comparaison entre l'expression des MRFs dans des cellules où *Pofut1* est surexprimé et des cellules témoins transfectées avec un vecteur sans insert, nous permet de mesurer l'effet de la modification de l'expression de *Pofut1* (Figure 7).

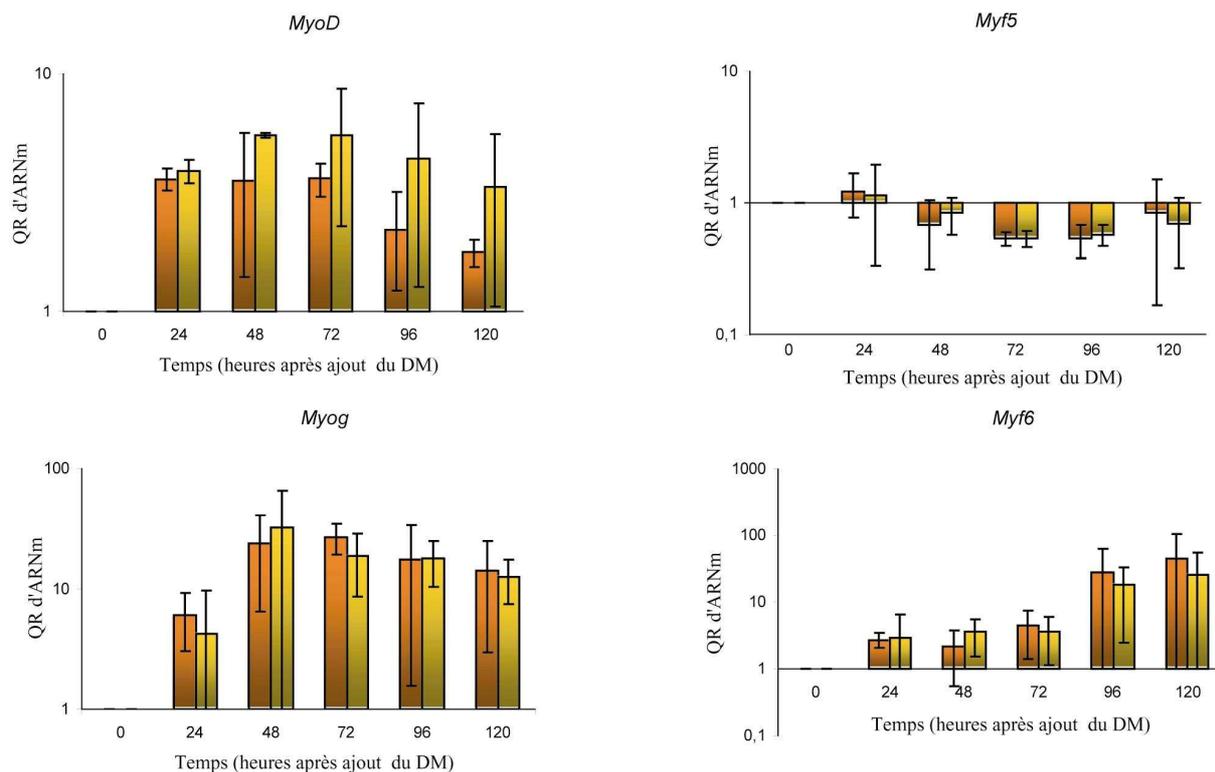


Fig.7 : Analyse par RT-PCR quantitative de l'expression des quatre MRFs au cours de la différenciation des cellules C2C12 surexprimant le gène *Pofut1*. Les histogrammes orange correspondent aux cellules transfectées par le vecteur pcDNA3.1 vide et les jaunes aux cellules transfectées par le pcDNA3.1-*Pofut1*. QR : Quantité Relative ; DM : Milieu de Différenciation.

Les écart-types observés sont dus à deux phénomènes, la faible expression des MRFs et les fortes variations qu'ils subissent lors de la différenciation des C2C12. L'allure des profils d'expression des MRFs lors des trois cultures de cellules effectuées pour cette expérimentation, est identique, ce qui indique que le programme myogénique est qualitativement similaire dans les trois cultures. En revanche, en fonction de la culture (qui peuvent faire intervenir des lots de sérum différents, de légères variations dans la concentrations des composants des milieux de croissance et de différenciation, de légères variations dans les concentrations de CO₂ ainsi que de la température dans l'incubateur,...), des différences dans l'intensité des variations sont observées ce qui induit un fort écart-type.

Les résultats obtenus sur l'expression des 4 MRFs des C2C12 (histogrammes orange) sont conformes aux données de la littérature (Dedieu *et al.*, 2002 ; Berkes et Tapscott, 2005). Les deux facteurs de détermination myogénique Myf5 et MyoD sont tous deux déjà présents lors de la phase de prolifération. Lors de la phase de différenciation, MyoD montre une surexpression d'un facteur compris entre 3 et 4 et Myf5 est faiblement sous-exprimé. Le gène *Myog*, faiblement exprimé en phase proliférative (Ct>30), voit son expression augmenter très

rapidement après l'ajout du milieu de différenciation, pour atteindre son maximum à 72h (facteur 26). L'expression de Myf6 (Mrf4) est plus tardive, elle est très faible ($Ct > 34$) avant 72h, mais augmente fortement par la suite (jusqu'à un facteur 40 à 120h).

Les données concernant la surexpression de *Pofut1* (histogrammes jaunes) confirment les observations phénotypiques. Aucune différence significative n'est remarquable dans l'expression des MRFs. On peut clairement affirmer que, dans ce système, la surexpression de *Pofut1* n'a pas d'effet significatif sur le déroulement du programme myogénique des C2C12. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'expression endogène de *Pofut1* (aussi faible qu'elle soit) suffit à *O*-fucosyler tous les acteurs potentiellement impliqués dans la myogenèse. Cependant, une autre hypothèse, due au système utilisé, peut être formulée. Le taux de transfection des C2C12 est d'environ 10% (Loriol, 2006), ce qui correspond aux valeurs trouvées dans la littérature. La valeur de l'expression mesurée pour *Pofut1* résulte donc d'une moyenne de l'expression de toutes les cellules de la culture, même de celles qui ne possèdent pas le plasmide. Ceci signifie, par exemple, que sur 10^6 cellules, 10^5 seulement ont été correctement transfectées (10 %) et surexpriment *Pofut1* d'un facteur 1000 (car l'expression moyenne est de 100, 24h après transfection, figure 6). Les cellules non transfectées continuent leur différenciation normale masquant en quelque sorte les conséquences de la surexpression de *Pofut1*. Le programme myogénique pourrait être modifié dans les cellules transfectées mais malheureusement l'analyse globale de toutes les cellules en culture n'est pas assez sensible pour détecter des variations significatives.

II- Etablissement de lignées stables Pofut1

1) Système utilisé :

Pour résoudre le problème évoqué ci-dessus, nous avons décidé d'établir des lignées de cellules C2C12 qui expriment *Pofut1* de façon stable. Plusieurs questions se sont alors posées. Est-ce que les cellules qui surexpriment *Pofut1* de façon stable vont continuer à pouvoir proliférer, et seront-elles encore cultivables ? Si *Pofut1* joue un rôle dans la prolifération des myoblastes et modifie leur croissance, comment évaluer son rôle lors de la différenciation ? Pour répondre à ces interrogations, nous avons décidé de construire des lignées stables et inductibles. Nous avons choisi le système RevTet™ (Clontech, Heidelberg, Allemagne) qui combine les avantages du transfert de gène par les rétrovirus et le système d'expression régulé par la tétracycline, Tet-On (Figure 8).

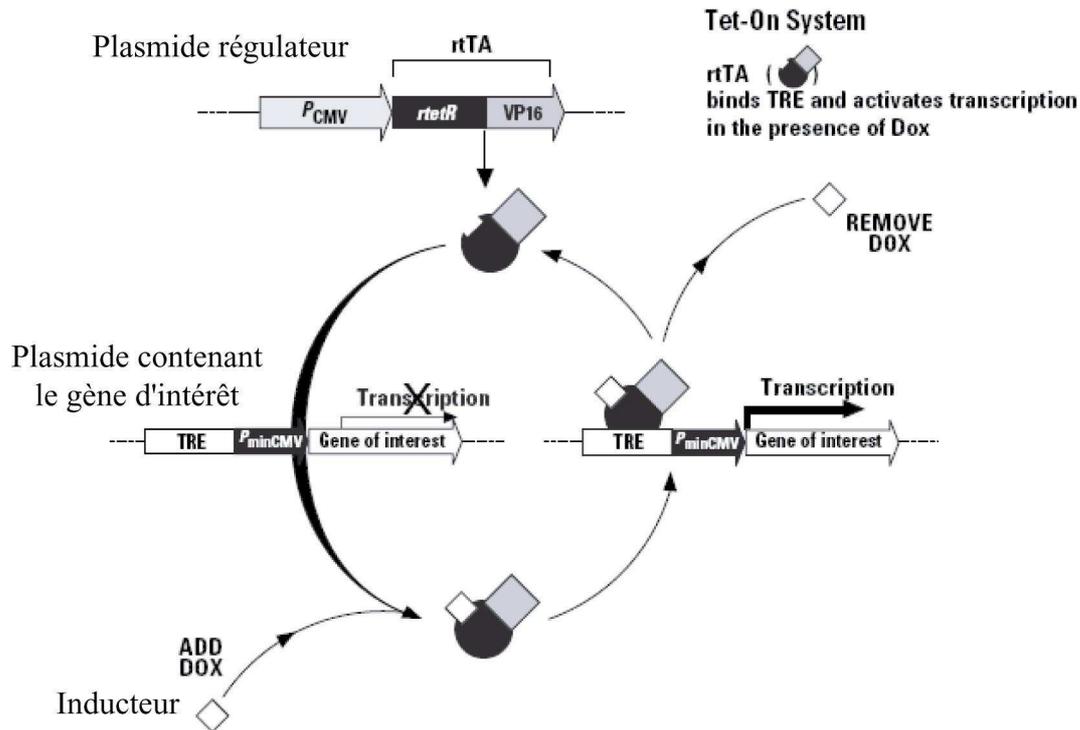


Fig.8 : Principe de fonctionnement du système Tet-On. L'établissement de lignées stables et inducibles se fait par l'insertion de deux séquences dans le génome des cellules. Une séquence qui code une protéine régulatrice (rtTA) sous le contrôle d'un promoteur fort (p_{CMV}) et une séquence composée du gène d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur régulé par la protéine rtTA. Le principe de l'induction se fait par la fixation de rtTA sur le promoteur contrôlant l'expression du gène d'intérêt, uniquement en présence de doxycycline (Dox, un dérivé de la tétracycline), de façon dose-dépendante. Une séquence de résistance à un antibiotique est associée à chacune des deux séquences (Néomycine pour plasmide régulateur et Hygromycine B pour plasmide du gène d'intérêt), ce qui permet la sélection des cellules dans lesquelles les séquences se sont insérées au génome.

Ce système nous apporte de nombreux avantages. L'utilisation de virus permet l'insertion d'une, voire de deux copies du gène seulement, ce qui nous assure de ne pas trop dérégler le fonctionnement de la cellule par une expression 1000 fois supérieure à l'expression endogène. Le fait de sélectionner les clones recombinants nous permet, tout d'abord, de nous affranchir de la difficulté de transfection des cellules C2C12, mais aussi d'être sûrs que toutes les cellules sans exception surexpriment bien le gène d'intérêt et que celui-ci n'est pas perdu, à l'image d'un plasmide non intégré, au cours des divisions cellulaires. De plus, en cas de cytotoxicité du produit du gène *Pofut1* (ou d'autres gènes), la surexpression est dépendante de la dose de Doxycycline. Les clones stables nous permettront dans le futur de faire varier la composition des *O*-fucosylglycannes, en construisant des souches sur- ou sous-exprimant plusieurs gènes responsables de leur synthèse. Enfin, le fait que les séquences régulatrices et

bout de 8 jours de culture et absence de cellule vivante au bout 10 jours). Ces concentrations serviront donc à la sélection des cellules ayant intégré les séquences régulatrices et celles contenant notre gène d'intérêt.

Après infection des cellules C2C12 avec les virus contenant le plasmide pRevTet-On, quinze clones résistants à la néomycine ont été isolés. Ces clones ont été criblés selon deux critères : le degré de fuite de leur promoteur et leur capacité à réguler l'expression d'un gène d'intérêt. Le protocole de criblage que nous avons établi est décrit en détails dans la partie « matériels et méthodes » (voir page 141). En résumé, les clones résistants sont amplifiés et stockés, puis ils sont remis en culture, transfectés transitoirement avec le plasmide pRev-TRE-*Pofut1* et dans une deuxième expérimentation avec le plasmide pRev-TRE-*luc* contenant la séquence codant la luciférase. Ceci permet de cribler les clones suivant l'expression de deux gènes différents afin d'éviter certains phénomènes de régulation dépendants d'un gène spécifique. L'induction de l'expression de ces gènes est ensuite initiée par ajout de doxycycline. L'expression de *Pofut1* est mesurée par la technique de RT-PCR quantitative et l'activité luciférase quantifiée grâce à un luminomètre. Un exemple représentatif des 15 clones, concernant le clone 7, est montré sur la figure 10.

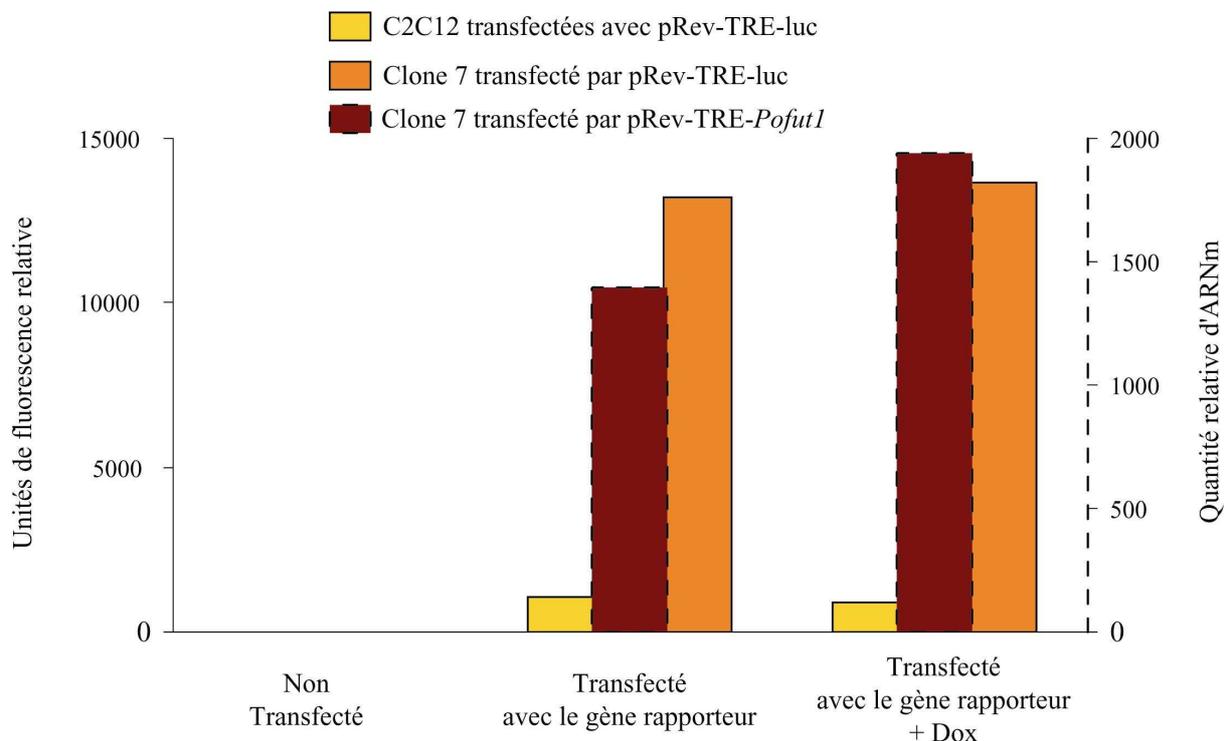


Fig.10 : Exemple de criblage pour la réalisation de la souche Rev-Tet-On. Deux types de cellules ont été utilisés : des C2C12 classiques (jaune), qui servent ici de témoin et le clone 7 (orange et marron) résistant à la néomycine, qui doit donc avoir intégré la séquence régulatrice. Les cellules sont transfectées transitoirement avec le plasmide pRev-TRE-*luc* (mesure de l'activité luciférase) ou pRev-TRE-*Pofut1* (mesure de la quantité d'ARNm *Pofut1*) dans lequel l'expression du gène rapporteur est sous le contrôle de la séquence régulatrice insérée dans le clone 7 et de la doxycycline (Dox).

On remarque tout d'abord que les cellules C2C12 transfectées avec le vecteur pRev-TRE-*luc* ont une activité luciférase environ 100 fois supérieure au témoin non transfecté, que ce soit en absence et en présence de doxycycline, ce qui indique que le promoteur, normalement régulé par la protéine rtTA et la doxycycline, comporte des fuites. Dans les cellules du clone 7, l'activité luciférase est plus de dix fois supérieure à celle mesurée dans le témoin C2C12, donc la présence de la séquence codant la protéine rtTA intégrée dans le génome permet bien d'activer la transcription de la luciférase. Le problème majeur provient du fait que, dans les cellules du clone 7, l'expression du gène d'intérêt (*luc* ou *Pofut1*) n'est que très faiblement supérieure en présence de doxycycline. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ces résultats. Dans la littérature fournie par Clontech, il est décrit que certains sérums peuvent contenir de la doxycycline. Toutes les cultures ont été effectuées avec un sérum certifié (par Clontech) sans doxycycline. Cependant, même si nous n'avons trouvé aucune donnée sur le sujet, il se pourrait que de la doxycycline soit présente dans d'autres composants des milieux de culture (DMEM, L-glutamine,...). Une mutation dans le gène codant rtTA pourrait empêcher la liaison de la protéine avec la doxycycline. Mais, nous avons vérifié la séquence du plasmide qui avait servi à construire les souches Rev-Tet-On et aucune mutation n'a été trouvée. Il serait aussi possible que ce système d'expression soit incompatible avec la lignée C2C12, cependant plusieurs équipes ont déjà réussi à créer des lignées stables et inductibles avec ces cellules (Odelberg *et al.*, 2000). En conclusion, ce système permettra bien à terme de construire des cellules C2C12 surexprimant *Pofut1* de façon constitutive mais malheureusement non inductible. Cependant, chaque clone Rev-Tet-On présente une expression différente du gène rapporteur (facteur de surexpression compris entre 3 et 300) et pourra être utilisé pour tester l'effet de la variation de l'expression de *Pofut1* sur la différenciation des cellules C2C12. Malgré le fait qu'il soit non inductible, le clone 7, dont les résultats sont présentés ici, nous a servi à l'établissement d'une lignée stable de cellules C2C12 Rev-Tet-On-*Pofut1*, en insérant dans son génome la séquence d'ADNc *Pofut1* murin.

3) Etablissement de la lignée Rev-Tet-On-*Pofut1* :

Deux souches Rev-Tet-On-*Pofut1* ont été créées. La première (souche Rev-Tet-On-*Pofut1* A) résulte de l'infection du clone 7 (souche Rev-Tet-On) par des virus contenant le plasmide pRev-TRE-*Pofut1* (Figure 5) puis d'une sélection par l'hygromycine B. La deuxième (souche Rev-Tet-On-*Pofut1* B) a été produite par l'infection simultanée de

cellules C2C12 classiques par deux sortes de virus, ceux contenant le plasmide pRev-Tet-On et ceux contenant le plasmide pRev-TRE-*Pofut1*, suivie d'une sélection simultanée aux deux antibiotiques, la néomycine et l'hygromycine B. Les souches A et B sont (en théorie) différentes uniquement par la façon dont elles ont été établies. Les résultats obtenus sont similaires avec les deux souches de cellules, les données présentées sont celles de la souche A. La présence de la protéine Pofut1 dans ces cellules a été analysée par Western blot et l'activité *O*-fucosyltransférase a été mesurée (Figure 11).

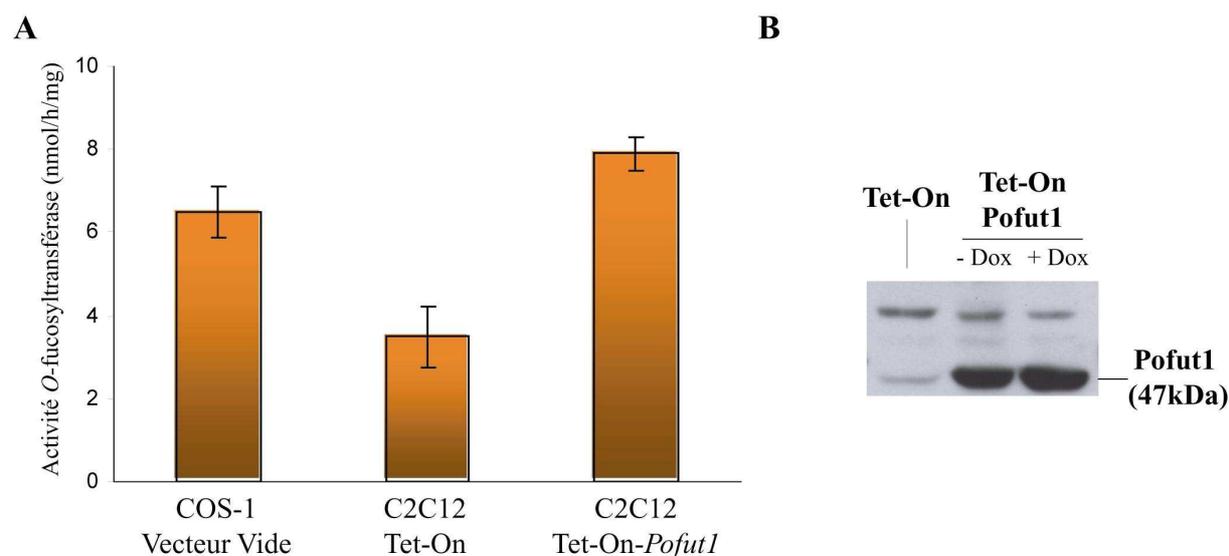


Fig.11 : Analyse de l'expression de Pofut1 dans la souche de cellules C2C12 Tet-On-*Pofut1*. (A) Activité *O*-fucosyltransférase mesurée dans les extraits protéiques bruts des cellules des souches Rev-Tet-On et Rev-Tet-On-*Pofut1*. La valeur de l'activité endogène mesurée dans les cellules COS-1 est donnée à titre de comparaison. (B) Western blot anti-Pofut1 réalisé sur les extraits protéiques (50 μ g de protéines) des souches Rev-Tet-On et Rev-Tet-On-*Pofut1*, en absence et en présence de doxycycline (Dox, 5 μ g/ml).

Le premier résultat frappant concerne l'activité endogène plus faible dans les cellules C2C12 Rev-Tet-On (3,5 nmol.h⁻¹.mg⁻¹) (Figure 11A) en comparaison avec les cellules COS-1 (6,5 nmol.h⁻¹.mg⁻¹). Le Western blot anti-Pofut1 (Figure 11B) permet de voir que la quantité endogène de Pofut1 dans les cellules C2C12 est très inférieure à la quantité observée dans les COS-1 (Figure 4B). La protéine Pofut1 endogène est d'ailleurs très difficile à détecter dans les cellules C2C12. Il serait intéressant de vérifier ceci, *in vivo*, dans le rein (cellules COS-1) et dans le muscle squelettique (cellules C2C12). Par contre, l'analyse par Western blot montre l'augmentation significative de la quantité de Pofut1 dans la souche Rev-Tet-On-*Pofut1* (Figure 11B). Cependant, comme déjà observé lors du crible des clones Rev-Tet-On (qui utilisait une transfection transitoire de *Pofut1* ou du gène de la luciférase), l'ajout de

Doxycycline, à une concentration de 2 ou 5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, n'entraîne aucun changement dans l'expression de *Pofut1*. La souche Rev-Tet-On-*Pofut1* A exprime donc constitutivement la protéine *Pofut1* et il est impossible d'induire sa production par l'ajout de Doxycycline. L'augmentation de la quantité de *Pofut1* se traduit aussi par une augmentation de l'activité *O*-fucosyltransférase (7,9 nmol.h⁻¹.mg⁻¹) mesurée dans les extraits bruts de protéines issus de la souche Rev-Tet-On-*Pofut1* A (Figure 11A). L'activité mesurée est seulement deux fois supérieure à l'activité endogène (3,5 nmol.h⁻¹.mg⁻¹) alors que l'on a l'impression, en Western blot, que la quantité de *Pofut1* augmente fortement. Ceci est peut être dû à l'environnement cellulaire des C2C12 qui inhibe l'activité *O*-fucosyltransférase du test enzymatique *in vitro*.

III- Sous-expression du gène *Pofut1* :

1) Vecteur de shRNA :

Une étude préliminaire de sous-expression du gène *Pofut1* a également été menée sur les cellules C2C12. Pour ce faire, nous avons choisi d'utiliser des ARN interférents (ARNi). Le principe de l'interférence par ARN est de fournir à la cellule des petits ARN double brin ayant des séquences complémentaires à certaines portions de l'ARNm à détruire. Nous avons opté pour la technique du shRNA (Loriol, 2006) qui permet d'éteindre l'expression d'un gène d'intérêt de façon plus stable et plus durable que celle fournissant directement aux cellules de petits ARNi. Un vecteur de shRNA nous a été donné par le Professeur Pamela Stanley. Ce vecteur contient un fragment de séquence correspondant à une région de l'exon 3 du gène *Pofut1* murin, en sens et en antisens (Figure 12 A). L'efficacité de ce vecteur a déjà été testée et validée pour l'extinction d'ARNm *Pofut1* dans les cellules CHO (communication personnelle de P. Stanley). La séquence ciblée étant parfaitement identique chez la souris et chez le bovin, ce vecteur peut aussi servir à l'extinction du gène *Pofut1* bovin.

2) Observation phénotypique :

Contrairement à sa surexpression, la sous-expression du gène *Pofut1* entraîne un effet clairement observable au niveau phénotypique. Les résultats ne sont que préliminaires et il est encore difficile de tirer des conclusions très précises avant la réalisation de nouvelles mesures, mais il semble que les cellules transfectées par le vecteur pSilencer-*Pofut1* (Figure 12 A) ne suivent pas le même programme myogénique que les cellules C2C12 témoins. On peut

observer soit un retard de la différenciation, soit une diminution de la taille des myotubes (ou alors les deux à la fois) (Figure 12 B). Des analyses de l'expression, par PCR quantitative, des 4 MRFs sont en cours, afin d'étudier l'évolution du programme myogénique. Des marqueurs comme la Desmine et la Myosine seront utiles en Western blot et/ou en immunofluorescence, pour suivre la différenciation myoblastique *in vitro*.

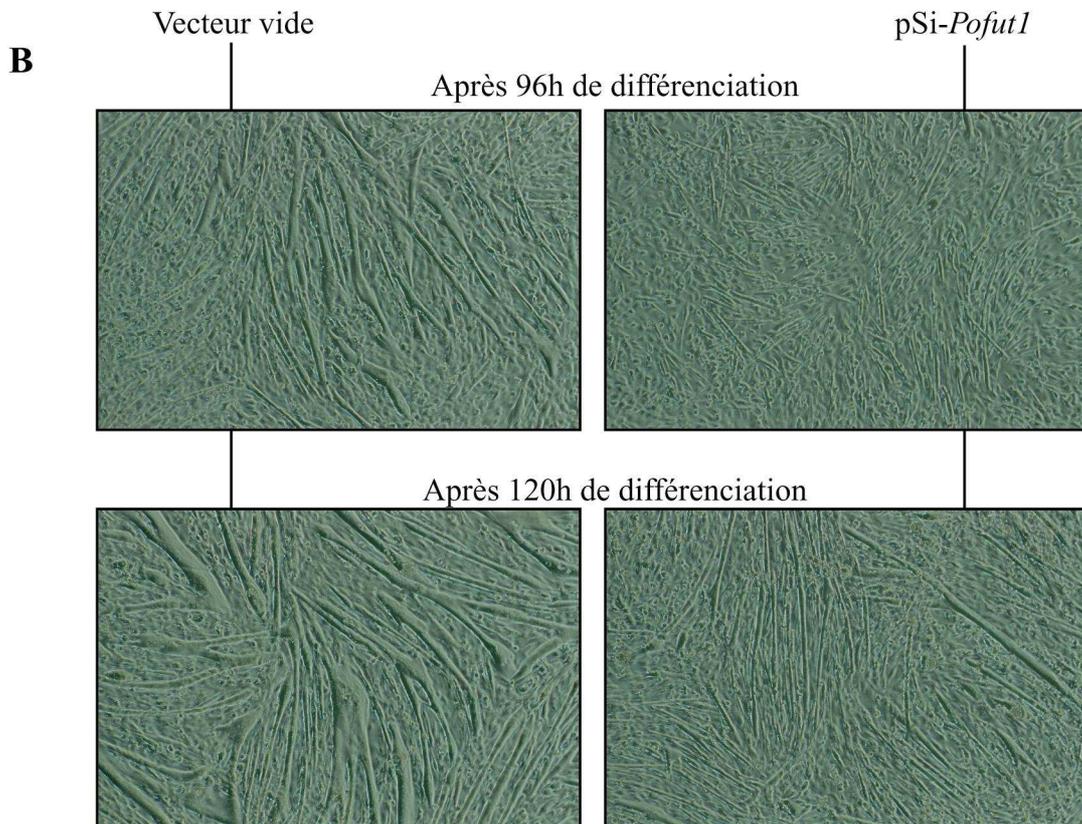
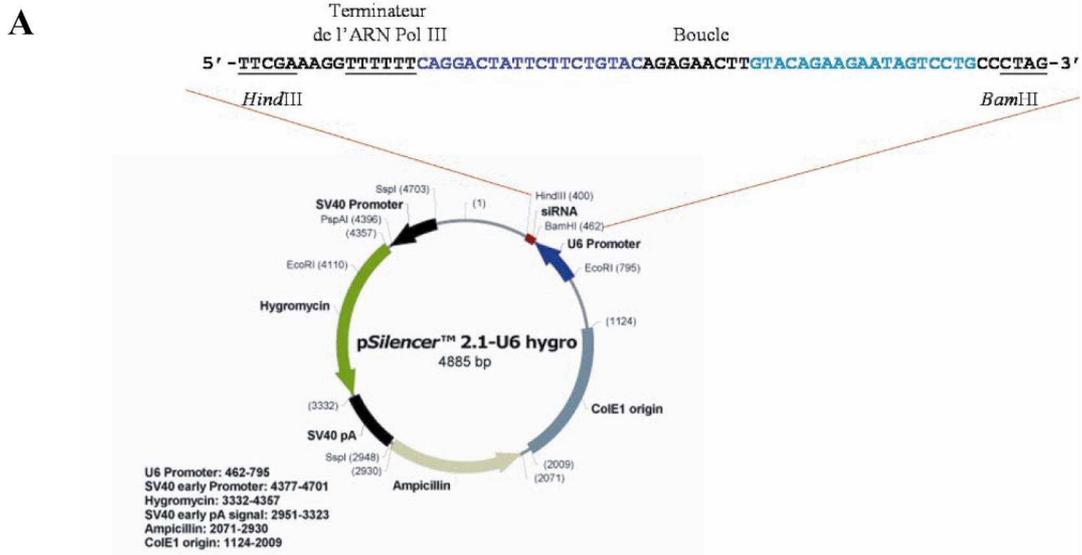


Fig.12 : Sous-expression de Pofut1 dans les cellules C2C12. (A) Vecteur utilisé pour la sous-expression de *Pofut1*. La séquence d'ADN responsable de l'extinction du gène *Pofut1* est détaillée. (B) Observation phénotypique de l'effet de la sous-expression de *Pofut1* après 96h et 120h de processus de différenciation myoblastique.

IV- Matériels et Méthodes :

Construction du vecteur pRev-TRE-*Pofut1* :

Le gène *Pofut1* murin a été amplifié par PCR à partir du vecteur pcDNA3.1-*Pofut1* avec les amorces 5'-CGGGATCCCGTTGTCGACATGGGCGCC-3' (sens) et 5'-CCATCGATGGTCAAATTCATCCCGAAGCTG-3' (antisens) contenant les sites de restriction des enzymes *Bam*HI (sens) et *Cla*I (antisens) aux extrémités 5' puis ligaturé dans le vecteur pRev-TRE après digestion du vecteur et du produit PCR par ces deux enzymes. Après criblage par PCR des bactéries TOP10 transformées par le produit de ligation, la construction est vérifiée par séquençage.

Production des virus :

Le processus de production des virus nécessaires à l'infection des cellules C2C12 est expliqué sur la figure 13. Trois types de virus ont été produits par cette méthode, ils contiennent l'un des trois vecteurs pRev-Tet-On, pRevTRE-*luc* et pRev-TRE-*Pofut1*.

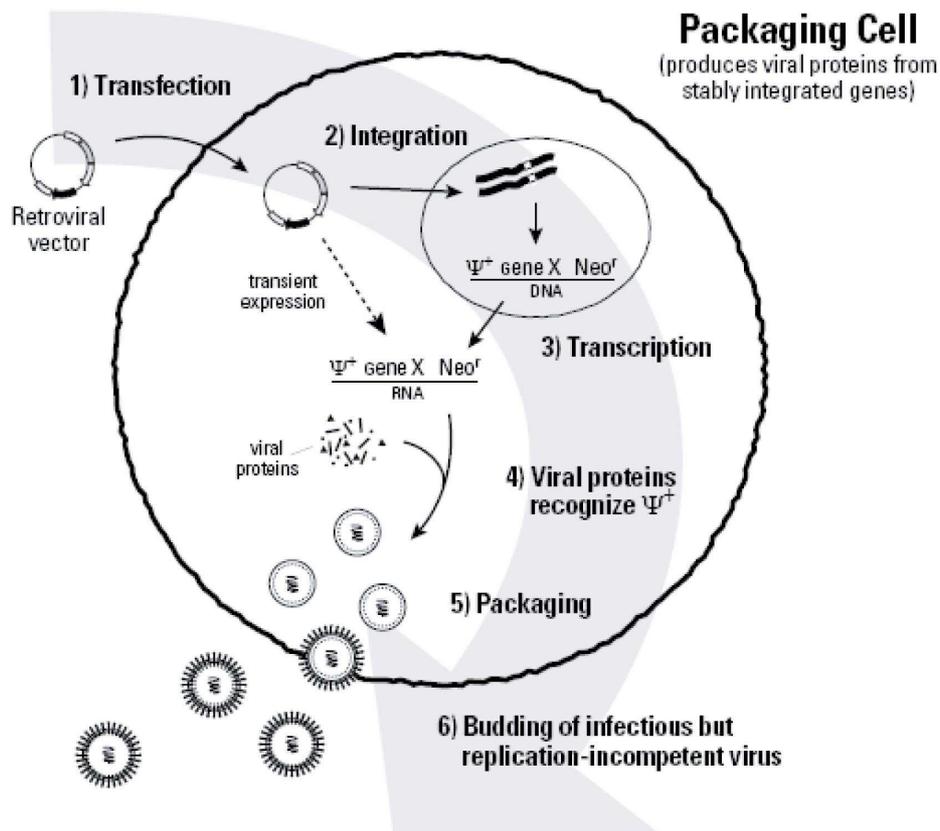


Fig.13 : Production des particules rétrovirales. Les vecteurs rétroviraux sont transfectés transitoirement avec du FuGENE[®]6 (Roche, Indianapolis, USA) mais peuvent aussi être intégrés stablement dans des cellules PT67. Cette lignée cellulaire apporte les gènes nécessaires à la formation de particules rétrovirales infectieuses contenant le plasmide d'intérêt mais incapables de se répliquer : *gag* (protéine structurale de la capsid), *pol* (transcriptase inverse, intégrase) et *env* (glycoprotéine de la capsid). Les virus produits à partir de cette lignée contiennent les produits de ces gènes (ils sont donc infectieux) mais pas les gènes eux-mêmes, ce qui empêche leur répllication dans d'autres lignées cellulaires (comme les cellules à infecter par exemple ; dans notre cas les cellules C2C12). (d'après Clontech, Indianapolis, USA).

Les cellules PT67 sont cultivées dans un milieu de croissance (DMEM, sérum de veau fœtal 10 %, L-glutamine 4 mM, pénicilline 100 U/ml, streptomycine 100 µg/ml) jusqu'à 80 % de confluence. Les vecteurs sont introduits dans les cellules par transfection transitoire avec du FuGENE[®]6. Quarante-huit heures après, le surnageant contenant les virus est récupéré, puis filtré sur filtre stérile 0,45 µm. Le surnageant est si possible utilisé immédiatement pour l'infection des C2C12 ou alors stockés à -80°C. L'utilisation de ces virus (dérivés du « Moloney murine leukemia virus ») se fait suivant les règles de sécurité de niveau 2 (*Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, U.S. Department of Health and Human Services, PHS, CDC, NIH, <http://bmbll.od.nih.gov>).

Infection des cellules C2C12 :

Les cellules C2C12 sont repiquées 24h avant infection de façon à obtenir 40 % de confluence au moment de l'infection. Le milieu de culture est alors remplacé par le surnageant contenant les virus auquel il a été ajouté du polybrène à une concentration finale de 4 µg/ml pour faciliter l'entrée des virus dans les cellules. Vingt-quatre heures après l'infection, le surnageant est remplacé par du milieu de croissance.

Sélection des clones résistants :

Au bout de 24h de croissance, on ajoute l'antibiotique de sélection, Néomycine ou Hygromycine B, en fonction du vecteur. La concentration des antibiotiques et la durée de la sélection sont définies par des études préliminaires (voir page 133). Les 15 colonies les plus larges (> à 100 cellules) et dont les cellules présentaient le meilleur aspect (semblable au C2C12 non infectées) sont isolées dans des boîtes individuelles, amplifiées et stockées dans l'azote liquide.

Criblage des clones après sélection :

Les clones isolés sont tous résistants à l'antibiotique de sélection. Cependant, en fonction de l'emplacement des séquences intégrées dans le génome, des variations importantes de l'expression de notre gène d'intérêt peuvent être observées. Il a donc fallu mettre au point un protocole de criblage capable de différencier efficacement les clones. La figure 14 résume le protocole mis en place.



Fig.14 : Protocole de criblage des clones résistants à l'antibiotique de sélection.

T0 : Chaque clone est repiqué dans une plaque 6 puits à 2.10^5 cellules par puits. **T24** : Dans quatre des six puits, les cellules sont transfectées transitoirement par le plasmide pRev-TRE-luc ou pRev-TRE-*Pofut1* avec du FuGENE6 (les deux puits restants servent de témoins non transfectés). **T48** : Dans deux des quatre puits transfectés, on ajoute de la doxycycline pour une concentration finale de 2 $\mu\text{g/ml}$ (les deux puits restants servent de témoins transfectés mais non induits). **T72** : Les cellules sont récupérées par décollement à la trypsine.

Mesure de l'activité luciférase :

Les protéines sont extraites dans 100 μl de tampon de lyse cellulaire (Promega, Madison, USA) pendant 10 min, puis dosées par la technique du BCA (Sigma, St Louis, USA). La mesure de l'activité luciférase se fait sur 5 μg d'extrait protéique, dans un luminomètre automatique, par ajout de 100 μl de substrat A et 100 μl de substrat B (Clontech, Indianapolis, USA).

Conclusion

Au travers de cette thèse, nous avons cherché à démontrer que l'enzyme *O*-fucosyltransférase 1, Pofut1, qui greffe le fucose sur les EGF-like de plusieurs protéines dont les récepteurs Notch et leurs ligands, pouvait jouer un rôle central dans le processus de myogenèse chez les Mammifères. Au vu des données bibliographiques sur le sujet, de nombreuses questions étaient soulevées et nécessitaient des réponses convaincantes. Quel est le fonctionnement enzymatique précis de la protéine Pofut1 ? Et plus particulièrement, quelles sont les entités structurales indispensables au bon fonctionnement de l'enzyme ? Quel est le fonctionnement moléculaire de la voie de signalisation de Notch dans le processus de myogenèse *in vitro* ? Quels sont les acteurs de cette voie présents dans les différents types cellulaires d'une lignée myoblastique ? Quel(s) rôle(s) joue Pofut1 dans la myogenèse au travers de la voie de signalisation de Notch ? Quelle est l'influence de la présence accrue ou de l'absence de Pofut1 ? Pour répondre à un maximum de ces questions, nous avons décidé de diviser le travail de thèse selon trois axes : l'étude structure-fonction de l'enzyme Pofut1 bovine, l'analyse de la voie de Notch dans la différenciation myogénique, et enfin l'étude de l'effet de la modification de l'expression de Pofut1 lors de ce même processus. A l'issue de mes trois années de thèse, nous avons montré que la fonctionnalité de Pofut1 était influencée par son état de glycosylation (Audfray *et al.*, 2007). Plusieurs équipes ont rapporté que le *O*-fucose greffé sur Notch1 (activité assurée par Pofut1) favorisait l'interaction de ce récepteur avec ses ligands DSL (Haines et Irvine 2003, Stanley, 2007). Ce qui implique que la voie de signalisation de Notch est aussi indirectement régulée par le processus de *N*-glycosylation. Ces résultats, associés aux données de la littérature, mettent en évidence les domaines structuraux nécessaires à la fonctionnalité de Pofut1 chez les mammifères : tout d'abord, Pofut1 est une protéine réticulaire, sa rétention dans le RE est due à sa séquence KDEL (Luo et Haltiwanger, 2005). La *O*-fucosyltransférase possède également une fonction de chaperonne à l'égard du récepteur Notch chez la drosophile (Okajima *et al.*, 2005). Même si aucune étude ne s'est encore penchée sur l'implication de motifs spécifiques nécessaires à cette activité chaperonne, on peut penser que les éléments structuraux impliqués dans la liaison à son accepteur (Breton *et al.*, 1998, Dupuy *et al.*, 2004) sont les meilleurs candidats à cette fonction. Son repliement et son activité enzymatique sont favorisés par la présence du *N*-glycane à la position N⁶⁵, (Audfray *et al.*, 2007). Les seuls accepteurs reconnus par Pofut1 sont les EGF-like correctement repliés contenant la séquence consensus C²X₄₋₅(S/T)C³. L'affinité (Km), *in vitro*, de l'enzyme pour ses substrats est de l'ordre du micromolaire et, le Vmax est d'environ 3 µmol/min/mg (Wang *et al.*, 2001) ce qui représente des valeurs habituelles pour une glycosyltransférase (Rohfritsch *et al.*, 2006). La *O*-fucosylation assurée

par Pofut1 est également dépendante d'un cation divalent dont le plus efficace est le Mn^{2+} (Wang *et al.*, 1996). La protéine Pofut1 partage avec les $\alpha 2$ et $\alpha 6$ -fucosyltransférases, trois motifs peptidiques conservés (I, II et III) et une séquence DXD impliqués dans la catalyse enzymatique (Martinez-Dunker *et al.*, 2003). L'ensemble de ces données contribue à une meilleure connaissance du comportement de Pofut1 vis-à-vis de ces cibles, en particulier de Notch et ses ligands. Ces connaissances sont très précieuses, elles peuvent par exemple servir à l'ingénierie protéique de Pofut1 afin de créer une forme recombinante parfaitement active. Pour le laboratoire, ces données permettent d'aborder les futures études sur l'implication de Pofut1 dans la myogenèse en ayant des connaissances sur l'environnement optimal de la réaction catalysée par Pofut1. Pour ces études sur la myogenèse, nous avons commencé par valider notre outil biologique, en confirmant que la lignée cellulaire C2C12 représentait un bon modèle à l'étude de la différenciation myogénique. Ces analyses (courbe de fusion, analyse de marqueurs comme la myosine, la desmine, les MRFs,...) doivent accompagner chacune des cultures de cellules C2C12 afin de suivre très précisément le programme de différenciation myogénique. Au sein d'une culture de cellules C2C12 différenciées, la séparation des myotubes et des cellules de réserve constitue un bon moyen pour étudier et appréhender, *in vitro*, le rôle des cellules satellites au sein des fibres musculaires. La technique de PCR quantitative en temps réel et l'apport du format TLDA permettent l'analyse simultanée de l'expression d'un grand nombre de gènes de la voie de signalisation de Notch. Cette technologie, basée sur les sondes Taqman, est d'une haute sensibilité, elle est particulièrement adaptée à l'étude des gènes faiblement exprimés ce qui est en général le cas des glycosyltransférases et de nombreux acteurs de la voie de signalisation de Notch. Dans ce contexte, les analyses protéomiques sont difficiles car la quantité de protéines produites par ces gènes est minoritaire par rapport à la quantité de protéines totales. L'utilisation de ces outils transcriptomiques constitue donc un bon moyen de cribler un nombre important de gènes pour ensuite étudier en profondeur ceux dont les variations d'expression sont les plus significatives. Cette technique nous a permis de montrer que l'expression de plusieurs acteurs de la voie de signalisation de Notch présente des variations significatives. Les résultats obtenus nous ont permis la mise au point d'un modèle qui résume l'implication de la voie de Notch au cours de la différenciation myogénique. Ce modèle constitue une base à affiner, à corriger et à compléter lors de prochaines analyses. Il constitue également une base aux études visant à mesurer l'effet de modifications de l'expression de Pofut1 sur la différenciation myogénique. Dans ce domaine, la difficulté à transfecter efficacement les C2C12 demeure un frein évident mais l'établissement de lignées stables semble être une bonne alternative. Le

système Rev-Tet-On est en théorie l'outil le plus adapté à ces recherches mais certains éléments nous manquent encore pour établir une lignée inductible, on trouve dans la littérature quelques équipes ayant utilisé le système Tet-On avec la lignée C2C12 (Odelberg *et al.*, 2000). Néanmoins, la souche de C2C12 surexprimant Pofut1 de façon constitutive est un outil biologique précieux, des études sur l'effet de cette surexpression sur la voie de signalisation de Notch lors de la différenciation myogénique sont en cours au laboratoire. Une prochaine étape intéressante serait la création d'une souche de C2C12 qui sous-exprime Pofut1, idéalement de façon inductible. Le laboratoire dispose actuellement de tous les outils nécessaires (séquence d'ARNi, vecteurs rétroviraux, moyens d'analyse de la sous-expression,...).

Ces trois années de recherche m'ont permis de contribuer aux connaissances déjà acquises à l'interface entre les domaines de la myogenèse, la voie de signalisation de Notch, et la glycosylation. Je souhaite bien évidemment qu'elle ne cesse de s'enrichir dans les prochaines années. Je souhaite surtout que le laboratoire de l'UGMA continue à contribuer à ces connaissances. D'un point de vue personnel, ces 3 années m'ont permis de parfaire ma formation et de goûter à une première expérience professionnelle au sein d'une équipe de recherche. Ainsi cette formation par la recherche a permis de m'inculquer une solide formation scientifique, mais elle représente aussi l'apprentissage du mode de fonctionnement d'un milieu professionnel. J'ai le sentiment d'y avoir trouvé une place et espère que mon intérêt pour les activités de recherche restera intact au cours de l'ensemble de ma vie professionnelle.

Bibliographie

1. **Abmayr, S. M., L. Balagopalan, B. J. Galletta, and S. J. Hong.** 2003. Cell and molecular biology of myoblast fusion. *Int Rev Cytol* **225**:33-89.
2. **Acar, M., H. Jafar-Nejad, H. Takeuchi, A. Rajan, D. Ibrani, N. A. Rana, H. Pan, R. S. Haltiwanger, and H. J. Bellen.** 2008. Rumi Is a CAPI10 Domain Glycosyltransferase that Modifies Notch and Is Required for Notch Signaling. *Cell* **132**:247-258.
3. **Appel, B., P. Marasco, L. E. McClung, and A. J. Latimer.** 2003. *lunatic fringe* regulates delta-notch induction of hypochord in zebrafish. *Developmental Dynamics* **228**:281-286.
4. **Armand, A.-S., I. Laziz, and C. Chanoine.** 2006. FGF6 in myogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1763**:773-778.
5. **Arnold, H., and T. Braun.** 1996. Targeted inactivation of myogenic factor genes reveals their role during mouse myogenesis: a review. *Int J Dev Biol* **40**:345-353.
6. **Artavanis-Tsakonas, S., M. D. Rand, and R. J. Lake.** 1999. Notch Signaling: Cell Fate Control and Signal Integration in Development. *Science* **284**:770-776.
7. **Asano, M., K. Furukawa, M. Kido, S. Matsumoto, Y. Umesaki, N. Kochibe, and Y. Iwakura.** 1997. Growth retardation and early death of beta-1,4-galactosyltransferase knockout mice with augmented proliferation and abnormal differentiation of epithelial cells. *EMBO J* **16**:1850-7.
8. **Ashley C. Wozniak, J. E. A.** 2007. Nitric oxide-dependence of satellite stem cell activation and quiescence on normal skeletal muscle fibers. *Developmental Dynamics* **236**:240-250.
9. **Aulehla, A., C. Wehrle, B. Brand-Saberi, R. Kemler, A. Gossler, B. Kanzler, and B. G. Herrmann.** 2003. Wnt3a Plays a Major Role in the Segmentation Clock Controlling Somitogenesis. *Developmental Cell* **4**:395-406.
10. **Baladrón, V., M. J. Ruiz-Hidalgo, M. L. Nueda, M. J. M. Díaz-Guerra, J. J. García-Ramírez, E. Bonvini, E. Gubina, and J. Laborda.** 2005. dlk acts as a negative regulator of Notch1 activation through interactions with specific EGF-like repeats. *Experimental Cell Research* **303**:343-359.
11. **Barbieri, G., L. De Angelis, S. Feo, G. Cossu, and A. Giallongo.** 1990. Differential expression of muscle-specific enolase in embryonic and fetal myogenic cells during mouse development. *Differentiation* **45**:179-184.
12. **Barreaud, J.-P., K. Saunier, J. Souchaire, D. Delourme, A. Oulmouden, R. Oriol, H. Leveziel, R. Julien, and J.-M. Petit.** 2000. Three bovine α 2-fucosyltransferase genes encode enzymes that preferentially transfer fucose on Galb1-3GalNAc acceptor substrates. *Glycobiology* **10**:611-621.
13. **Barret, A., L. Forestier, J.-P. Deslys, R. Julien, and P. F. Gallet.** 2005. Glycosylation-related Gene Expression in Prion Diseases: PrPSc Accumulation in Scrapie Infected GT1 Cells Depends on b-1,4-linked GalNAc-4-SO₄ Hyposulfation. *J. Biol. Chem.* **280**:10516-10523.
14. **Bate, M.** 1990. The embryonic development of larval muscles in *Drosophila*. *Development* **110**:791-804.
15. **Bauer, S. R., M. J. Ruiz-Hidalgo, E. K. Rudikoff, J. Goldstein, and J. Laborda.** 1998. Modulated Expression of the Epidermal Growth Factor-Like Homeotic Protein dlk Influences Stromal-Cell-Pre-B-Cell Interactions, Stromal Cell Adipogenesis, and Pre-B-Cell Interleukin-7 Requirements. *Mol. Cell. Biol.* **18**:5247-5255.
16. **Beauchamp, J. R., L. Heslop, D. S. W. Yu, S. Tajbakhsh, R. G. Kelly, A. Wernig, M. E. Buckingham, T. A. Partridge, and P. S. Zammit.** 2000. Expression of CD34 and Myf5 Defines the Majority of Quiescent Adult Skeletal Muscle Satellite Cells. *J. Cell Biol.* **151**:1221-1234.
17. **Becker, D. J., and J. B. Lowe.** 2003. Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. *Glycobiology* **13**:41R-53.
18. **Beckers, J., A. Clark, K. Wünsch, M. Hrabé De Angelis, and A. Gossler.** 1999. Expression of the mouse Delta1 gene during organogenesis and fetal development. *Mechanisms of Development* **84**:165-168.
19. **Berkes, C. A., and S. J. Tapscott.** 2005. MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **16**:585-595.
20. **Bessho, Y., G. Miyoshi, R. Sakata, and R. Kageyama.** 2001. Hes7 : a bHLH-type repressor gene regulated by Notch and expressed in the presomitic mesoderm. *Genes to Cells* **6**:175-185.
21. **Bessho, Y., R. Sakata, S. Komatsu, K. Shiota, S. Yamada, and R. Kageyama.** 2001. Dynamic expression and essential functions of Hes7 in somite segmentation. *Genes Dev.* **15**:2642-2647.
22. **Bettenhausen, B., M. Hrabé de Angelis, D. Simon, J. L. Guenet, and A. Gossler.** 1995. Transient and restricted expression during mouse embryogenesis of Dll1, a murine gene closely related to *Drosophila* Delta. *Development* **121**:2407-2418.

23. **Birchmeier, C., and H. Brohmann.** 2000. Genes that control the development of migrating muscle precursor cells. *Current Opinion in Cell Biology* **12**:725-730.
24. **Birchmeier, C., and E. Gherardi.** 1998. Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase. *Trends in Cell Biology* **8**:404-410.
25. **Biressi, S., M. Molinaro, and G. Cossu.** 2007. Cellular heterogeneity during vertebrate skeletal muscle development. *Developmental Biology* **308**:281-293.
26. **Bischoff, R.** 1997. Chemotaxis of skeletal muscle satellite cells. *Developmental Dynamics* **208**:505-515.
27. **Bladt, F., D. Riethmacher, S. Isenmann, A. Aguzzi, and C. Birchmeier.** 1995. Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* **376**:768-771.
28. **Blake, D. J., A. Weir, S. E. Newey, and K. E. Davies.** 2002. Function and Genetics of Dystrophin and Dystrophin-Related Proteins in Muscle. *Physiol. Rev.* **82**:291-329.
29. **Blaumueller, C., and S. Artavanis-Tsakonas.** 1997. Comparative aspects of Notch signaling in lower and higher eukaryotes. *Perspect Dev Neurobiol* **4**:325-43.
30. **Blaumueller, C. M., H. Qi, P. Zagouras, and S. Artavanis-Tsakonas.** 1997. Intracellular Cleavage of Notch Leads to a Heterodimeric Receptor on the Plasma Membrane. *Cell* **90**:281-291.
31. **Bober, E., G. E. Lyons, T. Braun, G. Cossu, M. Buckingham, and H. H. Arnold.** 1991. The muscle regulatory gene, Myf-6, has a biphasic pattern of expression during early mouse development. *J. Cell Biol.* **113**:1255-1265.
32. **Booth, F. W., and D. B. Thomason.** 1991. Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: perspectives of various models. *Physiol. Rev.* **71**:541-585.
33. **Borycki, A. G., B. Brunk, S. Tajbakhsh, M. Buckingham, C. Chiang, and C. P. Emerson.** 1999. Sonic hedgehog controls epaxial muscle determination through Myf5 activation. *Development* **126**:4053-4063.
34. **Brand-Saberri, B., and B. Christ.** 1999. Genetic and epigenetic control of muscle development in vertebrates. *Cell Tissue Res* **296**:199-212.
35. **Brand-Saberri, B., J. Wilting, C. Ebersperger, and B. Christ.** 1996. The formation of somite compartments in the avian embryo. *Int J Dev Biol* **40**:411-420.
36. **Braun, T., M. A. Rudnicki, H.-H. Arnold, and R. Jaenisch.** 1992. Targeted inactivation of the muscle regulatory gene Myf-5 results in abnormal rib development and perinatal death. *Cell* **71**:369-382.
37. **Bray, S.** 1998. Notch signalling in *Drosophila*: three ways to use a pathway. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **9**:591-597.
38. **Bray, S. J.** 2006. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**:678-689.
39. **Breton, C., L. Snajdrova, C. Jeanneau, J. Koca, and A. Imberly.** 2006. Structures and mechanisms of glycosyltransferases. *Glycobiology* **16**:29R-37.
40. **Brou, C., F. Logeat, N. Gupta, C. Bessia, O. LeBail, J. R. Doedens, A. Cumano, P. Roux, R. A. Black, and A. Israël.** 2000. A Novel Proteolytic Cleavage Involved in Notch Signaling: The Role of the Disintegrin-Metalloprotease TACE. *Molecular Cell* **5**:207-216.
41. **Bruckner, K., L. Perez, H. Clausen, and S. Cohen.** 2000. Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch-Delta interactions. *Nature* **406**:411-415.
42. **Buckingham, M.** 1992. Making muscle in mammals. *Trends in Genetics* **8**:144-149.
43. **Buckingham, M., L. Bajard, T. Chang, P. Daubas, J. Hadchouel, S. Meilhac, D. Montarras, D. Rocancourt, and F. Relaix.** 2003. The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *Journal of Anatomy* **202**:59-68.
44. **Burda, P., and M. Aebi.** 1999. The dolichol pathway of N-linked glycosylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1426**:239-257.
45. **Caramelo, J. J., O. A. Castro, L. G. Alonso, G. de Prat-Gay, and A. J. Parodi.** 2003. UDP-Glc:glycoprotein glycosyltransferase recognizes structured and solvent accessible hydrophobic patches in molten globule-like folding intermediates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**:86-91.
46. **Casas, F., L. Pessemeesse, S. Grandemange, P. Seyer, N. Gueguen, O. Baris, L. Lepourry, G. Cabello, and C. Wrutniak-Cabello.** 2008. Overexpression of the mitochondrial T3 receptor p43 induces a shift in skeletal muscle fiber types. *PLoS ONE* **3**:e2501.
47. **Chai, J., and A. Tarnawski.** 2002. Serum response factor: discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing. *J Physiol Pharmacol* **53**:147-157.
48. **Chang, Y. C., and K. J. Kwon-Chung.** 1999. Isolation, Characterization, and Localization of a Capsule-Associated Gene, CAP10, of *Cryptococcus neoformans*. *J. Bacteriol.* **181**:5636-5643.

49. **Charrasse, S., M. Meriane, F. Comunale, A. Blangy, and C. Gauthier-Rouviere.** 2002. N-cadherin-dependent cell-cell contact regulates Rho GTPases and {beta}-catenin localization in mouse C2C12 myoblasts. *J. Cell Biol.* **158**:953-965.
50. **Chen, E. H., and E. N. Olson.** 2004. Towards a molecular pathway for myoblast fusion in *Drosophila*. *Trends in Cell Biology* **14**:452-460.
51. **Chen, J., and D. Goldhamer.** 2003. Skeletal muscle stem cells. *Reproductive Biology and Endocrinology* **1**:101.
52. **Chen, J., D. J. Moloney, and P. Stanley.** 2001. Fringe modulation of Jagged1-induced Notch signaling requires the action of Î²⁴galactosyltransferase-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**:13716-13721.
53. **Chen, Y.-W., J. W. Pedersen, H. H. Wandall, S. B. Levery, S. Pizette, H. Clausen, and S. M. Cohen.** 2007. Glycosphingolipids with extended sugar chain have specialized functions in development and behavior of *Drosophila*. *Developmental Biology* **306**:736-749.
54. **Chitnis, A.** 2006. Why is delta endocytosis required for effective activation of notch? *Developmental Dynamics* **235**:886-894.
55. **Christ, B., and C. Ordahl.** 1995. Early stages of chick somite development. *Anat Embryol* **191**:391-396.
56. **Cieniewski-Bernard, C., Y. Mounier, J.-C. Michalski, and B. Bastide.** 2006. O-GlcNAc level variations are associated with the development of skeletal muscle atrophy. *J Appl Physiol* **100**:1499-1505.
57. **Cifuentes-Diaz, C., M. Nicolet, D. Goudou, F. Rieger, and R. M. Mege.** 1994. N-cadherin expression in developing, adult and denervated chicken neuromuscular system: accumulations at both the neuromuscular junction and the node of Ranvier. *Development* **120**:1-11.
58. **Clegg, C. H., T. A. Linkhart, B. B. Olwin, and S. D. Hauschka.** 1987. Growth factor control of skeletal muscle differentiation: commitment to terminal differentiation occurs in G1 phase and is repressed by fibroblast growth factor. *J. Cell Biol.* **105**:949-956.
59. **Collins, C. A., I. Olsen, P. S. Zammit, L. Heslop, A. Petrie, T. A. Partridge, and J. E. Morgan.** 2005. Stem Cell Function, Self-Renewal, and Behavioral Heterogeneity of Cells from the Adult Muscle Satellite Cell Niche. *Cell* **122**:289-301.
60. **Conboy, I. M., and T. A. Rando.** 2002. The Regulation of Notch Signaling Controls Satellite Cell Activation and Cell Fate Determination in Postnatal Myogenesis. *Developmental Cell* **3**:397-409.
61. **Conlon, R. A., A. G. Reaume, and J. Rossant.** 1995. Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites. *Development* **121**:1533-1545.
62. **Cooke, J., and E. Zeeman.** 1976. A clock and wavefront model for control of the number of repeated structures during animal morphogenesis. *J Theor Biol* **58**:455-476.
63. **Cornelison, D. D. W., M. S. Filla, H. M. Stanley, A. C. Rapraeger, and B. B. Olwin.** 2001. Syndecan-3 and Syndecan-4 Specifically Mark Skeletal Muscle Satellite Cells and Are Implicated in Satellite Cell Maintenance and Muscle Regeneration. *Developmental Biology* **239**:79-94.
64. **Cornelison, D. D. W., and B. J. Wold.** 1997. Single-Cell Analysis of Regulatory Gene Expression in Quiescent and Activated Mouse Skeletal Muscle Satellite Cells. *Developmental Biology* **191**:270-283.
65. **Cossu, G., R. Kelly, S. Di Donna, E. Vivarelli, and M. Buckingham.** 1995. Myoblast differentiation during mammalian somitogenesis is dependent upon a community effect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**:2254-2258.
66. **Cossu, G., S. Tajbakhsh, and M. Buckingham.** 1996. How is myogenesis initiated in the embryo? *Trends in Genetics* **12**:218-223.
67. **de-Celis, J. F., and A. Garcia-Bellido.** 1994. Modifications of the Notch Function by Abruptex Mutations in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **136**:183-194.
68. **de Bernabe, D., H. van Bokhoven, E. van Beusekom, W. Van den Akker, S. Kant, W. B. Dobyns, B. Cormand, S. Currier, B. Hamel, B. Talim, H. Topaloglu, and H. G. Brunner.** 2003. A homozygous nonsense mutation in the Fukutin gene causes a Walker-Warburg syndrome phenotype. *J Med Genet* **40**:845-848.
69. **de Celis, J. F., and S. J. Bray.** 2000. The Abruptex domain of Notch regulates negative interactions between Notch, its ligands and Fringe. *Development* **127**:1291-1302.
70. **De Strooper, B., W. Annaert, P. Cupers, P. Saftig, K. Craessaerts, J. S. Mumm, E. H. Schroeter, V. Schrijvers, M. S. Wolfe, W. J. Ray, A. Goate, and R. Kopan.** 1999. A presenilin-1-dependent [gamma]-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* **398**:518-522.
71. **Delsuc, F., H. Brinkmann, D. Chourrout, and H. Philippe.** 2006. Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. *Nature* **439**:965-968.
72. **Dennis, J. W., M. Granovsky, and C. E. Warren.** 1999. Protein glycosylation in development and disease. *BioEssays* **21**:412-421.

73. **Dickson, G., D. Peck, S. E. Moore, C. H. Barton, and F. S. Walsh.** 1990. Enhanced myogenesis in NCAM-transfected mouse myoblasts. *Nature* **344**:348-351.
74. **Dietrich, S., F. Abou-Rebyeh, H. Brohmann, F. Bladt, E. Sonnenberg-Riethmacher, T. Yamaai, A. Lumsden, B. Brand-Saberi, and C. Birchmeier.** 1999. The role of SF/HGF and c-Met in the development of skeletal muscle. *Development* **126**:1621-1629.
75. **Diez del Corral, R., I. Olivera-Martinez, A. Goriely, E. Gale, M. Maden, and K. Storey.** 2003. Opposing FGF and Retinoid Pathways Control Ventral Neural Pattern, Neuronal Differentiation, and Segmentation during Body Axis Extension. *Neuron* **40**:65-79.
76. **Donalies, M., M. Cramer, M. Ringwald, and A. Starzinski-Powitz.** 1991. Expression of M-cadherin, a member of the cadherin multigene family, correlates with differentiation of skeletal muscle cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**:8024-8028.
77. **Donoviel, D. B., A.-K. Hadjantonakis, M. Ikeda, H. Zheng, P. S. G. Hyslop, and A. Bernstein.** 1999. Mice lacking both presenilin genes exhibit early embryonic patterning defects. *Genes Dev.* **13**:2801-2810.
78. **Dou, S., X. Zeng, P. Cortes, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, T. Honjo, and L. D. Vales.** 1994. The recombination signal sequence-binding protein RBP-2N functions as a transcriptional repressor. *Mol. Cell. Biol.* **14**:3310-3319.
79. **Dove, A.** 2001. The bittersweet promise of glycobiology. *Nat Biotechnol* **19**:913-7.
80. **Dubrulle, J., M. J. McGrew, and O. Pourquié.** 2001. FGF Signaling Controls Somite Boundary Position and Regulates Segmentation Clock Control of Spatiotemporal Hox Gene Activation. *Cell* **106**:219-232.
81. **Dulce Papy-Garcia, I. B. A. D. S. S. J.-P. C. D. B. I. M.** 2002. Glycosaminoglycan mimetics (RGTA) modulate adult skeletal muscle satellite cell proliferation *in vitro*. *Journal of Biomedical Materials Research* **62**:46-55.
82. **Dunglison, G. F., P. J. Scotting, and P. M. Wigmore.** 1999. Rat embryonic myoblasts are restricted to forming primary fibres while later myogenic populations are pluripotent. *Mechanisms of Development* **87**:11-19.
83. **Dunwoodie, S. L., D. Henrique, S. M. Harrison, and R. S. Beddington.** 1997. Mouse Dll3: a novel divergent Delta gene which may complement the function of other Delta homologues during early pattern formation in the mouse embryo. *Development* **124**:3065-3076.
84. **Dupuy, F., A. Germot, R. Julien, and A. Maftah.** 2004. Structure/function study of Lewis {alpha}3- and {alpha}3/4-fucosyltransferases: the {alpha}1,4 fucosylation requires an aromatic residue in the acceptor-binding domain. *Glycobiology* **14**:347-356.
85. **Dupuy, F., A. Germot, R. Julien, and A. Maftah.** 2004. Structure/function study of Lewis a3- and a3/4-fucosyltransferases: the a1,4 fucosylation requires an aromatic residue in the acceptor-binding domain. *Glycobiology* **14**:347-356.
86. **Dupuy, F., A. Germot, M. Marena, R. Oriol, A. Blancher, R. Julien, and A. Maftah.** 2002. a1,4-Fucosyltransferase Activity: A Significant Function in the Primate Lineage has Appeared Twice Independently. *Mol Biol Evol* **19**:815-824.
87. **Dupuy, F., J.-M. Petit, R. Mollicone, R. Oriol, R. Julien, and A. Maftah.** 1999. A Single Amino Acid in the Hypervariable Stem Domain of Vertebrate alpha 1,3/1,4-Fucosyltransferases Determines the Type 1/Type 2 Transfer. CHARACTERIZATION OF ACCEPTOR SUBSTRATE SPECIFICITY OF THE LEWIS ENZYME BY SITE-DIRECTED MUTAGENESIS. *J. Biol. Chem.* **274**:12257-12262.
88. **Duxson, M. J., Y. Usson, and A. J. Harris.** 1989. The origin of secondary myotubes in mammalian skeletal muscles: ultrastructural studies. *Development* **107**:743-750.
89. **Dworak, H., and H. Sink.** 2002. Myoblast fusion in *Drosophila*. *BioEssays* **24**:591-601.
90. **Edom-Vovard, F., M.-A. Bonnin, and D. Duprez.** 2001. Fgf8 transcripts are located in tendons during embryonic chick limb development. *Mechanisms of Development* **108**:203-206.
91. **Eiraku, M., A. Tohgo, K. Ono, M. Kaneko, K. Fujishima, T. Hirano, and M. Kengaku.** 2005. DNER acts as a neuron-specific Notch ligand during Bergmann glial development. *Nat Neurosci* **8**:873-880.
92. **Ermonval, M., D. Petit, A. Le Duc, O. Kellermann, and P.-F. Gallet.** Glycosylation-related genes are variably expressed depending on the differentiation state of a bioaminergic neuronal cell line: implication for the cellular prion protein. *Glycoconjugate Journal*.
93. **Ervasti, J. M., and K. P. Campbell.** 1993. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J. Cell Biol.* **122**:809-823.
94. **Escudero, L. M., S.-Y. Wei, W.-H. Chiu, J. Modolell, and J.-C. Hsu.** 2003. Echinoid synergizes with the Notch signaling pathway in *Drosophila* mesothorax bristle patterning. *Development* **130**:6305-6316.
95. **Evans, D., H. Baillie, A. Caswell, and P. Wigmore.** 1994. During Fetal Muscle Development, Clones of Cells Contribute to Both Primary and Secondary Fibers. *Developmental Biology* **162**:348-353.

96. **Evrard, Y. A., Y. Lun, A. Aulehla, L. Gan, and R. L. Johnson.** 1998. lunatic fringe is an essential mediator of somite segmentation and patterning. *Nature* **394**:377-381.
97. **Fehon, R. G., P. J. Kooh, I. Rebay, C. L. Regan, T. Xu, M. A. T. Muskavitch, and S. Artavanis-Tsakonas.** 1990. Molecular interactions between the protein products of the neurogenic loci Notch and Delta, two EGF-homologous genes in *Drosophila*. *Cell* **61**:523-534.
98. **Ferrari, S., S. Molinari, R. Melchionna, M. G. Cusella-De Angelis, R. Battini, L. De Angelis, R. Kelly, and G. Cossu.** 1997. Absence of MEF2 binding to the A/T-rich element in the muscle creatine kinase (MCK) enhancer correlates with lack of early expression of the MCK gene in embryonic mammalian muscle. *Cell Growth Differ* **8**:23-34.
99. **Figec, N., M. Daczewska, C. Marcelle, and K. Jagla.** 2007. Muscle stem cells and model systems for their investigation. *Developmental Dynamics* **236**:3332-3342.
100. **Fiuza, U.-M., and A. M. Arias.** 2007. Cell and molecular biology of Notch. *J Endocrinol* **194**:459-474.
101. **Fleming, R. J.** 1998. Structural conservation of Notch receptors and ligands. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **9**:599-607.
102. **Fleming, R. J., Y. Gu, and N. A. Hukriede.** 1997. Serrate-mediated activation of Notch is specifically blocked by the product of the gene fringe in the dorsal compartment of the *Drosophila* wing imaginal disc. *Development* **124**:2973-2981.
103. **Fleming, R. J., K. Purcell, and S. Artavanis-Tsakonas.** 1997. The NOTCH receptor and its ligands. *Trends in Cell Biology* **7**:437-441.
104. **Florini, J. R., D. Z. Ewton, and K. A. Magri.** 1991. Hormones, Growth Factors, and Myogenic Differentiation. *Annual Review of Physiology* **53**:201-216.
105. **Freeze, H. H., and M. Aebi.** 2005. Altered glycan structures: the molecular basis of congenital disorders of glycosylation. *Current Opinion in Structural Biology* **15**:490-498.
106. **Garry, D. J., A. Meeson, J. Elterman, Y. Zhao, P. Yang, R. Bassel-Duby, and R. S. Williams.** 2000. Myogenic stem cell function is impaired in mice lacking the forkhead /winged helix protein MNF. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**:5416-5421.
107. **Gavel, Y., and G. v. Heijne.** 1990. Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Eng.* **3**:433-442.
108. **Ge, C., T. Liu, X. Hou, and P. Stanley.** 2008. In vivo consequences of deleting EGF repeats 8-12 including the ligand binding domain of mouse Notch1. *BMC Developmental Biology* **8**:48.
109. **George-Weinstein, M., J. Gerhart, J. Blitz, E. Simak, and K. A. Knudsen.** 1997. N-cadherin Promotes the Commitment and Differentiation of Skeletal Muscle Precursor Cells. *Developmental Biology* **185**:14-24.
110. **Geyer, H., and R. Geyer.** 2006. Strategies for analysis of glycoprotein glycosylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* **1764**:1853-1869.
111. **Glittenberg, M., C. Pitsouli, C. Garvey, C. Delidakis, and S. Bray.** 2006. Role of conserved intracellular motifs in Serrate signalling, cis-inhibition and endocytosis. *EMBO J* **25**:4697-4706.
112. **Gordon, W. R., D. Vardar-Ulu, G. Histen, C. Sanchez-Irizarry, J. C. Aster, and S. C. Blacklow.** 2007. Structural basis for autoinhibition of Notch. *Nat Struct Mol Biol* **14**:295-300.
113. **Graef, I. A., F. Wang, F. Charron, L. Chen, J. Neilson, M. Tessier-Lavigne, and G. R. Crabtree.** 2003. Neurotrophins and Netrins Require Calcineurin/NFAT Signaling to Stimulate Outgrowth of Embryonic Axons. *Cell* **113**:657-670.
114. **Grammont, M., and K. D. Irvine.** 2001. fringe and Notch specify polar cell fate during *Drosophila* oogenesis. *Development* **128**:2243-2253.
115. **Greenwald, I.** 1994. Structure/function studies of lin-12/Notch proteins. *Curr Opin Genet Dev* **4**:456-462.
116. **Grewal, P. K., P. J. Holzfeind, R. E. Bittner, and J. E. Hewitt.** 2001. Mutant glycosyltransferase and altered glycosylation of alpha-dystroglycan in the myodystrophy mouse. *Nat Genet* **28**:151-4.
117. **Gridley, T.** 2006. The long and short of it: Somite formation in mice. *Developmental Dynamics* **235**:2330-2336.
118. **Grobet, L., D. Poncelet, L. Royo, B. Brouwers, D. Pirottin, C. Michaux, F. Ménessier, M. Zanotti, S. Dunner, and M. Georges.** 1998. Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. *Mamm Genome* **9**.
119. **Gros, J., M. Manceau, V. Thome, and C. Marcelle.** 2005. A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells. *Nature* **435**:954-958.
120. **Gu, J., and N. Taniguchi.** 2004. Regulation of integrin functions by N-glycans. *Glycoconj J* **21**:9-15.
121. **Gurdon, J. B., E. Tiller, J. Roberts, and K. Kato.** 1993. A community effect in muscle development. *Current Biology* **3**:1-11.

122. **Haines, N., and K. D. Irvine.** 2003. Glycosylation regulates Notch signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**:786-97.
123. **Hallgren, P., A. Lundblad, and S. Svensson.** 1975. A new type of carbohydrate-protein linkage in a glycopeptide from normal human urine. *J. Biol. Chem.* **250**:5312-5314.
124. **Haltiwanger, R. S.** 2002. Regulation of signal transduction pathways in development by glycosylation. *Current Opinion in Structural Biology* **12**:593-598.
125. **Haltiwanger, R. S., and J. B. Lowe.** 2004. ROLE OF GLYCOSYLATION IN DEVELOPMENT. *Annual Review of Biochemistry* **73**:491-537.
126. **Haltiwanger, R. S., and P. Stanley.** 2002. Modulation of receptor signaling by glycosylation: fringe is an O-fucose-[beta]1,3-N-acetylglucosaminyltransferase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1573**:328-335.
127. **Hammond, C., I. Braakman, and A. Helenius.** 1994. Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:913-7.
128. **Hansson, E. M., U. Lendahl, and G. Chapman.** 2004. Notch signaling in development and disease. *Seminars in Cancer Biology* **14**:320-328.
129. **Harduin-Lepers, A., D. Petit, R. Mollicone, P. Delannoy, J.-M. Petit, and R. Oriol.** 2008. Evolutionary history of the α 2,8-sialyltransferase (ST8Sia) gene family: Tandem duplications in early deuterostomes explain most of the diversity found in the vertebrate ST8Sia genes. *BMC Evolutionary Biology* **8**:258.
130. **Harris, R. J., and M. W. Spellman.** 1993. O-Linked fucose and other post-translational modifications unique to EGF modules. *Glycobiology* **3**:219-224.
131. **Hawke, T. J., and D. J. Garry.** 2001. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* **91**:534-551.
132. **Heanue, T. A., R. Reshef, R. J. Davis, G. Mardon, G. Oliver, S. Tomarev, A. B. Lassar, and C. J. Tabin.** 1999. Synergistic regulation of vertebrate muscle development by Dach2, Eya2, and Six1, homologs of genes required for Drosophila eye formation. *Genes Dev.* **13**:3231-3243.
133. **Heinonen, T. Y. K., L. Pasternack, K. Lindfors, C. Breton, L. N. Gastinel, M. Mäki, and H. Kainulainen.** 2003. A novel human glycosyltransferase: primary structure and characterization of the gene and transcripts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **309**:166-174.
134. **Helenius, A.** 1994. How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* **5**:253-65.
135. **Helenius, A., and M. Aebi.** 2004. ROLES OF N-LINKED GLYCANS IN THE ENDOPLASMIC RETICULUM. *Annual Review of Biochemistry* **73**:1019-1049.
136. **Henrique, D., E. Hirsinger, J. Adam, I. L. Roux, O. Pourquié, D. Ish-Horowicz, and J. Lewis.** 1997. Maintenance of neuroepithelial progenitor cells by Delta-Notch signalling in the embryonic chick retina. *Current Biology* **7**:661-670.
137. **Hess, D., J. J. Keusch, S. A. L. Oberstein, R. C. M. Hennekam, and J. Hofsteenge.** 2008. Peters Plus Syndrome Is a New Congenital Disorder of Glycosylation and Involves Defective O-Glycosylation of Thrombospondin Type 1 Repeats. *J. Biol. Chem.* **283**:7354-7360.
138. **Hicks, C., S. H. Johnston, G. diSibio, A. Collazo, T. F. Vogt, and G. Weinmaster.** 2000. Fringe differentially modulates Jagged1 and Delta1 signalling through Notch1 and Notch2. *Nat Cell Biol* **2**:515-520.
139. **Hirsch, C., E. Jarosch, T. Sommer, and D. H. Wolf.** 2004. Endoplasmic reticulum-associated protein degradation--one model fits all? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1695**:215-223.
140. **Hofsteenge, J., K. G. Huwiler, B. Macek, D. Hess, J. Lawler, D. F. Mosher, and J. Peter-Katalinic.** 2001. C-Mannosylation and O-Fucosylation of the Thrombospondin Type 1 Module. *J. Biol. Chem.* **276**:6485-6498.
141. **Hofsteenge, J., D. R. Müller, T. de Beer, A. Löffler, W. J. Richter, and J. F. Vliegthart.** 1994. New type of linkage between a carbohydrate and a protein: C-glycosylation of a specific tryptophan residue in human RNase Us. *Biochemistry* **33**:13524-30.
142. **Holmes, E. H., T.-Y. Yen, S. Thomas, R. Joshi, A. Nguyen, T. Long, F. Gallet, A. Maftah, R. Julien, and B. A. Macher.** 2000. Human alpha 1,3/4 Fucosyltransferases. CHARACTERIZATION OF HIGHLY CONSERVED CYSTEINE RESIDUES AND N-LINKED GLYCOSYLATION SITES. *J. Biol. Chem.* **275**:24237-24245.
143. **Horsley, V., and G. Pavlath.** 2004. Forming a multinucleated cell: molecules that regulate myoblast fusion. *Cells Tissues Organs* **176**:67-78.
144. **Horsley, V., and G. K. Pavlath.** 2002. Nfat: ubiquitous regulator of cell differentiation and adaptation. *J. Cell Biol.* **156**:771-774.

145. **Hosokawa, N., I. Wada, K. Hasegawa, T. Yorihuzi, L. O. Tremblay, A. Herscovics, and K. Nagata.** 2001. A novel ER alpha-mannosidase-like protein accelerates ER-associated degradation. *EMBO Rep* **2**:415-22.
146. **Houzelstein, D., G. Auda-Boucher, Y. Cheraud, T. Rouaud, I. Blanc, S. Tajbakhsh, M. E. Buckingham, J. Fontaine-Perus, and B. Robert.** 1999. The homeobox gene *Msx1* is expressed in a subset of somites, and in muscle progenitor cells migrating into the forelimb. *Development* **126**:2689-2701.
147. **Hsieh, J. J., T. Henkel, P. Salmon, E. Robey, M. G. Peterson, and S. D. Hayward.** 1996. Truncated mammalian Notch1 activates CBF1/RBPJk-repressed genes by a mechanism resembling that of Epstein-Barr virus EBNA2. *Mol. Cell. Biol.* **16**:952-959.
148. **Ibraghimov-Beskrovnaya, O., J. M. Ervasti, C. J. Leveille, C. A. Slaughter, S. W. Sernett, and K. P. Campbell.** 1992. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* **355**:696-702.
149. **Illa, I., M. Leon-Monzon, and M. C. Dalakas.** 1992. Regenerating and denervated human muscle fibers and satellite cells express neural cell adhesion molecule recognized by monoclonal antibodies to natural killer cells. *Ann Neurol* **31**:46-52.
150. **Imperiali, B., and S. E. O'Connor.** 1999. Effect of N-linked glycosylation on glycopeptide and glycoprotein structure. *Current Opinion in Chemical Biology* **3**:643-649.
151. **Irintchev, A., M. Zeschnigk, A. Starzinski-Powitz, and A. Wernig.** 1994. Expression pattern of M-cadherin in normal, denervated, and regenerating mouse muscles. *Developmental Dynamics* **199**:326-337.
152. **Irvine, K. D., and E. Wieschaus.** 1994. fringe, a boundary-specific signaling molecule, mediates interactions between dorsal and ventral cells during *Drosophila* wing development. *Cell* **79**:595-606.
153. **Isaji, T., Y. Sato, Y. Zhao, E. Miyoshi, Y. Wada, N. Taniguchi, and J. Gu.** 2006. N-Glycosylation of the beta-Propeller Domain of the Integrin {alpha}5 Subunit Is Essential for {alpha}5beta1 Heterodimerization, Expression on the Cell Surface, and Its Biological Function. *J. Biol. Chem.* **281**:33258-33267.
154. **Ishibashi, M., S. L. Ang, K. Shiota, S. Nakanishi, R. Kageyama, and F. Guillemot.** 1995. Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (*HES-1*) leads to up-regulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis, and severe neural tube defects. *Genes Dev.* **9**:3136-3148.
155. **Ishikawa, A., S. Kitajima, Y. Takahashi, H. Kokubo, J. Kanno, T. Inoue, and Y. Saga.** 2004. Mouse *Nkd1*, a Wnt antagonist, exhibits oscillatory gene expression in the PSM under the control of Notch signaling. *Mechanisms of Development* **121**:1443-1453.
156. **Ishimizu, T., K. Sano, T. Uchida, H. Teshima, K. Omichi, H. Hojo, Y. Nakahara, and S. Hase.** 2007. Purification and Substrate Specificity of UDP-D-xylose:{beta}-D-Glucoside {alpha}-1,3-D-Xylosyltransferase Involved in the Biosynthesis of the Xyl{alpha}1-3Xyl{alpha}1-3Glc{beta}1-O-Ser on Epidermal Growth Factor-like Domains. *J Biochem* **141**:593-600.
157. **Iso, T., L. Kedes, and Y. Hamamori.** 2003. *HES* and *HERP* families: Multiple effectors of the notch signaling pathway. *Journal of Cellular Physiology* **194**:237-255.
158. **Itoh, M., C.-H. Kim, G. Palardy, T. Oda, Y.-J. Jiang, D. Maust, S.-Y. Yeo, K. Lorick, G. J. Wright, L. Ariza-McNaughton, A. M. Weissman, J. Lewis, S. C. Chandrasekharappa, and A. B. Chitnis.** 2003. Mind Bomb Is a Ubiquitin Ligase that Is Essential for Efficient Activation of Notch Signaling by Delta. *Developmental Cell* **4**:67-82.
159. **Izon, D. J., J. C. Aster, Y. He, A. Weng, F. G. Karnell, V. Patriub, L. Xu, S. Bakkour, C. Rodriguez, D. Allman, and W. S. Pear.** 2002. *Deltex1* Redirects Lymphoid Progenitors to the B Cell Lineage by Antagonizing Notch1. *Immunity* **16**:231-243.
160. **Jacobsen, T. L., K. Brennan, A. M. Arias, and M. A. Muskavitch.** 1998. Cis-interactions between Delta and Notch modulate neurogenic signalling in *Drosophila*. *Development* **125**:4531-4540.
161. **Jaeken, J., and G. Matthijs.** 2007. Congenital Disorders of Glycosylation: A Rapidly Expanding Disease Family. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* **8**:261-278.
162. **Jagla, K., P. Dollé, M.-G. Mattei, T. Jagla, B. Schuhbaur, G. Dretzen, F. Bellard, and M. Bellard.** 1995. Mouse *Lbx1* and human *LBX1* define a novel mammalian homeobox gene family related to the *Drosophila* lady bird genes. *Mechanisms of Development* **53**:345-356.
163. **Jakob, C. A., P. Burda, J. Roth, and M. Aebi.** 1998. Degradation of Misfolded Endoplasmic Reticulum Glycoproteins in *Saccharomyces cerevisiae* Is Determined by a Specific Oligosaccharide Structure. *J. Cell Biol.* **142**:1223-1233.
164. **Jan, Y., and L. Jan.** 1993. The peripheral nervous system, in the development of *Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor:pp 1207]1244.

165. **Jarriault, S., O. Le Bail, E. Hirsinger, O. Pourquie, F. Logeat, C. F. Strong, C. Brou, N. G. Seidah, and A. Israel.** 1998. Delta-1 Activation of Notch-1 Signaling Results in HES-1 Transactivation. *Mol. Cell. Biol.* **18**:7423-7431.
166. **Javaud, C., F. Dupuy, A. Maftah, R. Julien, and J.-M. Petit.** 2003. The Fucosyltransferase Gene Family: An Amazing Summary of the Underlying Mechanisms of Gene Evolution. *Genetica* **118**:157-170.
167. **Javaud, C., F. Dupuy, A. Maftah, J.-C. Michalski, R. Oriol, J.-M. Petit, and R. Julien.** 2000. Ancestral Exonic Organization of FUT8, the Gene Encoding the $\{\alpha\}$ 6-Fucosyltransferase, Reveals Successive Peptide Domains Which Suggest a Particular Three-Dimensional Core Structure for the $\{\alpha\}$ 6-Fucosyltransferase Family. *Mol Biol Evol* **17**:1661-1672.
168. **Johnson, C. P., I. Fujimoto, U. Rutishauser, and D. E. Leckband.** 2005. Direct Evidence That Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) Polysialylation Increases Intermembrane Repulsion and Abrogates Adhesion. *J. Biol. Chem.* **280**:137-145.
169. **Johnston, S. H., C. Rauskolb, R. Wilson, B. Prabhakaran, K. D. Irvine, and T. F. Vogt.** 1997. A family of mammalian Fringe genes implicated in boundary determination and the Notch pathway. *Development* **124**:2245-2254.
170. **Jones, N. C., K. J. Tyner, L. Nibarger, H. M. Stanley, D. D. W. Cornelison, Y. V. Fedorov, and B. B. Olwin.** 2005. The p38 $\{\alpha\}/\{\beta\}$ MAPK functions as a molecular switch to activate the quiescent satellite cell. *J. Cell Biol.* **169**:105-116.
171. **Jostes, B., C. Walther, and P. Gruss.** 1990. The murine paired box gene, Pax7, is expressed specifically during the development of the nervous and muscular system. *Mechanisms of Development* **33**:27-37.
172. **Joulia-Ekaza, D., and G. Cabello.** 2006. Myostatin regulation of muscle development: Molecular basis, natural mutations, physiopathological aspects. *Experimental Cell Research* **312**:2401-2414.
173. **Jouve, C., I. Palmeirim, D. Henrique, J. Beckers, A. Gossler, D. Ish-Horowitz, and O. Pourquie.** 2000. Notch signalling is required for cyclic expression of the hairy-like gene HES1 in the presomitic mesoderm. *Development* **127**:1421-1429.
174. **Kaehn, K., H. Jacob, B. Christ, K. Hinrichsen, and R. Poelmann.** 1988. The onset of myotome formation in the chick. *Anat Embryol* **177**:191-201.
175. **Kalcheim, C., and R. Ben-Yair.** 2005. Cell rearrangements during development of the somite and its derivatives. *Current Opinion in Genetics & Development* **15**:371-380.
176. **Kang, J. S., J. L. Feinleib, S. Knox, M. A. Ketteringham, and R. S. Krauss.** 2003. Promyogenic members of the Ig and cadherin families associate to positively regulate differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**:3989-3994.
177. **Kang, J. S., P. J. Mulieri, Y. Hu, L. Taliana, and K. R. S.** 2002. BOC, an Ig superfamily member, associates with CDO to positively regulate myogenic differentiation. *EMBO J* **21**:114-124.
178. **Kang, J. S., P. J. Mulieri, C. Miller, D. A. Sassoon, and R. S. Krauss.** 1998. CDO, A Robo-related Cell Surface Protein that Mediates Myogenic Differentiation. *J. Cell Biol.* **143**:403-413.
179. **Kang, J. S., M. J. Yi, W. Zhang, J. L. Feinleib, F. Cole, and R. S. Krauss.** 2004. Netrins and neogenin promote myotube formation. *J. Cell Biol.* **167**:493-504.
180. **Kaoru Omichi, K. A. S. M. S. H.** 1997. Presence of UDP-D-Xylose:B-D-Glucoside α -1,3-D-Xylosyltransferase Involved in the Biosynthesis of the Xyla1;l-3Glc1-Ser Structure of Glycoproteins in the Human Hepatoma Cell Line HepG2. *European Journal of Biochemistry* **245**:143-146.
181. **Kasahara, M.** 2007. The 2R hypothesis: an update. *Current Opinion in Immunology* **19**:547-552.
182. **Käsbauer, T., P. Towb, O. Alexandrova, C. N. David, E. Dall'Armi, A. Staudigl, B. Stiening, and A. Böttger.** 2007. The Notch signaling pathway in the cnidarian Hydra. *Developmental Biology* **303**:376-390.
183. **Kassar-Duchossoy, L., B. Gayraud-Morel, D. Gomes, D. Rocancourt, M. Buckingham, V. Shinin, and S. Tajbakhsh.** 2004. Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:Myod double-mutant mice. *Nature* **431**:466-471.
184. **Kawakami, K., S. Sato, H. Ozaki, and K. Ikeda.** 2000. Six family genes - structure and function as transcription factors and their roles in development. *BioEssays* **22**:616-626.
185. **Kelly, A. M., and S. I. Zacks.** 1969. THE HISTOGENESIS OF RAT INTERCOSTAL MUSCLE. *J. Cell Biol.* **42**:135-153.
186. **Kidd, S., and T. Lieber.** 2002. Furin cleavage is not a requirement for Drosophila Notch function. *Mechanisms of Development* **115**:41-51.
187. **Kishi, N., Z. Tang, Y. Maeda, A. Hirai, R. Mo, M. Ito, S. Suzuki, K. Nakao, T. Kinoshita, T. Kadesch, C.-c. Hui, S. Artavanis-Tsakonas, H. Okano, and K. Matsuno.** 2001. Murine homologs of *deltex* define a novel gene family involved in vertebrate Notch signaling and neurogenesis. *International Journal of Developmental Neuroscience* **19**:21-35.

188. **Kitagawa, M., T. Oyama, T. Kawashima, B. Yedvobnick, A. Kumar, K. Matsuno, and K. Harigaya.** 2001. A Human Protein with Sequence Similarity to Drosophila Mastermind Coordinates the Nuclear Form of Notch and a CSL Protein To Build a Transcriptional Activator Complex on Target Promoters. *Mol. Cell. Biol.* **21**:4337-4346.
189. **Kitzmann, M., and A. Fernandez.** 2001. Crosstalk between cell cycle regulators and the myogenic factor MyoD in skeletal myoblasts. *Cellular and Molecular Life Science* **58**:571-579.
190. **Kortschak, D., R. Tamme, and M. Lardelli.** 2001. Evolutionary analysis of vertebrate Notch genes. *Development Genes and Evolution* **211**:350-354.
191. **Kortschak, R. D., R. Tamme, and M. Lardelli.** 2001. Evolutionary analysis of vertebrate Notch genes. *Dev Genes Evol* **211**:350-354.
192. **Kozma, K., J. J. Keusch, B. Hegemann, K. B. Luther, D. Klein, D. Hess, R. S. Haltiwanger, and J. Hofsteenge.** 2006. Identification and Characterization of abeta1,3-Glucosyltransferase That Synthesizes the Glc-beta1,3-Fuc Disaccharide on Thrombospondin Type 1 Repeats. *J. Biol. Chem.* **281**:36742-36751.
193. **Krauss, R. S., F. Cole, U. Gaio, G. Takaesu, W. Zhang, and J.-S. Kang.** 2005. Close encounters: regulation of vertebrate skeletal myogenesis by cell-cell contact. *J Cell Sci* **118**:2355-2362.
194. **Kuang, S., K. Kuroda, F. Le Grand, and M. A. Rudnicki.** 2007. Asymmetric Self-Renewal and Commitment of Satellite Stem Cells in Muscle. *Cell* **129**:999-1010.
195. **Kundra, R., and S. Kornfeld.** 1999. Asparagine-linked Oligosaccharides Protect Lamp-1 and Lamp-2 from Intracellular Proteolysis. *J. Biol. Chem.* **274**:31039-31046.
196. **Kuroda, K., S. Tani, K. Tamura, S. Minoguchi, H. Kurooka, and T. Honjo.** 1999. Delta-induced Notch Signaling Mediated by RBP-J Inhibits MyoD Expression and Myogenesis. *J. Biol. Chem.* **274**:7238-7244.
197. **Kurooka, H., K. Kuroda, and T. Honjo.** 1998. Roles of the ankyrin repeats and C-terminal region of the mouse notch1 intracellular region [published erratum appears in *Nucleic Acids Res* 1999 Mar 1;27(5):following 1407]. *Nucl. Acids Res.* **26**:5448-5455.
198. **Laborda, J.** 2000. The role of the epidermal growth factor-like protein dlk in cell differentiation. *Histol Histopathol* **15**:119-129.
199. **Ladi, E., J. T. Nichols, W. Ge, A. Miyamoto, C. Yao, L.-T. Yang, J. Boulter, Y. E. Sun, C. Kintner, and G. Weinmaster.** 2005. The divergent DSL ligand Dll3 does not activate Notch signaling but cell autonomously attenuates signaling induced by other DSL ligands. *J. Cell Biol.* **170**:983-992.
200. **Lai, E. C.** 2002. Keeping a good pathway down: transcriptional repression of Notch pathway target genes by CSL proteins *EMBO rep* **3**:840-845.
201. **Lairson, L. L., B. Henrissat, G. J. Davies, and S. G. Withers.** 2008. Glycosyltransferases: Structures, Functions, and Mechanisms. *Annual Review of Biochemistry* **77**:521-555.
202. **Le Grand, F., and M. A. Rudnicki.** 2007. Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Current Opinion in Cell Biology* **19**:628-633.
203. **Leimeister, C., A. Externbrink, B. Klamt, and M. Gessler.** 1999. Hey genes: a novel subfamily of hairy- and Enhancer of split related genes specifically expressed during mouse embryogenesis. *Mechanisms of Development* **85**:173-177.
204. **Li, Y., L. Li, K. D. Irvine, and N. E. Baker.** 2003. Notch activity in neural cells triggered by a mutant allele with altered glycosylation. *Development* **130**:2829-2840.
205. **Lin, S.-P., P. Coan, S. T. da Rocha, H. Seitz, J. Cavaille, P.-W. Teng, S. Takada, and A. C. Ferguson-Smith.** 2007. Differential regulation of imprinting in the murine embryo and placenta by the Dlk1-Dio3 imprinting control region. *Development* **134**:417-426.
206. **Linask, K. K., C. Ludwig, M.-D. Han, X. Liu, G. L. Radice, and K. A. Knudsen.** 1998. N-Cadherin/Catenin-Mediated Morphoregulation of Somite Formation. *Developmental Biology* **202**:85-102.
207. **Lindsell, C. E., J. Boulter, G. diSibio, A. Gossler, and G. Weinmaster.** 1996. Expression Patterns of Jagged, Delta1, Notch1, Notch2, and Notch3 Genes Identify Ligand-Receptor Pairs That May Function in Neural Development. *Molecular and Cellular Neuroscience* **8**:14-27.
208. **Lindsell, C. E., C. J. Shawber, J. Boulter, and G. Weinmaster.** 1995. Jagged: A mammalian ligand that activates notch1. *Cell* **80**:909-917.
209. **Logeat, F., C. Bessia, C. Brou, O. LeBail, S. Jarriault, N. G. Seidah, and A. Israël.** 1998. The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**:8108-8112.
210. **Loriol, C., F. Dupuy, R. Rampal, M. A. Dlugosz, R. S. Haltiwanger, A. Maftah, and A. Germot.** 2006. Molecular evolution of protein O-fucosyltransferase genes and splice variants. *Glycobiology* **16**:736-747.

211. **Lu, L., and P. Stanley.** 2006. Roles of O-Fucose Glycans in Notch Signaling Revealed by Mutant Mice, p. 127-136, *Methods in Enzymology*, vol. Volume 417. Academic Press.
212. **Lu, Q., P. Hasty, and B. D. Shur.** 1997. Targeted Mutation in [beta]1,4-Galactosyltransferase Leads to Pituitary Insufficiency and Neonatal Lethality. *Developmental Biology* **181**:257-267.
213. **Luo, B., J. C. Aster, R. P. Hasserjian, F. Kuo, and J. Sklar.** 1997. Isolation and functional analysis of a cDNA for human Jagged2, a gene encoding a ligand for the Notch1 receptor. *Mol. Cell. Biol.* **17**:6057-6067.
214. **Luo, Y., K. Koles, W. Vorndam, R. S. Haltiwanger, and V. M. Panin.** 2006. Protein O-Fucosyltransferase 2 Adds O-Fucose to Thrombospondin Type 1 Repeats. *J. Biol. Chem.* **281**:9393-9399.
215. **Lyons, G., R. Moore, O. Yahara, M. Buckingham, and F. Walsh.** 1992. Expression of NCAM isoforms during skeletal myogenesis in the mouse embryo. *Developmental Dynamics* **194**:94-104.
216. **Marics, I., F. Padilla, J.-F. Guillemot, M. Scaal, and C. Marcelle.** 2002. FGFR4 signaling is a necessary step in limb muscle differentiation. *Development* **129**:4559-4569.
217. **Martinez-Duncker, I., R. Mollicone, J.-J. Candelier, C. Breton, and R. Oriol.** 2003. A new superfamily of protein-O-fucosyltransferases, {alpha}2-fucosyltransferases, and {alpha}6-fucosyltransferases: phylogeny and identification of conserved peptide motifs. *Glycobiology* **13**:1C-5.
218. **Martins, K. J. B., T. Gordon, D. Pette, W. T. Dixon, G. R. Foxcroft, I. M. MacLean, and C. T. Putman.** 2006. Effect of satellite cell ablation on low-frequency-stimulated fast-to-slow fibre-type transitions in rat skeletal muscle. *J Physiol* **572**:281-294.
219. **Matsuno, K., R. J. Diederich, M. J. Go, C. M. Blaumueller, and S. Artavanis-Tsakonas.** 1995. Deltex acts as a positive regulator of Notch signaling through interactions with the Notch ankyrin repeats. *Development* **121**:2633-2644.
220. **Matsuura, A., M. Ito, Y. Sakaidani, T. Kondo, K. Murakami, K. Furukawa, D. Nadano, T. Matsuda, and T. Okajima.** 2008. O-linked GlcNAc is present on the extracellular domain of notch receptors. *J. Biol. Chem.*:M806202200.
221. **Mauro, A.** 1961. SATELLITE CELL OF SKELETAL MUSCLE FIBERS. *J. Cell Biol.* **9**:493-495.
222. **McCroskery, S., M. Thomas, L. Maxwell, M. Sharma, and R. Kambadur.** 2003. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *J. Cell Biol.* **162**:1135-1147.
223. **McPherron, A. C., A. M. Lawler, and S.-J. Lee.** 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-p superfamily member. *Nature* **387**:83-90.
224. **Mennerich, D., K. Schäfer, and T. Braun.** 1998. Pax-3 is necessary but not sufficient for *lhx1* expression in myogenic precursor cells of the limb. *Mechanisms of Development* **73**:147-158.
225. **Menzel, O., T. Vellai, K. Takacs-Vellai, A. Reymond, F. Mueller, S. E. Antonarakis, and M. Guipponi.** 2004. The *Caenorhabditis elegans* ortholog of C21orf80, a potential new protein O-fucosyltransferase, is required for normal development. *Genomics* **84**:320-330.
226. **Minamida, S., K. Aoki, S. Natsuka, K. Omichi, K. Fukase, S. Kusumoto, and S. Hase.** 1996. Detection of UDP-D-Xylose:{alpha}-D-Xyloside {alpha}->3Xylosyltransferase Activity in Human Hepatoma Cell Line HepG2. *J Biochem* **120**:1002-1006.
227. **Minasi, M. G., M. Riminucci, L. De Angelis, U. Borello, B. Berarducci, A. Innocenzi, A. Caprioli, D. Sirabella, M. Baiocchi, R. De Maria, R. Boratto, T. Jaffredo, V. Broccoli, P. Bianco, and G. Cossu.** 2002. The meso-angioblast: a multipotent, self-renewing cell that originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues. *Development* **129**:2773-2783.
228. **Molinari, M., and A. Helenius.** 2000. Chaperone Selection During Glycoprotein Translocation into the Endoplasmic Reticulum. *Science* **288**:331-333.
229. **Moloney, D. J., and R. S. Haltiwanger.** 1999. The O-linked fucose glycosylation pathway: identification and characterization of a uridine diphosphoglucose: fucose-beta1,3- glucosyltransferase activity from Chinese hamster ovary cells. *Glycobiology* **9**:679-687.
230. **Moloney, D. J., A. I. Lin, and R. S. Haltiwanger.** 1997. The O-Linked Fucose Glycosylation Pathway. EVIDENCE FOR PROTEIN-SPECIFIC ELONGATION OF O-LINKED FUCOSE IN CHINESE HAMSTER OVARY CELLS. *J. Biol. Chem.* **272**:19046-19050.
231. **Moloney, D. J., V. M. Panin, S. H. Johnston, J. Chen, L. Shao, R. Wilson, Y. Wang, P. Stanley, K. D. Irvine, R. S. Haltiwanger, and T. F. Vogt.** 2000. Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch. *Nature* **406**:369-375.
232. **Moloney, D. J., L. H. Shair, F. M. Lu, J. Xia, R. Locke, K. L. Matta, and R. S. Haltiwanger.** 2000. Mammalian Notch1 Is Modified with Two Unusual Forms of O-Linked Glycosylation Found on Epidermal Growth Factor-like Modules. *J. Biol. Chem.* **275**:9604-9611.
233. **Montarras, D., J. Morgan, C. Collins, F. Relaix, S. Zaffran, A. Cumano, T. Partridge, and M. Buckingham.** 2005. Direct Isolation of Satellite Cells for Skeletal Muscle Regeneration. *Science* **309**:2064-2067.

234. **Moon, Y. S., C. M. Smas, K. Lee, J. A. Villena, K.-H. Kim, E. J. Yun, and H. S. Sul.** 2002. Mice Lacking Paternally Expressed Pref-1/Dlk1 Display Growth Retardation and Accelerated Adiposity. *Mol. Cell. Biol.* **22**:5585-5592.
235. **Moore, C. J., and J. E. Hewitt.** 2008. Dystroglycan glycosylation and muscular dystrophy. *Glycoconj J* [Epub ahead of print].
236. **Moran, J. L., S. H. Johnston, C. Rauskolb, J. Bhalerao, A. M. Bowcock, and T. F. Vogt.** 1999. Genomic structure, mapping, and expression analysis of the mammalian Lunatic, Manic, and Radical fringe genes. *Mamm Genome* **10**:535-41.
237. **Moran, J. L., J. M. Levorse, and T. F. Vogt.** 1999. Limbs move beyond the Radical fringe. *Nature* **399**:742-743.
238. **Mulieri, P., J. Kang, D. Sassoon, and R. Krauss.** 2002. Expression of the *boc* gene during murine embryogenesis. *Developmental Dynamics* **223**:379-388.
239. **Mulieri, P., A. Okada, D. Sassoon, S. McConnell, and R. Krauss.** 2000. Developmental expression pattern of the *cdo* gene. *Developmental Dynamics* **219**:40-49.
240. **Muntoni, F., M. Brockington, S. Torelli, and S. C. Brown.** 2004. Defective glycosylation in congenital muscular dystrophies. *Curr Opin Neurol* **17**:205-9.
241. **Murgia, M., A. L. Serrano, E. Calabria, G. Pallafacchina, T. Lomo, and S. Schiaffino.** 2000. Ras is involved in nerve-activity-dependent regulation of muscle genes. *Nat Cell Biol* **2**:142-147.
242. **Muroi, E., S. Manabe, M. Ikezaki, Y. Urata, S. Sato, T. Kondo, Y. Ito, and Y. Ihara.** 2007. C-Mannosylated peptides derived from the thrombospondin type 1 repeat enhance lipopolysaccharide-induced signaling in macrophage-like RAW264.7 cells. *Glycobiology* **17**:1015-1028.
243. **Muroya, S., H. Takagi, S. Tajima, and A. Asano.** 1994. Selective inhibition of a step of myotube formation with wheat germ agglutinin in a murine myoblast cell line, C2C12. *Cell Struct Funct* **19**:241-252.
244. **Muskavitch, M. A. T.** 1994. Delta-Notch Signaling and *Drosophila* Cell Fate Choice. *Developmental Biology* **166**:415-430.
245. **Nabeshima, Y., K. Hanaoka, M. Hayasaka, E. Esumi, S. Li, I. Nonaka, and Y.-i. Nabeshima.** 1993. Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. *Nature* **364**:532-535.
246. **Nakagawa, O., D. G. McFadden, M. Nakagawa, H. Yanagisawa, T. Hu, D. Srivastava, and E. N. Olson.** 2000. Members of the HRT family of basic helix-loop-helix proteins act as transcriptional repressors downstream of Notch signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**:13655-13660.
247. **Nakatsukasa, K., and J. F. Brodsky.** 2008. The Recognition and Retrotranslocation of Misfolded Proteins from the Endoplasmic Reticulum. *Traffic* **9**:861-870.
248. **Nichols, S. A., W. Dirks, J. S. Pearse, and N. King.** 2006. Early evolution of animal cell signaling and adhesion genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**:12451-12456.
249. **Nishikawa, A., A. Nanda, W. Gregory, J. Frenz, and S. Kornfeld.** 1999. Identification of Amino Acids That Modulate Mannose Phosphorylation of Mouse DNase I, a Secretory Glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **274**:19309-19315.
250. **Oda, Y., N. Hosokawa, I. Wada, and K. Nagata.** 2003. EDEM As an Acceptor of Terminally Misfolded Glycoproteins Released from Calnexin. *Science* **299**:1394-1397.
251. **Odelberg, S. J., A. Kollhoff, and M. T. Keating.** 2000. Dedifferentiation of Mammalian Myotubes Induced by *msx1*. *Cell* **103**:1099-1109.
252. **Ohtsubo, K., and J. D. Marth.** 2006. Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. *Cell* **126**:855-867.
253. **Ohtsuka, T., M. Ishibashi, G. Gradwohl, S. Nakanishi, F. Guillemot, and R. Kageyama.** 1999. *Hes1* and *Hes5* as notch effectors in mammalian neuronal differentiation. *EMBO J* **18**:2196-2207.
254. **Oka, C., T. Nakano, A. Wakeham, J. L. de la Pompa, C. Mori, T. Sakai, S. Okazaki, M. Kawaichi, K. Shiota, T. W. Mak, and T. Honjo.** 1995. Disruption of the mouse RBP-J kappa gene results in early embryonic death. *Development* **121**:3291-3301.
255. **Okajima, T., and K. D. Irvine.** 2002. Regulation of Notch Signaling by O-Linked Fucose. *Cell* **111**:893-904.
256. **Okajima, T., B. Reddy, T. Matsuda, and K. Irvine.** 2008. Contributions of chaperone and glycosyltransferase activities of O-fucosyltransferase 1 to Notch signaling. *BMC Biology* **6**:1.
257. **Okajima, T., A. Xu, and K. D. Irvine.** 2003. Modulation of Notch-Ligand Binding by Protein O-Fucosyltransferase 1 and Fringe. *J. Biol. Chem.* **278**:42340-42345.
258. **Okajima, T., A. Xu, L. Lei, and K. D. Irvine.** 2005. Chaperone Activity of Protein O-Fucosyltransferase 1 Promotes Notch Receptor Folding. *Science* **307**:1599-1603.

259. **Okamura, Y., and Y. Saga.** 2008. Pofut1 is required for the proper localization of the Notch receptor during mouse development. *Mechanisms of Development* **125**:663-673.
260. **Okochi, M., H. Steiner, A. Fukumori, H. Tanii, T. Tomita, T. Tanaka, T. Iwatsubo, T. Kudo, M. Takeda, and C. Haass.** 2002. Presenilins mediate a dual intramembranous γ -secretase cleavage of Notch-1. *EMBO J* **21**:5408-16.
261. **Olguin, H. C., and B. B. Olwin.** 2004. Pax-7 up-regulation inhibits myogenesis and cell cycle progression in satellite cells: a potential mechanism for self-renewal. *Developmental Biology* **275**:375-388.
262. **Olson, E. N.** 1992. Interplay between proliferation and differentiation within the myogenic lineage. *Developmental Biology* **154**:261-272.
263. **Olson, E. N., and R. S. Williams.** 2000. Calcineurin Signaling and Muscle Remodeling. *Cell* **101**:689-692.
264. **Olwin, B., K. Hannon, and A. Kudla.** 1994. Are fibroblast growth factors regulators of myogenesis in vivo? *Prog Growth Factor Res* **5**:148-158.
265. **Ordahl, C. P., and N. M. Le Douarin.** 1992. Two myogenic lineages within the developing somite. *Development* **114**:339-353.
266. **Ordentlich, P., A. Lin, C.-P. Shen, C. Blaumueller, K. Matsuno, S. Artavanis-Tsakonas, and T. Kadesch.** 1998. Notch Inhibition of E47 Supports the Existence of a Novel Signaling Pathway. *Mol. Cell. Biol.* **18**:2230-2239.
267. **Ornitz, D., and N. Itoh.** 2001. Fibroblast growth factors. *Genome Biology* **2**:reviews3005.1 - reviews3005.12.
268. **Oswald, F., B. Tauber, T. Dobner, S. Bourteele, U. Kostezka, G. Adler, S. Liptay, and R. M. Schmid.** 2001. p300 Acts as a Transcriptional Coactivator for Mammalian Notch-1. *Mol. Cell. Biol.* **21**:7761-7774.
269. **Ott, M. O., E. Bober, G. Lyons, H. Arnold, and M. Buckingham.** 1991. Early expression of the myogenic regulatory gene, myf-5, in precursor cells of skeletal muscle in the mouse embryo. *Development* **111**:1097-1107.
270. **Ou, W.-J., P. H. Cameron, D. Y. Thomas, and J. J. M. Bergeron.** 1993. Association of folding intermediates of glycoproteins with calnexin during protein maturation. *Nature* **364**:771-776.
271. **Palmeirim, I., D. Henrique, D. Ish-Horowicz, and O. Pourquié.** 1997. Avian hairy Gene Expression Identifies a Molecular Clock Linked to Vertebrate Segmentation and Somitogenesis. *Cell* **91**:639-648.
272. **Panin, V. M., V. Papayannopoulos, R. Wilson, and K. D. Irvine.** 1997. Fringe modulates Notch-ligand interactions. *Nature* **387**:908-912.
273. **Panin, V. M., L. Shao, L. Lei, D. J. Moloney, K. D. Irvine, and R. S. Haltiwanger.** 2002. Notch Ligands Are Substrates for Protein O-Fucosyltransferase-1 and Fringe. *J. Biol. Chem.* **277**:29945-29952.
274. **Parodi, A. J.** 2000. PROTEIN GLUCOSYLATION AND ITS ROLE IN PROTEIN FOLDING. *Annual Review of Biochemistry* **69**:69-93.
275. **Paulson, J. C.** 1989. Glycoproteins: what are the sugar chains for? *Trends in Biochemical Sciences* **14**:272-276.
276. **Pavlat, G. K., and V. Horsley.** 2003. Cell Fusion in Skeletal Muscle: Central Role of NFATC2 in Regulating Muscle Cell Size. *Cell Cycle* **2**:420-423.
277. **Pei, Z., and N. Baker.** 2008. Competition between Delta and the Abruption domain of Notch. *BMC Developmental Biology* **8**:4.
278. **Peterson, R. E., and D. R. McClay.** 2005. A Fringe-modified Notch signal affects specification of mesoderm and endoderm in the sea urchin embryo. *Developmental Biology* **282**:126-137.
279. **Petit, D., A. Maftah, R. Julien, and J.-M. Petit.** 2006. En Bloc Duplications, Mutation Rates, and Densities of Amino Acid Changes Clarify the Evolution of Vertebrate α -1,3/4-Fucosyltransferases. *Journal of Molecular Evolution* **63**:353-364.
280. **Pisconti, A., S. Brunelli, M. Di Padova, C. De Palma, D. Deponti, S. Baesso, V. Sartorelli, G. Cossu, and E. Clementi.** 2006. Follistatin induction by nitric oxide through cyclic GMP: a tightly regulated signaling pathway that controls myoblast fusion. *J. Cell Biol.* **172**:233-244.
281. **Plempner, R. K., and D. H. Wolf.** 1999. Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease. *Trends in Biochemical Sciences* **24**:266-270.
282. **Pownall, M. E., and C. P. Emerson.** 1992. Sequential activation of three myogenic regulatory genes during somite morphogenesis in quail embryos. *Developmental Biology* **151**:67-79.
283. **Previato, J. O., M. Sola-Penna, O. A. Agrellos, C. Jones, T. Oeltmann, L. R. Travassos, and L. Mendonca-Previato.** 1998. Biosynthesis of O-N-Acetylglucosamine-linked Glycans in *Trypanosoma cruzi*. CHARACTERIZATION OF THE NOVEL URIDINE DIPHOSPHO-N-ACETYLGLUCOSAMINE:POLYPEPTIDE N-ACETYLGLUCOSAMINYLTRANSFERASE-

- CATALYZING FORMATION OF N-ACETYLGLUCOSAMINE α 1right-arrowO-THREONINE. *J. Biol. Chem.* **273**:14982-14988.
284. **Rabbani, S. A., A. P. Mazar, S. M. Bernier, M. Haq, I. Bolivar, J. Henkin, and D. Goltzman.** 1992. Structural requirements for the growth factor activity of the amino-terminal domain of urokinase. *J. Biol. Chem.* **267**:14151-14156.
285. **Rampal, R., J. F. Arboleda-Velasquez, A. Nita-Lazar, K. S. Kosik, and R. S. Haltiwanger.** 2005. Highly Conserved O-Fucose Sites Have Distinct Effects on Notch1 Function. *J. Biol. Chem.* **280**:32133-32140.
286. **Rampal, R., A. S. Y. Li, D. J. Moloney, S. A. Georgiou, K. B. Luther, A. Nita-Lazar, and R. S. Haltiwanger.** 2005. Lunatic Fringe, Manic Fringe, and Radical Fringe Recognize Similar Specificity Determinants in O-Fucosylated Epidermal Growth Factor-like Repeats. *J. Biol. Chem.* **280**:42454-42463.
287. **Rampal, R., K. B. Luther, and R. S. Haltiwanger.** 2007. Notch signaling in normal and disease States: possible therapies related to glycosylation. *Curr Mol Med* **7**:427-45.
288. **Rand, M. D., L. M. Grimm, S. Artavanis-Tsakonas, V. Patriub, S. C. Blacklow, J. Sklar, and J. C. Aster.** 2000. Calcium Depletion Dissociates and Activates Heterodimeric Notch Receptors. *Mol. Cell. Biol.* **20**:1825-1835.
289. **Rebay, I., R. J. Fleming, R. G. Fehon, L. Cherbas, P. Cherbas, and S. Artavanis-Tsakonas.** 1991. Specific EGF repeats of Notch mediate interactions with Delta and serrate: Implications for notch as a multifunctional receptor. *Cell* **67**:687-699.
290. **Relaix, F., D. Montarras, S. Zaffran, B. Gayraud-Morel, D. Rocancourt, S. Tajbakhsh, A. Mansouri, A. Cumanò, and M. Buckingham.** 2006. Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. *J. Cell Biol.* **172**:91-102.
291. **Ricketts, L. M., M. Dlugosz, K. B. Luther, R. S. Haltiwanger, and E. M. Majerus.** 2007. O-Fucosylation Is Required for ADAMTS13 Secretion. *J. Biol. Chem.* **282**:17014-17023.
292. **Rida, P. C. G., N. Le Minh, and Y.-J. Jiang.** 2004. A Notch feeling of somite segmentation and beyond. *Developmental Biology* **265**:2-22.
293. **Roos, C., M. Kolmer, P. Mattila, and R. Renkonen.** 2002. Composition of *Drosophila melanogaster* Proteome Involved in Fucosylated Glycan Metabolism. *J. Biol. Chem.* **277**:3168-3175.
294. **Rosen, G. D., J. R. Sanes, R. LaChance, J. M. Cunningham, J. Roman, and D. C. Dean.** 1992. Roles for the integrin VLA-4 and its counter receptor VCAM-1 in myogenesis. *Cell* **69**:1107-1119.
295. **Rudnicki, M. A., T. Braun, S. Hinuma, and R. Jaenisch.** 1992. Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development. *Cell* **71**:383-390.
296. **Rudnicki, M. A., P. N. J. Schnegelsberg, R. H. Stead, T. Braun, H.-H. Arnold, and R. Jaenisch.** 1993. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* **75**:1351-1359.
297. **Rusconi, J. C., and V. Corbin.** 1998. Evidence for a novel Notch pathway required for muscle precursor selection in *Drosophila*. *Mechanisms of Development* **79**:39-50.
298. **Sanchez-Irizarry, C., A. C. Carpenter, A. P. Weng, W. S. Pear, J. C. Aster, and S. C. Blacklow.** 2004. Notch Subunit Heterodimerization and Prevention of Ligand-Independent Proteolytic Activation Depend, Respectively, on a Novel Domain and the LNR Repeats. *Mol. Cell. Biol.* **24**:9265-9273.
299. **Sandra, A., M. A. Leon, and R. J. Przybylski.** 1977. Suppression of myoblast fusion by concanavalin A: possible involvement of membrane fluidity. *J Cell Sci* **28**:251-272.
300. **Sasai, Y., R. Kageyama, Y. Tagawa, R. Shigemoto, and S. Nakanishi.** 1992. Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to *Drosophila* hairy and Enhancer of split. *Genes Dev.* **6**:2620-2634.
301. **Sasaki, N., T. Sasamura, H. O. Ishikawa, M. Kanai, R. Ueda, K. Saigo, and K. Matsuno.** 2007. Polarized exocytosis and transcytosis of Notch during its apical localization in *Drosophila* epithelial cells. *Genes to Cells* **12**:89-103.
302. **Sasamura, T., H. O. Ishikawa, N. Sasaki, S. Higashi, M. Kanai, S. Nakao, T. Ayukawa, T. Aigaki, K. Noda, E. Miyoshi, N. Taniguchi, and K. Matsuno.** 2007. The O-fucosyltransferase O-fut1 is an extracellular component that is essential for the constitutive endocytic trafficking of Notch in *Drosophila*. *Development* **134**:1347 - 1356.
303. **Sasamura, T., N. Sasaki, F. Miyashita, S. Nakao, H. O. Ishikawa, M. Ito, M. Kitagawa, K. Harigaya, E. Spana, D. Bilder, N. Perrimon, and K. Matsuno.** 2003. neurotic, a novel maternal neurogenic gene, encodes an O-fucosyltransferase that is essential for Notch-Delta interactions. *Development* **130**:4785-4795.
304. **Sato, T., M. Sato, K. Kiyohara, M. Sogabe, T. Shikanai, N. Kikuchi, A. Togayachi, H. Ishida, H. Ito, A. Kameyama, M. Gotoh, and H. Narimatsu.** 2006. Molecular cloning and characterization of a novel human β 1,3-glycosyltransferase, which is localized at the endoplasmic reticulum and

- glucosylates O-linked fucosylglycan on thrombospondin type 1 repeat domain. *Glycobiology* **16**:1194-1206.
305. **Saunier, K., J.-P. Barreaud, A. Eggen, R. Oriol, H. Leveziel, R. Julien, and J.-M. Petit.** 2001. Organization of the Bovine α 2-Fucosyltransferase Gene Cluster Suggests that the Sec1 Gene Might Have Been Shaped Through a Nonautonomous L1-Retrotransposition Event Within the Same Locus. *Mol Biol Evol* **18**:2083-2091.
306. **Schafer, K., and T. Braun.** 1999. Early specification of limb muscle precursor cells by the homeobox gene *Lbx1h*. *Nat Genet* **23**:213-216.
307. **Schienda, J., K. A. Engleka, S. Jun, M. S. Hansen, J. A. Epstein, C. J. Tabin, L. M. Kunkel, and G. Kardon.** 2006. Somitic origin of limb muscle satellite and side population cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**:945-950.
308. **Schier, A. F.** 2003. NODAL SIGNALING IN VERTEBRATE DEVELOPMENT. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **19**:589-621.
309. **Schiffer, S. G., S. Foley, A. Kaffashan, X. Hronowski, A. E. Zichittella, C.-Y. Yeo, K. Miatkowski, H. B. Adkins, B. Damon, M. Whitman, D. Salomon, M. Sanicola, and K. P. Williams.** 2001. Fucosylation of Cripto Is Required for Its Ability to Facilitate Nodal Signaling. *J. Biol. Chem.* **276**:37769-37778.
310. **Schuelke, M., K. R. Wagner, L. E. Stolz, C. Hubner, T. Riebel, W. Komen, T. Braun, J. F. Tobin, and S.-J. Lee.** 2004. Myostatin Mutation Associated with Gross Muscle Hypertrophy in a Child. *N Engl J Med* **350**:2682-2688.
311. **Schuster-Gossler, K., R. Cordes, and A. Gossler.** 2007. Premature myogenic differentiation and depletion of progenitor cells cause severe muscle hypotrophy in *Delta1* mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**:537-542.
312. **Seale, P., L. A. Sabourin, A. Giris-Gabardo, A. Mansouri, P. Gruss, and M. A. Rudnicki.** 2000. Pax7 Is Required for the Specification of Myogenic Satellite Cells. *Cell* **102**:777-786.
313. **Sestan, N., S. Artavanis-Tsakonas, and P. Rakic.** 1999. Contact-Dependent Inhibition of Cortical Neurite Growth Mediated by Notch Signaling. *Science* **286**:741-746.
314. **Shalchian-Tabrizi, K., M. A. Minge, M. Espelund, R. Orr, T. Ruden, K. S. Jakobsen, and T. Cavalier-Smith.** 2008. Multigene Phylogeny of Choanozoa and the Origin of Animals. *PLoS ONE* **3**:e2098.
315. **Shao, L., Y. Luo, D. J. Moloney, and R. S. Haltiwanger.** 2002. O-Glycosylation of EGF repeats: identification and initial characterization of a UDP-glucose: protein O-glucosyltransferase. *Glycobiology* **12**:763-770.
316. **Shao, L., D. J. Moloney, and R. Haltiwanger.** 2003. Fringe Modifies O-Fucose on Mouse Notch1 at Epidermal Growth Factor-like Repeats within the Ligand-binding Site and the Abruptex Region. *J. Biol. Chem.* **278**:7775-7782.
317. **Shawber, C., D. Nofziger, J. J. Hsieh, C. Lindsell, O. Bogler, D. Hayward, and G. Weinmaster.** 1996. Notch signaling inhibits muscle cell differentiation through a CBF1-independent pathway. *Development* **122**:3765-3773.
318. **Shi, S., C. Ge, Y. Luo, X. Hou, R. S. Haltiwanger, and P. Stanley.** 2007. The Threonine That Carries Fucose, but Not Fucose, Is Required for Cripto to Facilitate Nodal Signaling. *J. Biol. Chem.* **282**:20133-20141.
319. **Shi, S., and P. Stanley.** 2003. Protein O-fucosyltransferase 1 is an essential component of Notch signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**:5234-5239.
320. **Shih, H. P., M. K. Gross, and C. Kioussi.** 2008. Muscle development: Forming the head and trunk muscles. *Acta Histochemica* **110**:97-108.
321. **Shimizu, K., S. Chiba, T. Saito, K. Kumano, T. Takahashi, and H. Hirai.** 2001. Manic Fringe and Lunatic Fringe Modify Different Sites of the Notch2 Extracellular Region, Resulting in Different Signaling Modulation. *J. Biol. Chem.* **276**:25753-25758.
322. **Smalheiser, N. R., S. M. Haslam, M. Sutton-Smith, H. R. Morris, and A. Dell.** 1998. Structural Analysis of Sequences O-Linked to Mannose Reveals a Novel Lewis X Structure in Cranin (Dystroglycan) Purified from Sheep Brain. *J. Biol. Chem.* **273**:23698-23703.
323. **Sporle, R., T. Gunther, M. Struwe, and K. Schughart.** 1996. Severe defects in the formation of epaxial musculature in open brain (opb) mutant mouse embryos. *Development* **122**:79-86.
324. **Stahl, M., K. Uemura, C. Ge, S. Shi, Y. Tashima, and P. Stanley.** 2008. Roles of Pofut1 and O-Fucose in Mammalian Notch Signaling. *J. Biol. Chem.* **283**:13638-13651.
325. **Stanley, P.** 2007. Regulation of Notch signaling by glycosylation. *Current Opinion in Structural Biology* **17**:530-535.

326. **Stollewerk, A.** 2002. Recruitment of cell groups through Delta/Notch signalling during spider neurogenesis. *Development* **129**:5339-5348.
327. **Sun, J., C. N. Kamei, M. D. Layne, M. K. Jain, J. K. Liao, M.-E. Lee, and M. T. Chin.** 2001. Regulation of Myogenic Terminal Differentiation by the Hairy-related Transcription Factor CHF2. *J. Biol. Chem.* **276**:18591-18596.
328. **Tajbakhsh, S., and M. E. Buckingham.** 1994. Mouse limb muscle is determined in the absence of the earliest myogenic factor myf-5. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**:747-751.
329. **Templeton, T. J., and S. D. Hauschka.** 1992. FGF-mediated aspects of skeletal muscle growth and differentiation are controlled by a high affinity receptor, FGFR1. *Developmental Biology* **154**:169-181.
330. **Tietze, K., N. Oellers, and E. Knust.** 1992. Enhancer of splitD, a dominant mutation of *Drosophila*, and its use in the study of functional domains of a helix-loop-helix protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**:6152-6156.
331. **Tucker, R. P.** 2004. The thrombospondin type 1 repeat superfamily. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **36**:969-974.
332. **Tun, T., Y. Hamaguchi, N. Matsunami, T. Furukawa, T. Honjo, and M. Kawaichi.** 1994. Recognition sequence of a highly conserved DNA binding protein RBP-Jx. *Nucl. Acids Res.* **22**:965-971.
333. **Vasyutina, E., D. C. Lenhard, and C. Birchmeier.** 2007. Notch function in myogenesis. *Cell Cycle* **6**:1451-4.
334. **Vasyutina, E., D. C. Lenhard, H. Wende, B. Erdmann, J. A. Epstein, and C. Birchmeier.** 2007. RBP-J (Rbpsiuh) is essential to maintain muscle progenitor cells and to generate satellite cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**:4443-4448.
335. **Vodovar, N., and F. Schweisguth.** 2008. Functions of O-fucosyltransferase in Notch trafficking and signaling: towards the end of a controversy? *Journal of Biology* **7**:7.
336. **Wahl, M. B., C. Deng, M. Lewandoski, and O. Pourquie.** 2007. FGF signaling acts upstream of the NOTCH and WNT signaling pathways to control segmentation clock oscillations in mouse somitogenesis. *Development* **134**:4033-4041.
337. **Wakelam, M. J.** 1985. The fusion of myoblasts. *Biochem J* **228**:1-12.
338. **Wang, F., T. Metcalf, H. van der Wel, and C. M. West.** 2003. Initiation of Mucin-type O-Glycosylation in *Dictyostelium* Is Homologous to the Corresponding Step in Animals and Is Important for Spore Coat Function. *J. Biol. Chem.* **278**:51395-51407.
339. **Wang, L. W., M. Dlugosz, R. P. T. Somerville, M. Raed, R. S. Haltiwanger, and S. S. Apte.** 2007. O-Fucosylation of Thrombospondin Type 1 Repeats in ADAMTS-like-1/Punctin-1 Regulates Secretion: IMPLICATIONS FOR THE ADAMTS SUPERFAMILY. *J. Biol. Chem.* **282**:17024-17031.
340. **Wang, Y., G. F. Lee, R. F. Kelley, and M. W. Spellman.** 1996. Identification of a GDP-L-fucose:polypeptide fucosyltransferase and enzymatic addition of O-linked fucose to EGF domains. *Glycobiology* **6**:837-842.
341. **Wang, Y., L. Shao, S. Shi, R. J. Harris, M. W. Spellman, P. Stanley, and R. S. Haltiwanger.** 2001. Modification of Epidermal Growth Factor-like Repeats with O-Fucose. MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION OF A NOVEL GDP-FUCOSE PROTEIN O-FUCOSYLTRANSFERASE. *J. Biol. Chem.* **276**:40338-40345.
342. **Wang, Y., and M. W. Spellman.** 1998. Purification and Characterization of a GDP-fucose:Polypeptide Fucosyltransferase from Chinese Hamster Ovary Cells. *J. Biol. Chem.* **273**:8112-8118.
343. **Weinmaster, G., V. J. Roberts, and G. Lemke.** 1991. A homolog of *Drosophila* Notch expressed during mammalian development. *Development* **113**:199-205.
344. **Weintraub, H., R. Davis, S. Tapscott, M. Thayer, M. Krause, R. Benezra, T. K. Blackwell, D. Turner, R. Rupp, S. Hollenberg, and a. et.** 1991. The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science* **251**:761-766.
345. **Wigge, P. A., and D. Weigel.** 2001. Arabidopsis genome: Life without Notch. *Current Biology* **11**:R112-R114.
346. **Wigmore, P. M., and D. J. Evans.** 2002. Molecular and cellular mechanisms involved in the generation of fiber diversity during myogenesis. *Int Rev Cytol* **216**:175-232.
347. **Williams, B. A., and C. P. Ordahl.** 1994. Pax-3 expression in segmental mesoderm marks early stages in myogenic cell specification. *Development* **120**:785-796.
348. **Wilson-Rawls, J., J. D. Molkenin, B. L. Black, and E. N. Olson.** 1999. Activated Notch Inhibits Myogenic Activity of the MADS-Box Transcription Factor Myocyte Enhancer Factor 2C. *Mol. Cell. Biol.* **19**:2853-2862.
349. **Wilson, J. J., and R. A. Kovall.** 2006. Crystal Structure of the CSL-Notch-Mastermind Ternary Complex Bound to DNA. *Cell* **124**:985-996.

350. **Wormald, M. R., and R. A. Dwek.** 1999. Glycoproteins: glycan presentation and protein-fold stability. *Structure* **7**:155-60.
351. **Wouters, M. A., I. Rigoutsos, C. Chu, L. L. Feng, D. B. Sparrow, and S. L. Dunwoodie.** 2005. Evolution of distinct EGF domains with specific functions. *Protein Sci* **14**:1091-1103.
352. **Xu, A., L. Lei, and K. D. Irvine.** 2005. Regions of Drosophila Notch That Contribute to Ligand Binding and the Modulatory Influence of Fringe. *J. Biol. Chem.* **280**:30158-30165.
353. **Xu, C., G. Liguori, M. G. Persico, and E. D. Adamson.** 1999. Abrogation of the *Cripto* gene in mouse leads to failure of postgastrulation morphogenesis and lack of differentiation of cardiomyocytes. *Development* **126**:483-494.
354. **Yang, L.-T., J. T. Nichols, C. Yao, J. O. Manilay, E. A. Robey, and G. Weinmaster.** 2005. Fringe Glycosyltransferases Differentially Modulate Notch1 Proteolysis Induced by Delta1 and Jagged1. *Mol. Biol. Cell* **16**:927-942.
355. **Yoshida, N., S. Yoshida, K. Koishi, K. Masuda, and Y. Nabeshima.** 1998. Cell heterogeneity upon myogenic differentiation: down-regulation of MyoD and Myf-5 generates 'reserve cells'. *J Cell Sci* **111**:769-779.
356. **Yun, K., and B. Wold.** 1996. Skeletal muscle determination and differentiation: story of a core regulatory network and its context. *Current Opinion in Cell Biology* **8**:877-889.
357. **Zammit, P. S., J. P. Golding, Y. Nagata, V. Hudon, T. A. Partridge, and J. R. Beauchamp.** 2004. Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? *J. Cell Biol.* **166**:347-357.
358. **Zappelli, F., D. Willems, S.-i. Osada, S. Ohno, W. C. Wetsel, M. Molinaro, G. Cossu, and M. Bouché.** 1996. The Inhibition of Differentiation Caused by TGF[β] in Fetal Myoblasts Is Dependent upon Selective Expression of PKC[θ]: A Possible Molecular Basis for Myoblast Diversification during Limb Histogenesis. *Developmental Biology* **180**:156-164.
359. **Zeiser, S., O. Rivera, C. Kuttler, B. Hense, R. Lasser, and G. Winkler.** 2008. Oscillations of *Hes7* caused by negative autoregulation and ubiquitination. *Computational Biology and Chemistry* **32**:48-52.
360. **Zeschnigk, M., D. Kozian, C. Kuch, M. Schmoll, and A. Starzinski-Powitz.** 1995. Involvement of M-cadherin in terminal differentiation of skeletal muscle cells. *J Cell Sci* **108**:2973-2981.
361. **Zhang, M., and I. S. McLennan.** 1998. Primary myotubes preferentially mature into either the fastest or slowest muscle fibers. *Developmental Dynamics* **213**:147-157.
362. **Zhang, N., and T. Gridley.** 1998. Defects in somite formation in lunatic fringe-deficient mice. *Nature* **394**:374-377.
363. **Zhang, N., C. R. Norton, and T. Gridley.** 2002. Segmentation defects of Notch pathway mutants and absence of a synergistic phenotype in lunatic fringe/radical fringe double mutant mice. *genesis* **33**:21-28.
364. **Zhao, Y., Y. Sato, T. Isaji, T. Fukuda, A. Matsumoto, E. Miyoshi, J. Gu, and N. Taniguchi.** 2008. Branched N-glycans regulate the biological functions of integrins and cadherins. *FEBS Journal* **275**:1939-1948.
365. **Zheng, M., H. Fang, and S. Hakomori.** 1994. Functional role of N-glycosylation in alpha 5 beta 1 integrin receptor. De-N-glycosylation induces dissociation or altered association of alpha 5 and beta 1 subunits and concomitant loss of fibronectin binding activity. *J. Biol. Chem.* **269**:12325-12331.