

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE THEMATIQUE Biologie, Santé

FACULTE des Sciences et Techniques

Unité de Génétique Moléculaire Animale

UMR 1061 INRA/Université de Limoges

Thèse n° 8-2010

Thèse

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Limoges

Discipline : Biologie, Sciences, Santé

Présentée par : Mathilde JANOT

**Recherche et analyse fonctionnelle des gènes de la glycosylation
impliqués dans la différenciation de la cellule musculaire**

Soutenance publique le 4 mars 2010

Directeurs de thèse : Pr. Abderrahman MAFTAH et Dr. Fabrice DUPUY

Jury :

Rapporteurs : **Anne BONNIEU**, Chargée de Recherche, INRA, Montpellier
Tony LEFEBVRE, Professeur, Université de Lille 1

Examineurs : **Véronique BLANQUET**, Professeur, Université de Limoges
Christophe JAGLA, Directeur de Recherche, INSERM, Clermont-Ferrand 1
Fabrice DUPUY, Maître de conférences, Université de Limoges
Abderrahman MAFTAH, Professeur, Université de Limoges

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE THEMATIQUE Biologie, Santé

FACULTE des Sciences et Techniques

Unité de Génétique Moléculaire Animale

UMR 1061 INRA/Université de Limoges

Thèse n° 8-2010

Thèse

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Limoges

Discipline : Biologie, Sciences, Santé

Présentée par : Mathilde JANOT

**Recherche et analyse fonctionnelle des gènes de la glycosylation
impliqués dans la différenciation de la cellule musculaire**

Soutenance publique le 4 mars 2010

Directeurs de thèse : Pr. Abderrahman MAFTAH et Dr. Fabrice DUPUY

Jury :

Rapporteurs : **Anne BONNIEU**, Chargée de Recherche, INRA, Montpellier
Tony LEFEBVRE, Professeur, Université de Lille 1

Examineurs : **Véronique BLANQUET**, Professeur, Université de Limoges
Christophe JAGLA, Directeur de Recherche, INSERM, Clermont-Ferrand 1
Fabrice DUPUY, Maître de conférences, Université de Limoges
Abderrahman MAFTAH, Professeur, Université de Limoges

Résumé :

La myogenèse du muscle squelettique est un processus de différenciation complexe au cours duquel les myoblastes fusionnent en myotubes multinucléés. Bien que des approches transcriptomiques et protéomiques aient déjà été appliquées dans ce contexte, aucune n'a généré de données spécifiques sur le rôle des glycanes. L'implication des glycoconjugués dans des événements biologiques comme le développement et la différenciation est pourtant démontrée. J'ai donc développé une approche transcriptomique pour étudier l'expression de 375 gènes de la glycosylation, soit environ 60% du glycogénome, au cours de la différenciation précoce de la lignée de myoblastes murins C2C12. Parmi les 276 gènes exprimés, 37 sont dérégulés dans leur expression d'un facteur supérieur à 4, 29 n'ayant jamais été associés à la myogenèse. L'analyse des fonctions des protéines codées a permis de proposer un modèle décrivant le rôle des glycanes au cours de la différenciation myogénique. La biosynthèse des glycosaminoglycannes et des glycolipides semblerait particulièrement affectée suggérant une modification profonde de la membrane plasmique avant la fusion cellulaire. Pour le vérifier, j'ai établi des lignées de cellules C2C12 stables surexprimant des gènes impliqués dans la biosynthèse des glycolipides. J'ai montré que les lignées surexprimant les gènes *Fut1* et *Fut2*, codant les enzymes de la fucosylation périphérique des glycolipides membranaires, présentent un retard de différenciation. Des épitopes fucosylés seraient donc impliqués dans la différenciation myogénique des cellules C2C12. A terme, l'étude des lignées établies permettra de mieux comprendre le rôle des glycanes au cours de la myogenèse squelettique.

Mots clés :

α 1,2-fucosylation, différenciation, glycogénome, glycoconjugués, lignée C2C12, myogenèse, souris

Abstract :

Skeletal myogenesis is a complex differentiation process where myoblasts fuse into multinucleated myotubes. Although transcriptomic and proteomic approaches have already been applied in this context, none has generated any specific data on the role of glycans. Nevertheless, the involvement of glycoconjugates in biological events such as development and differentiation has been demonstrated. I consequently developed a transcriptomic approach to study the expression of 375 glycosylation genes, which represent around 60% of the glycogenome, during the early differentiation of murine C2C12 myoblast cell line. Among the 276 expressed genes, 37 are deregulated in their expression by more than 4-fold. Among them, 29 have never been associated with myogenesis. The functional analysis of the encoded proteins led us to propose a model which describes a role for glycans during myogenic differentiation. The biosynthesis of glycosaminoglycans and glycolipids seems particularly modified suggesting a considerable change in the plasma membrane before cell fusion. To check this hypothesis, I established stable C2C12 cell lines overexpressing *Fut1* and *Fut2*, two genes involved in the peripheral fucosylation of glycolipids. I showed that these cells have delayed differentiation. Fucosylated epitopes may therefore be involved in the myogenic differentiation of C2C12 cells. Further studies of these established cell lines will help to better understand the role of glycans in skeletal myogenesis.

Keywords :

α 1,2-fucosylation, C2C12 cell line, differentiation, glycogenome, glycoconjugates, myogenesis, mouse

REMERCIEMENTS

Et voilà, ça y est ! Ces années de thèse sont passées et cette aventure se termine donc. Une thèse, c'est bien sûr avant tout un long travail scientifique, mais c'est aussi une expérience forte et ô combien enrichissante. C'est également un travail de prime abord personnel, mais qui pourtant ne saurait être réalisé seul. C'est ainsi que je souhaite ici remercier toutes les personnes qui, d'une manière ou d'une autre, m'ont aidée à mener à bien ce projet. Il est difficile d'exprimer par des mots tous ces sentiments, mais je vais tenter de le faire, en essayant de n'oublier personne.

Mes remerciements vont en premier lieu à mes deux directeurs de thèse, Fabrice Dupuy et Abdou Maftah, pour m'avoir accueillie au sein de l'UGMA et pour m'avoir confié ce sujet de recherche. Je vous remercie pour votre aide, votre soutien et vos conseils durant toutes ces années.

Ensuite, je tiens à exprimer mes remerciements aux membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail. Merci à Anne Bonnieu et Tony Lefebvre pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail en acceptant d'en être rapporteurs, et à Christophe Jagla et Véronique Blanquet pour en avoir été examinateurs.

Je tiens bien sûr aussi à adresser mes remerciements à l'ensemble des membres du laboratoire, qui m'ont permis d'avancer dans ce travail tant techniquement que moralement. Je pense notamment à l'équipée du RU, avec bien sûr Xavier et ses célèbres dédicaces, Marie-Clémence, Katy et Mélanie. Lamia, merci pour ta gentillesse et nos petites discussions du weekend au labo. Anne, j'ai été ravie de découvrir l'anatomie de la cione et de l'oursin grâce à nos sujets d'examen ! Je tiens aussi à remercier plus particulièrement toute l'équipe du 4/5 (il paraît qu'il faut dire la salle 104 à présent !). Fabrice et Agnès, merci pour votre aide et la confiance que vous m'avez accordée lors de mes enseignements, et pour m'avoir fait découvrir un petit pan de Biologie Animale, avec notamment les joies de la dissection et de la cuisine de l'encornet... Aurélie et Sébastien, pour nos nombreux échanges, nos longs moments passés en salle de culture, devant le microscope... Ousmane, pour ton calme et ta bonne humeur permanente. Je te souhaite une excellente fin de thèse. Enfin, j'espère que les stagiaires qui ont partagé quelques temps nos paillasses en gardent de bons souvenirs !

Et puis, avec le temps, certaines personnes sont devenues plus que des collègues, et je tiens à leur dire combien j'ai apprécié travailler à leurs côtés et partager tous ces bons

moments hors du labo. Nathalie et Emilie, je repense souvent à nos fameuses « soirées filles » et nos petites escapades sur le mur d'escalade... Il y a bien sûr les excellents souvenirs des soirées et weekends passés avec Benoît, Caro, François, Aymeric et Valy, des moments qui sont si précieux au cours d'une thèse, merci pour votre bonne humeur, votre soutien et tous ces instants où on s'est vraiment bien marré !

Je remercie également tous mes amis qui m'ont soutenue avec nos petits weekends bien sympathiques (quand la salle de culture ne me retenait pas !), de Limoges à Amsterdam.

Mes pensées vont aussi à mon frère (un relecteur attentif !), mes grands-parents et mes parents, pour tout ce qu'ils ont fait pour moi et leur soutien sans faille tout au long de ces années de travail.

Enfin, un grand merci à Mathieu pour m'avoir supportée dans tous ces moments (ce n'était pas toujours facile !) et pour son soutien de tous les instants...

Merci à tous.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications :

Janot M., Audfray A., Loriol C., Germot A., Maftah A. & Dupuy F. (2009) : Glycogenome expression dynamics during mouse C2C12 myoblast differentiation suggests a sequential reorganization of membrane glycoconjugates. **BMC Genomics 2009, 10:483.**

Audfray A., Gaye O., Janot M., Maftah A. & Germot A. : The notch signaling pathway could control C2C12 cell differentiation through Pofut1 expression. En préparation pour soumission à J. Cell Physiol.

Communications écrites :

Janot M., Dupuy F, Maftah A. Rôle des gènes de la glycosylation dans la différenciation musculaire. 9^{ème} Séminaire des Thésards du département de génétique animale de l'INRA, Jouy en Josas 25 et 26 avril 2007.

Janot M., Audfray A, Germot A, Maftah A & Dupuy F. Rôle des gènes de la glycosylation dans la différenciation musculaire. Journée de l'IFR GEIST, Limoges 28 septembre 2007.

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

Janot M., Dupuy F and Maftah A. Glycogenome expression dynamics during mouse C2C12 myoblast differentiation. GLUCIDOC, Autrans, 13-16 octobre 2009.

Communications orales :

Janot M., Dupuy F, Maftah A. Recherche et analyse fonctionnelle des gènes de la glycosylation impliqués dans la différenciation de la cellule musculaire. 10^{ème} Séminaire des Thésards du Département de Génétique Animale de l'INRA, Toulouse, 20 et 21 mars 2008

Janot M., Dupuy F, Maftah A. Recherche et analyse fonctionnelle des gènes de la glycosylation impliqués dans la différenciation de la cellule musculaire. Journée de l'IFR GEIST, Limoges 29 janvier 2009

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Actb : Actine β	Dlk : Delta-like homologue
AchR : Acetylcholine Receptor	DM : Differentiation Medium
ADN : Acide Désoxyribonucléique	DMEM : Dubelcco's Modified Eagle's Medium
ADNc : Acide Désoxyribonucléique complémentaire	DSL : Delta/Serrate/Lag-2
ARN : Acide Ribonucléique	eFGF : FGF embryonnaire
ARNi : ARN interférence	EGF : Epidermal Growth Factor
Asn : Asparagine	EphA4 : Ephrin type-A receptor 4
ATP : Adénosine TriPhosphate	ERGIC-53 : ER-Golgi intermediate compartment 53 kDa protein
BCA : Bicinchoninic Acid	ERK : Extracellular signal-Regulated Kinases
BHK : Baby Hamster Kidneys	ES : Embryonic Stem
bHLH : basic Helix-Loop-Helix	FAK : Focal Adhesion Kinase
BMP : Bone Morphogenic Factor	FCMD : Fukuyama Congenital Muscular Dystrophy
BOC : Brother Of CDON	FGF : Fibroblast Growth Factor
CAM : Cell Adhesion Molecules	FGFR : Fibroblast Growth Factor Receptor
CAZy : Carbohydrate-Active Enzymes	FKRP : Fukutin related protein
CBF : C-Promoter Binding Factor	Fuc : Fucose
CCF : Cellule Compétente à la Fusion	GAG : GlycosAminoGlycane
Cer : Céramide	Gal : Galactose
Cdc : Cell Division Control protein	GalNAc : N-acétylgalactosamine
CDG : Congenital Disorder of Glycosylation	GalT : Galactosyltransférase
CDK : Cyclin Dependent Kinase	Gapdh : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
CDO /CDON : Cell adhesion molecule-related/Downregulated by Oncogenes	GDP : Guanosine diphosphate
CF : Cellule Fondatrice	GEF : Guanosine Exchange Factor
CHO : Chinese Hamster Ovary	GFP : Green Fluorescent Protein
CMD : Congenital Muscular Dystrophy	Glc : Glucose
CMP : Cytidine Monophosphate	GlcA : Acide Glucuronique
CMV : Cytomegalovirus	GlcNAc : N-acétylglucosamine
Ct : Cycle threshold	GLYCAM-1 : Glycosylation-dependent cell adhesion molecule 1
CT : Cytotoxic T cell	GM : Growth Medium
CTD : C-Terminal Domain	GMP : Guanosine monophosphate
C2C12 : lignée myoblastique murine	GPI : GlycosylPhosphatidyInositol
DAG : DiAcylGlycérol	GTP : Guanosine triphosphate
DAPI : 49,6-diamidino-2-phenylindole	G6pdx : Glucose-6-phosphate dehydrogenase
Des : Desmine	Hes : Hairy/Enhancer of Split
DGC : Dystrophin-associated Glycoprotein Complex	HGF : Hepatocyte Growth Factor
Dll : Delta-like	

IdoA : Acide Iduronique
IGF: Insulin-like Growth Factor
Itg : Intégrine
j.p.c : jours *post-coïtum*
Lbx1: Ladybird homeobox 1
Lfng: Lunatic Fringe
LGMD : Limb Girdle Muscular Dystrophy
Lys : Lysine
MADS-box : MCM1-Agamous-Deficiens-SRF box
Man: Mannose
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MCK : Muscle Creatine Kinase
Mdx : X-linked muscular Dystrophy
MEB : Muscle Eye Brain Disease
MEC : Matrice ExtraCellulaire
Mef: Myocyte Enhancer Factor
Mfng: Manic Fringe
MGI : Mouse Genome Informatics
MNF: Myocyte Nuclear Factor
MRF: Myogenic Regulatory Factor
MSD : Muscle Specific Domain
Msx: Muscle-segment homeobox
MyHC: Myosin Heavy Chain
Myog: Myogénine
NCAM: Neural Cell Adhesion Molecule
NeuAc: Acide Neuraminique (Acide sialique)
Neu2 : Neuraminidase 2
NFATC: Nuclear Factor of Activated T-cells
NICD : Notch IntraCellular Domain
OGT: O-GlcNAc transférase
OST : OligoSaccharylTtransférase
PA : Phosphatidic Acid
Pax : Paired-box
p.c.: *post-coïtum*
PCR: Polymerase Chain Reaction
PI : PhosphatidylInositol
Pofut1: protéine-O-fucosyltransférase 1
Pofut2: protéine-O-fucosyltransférase 2
POMGnT1 : Protein O-linked mannose β 1,2-N-acetylglucosaminyltransferase 1
POMT: Protéine-O-Mannosyltransférase
PSA : PolySialic Acid
PSM: Presomitic Mesoderm
RA : Retinoic Acid
Ras : Rat Sarcoma
Rb : Retinoblastoma-associated protein
RE: Réticulum Endoplasmique
RER : Réticulum Endoplasmique Rugueux
Rfng: Radical Fringe
RT-PCR: Real-time Polymerase Chain Reaction
Ser : Sérine
SF: Scatter Factor
SiRNA : Small Interfering RNA
SRF: Serum Response Factor
Shh: Sonic Hedgehog
ShRNA: Short hairpin Ribonucleic Acid
SiaT: Sialyltransférase
Six : Sine Oculis Homeobox
TAD : Transactivation Amino-terminal Domain
Tbp: TATA box binding protein
Tcea1: Transcription elongation factor A1
TGF: Transforming Growth Factor
TNF : Tumor Necrosis Factor
Thr: Thréonine
TLDA: TaqMan Low Density Array
Trp : Tryptophane
TSR: Trombospondin type 1 repeat
Tyr : Tyrosine
UDP: Uridine diphosphate
VCAM: Vascular Cell Adhesion Molecule
Wnt: Wingless
wt: Wild Type
Xyl: Xylose
VCAM: Vascular Cell Adhesion Molecule
Wnt: Wingless
wt: Wild Type
WWS : Walker Warburg Syndrome
Xyl: Xylose

SOMMAIRE

Avant-propos	1
Exposé bibliographique	5
I. La myogenèse du muscle squelettique.....	5
1. Le système musculaire squelettique.....	5
a. Les différents tissus musculaires.....	5
b. Organisation du muscle squelettique.....	7
i Structure du muscle squelettique.....	7
ii Diversité des fibres musculaires.....	9
c. Modèles d'études de la myogenèse.....	10
2. Edification du muscle squelettique	13
a. Formation des somites.....	15
b. Compartimentation des somites et acquisition de l'identité myogénique.....	18
c. Détachement et migration des progéniteurs musculaires.....	20
d. Progression myogénique	21
i Les MRFs, acteurs centraux de la différenciation myogénique	22
ii Détermination myogénique par les MRFs	24
iii Prolifération des myoblastes.....	26
iv Arrêt de la prolifération et levée de l'inhibition de la différenciation	28
v Activation du programme myogénique.....	30
vi Fusion des myoblastes en myotubes.....	32
vii Fibres I et II	41
viii Cellules satellites et régénération musculaire.....	42
II. Les glycoconjugués et la myogenèse	47
1. Les glycanes, constituants majeurs de la cellule musculaire.....	47
2. Les glycanes et glycoconjugués impliqués dans le développement musculaire	51
3. Implication des glycoconjugués dans la myogenèse.....	56
a. Implication des glycanes dans la somitogenèse	56
i Les <i>N</i> -glycanes	56
ii Les <i>O</i> -glycanes de Notch	60
b. Implication des glycanes dans la migration des précurseurs musculaires	62
i Structure et diversité des GAGs et des protéoglycanes.....	63
ii Fonctions des GAGs et protéoglycanes dans la migration.....	67
c. La progression myogénique : prolifération et fusion	68
i Des glycoconjugués influencent la prolifération.....	69
ii D'autres glycoconjugués participent à la fusion des myoblastes.....	70
d. Les glycoconjugués et la physiologie musculaire	80
i Des glycanes régulent l'homéostasie de la cellule musculaire	80
ii Les défauts de glycosylation, causes de pathologies musculaires	83
e. Les glycanes participent à la régénération musculaire.....	86
4. Le glycogénome	88

Résultats-Discussion	97
I. Expression du glyco-génome au cours de la différenciation musculaire.....	97
1. Analyse transcriptomique de glyco-gènes au cours de la différenciation des myoblastes murins C2C12 par TLDA.....	97
2. Voies de signalisation impliquant des glycanes activées au cours de la myogenèse	102
3. Des rôles pour les glycanes dans la maturation des myotubes.....	103
4. Conclusion.....	105
II. Rôle des glycosphingolipides dans la myogenèse.....	107
1. Choix des gènes d'intérêt	107
2. Conséquences de la modification de l'expression des gènes d'intérêt.....	111
a. Résultats de la surexpression transitoire des gènes d'intérêt	112
i Surexpression des gènes d'intérêt dans les cellules C2C12.....	112
ii Conséquences sur la différenciation des cellules C2C12.....	115
b. Résultats de la sous-expression des gènes d'intérêt par siRNA.....	118
c. Résultats de la surexpression stable des gènes d'intérêt	121
III. L'α1,2-fucosylation et la différenciation des C2C12.....	129
1. Caractérisation des clones transfectés par <i>Fut1</i> ou <i>Fut2</i>	130
a. Analyse de l'expression transcriptionnelle des gènes <i>Fut1</i> et <i>Fut2</i>	131
b. Analyses des phénotypes des cellules surexprimant <i>Fut1</i> ou <i>Fut2</i>	132
2. La surexpression de <i>Fut1</i> ou <i>Fut2</i> diminue la différenciation des cellules C2C12	133
3. Le retard de différenciation des cellules C2C12 dans les lignées surexprimant le gène <i>Fut2</i> n'est pas lié à une modification de l'expression des MRFs	136
4. Conclusion/ Perspectives.....	138
IV. Matériel et méthodes	141
1. Matériel biologique	141
2. PCR quantitative en temps réel	141
3. Détermination des quantités relatives en ARNm	141
4. Immunodétection par la technique de Western Blot	142
5. Clonage dans le vecteur d'expression pcDNA3.1	143
6. Transfection des cellules C2C12.....	144
a. Surexpression transitoire par lipofection des cellules C2C12.....	144
b. Transfection des siRNA	144
c. Etablissement des lignées stables.....	144
7. Courbes de fusion.....	145
Conclusion générale et perspectives	147
Références	151
Annexe	171

Index des figures

Figure 1. Photographies des 3 types musculaires (x400) et formes caractéristiques des cellules musculaires correspondantes.	6
Figure 2. Représentation des différents niveaux d'organisation du muscle squelettique.....	7
Figure 3. Le sarcomère, unité contractile.	8
Figure 4. Exemples de modèles d'étude de la myogenèse.	12
Figure 5. Représentation schématique de la myogenèse squelettique du membre chez les Vertébrés.	14
Figure 6. Représentation schématique et micrographie de la somitogenèse chez les vertébrés.	15
Figure 7. Les somites.	16
Figure 8. La somitogenèse : modèle "Clock and Wavefront".	17
Figure 9. Signaux contrôlant la détermination des cellules somitiques en progéniteurs musculaires.	18
Figure 10. Devenir des cellules somitiques chez les mammifères.	19
Figure 11. Représentation schématique d'un facteur à domaine bHLH.	23
Figure 12. Représentation schématique de l'expression des MRFs au cours du développement musculaire murin.	24
Figure 13. Expression et relations hiérarchiques des MRFs au cours de la myogenèse.	26
Figure 14. Exemples de facteurs impliqués dans la prolifération et la différenciation des myoblastes.	28
Figure 15. Résultats des invalidations des gènes MRFs chez la souris.	30
Figure 16. Distribution de la M-Cadhérine et de la β -caténine dans des myoblastes de rat en différenciation.	33
Figure 17. Modèle du complexe de surface "promyogénique" aux sites de contacts entre myoblastes.	35
Figure 18. Le remodelage des filaments d'actine du cytosquelette est crucial pour la fusion des myoblastes chez les mammifères.	36
Figure 19. Fusion des myoblastes chez la drosophile.	38
Figure 20. La fusion myoblastique chez les mammifères : un processus biphasique.	39
Figure 21. Myogenèses primaire et secondaire chez la souris.	41
Figure 22. Les cellules satellites.....	43
Figure 23. Régénération des fibres musculaires chez les Vertébrés.	44
Figure 24. Liaisons glycosidiques produites par les glycosyltransférases de mammifères. ...	48
Figure 25. Représentation schématique de la glycoprotéine Thy-1.	50

Figure 26. Micrographie électronique du glycocalyx à la surface de cellules épithéliales intestinales animales.	50
Figure 27. Exemples de <i>N</i> - et <i>O</i> -glycannes.	51
Figure 28. Structure des glycosphingolipides : exemple du galactosylcéramide.	52
Figure 29. Représentation schématique de l'implication connue des glycannes dans la myogenèse squelettique du membre.	53
Figure 30. Classes communes de glycannes dans les cellules animales	54
Figure 31. Fonctions générales des glycannes.	55
Figure 32. Représentation simplifiée des grandes étapes de la biosynthèse des <i>N</i> -glycannes dans la cellule.	57
Figure 33. Les trois types de <i>N</i> -glycannes.	58
Figure 34. Phénotypes embryonnaires résultant de la perte des <i>N</i> -glycannes complexes.	59
Figure 35. Les <i>N</i> -glycannes régulent les fonctions des intégrines.	60
Figure 36. Représentation des domaines EGF et TSR.	61
Figure 37. Défauts morphologiques des embryons <i>Pofut1^{-/-}</i>	62
Figure 38. Exemples de protéoglycannes.	63
Figure 39. Les GAGs sont constitués d'unités disaccharidiques répétées.	64
Figure 40. Liaison des GAGs au coeur protéique des protéoglycannes, représentation schématique.	65
Figure 41. Rôles des protéoglycannes dans la physiologie cellulaire : exemple des héparanes sulfates.	68
Figure 42. Les glypicanes et les syndécans, protéoglycannes membranaires.	71
Figure 43. Représentation schématique d'une mucine.	73
Figure 44. Effet de la polysialylation et de la <i>O</i> -glycosylation de Ncam sur la fusion des C2C12.	74
Figure 45. Structures "cœur" majeures des glycosphingolipides.	76
Figure 46. Les glycosynapses.	78
Figure 47. Effet de la surexpression de <i>Neu2</i> sur la différenciation des cellules C2C12.	80
Figure 48. Les protéines <i>O</i> -GlcNAcylées sont présentes dans différents compartiments cellulaires et appartiennent à de nombreuses classes fonctionnelles.	82
Figure 49. Représentation schématique du complexe DGC dans le muscle squelettique et de certaines des protéines associées.	84
Figure 50. Mécanismes cellulaires impliquant les glycannes.	88
Figure 51. Biosynthèse, utilisation et "turnover" d'un monosaccharide commun, le galactose.	89
Figure 52. Structure générale des ancres GPI.	92

Figure 53. Analyse de l'expression de <i>Glut4</i> dans les myoblastes C2C12 en différenciation.	104
Figure 54. Fonctions associées aux 37 gènes hautement variants.	108
Figure 55. Représentation schématique (A) de la voie de biosynthèse des glycosphingolipides et (B) des déterminants antigéniques principaux des groupes sanguins et tissulaires ABO et Lewis.	109
Figure 56. Voie de biosynthèse des gangliosides.	110
Figure 57. Carte du vecteur pcDNA3.1.	112
Figure 58. Résultats de la quantification de l'expression des glyco-gènes d'intérêt dans les C2C12 après transfection transitoire.	113
Figure 59. Résultats de l'analyse par PCR quantitative de l'expression des gènes <i>Neu2</i> (A), <i>Fut1</i> (B) et <i>Fut2</i> (C) au cours de la différenciation myogénique des cellules C2C12 transfectées transitoirement par les vecteurs correspondants.	114
Figure 60. Résultats de l'analyse des index de fusion des cellules C2C12 et des mêmes cellules transfectées transitoirement par le plasmide pcDNA3.1/Amp.	116
Figure 61. Représentation des index de fusion obtenus après transfection et différenciation des cellules C2C12 par différentes constructions.	117
Figure 62. Résultats de RT-PCR quantitative lors de la sous-expression de 5 gènes d'intérêt par siRNA.	119
Figure 63. Résultats de RT-PCR quantitative lors de la sous-expression de <i>Fut4</i> par siRNA.	119
Figure 64. Observations microscopiques de cellules C2C12 en cours différenciation lors du masquage des gangliosides GM3.	120
Figure 65. Observations microscopiques de cellules C2C12 en prolifération exprimant stablement des glyco-gènes d'intérêt.	122
Figure 66. Stratégie suivie pour le choix des gènes à étudier.	125
Figure 67. Analyse par RT-PCR quantitative de l'expression des gènes murins d' α 1,2- fucosyltransférases dans des clones de cellules C2C12 transfectées stablement par le gène <i>Fut1</i> ou <i>Fut2</i>	131
Figure 68. Evolution de l'index de fusion des cellules C2C12 surexprimant les gènes murins <i>Fut1</i> ou <i>Fut2</i>	133
Figure 69. Observations microscopiques de cellules C2C12 stablement transfectées par le gène <i>Fut1</i> ou <i>Fut2</i> , à différents stades de différenciation.	135
Figure 70. Résultats de la quantification de l'ARNm du gène <i>Fut2</i> lors de la différenciation de cellules C2C12 transformées stablement par la séquence codante du gène <i>Fut2</i>	136
Figure 71. Expression transcriptionnelle des gènes de MRFs.	137
Figure 72. Méthode des $\Delta\Delta$ Ct de quantification relative en RT-PCR semi-quantitative en temps réel.	142

Index des tableaux

Tableau 1. Caractéristiques des fibres musculaires chez la souris.	9
Tableau 2. Régulation du niveau d'expression des protéines du cycle cellulaire au cours de la différenciation myogénique.	29
Tableau 3. Liste non exhaustive des protéines impliquées dans la fusion de myoblastes chez les mammifères et les vertébrés.	40
Tableau 4. Structures des GAGS et sites typiques d'expression.	64
Tableau 5. Exemples de protéoglycannes	66
Tableau 6. Structures des différents coeurs glycaniques retrouvés sur les <i>O</i> -glycannes de type mucine.	74
Tableau 7. Exemples de fonctions des glycosphingolipides.	77
Tableau 8. Exemples de protéines porteuses de <i>O</i> -GlcNAc identifiées dans le muscle squelettique.	83
Tableau 9. Gènes impliqués dans les dystroglycanopathies chez l'homme.	85
Tableau 10. Défauts des héparanes sulfates des interstices musculaires résultant en des myopathies.	86
Tableau 11. Acteurs de la biosynthèse des <i>N</i> -glycannes complexes et hybrides.	91
Tableau 12. Le glycogénome murin.	94
Tableau 13. Eléments généraux ayant contribué au choix d'une liste de 10 gènes d'intérêt.	111
Tableau 14. Niveaux d'expression des gènes d'intérêt déterminés par PCR quantitative dans les différents clones amplifiés (en bleu).	124
Tableau 15. Données relatives à l'inactivation des gènes murins <i>Fut1</i> et <i>Fut2</i>	130

AVANT-PROPOS

La myogenèse est un processus développemental fondamental qui conduit à l'établissement de l'un des tissus les plus abondants chez les mammifères, le tissu musculaire. Au sein d'un organisme, ce tissu assure de nombreuses fonctions grâce aux mouvements volontaires et involontaires qui lui sont associés. De ce fait, la compréhension des mécanismes impliqués dans son élaboration est essentielle, d'autant plus que de telles études ont un intérêt tant médical qu'économique. En effet, chez l'Homme, de nombreuses maladies, telles que les myopathies, sont liées à des défauts au niveau des muscles squelettiques. Par ailleurs, la myogenèse détermine aussi la masse musculaire des animaux de rente et, de ce fait, présente un intérêt socio-économique non négligeable. C'est dans ce cadre que se positionne une partie des recherches effectuées dans l'UMR1061 qui m'a accueillie pour ma thèse. L'Unité de Génétique Moléculaire Animale dépend du département de génétique animale de l'INRA et de l'Université de Limoges. Elle s'intéresse notamment à la recherche des déterminants génétiques conditionnant le développement musculaire des animaux de rente. A terme, il s'agit de mieux comprendre comment la variabilité génétique contrôle la variabilité phénotypique liée au tissu musculaire. Pour répondre aux nombreuses questions relatives à cette thématique, la recherche dans notre unité s'effectue selon deux grands axes :

1 - l'étude de la génomique du muscle squelettique pour laquelle les travaux associés visent à parfaire les connaissances sur le muscle bovin et à élaborer de nouveaux outils moléculaires utilisables pour la sélection des animaux les plus performants.

2 - l'étude du glyco-génome, les objectifs de cet axe de recherche étant d'analyser sur le plan fonctionnel et évolutif les gènes de glycosyltransférases et de déterminer la contribution du glyco-génome (c'est-à-dire la partie du génome qui contrôle l'élaboration et la reconnaissance des glycanes) à des processus pathologiques (maladies à prion) et physiologiques (myogenèse).

C'est dans ce dernier axe que j'ai débuté mes travaux de thèse en octobre 2006. L'objectif de l'équipe que j'ai intégrée, « glyco-génome et myogénèse », est de déterminer l'implication des glycanes dans la myogenèse. En effet, au cours de la différenciation myogénique, les cellules musculaires (myoblastes) se différencient et fusionnent pour donner des cellules multinucléées (myotubes) puis les fibres musculaires. Ces différentes étapes font intervenir de nombreux acteurs, parmi lesquels des facteurs de croissance, des régulateurs transcriptionnels et des récepteurs variés. L'étape de fusion repose également sur d'importants événements d'interactions cellulaires. Un large panel de protéines est ainsi impliqué dans la différenciation myogénique ; leurs modifications post-traductionnelles par des glycanes s'avèrent tout aussi importantes pour leurs fonctions. Outre leurs rôles dans la structuration

des protéines qui les portent, ces structures glycaniques se trouvent exposées à la surface cellulaire et de ce fait joueraient des fonctions spécifiques et/ou complémentaires à celles des protéines. Cette équipe s'intéresse donc aux rôles de ces structures sucrées portées par des glycoconjugués dans les processus de différenciation de la cellule musculaire murine. Cette thématique de recherche s'inscrit par conséquent à l'interface entre l'étude de la myogenèse et celle de la glycobiologie ; elle est aujourd'hui encore peu explorée au sein de la communauté scientifique. Toutefois, des travaux soulignent l'implication des glycoconjugués dans la régulation de la myogenèse embryonnaire (Olguin, H.C., *et al.* 2003), dans la physiologie du muscle squelettique adulte (Cieniewski-Bernard, C., *et al.* 2006) et dans la régénération musculaire en cas de lésions traumatiques ou pathologiques (Papy-Garcia, D., *et al.* 2002, Villena, J. et Brandan, E. 2004). Ainsi, les glycannes des protéoglycannes de la surface membranaire participent aux interactions et fusions cellulaires, et donc à la formation des myotubes et leur maturation en fibres musculaires. De même, certains glycannes sont indispensables aux interactions cellulaires et aux cascades de signalisation contrôlant le programme myogénique. C'est le cas des glycannes portés par les récepteurs Notch et leurs ligands. Chez les Mammifères, leurs interactions ne sont possibles que si les deux partenaires sont correctement *O*-fucosylés, en particulier par l'enzyme Pofut1 (Moloney, D.J., *et al.* 2000, Panin, V.M., *et al.* 2002). Ces différents travaux soulignent l'intérêt d'un tel champ de recherche.

Cette thématique s'intègre en partie dans le domaine de la glycobiologie, une discipline qui a vu le jour à la fin des années 1980. La glycobiologie recouvre à la fois la chimie des sucres, la biochimie, et la biologie cellulaire et moléculaire des glycannes. Les enseignants-chercheurs de l'équipe travaillent depuis plusieurs années dans ce vaste champ de recherche. Leurs travaux ont, par le passé, porté sur la caractérisation des gènes bovins de glycosyltransférases (Barraud, J.P., *et al.* 2000, Javaud, C., *et al.* 2000, Loriol, C., *et al.* 2006, Mercier, D., *et al.* 1999, Oulmouden, A., *et al.* 1997), l'étude des relations structure-fonction des enzymes codées par ces gènes (Dupuy, F., *et al.* 2004, Dupuy, F., *et al.* 1999, Holmes, E.H., *et al.* 2000) et l'évolution de ces enzymes dans le règne animal (Dupuy, F., *et al.* 2002, Javaud, C., *et al.* 2003, Loriol, C., *et al.* 2006, Petit, D., *et al.* 2006, Saunier, K., *et al.* 2001, Wierinckx, A., *et al.* 1999). La compréhension du rôle de la glycosylation dans la myogenèse revient à définir les fonctions des différents glycannes et glycoconjugués dans les processus moléculaires et cellulaires associés à ces mécanismes développementaux. De ce fait, les travaux actuels portant sur le rôle des glycannes dans le développement musculaire bénéficient largement de cette expérience.

Afin d'examiner le rôle des glycanes dans la myogenèse, le projet scientifique de l'équipe dans laquelle j'ai réalisé ma thèse repose sur deux approches, complémentaires. La première est une approche dite « gènes candidats », qui s'appuie sur les données de la littérature et cible les gènes contrôlant la glycosylation du récepteur Notch. Ainsi, certains projets ont porté sur la caractérisation des gènes et des enzymes Pofut1 et Pofut2 bovins (Loriol, C., *et al.* 2007, Loriol, C., *et al.* 2006), ainsi que sur l'implication des *O*-fucosylglycanes dans la différenciation myogénique murine, au travers de la voie de Notch. Un nouveau projet, débuté en 2008, concerne cette fois l'étude de la *O*-glucosylation de Notch par la *O*-glucosyltransférase rumi. La seconde approche est « globale ». Elle consiste à analyser l'ensemble des gènes de la glycosylation, gènes codant des protéines intervenant dans l'élaboration et la reconnaissance des structures glycaniques et rassemblés sous le terme de glycogénome. L'objectif ultime est d'identifier les structures glycaniques intervenant dans les différents mécanismes moléculaires et cellulaires responsables de la myogenèse. Ces travaux comportent des visées tant académiques qu'appliquées. Ils pourraient ainsi contribuer à l'explication des dérèglements physiologiques (musculature plus ou moins importante) ou pathologiques (atrophie musculaire et myopathie par exemple) affectant la prolifération et la différenciation de la cellule musculaire. Ils permettraient également, par l'analyse fonctionnelle du polymorphisme des régions codantes et non codantes de ces gènes, de prouver l'implication des structures glycaniques dans le phénotype musculaire chez les bovins. C'est dans cette dernière approche globale que s'inscrit mon projet de thèse.

Mes travaux de thèse font partie d'un projet plus large qui vise à identifier les structures glycaniques impliquées dans la différenciation de la cellule musculaire et à comprendre leurs fonctions dans un tel processus. Mon travail de thèse reposait sur 3 principales étapes : (i) identifier les glyco-gènes dérégulés au cours des étapes précoces de la différenciation de la lignée de cellules musculaires murines C2C12 et en déduire les structures glycaniques pouvant être impliquées, (ii) vérifier la réelle implication de ces gènes dans la myogenèse en modifiant leur expression normale, et (iii) cibler une structure glycanique et comprendre sa fonction dans ce processus. Pour cela, mon travail a tout d'abord débuté par la mise en place d'une technologie de RT-PCR quantitative à haut débit (TLDA : TaqMan Low Density Array®, Applied Biosystems) appliquée au glycogénome. J'ai ensuite utilisé cette technique pour une analyse simultanée par PCR en temps réel des niveaux d'expression de 375 gènes de la glycosylation au cours de la différenciation des cellules musculaires murines. Au cours de ce travail de criblage, j'ai ainsi pu identifier des gènes candidats dont l'expression était hautement régulée au cours de la différenciation myogénique de la lignée

murine C2C12. Un modèle présentant les fonctions potentielles supportées par ces gènes au cours de ce processus a ainsi pu être établi. La seconde partie de mon travail de thèse a consisté à créer des lignées stables qui surexpriment ou sous-expriment certains gènes d'intérêt. Ainsi, des lignées surexprimant les gènes *Fut1* et *Fut2*, codant des α 1,2-fucosyltransférases intervenant dans la synthèse d'épitopes glycaniques membranaires, ont fait l'objet d'investigations plus précises. Tout d'abord, l'état des connaissances dans le domaine de la myogenèse et du rôle des glycannes dans ce processus développemental sera exposé dans ce manuscrit. Ensuite, les principaux résultats obtenus seront présentés et discutés.

EXPOSÉ BIBLIOGRAPHIQUE

I. LA MYOGENÈSE DU MUSCLE SQUELETTIQUE

1. Le système musculaire squelettique

Pour la plupart des espèces animales, le tissu musculaire est un constituant fondamental de l'organisme. C'est l'un des tissus les plus abondants chez les vertébrés. A titre d'exemple, il représente de 30 à 40% de la masse corporelle totale de l'Homme. Chez les mammifères, les muscles participent à diverses fonctions essentielles à la vie de l'organisme, comme la respiration ou la digestion, et à son adaptation au milieu environnant, comme la locomotion ou la thermorégulation.

a. Les différents tissus musculaires

Le tissu musculaire est caractérisé par sa capacité de contraction. Celle-ci est une fonction cellulaire fondamentale, qui est impliquée dans plusieurs mécanismes autres que la contraction de la cellule musculaire. Des faisceaux contractiles transitoires composent en effet l'anneau contractile mitotique et les fibres de tension lors de la cicatrisation des tissus. D'autres faisceaux contractiles permanents cette fois composent les ceintures d'adhérence, impliquées dans la formation de tissus embryonnaires, et bien sûr le tissu musculaire. Trois principaux types musculaires, bien qu'ayant tous des fonctions relatives à la contraction cellulaire, se distinguent par leurs aspects structuraux et par les fonctions qu'ils effectuent (Figure 1). Le premier type correspond aux *muscles squelettiques*. Du fait de l'organisation des protéines contractiles, ils apparaissent striés. Cet aspect structural est développé dans le paragraphe suivant. Ils sont composés de myofibres multinucléées, les noyaux étant situés en périphérie. Ils interviennent dans la fonction motrice et la posture. Leur contrôle s'effectue principalement *via* le système nerveux central. Leurs contractions, qui déclenchent les mouvements, sont donc volontaires. Les *muscles lisses* constituent le deuxième type musculaire. Ils sont contrôlés par le système nerveux autonome, leur contraction étant donc involontaire et associée aux fonctions végétatives. La musculature lisse assure par exemple les mouvements de l'intestin et le transit intestinal, la contraction des vaisseaux et donc la pression sanguine. Ces muscles assurent par conséquent toutes les fonctions internes et involontaires à l'exception de la respiration et des battements cardiaques. Les cellules musculaires lisses n'ont pas de striations visibles, bien qu'elles contiennent les mêmes

protéines contractiles que les autres tissus musculaires. Les noyaux sont situés cette fois au centre des cellules, fusiformes et mononucléés.

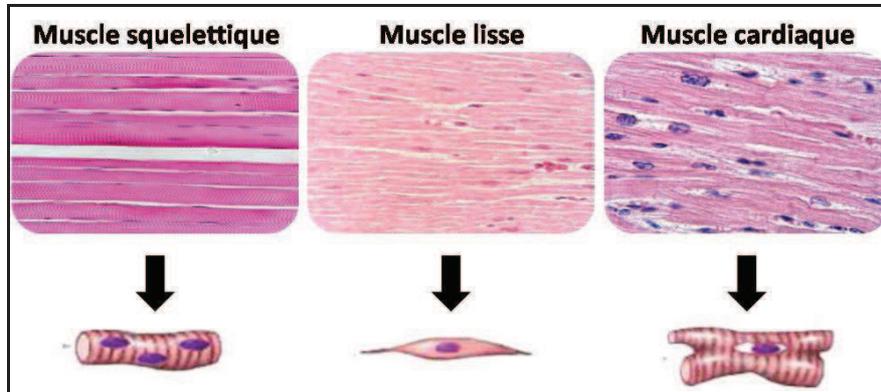


Figure 1. Photographies des 3 types musculaires (x400) et formes caractéristiques des cellules musculaires correspondantes.

Après coloration à l'hématoxyline (noyau) et à l'éosine (cytoplasme), les types musculaires cardiaque et squelettique apparaissent striés, contrairement au type musculaire lisse. Les cellules musculaires squelettiques comportent des noyaux périphériques, elles sont multinucléées, les noyaux étant périphériques. Elles interviennent dans le contrôle volontaire de la contraction (mouvement, locomotion...). Les cellules musculaires lisses comportent chacune un noyau central, elles interviennent dans le contrôle autonome de la contraction et sont donc impliquées dans les fonctions végétatives (intestin, estomac, endomètre, vaisseaux sanguins...). Enfin, les cellules musculaires cardiaques comportent des noyaux centraux, elles sont mono ou binucléées et ramifiées. Elles interviennent dans le contrôle autonome de la contraction cardiaque.

Enfin, le *myocarde* correspond au troisième type musculaire. Il a bien l'aspect d'un muscle strié mais sa contraction, rythmique et continue, dépend du système nerveux autonome. Contrairement aux cellules du muscle squelettique, les cellules cardiaques sont mononucléées ou binucléées, le(les) noyau(x) étant en position centrale. Elles possèdent une taille plus réduite. A l'inverse des autres cellules musculaires, elles sont souvent ramifiées.

Dans ce manuscrit, nous nous intéresserons plus précisément à l'édification du muscle squelettique, responsable de la motricité de l'organisme, et dont l'organisation et la formation sont des éléments complexes restant aujourd'hui encore incomplètement compris. Leur étude est essentielle, d'une part pour comprendre et traiter les pathologies musculaires humaines, et d'autre part pour élucider les mécanismes régulant la masse musculaire chez les animaux de rentes, notamment les ruminants.

b. Organisation du muscle squelettique

i Structure du muscle squelettique

Le muscle est connecté au système squelettique par l'intermédiaire des tendons et assure ainsi la fonction locomotrice. Chaque muscle est composé par des faisceaux de fibres musculaires, regroupés dans un tissu conjonctif dense, l'épimysium. Les faisceaux sont délimités par une gaine plus épaisse, le péri-mysium. Le muscle squelettique est composé majoritairement par des milliers de fibres musculaires, elles-même entourées d'une gaine de tissu conjonctif appelé endomysium (Figure 2).

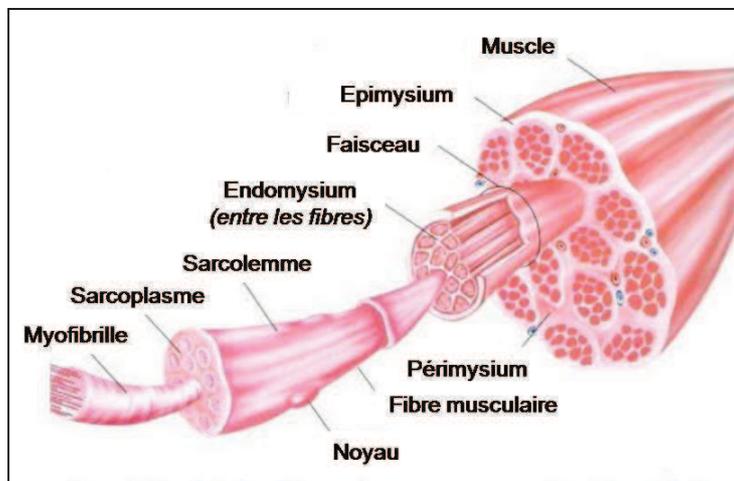


Figure 2. Représentation des différents niveaux d'organisation du muscle squelettique.

Les myofibrilles constituent l'élément contractile de la fibre musculaire, ou myofibre. Délimitées par l'endomysium, les fibres s'organisent en faisceaux délimités eux-mêmes par le péri-mysium. Regroupés, ces faisceaux forment le muscle, entouré par l'épimysium. (D'après NSCA, 2000).

Ces fibres renferment un important matériel contractile. Elles correspondent à de longues cellules cylindriques (jusqu'à 5 cm de long, 10 à 100 μm de diamètre), résultant de la fusion de plusieurs cellules au cours du développement embryonnaire ou en cas de régénération musculaire dans le tissu adulte. Elles contiennent donc de nombreux noyaux, aplatis et situés en périphérie, sous la membrane plasmique, appelée sarcolemme (Figures 1 et 2). Le cytoplasme, ou sarcoplasme, contient les différents éléments nécessaires à la production d'énergie comme les mitochondries, les gouttelettes lipidiques et granules de glycogène et la myoglobine, fournisseur d'oxygène de la fibre musculaire striée. Le sarcoplasme contient également des centaines de filaments cylindriques plus minces, les myofibrilles, qui s'étendent d'un bout à l'autre de la cellule et qui assurent la fonction de contraction. Elles sont en effet constituées de myofilaments, qui correspondent à des filaments fins d'actine- α

associés à la tropomyosine et la troponine (régulant la contraction *via* les ions Ca^{2+}) et à des filaments épais constitués de myosine, organisés eux-mêmes par des filaments intermédiaires et des protéines de liaison de l'actine (Figure 3). Les myofilaments sont disposés selon une organisation géométrique très rigoureuse. Cet assemblage crée une succession d'unités contractiles, nommées sarcomères, qui forment la myofibrille et lui donnent son aspect strié. Vus en coupe longitudinale (Figure 3), les filaments fins sont attachés de part et d'autre des disques Z, constitués notamment d' α -actinine. Ces structures sont alignées parallèlement. Entre deux disques Z, dans les espaces entre les filaments fins, se logent les filaments épais de myosine. En coupe transversale, la disposition des microfilaments d'actine autour des filaments de myosine est pentagonale. Les sarcomères constituent la base de l'organisation des myofibrilles de la fibre musculaire.

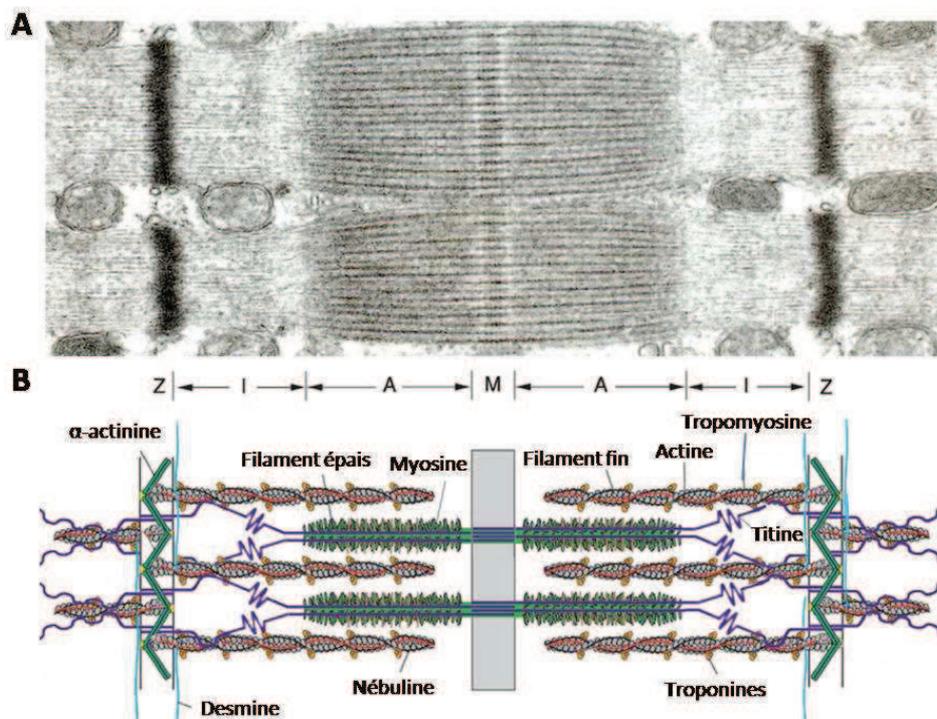


Figure 3. Le sarcomère, unité contractile.

A. Micrographie électronique de l'organisation ultrastructurale des sarcomères. **B.** Représentation schématique simplifiée des sarcomères. Le sarcomère est composé par des filaments fins (principalement d'actine), des filaments épais (principalement de myosine), et par la protéine filamenteuse titine. Les filaments fins sont ancrés au niveau des disques Z, où est localisée l' α -actinine. Les filaments épais constituent la bande A. Les têtes de myosines du filament épais interagissent avec l'actine au cours de la contraction. La titine s'étend sur la moitié du sarcomère, depuis le disque Z à la bande M et constitue un filament sarcomérique supplémentaire. Au niveau de la bande I, la titine est extensible et fonctionne comme un ressort moléculaire. Au niveau de la bande A, la titine est inextensible du fait de son interaction avec le filament épais. (D'après Ottenheijm, C.A., *et al.* 2008).

ii Diversité des fibres musculaires

Chez les mammifères, la contraction pourra être rapide et intense, ou au contraire lente, cela étant fonction du type de mouvement et du type de locomotion. Les fibres musculaires présentent donc des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles différentes, avec par conséquent des propriétés différentes de contraction. Cette diversité résulte notamment de leurs origines au cours de la myogenèse, comme nous le verrons plus tard dans ce manuscrit. Leur nature diffère principalement par leur composition en myosine. En effet, plusieurs isoformes de chaînes lourdes de myosine (MyHC pour Myosin Heavy Chain), issues d'une famille multigénique, sont exprimées au cours du développement des mammifères. Chez la souris, huit gènes de MyHC sarcomérique, deux gènes de MyHC cardiaque (MyHC- α , MyHC- β) et six de MyHC squelettique (MyHC-embryonnaire, MyHC-périnatale, MyHC-IIa, MyHC-IIb, MyHC-IIx/d, MyHC-extraoculaire) sont retrouvés associés en clusters sur les chromosomes 14 et 11 (Gulick, J., *et al.* 1991). Les isoformes rapides de MyHCs de type IIa, IIb, et IIx/d, de même que de type I β -lent « cardiaque » prédominent dans les muscles squelettiques mammifères (Pette, D. et Staron, R.S. 1990, Schiaffino, S. et Reggiani, C. 1996). Les isoformes MyHC-IIa, -IId et -IIb sont à plus de 93% identiques au niveau de leur séquence en acides aminés (Weiss, A. et Leinwand, L.A. 1996). Les isoformes de MyHC permettent de classifier les fibres musculaires en deux principaux types (Hughes, S.M., *et al.* 1999) (Tableau 1).

Tableau 1. Caractéristiques des fibres musculaires chez la souris.

Type de fibre	Isoforme de MyHC	Activité ATPasique	Métabolisme	Vitesse de contraction
I	I β (1935 AA)	Faible	Oxydatif	Lente
II	IIa (1912 AA)	Forte	Glycolytique	Rapide
	IIx (1942 AA)			
	IIb (1939 AA)			

Les fibres de type I sont dites « lentes » ou fibres « rouges » : ce sont les fibres de l'endurance. Elles expriment des chaînes lourdes de myosine de type I β et présentent un métabolisme oxydatif, aérobie. Leur densité en capillaires et leur richesse en myoglobine sont responsables de la couleur rouge qui les caractérise. Elles présentent également une richesse en mitochondries, celles-ci produisant l'ATP apportant l'énergie nécessaire à la contraction. Elles possèdent par ailleurs une faible activité ATPasique. Les fibres de type II sont des fibres

« rapides ». Elles expriment les chaînes lourdes de myosine de type IIa, IIx et IIb. Les fibres de type IIa, à métabolisme aérobie, riches en mitochondries et qui apparaissent rouges tout comme les fibres de type I, sont des intermédiaires entre ces dernières et les fibres IIx et IIb. Elles présentent un métabolisme oxydo-glycolytique. Les fibres de type IIx (ou IIc) sont moins denses en mitochondries et myoglobine : ce sont les fibres les plus rapides chez l'Homme. Elles se contractent rapidement mais ne peuvent soutenir des efforts prolongés. Elles présentent un métabolisme oxydo-glycolytique intermédiaire. Enfin, les fibres de type IIb présentent un métabolisme anaérobie, glycolytique (Booth, F.W. et Thomason, D.B. 1991, Casas, F.o., *et al.* 2008) ; elles sont dites « blanches » et sont moins denses en mitochondries et myoglobine. Elles ont une forte activité ATPasique. Ce sont les fibres rapides majeures de certains animaux comme les rongeurs, ce qui explique la couleur claire de leur chair. L'acquisition des isoformes adultes de type I et de type II a lieu tout au long de la vie fœtale, ce qui permet d'obtenir, à la naissance, des muscles différenciés de type lent, mixte ou rapide, selon les proportions et la qualité des fibres qui les composent. Les mécanismes moléculaires qui régulent l'acquisition des phénotypes lent et rapide sont encore relativement mal connus. Cependant, des études ont montré qu'une voie de signalisation, dépendante du calcium et activée par une phosphatase, la calcineurine, serait impliquée dans l'expression de gènes définissant le phénotype lent, *via* le facteur de transcription NFAT (Olson, E.N. et Williams, R.S. 2000). De même, la voie de signalisation Ras/MAPK/ERK participerait elle aussi à ce mécanisme (Murgia, M., *et al.* 2000). Enfin, il a aussi été montré que lors d'exercices physiques particuliers ou en cas de pathologies, des transitions entre fibres lentes et fibres rapides pouvaient avoir lieu (Olson, E.N. et Williams, R.S. 2000).

c. Modèles d'études de la myogenèse

Afin de comprendre la structure du muscle squelettique et les pathologies qui lui sont associées, de nombreux travaux se sont portés sur la compréhension des mécanismes gouvernant sa formation, la myogenèse. La myogenèse est un processus fondamental qui existe, avec des niveaux de complexité différents, chez de nombreux organismes allant de la méduse à l'être humain. Plusieurs étapes sont nécessaires au déroulement de la myogenèse, ce qui en fait un processus complexe avec des acteurs multiples et divers comme cela sera présenté par la suite. Pour mieux comprendre ce mécanisme, l'utilisation et la caractérisation de modèles animaux et cellulaires ont été nécessaires. Ainsi, l'élaboration et la mise en place du tissu musculaire ont tout particulièrement été étudiées *in vivo* chez certaines espèces modèles comme la drosophile, le poisson zèbre, le xénope, le poulet et la souris. Les études

menées chez le poulet ont par exemple apporté de nombreuses données sur les étapes précoces de la myogenèse, comme la migration des précurseurs cellulaires ou la compartimentation des somites, tandis que les analyses réalisées chez la drosophile ont enrichi les notions concernant le déroulement du processus de fusion des myoblastes en myotubes multinucléés. Les connaissances actuelles sur la myogenèse ont également bénéficié de l'apport d'animaux modèles mutés. Ainsi, des lignées de souris ont été développées, dans le but de fournir des modèles d'études de dystrophies musculaires. Ces animaux présentent généralement des défauts physiologiques également observés chez les patients humains. Ils peuvent être utilisés en tant qu'outils pour les études génétiques, cliniques et histopathologiques. La souris mdx, déficiente pour la dystrophine, a par exemple été utilisée en tant que modèle de dystrophie musculaire de Duchenne (Bulfield, G., *et al.* 1984, Grounds, M.D., *et al.* 2008, Sicinski, P., *et al.* 1989), tandis que les souris dont le gène de la myostatine a été invalidé, au fort développement musculaire (Figure 4A), ont permis de mieux comprendre le rôle de ce facteur dans la myogenèse (Vainzof, M., *et al.* 2008).

Cependant, la génération d'animaux mutants est relativement longue et leur étude ne permet pas toujours d'obtenir des informations sur des mécanismes moléculaires précis. Les modèles animaux ont donc été complétés par plusieurs modèles cellulaires. L'étude de la myogenèse est ainsi simplifiée et permet de mettre en évidence des acteurs intervenant dans des étapes bien particulières de la différenciation myogénique. Néanmoins, le modèle cellulaire présente le défaut de réduire la myogenèse aux seuls événements induits par les cellules myoblastiques. Les systèmes d'étude *in vitro* s'appuient soit sur des cellules en cultures primaires soit sur des lignées cellulaires immortalisées. En cultures primaires, les précurseurs musculaires sont fraîchement isolés, généralement à partir de muscles pectoraux d'embryon de poulet ou de caille, et de muscles des membres postérieurs de rat et de souris nouveau-nés. Ils sont capables de reproduire les phases de prolifération et différenciation de la myogenèse. Les cultures primaires ont l'avantage d'être plus proches des systèmes *in vivo* que les lignées cellulaires immortalisées, mais, outre le nombre limité de repiquages, leur obtention reste parfois compliquée. Il peut être en effet difficile d'obtenir une population pure de myoblastes à partir d'un muscle entier, sans contamination par des cellules associées tels que les fibroblastes. C'est pourquoi ce sont les lignées cellulaires immortalisées qui restent aujourd'hui les modèles *in vitro* les plus utilisés pour l'étude de la myogenèse. Leur utilisation a ainsi apporté de très nombreuses connaissances sur le déroulement de la myogenèse. En particulier, de nombreuses informations ont été acquises sur le rôle et l'expression des facteurs de transcription myogéniques, les MRFs (Myogenic Regulatory Factors) MyoD, Myf5,

Myogénine et Mrf4, dans ce processus. La lignée la plus employée, la lignée C2C12, est un sous-clone dérivé de la lignée originelle C2, isolée à partir de muscle de cuisse de souris C3H âgées de deux mois (Yaffe, D. 1968, Yaffe, D. et Saxel, O. 1977). Elles correspondent à des cellules satellites du muscle, qui *in vivo* sont impliquées dans la régénération musculaire, un processus qui sera présenté plus tard. Les C2C12 ont la capacité de se mettre en différenciation en cas de privation de sérum dans le milieu de culture, ou en cas de forte densité cellulaire. En prolifération, elles ressemblent à des fibroblastes (Figure 4B).

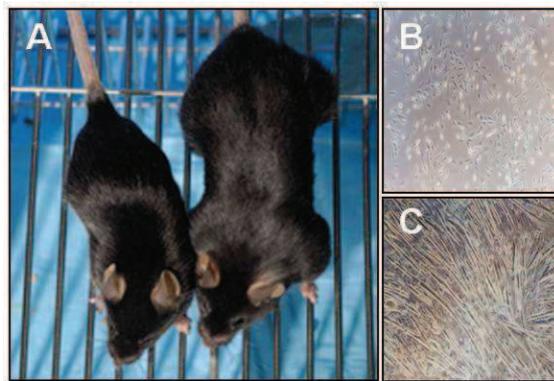


Figure 4. Exemples de modèles d'étude de la myogenèse.

A. Souris sauvage et *Myostatine*^{-/-}. La souris mutante présente une musculature beaucoup plus développée que la souris sauvage. (D'après Lee, S.J. 2007). **B.** et **C.** Cellules C2C12 en prolifération (**B**) et à 10 jours de différenciation (**C**), les myotubes sont alors très développés.

Lors de leur différenciation, lorsqu'elles fusionnent en myotubes, elles présentent un aspect tubulaire (Figure 4C). Leurs comportements en termes de signalisation et de réponse transcriptionnelle sont assez proches de ceux de myoblastes primaires (Cornelison, D.D.W. 2008). Elles sont donc largement utilisées pour acquérir de nouvelles informations sur la différenciation musculaire. Ces éléments, associés à leur facilité d'utilisation, en font un modèle de choix pour l'étude de la myogenèse. Mais, comme toute lignée et système d'étude *in vitro*, leur immortalisation pose la question de savoir les répercussions sur leur comportement, et notamment sur la machinerie du cycle cellulaire. De plus, différents supports peuvent être utilisés pour leur culture. Dans tous les cas, le comportement des cellules ne peut donc refléter complètement la situation tissulaire. Il convient donc de prendre en compte ces limites et de vérifier *in vivo* les connaissances acquises grâce aux lignées lorsque cela est possible. Outre les C2C12, d'autres lignées bien caractérisées ont aussi été développées pour l'étude de la myogenèse, les plus utilisées étant les lignées de rat L6 et L8. La lignée L6 dérive de myoblastes obtenus à partir de la patte postérieure de rats nouveau-nés, stabilisés dans les premiers passages par un agent carcinogène chimique (Yaffe, D. et Saxel,

O. 1977). Les cellules de cette lignée ont une forte capacité de différenciation dans des milieux de culture contenant peu de sérum, mais la multiplicité des passages diminue leur capacité de fusion, ce qui rend nécessaire un clonage périodique de la lignée. Quant à la lignée L8, isolée à partir de cultures primaires de muscle de rat, aucun agent carcinogène n'a été utilisé (Yaffe, D. 1969). Elle doit elle aussi être périodiquement clonée pour éviter la perte de la capacité de fusion. D'autres lignées sont aussi utilisées, mais à moindre fréquence. C'est le cas des cellules murines C2.7, un sous-clone des myoblastes C2 (Pinset, C., *et al.* 1988, Yaffe, D. et Saxel, O. 1977), ou les cellules MM14. Ces dernières dérivent de muscle de patte de souris mâle de deux mois (Linkhart, T.A., *et al.* 1980). Leur morphologie et leur profil de transcription de gènes sont également assez proches de ceux des cellules fraîchement isolées en vue de cultures primaires (Cornelison, D.D.W. 2008).

2. Edification du muscle squelettique

L'étude de la myogenèse *in vivo* et *in vitro* a permis de déterminer et de mieux comprendre les différentes étapes menant à l'élaboration des différentes fibres musculaires et donc à la constitution du tissu musculaire squelettique. Ce processus implique de nombreux mécanismes moléculaires qui varient considérablement selon les modèles animaux étudiés et le type de muscle élaboré. Ainsi, les données qui seront présentées ici porteront sur l'étude de la myogenèse squelettique chez les vertébrés, et sauf mention contraire, sur la myogenèse des muscles des membres chez les mammifères et plus précisément chez la souris. Chez ces organismes, la myogenèse comporte plusieurs phases successives : après (i) formation des somites, (ii) les cellules souches du mésoderme somitique sont déterminées en cellules de la lignée musculaire squelettique, (iii) les cellules myoblastiques précurseurs migrent vers les bourgeons des membres, (iv) elles sont déterminées et prolifèrent, (v) avant de débiter leur différenciation en sortant du cycle cellulaire puis (vi) de fusionner en myotubes multinucléés et enfin (vii) de se différencier en fibres musculaires (Figure 5). C'est à ce stade que des protéines contractiles, spécifiques du muscle squelettique, seront exprimées et participeront à la constitution des myofibrilles. Les facteurs myogéniques MRFs comptent parmi les principaux régulateurs de cette suite d'évènements. Dans cette partie sont présentées ces différentes étapes, ainsi que les mécanismes moléculaires impliqués.

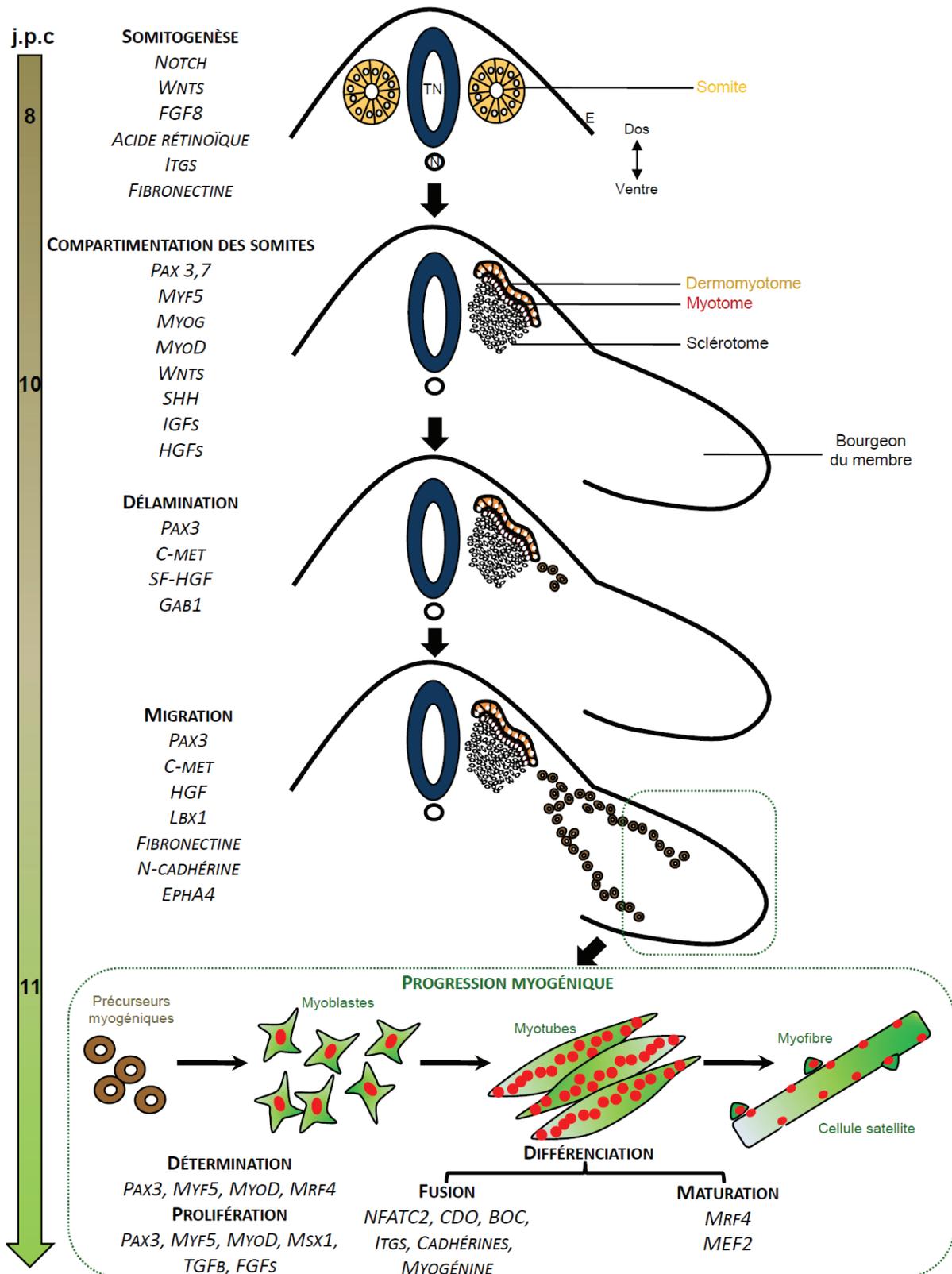


Figure 5. Représentation schématique de la myogenèse squelettique du membre chez les Vertébrés.

La myogenèse se déroule en plusieurs étapes pour obtenir les myofibres contractiles à partir des cellules initialement présentes dans les somites. Chacune de ces étapes fait intervenir plusieurs acteurs. Les principaux gènes et voies de signalisation correspondants, également cités dans la suite de cet exposé, sont notés en italique. E, Ectoderme ; N, Notochorde ; TN, Tube Neural.

a. Formation des somites

Chez les Vertébrés, les muscles squelettiques du tronc et des membres de l'embryon dérivent de précurseurs initialement contenus dans les somites (Christ, B. et Ordahl, C.P. 1995). La somitogenèse est donc un prérequis indispensable à la myogenèse. Les somites sont des structures épithéliales transitoires dérivant du mésoderme paraxial. Ils se forment par paires, selon une progression antéro-postérieure, de chaque côté du tube neural et de la notochorde en formation (Figure 6).

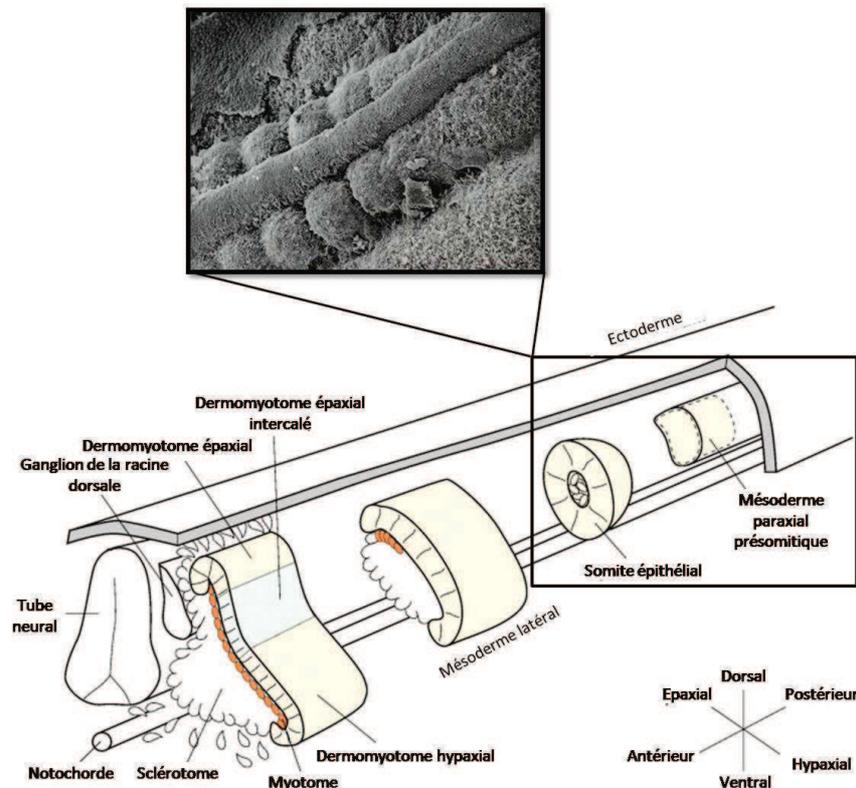


Figure 6. Représentation schématique et micrographie de la somitogenèse chez les vertébrés.

Les somites se forment à partir du mésoderme paraxial, de part et d'autre du tube neural et de la notochorde suivant un axe antéro-postérieur. Les somites donnent ensuite naissance au mésoderme qui se régionalise à son tour (dermomyotome, myotome, sclérotome) (Représentation schématique, d'après Buckingham, M., *et al.* 2003). La micrographie par balayage électronique montre des somites bien formés et du mésoderme paraxial (en haut à droite) qui n'est pas encore séparé en somites distincts (mésoderme présomitique). Le tube neural est bien visible entre les somites. (D'après Gilbert, S.F. 2000).

Les somites sont des structures sphériques avec une cavité centrale, le somitocoele. Chaque somite est entouré par une couche épaisse de matrice extracellulaire (MEC) qui le connecte aux structures adjacentes (Figure 7).

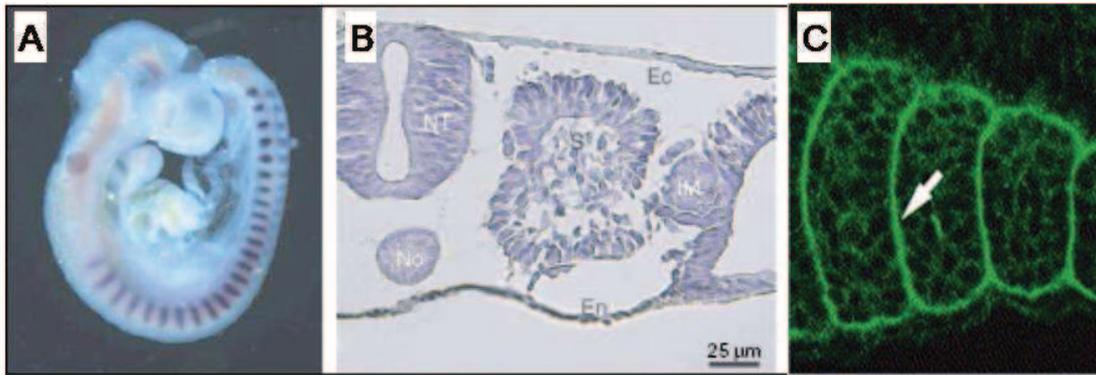


Figure 7. Les somites.

A. Hybridation *in situ* sur un embryon entier de souris âgé de 9,5 jours post-coïtum (p.c.) en vue latérale. La sonde utilisée est dirigée contre le gène *Uncx1.1*, qui est exprimé dans la région caudale du somite. (D'après Gridley, T. 2006). **B.** Section transversale d'embryon de poulet illustrant le caractère épithélial du somite (juste après sa formation). Des cellules pseudo-stratifiées entourent le lumen central, le somitocœle (s). A ce stade, le somite est limité par plusieurs formations qui l'entourent : le tube neural (NT), l'ectoderme (Ec), l'endoderme (En), et le mésoderme intermédiaire (IM). (D'après Kalcheim, C. et Ben-Yair, R. 2005). **C.** Micrographie confocale en vue latérale d'un embryon de poisson zèbre. La fibronectine, apparaissant en vert (flèche), est utilisée pour marquer la MEC, qui entoure les somites. (D'après Henry, C.A., *et al.* 2005).

La formation des somites chez le poisson zèbre, le Xénope, le poulet et la souris dépend notamment d'interactions entre les cellules du mésoderme présomitique et des molécules de la MEC (George, E.L., *et al.* 1993, Georges-Labouesse, E., N., *et al.* 1996, Julich, D., *et al.* 2005, Kragtorp, K.A. et Miller, J.R. 2006, Rifès, P., *et al.* 2007, Winklbauer, R. et Keller, R.E. 1996). Les fibres de collagène de la MEC ancrent les somites en formation aux tissus environnants et les stabilisent (Lipton, B.H. et Jacobson, A.G. 1974a, Lipton, B.H. et Jacobson, A.G. 1974b). En effet, l'absence de collagène fibrillaire chez les embryons de poulet et de souris résulte en une somitogenèse anormale, avec un défaut dans le nombre et la morphologie des somites (Chernoff, E.A.G., *et al.* 2001). La fibronectine, autre composant de la MEC, est également impliquée. Cette glycoprotéine a pour récepteur cellulaire l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$, un dimère protéique transmembranaire. Les extrémités N-terminales extracellulaires de chacune des sous-unités α et β s'associent pour former un domaine de liaison à la MEC. Les extrémités C-terminales intracellulaires interagissent avec le cytosquelette et des molécules de signalisation (Zhao, Y., *et al.* 2008). Chez la souris, les embryons dont le gène de la fibronectine 1 ou celui de la sous-unité $\alpha 5$ de l'intégrine est invalidé ne forment pas de somites, malgré la présence de mésoderme paraxial (George, E.L., *et al.* 1993, Georges-Labouesse, E., N., *et al.* 1996, Yang, J.T., *et al.* 1999). Une conséquence de l'absence de ce type d'interaction, outre le mauvais ancrage des cellules, serait la perte de signalisations spécifiques. Ainsi, la molécule de signalisation FAK (Focal Adhesion Kinase) est activée par

des interactions intégrines-MEC. Or, cette kinase semble requise pour la somitogenèse chez la souris puisque les embryons qui en sont dépourvus présentent des anomalies dans le développement du mésoderme (Furuta, Y., *et al.* 1995).

En plus de ces acteurs, un important mécanisme de régulation spatiale et temporelle orchestre la somitogenèse (Figure 8). Ce mécanisme est décrit par le modèle « clock and wavefront » (Cooke, J. et Zeeman, E.C. 1976), dans lequel un gradient d'expression de gènes, comme *FGF8*, définit une zone de segmentation du mésoderme tandis que des oscillations spatio-temporelles de l'expression d'autres gènes, appartenant en particulier aux voies de Notch et des Wnts, permettent de spécifier l'emplacement et la taille du futur somite (Gomez, C. et Pourquié, O. 2009) (Figure 8).

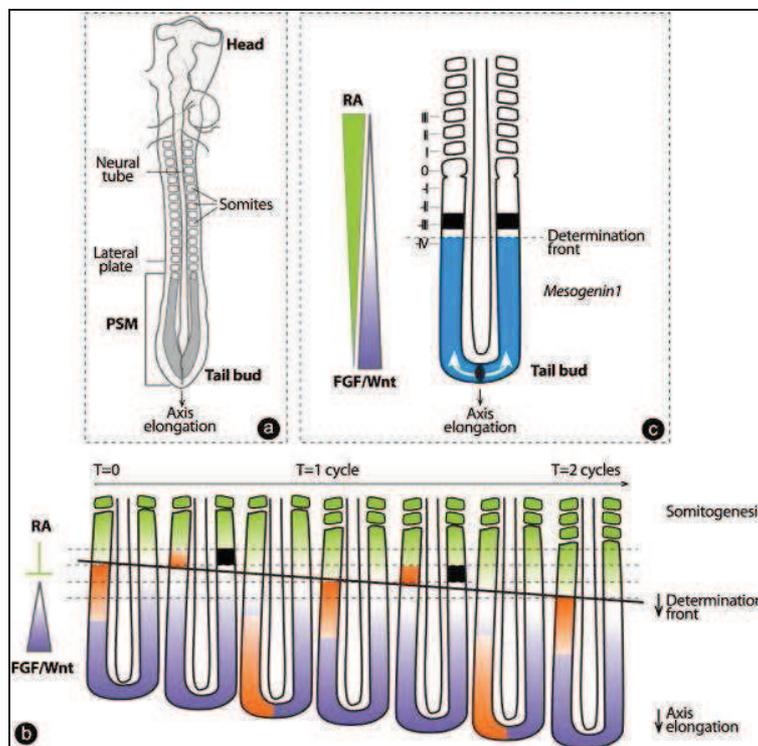


Figure 8. La somitogenèse : modèle "Clock and Wavefront".

a. Représentation schématique de la formation des somites chez un embryon de poulet à 2 jours de développement. **b.** Séquences temporelles accompagnant la formation de 2 somites. L'horloge de segmentation correspond à des vagues périodiques de transcription de gènes (en orange, côté gauche) dans le mésoderme présomitique au cours de la formation de chaque somite. Le front de détermination est fixé par les gradients d'expression antagonistes de Wnt /FGF (violet) et RA (vert). Les cellules ayant passé ce front de détermination activent l'expression de gènes de segmentation (noir). **c.** Le front de détermination (pointillés horizontaux) est engendré par les activités antagonistes des gradients FGF/Wnt (violet) et RA (vert) et peut être localisé à la limite antérieure du domaine d'expression du gène *Mésogénine1* (bleu). Les chiffres romains correspondent aux somites et à leurs précurseurs. PSM, presomitic mesoderm; RA, retinoic acid. (D'après Gomez, C. et Pourquié, O. 2009).

L'acide rétinoïque joue aussi un rôle important dans la segmentation du mésoderme présomitique, puisqu'un gradient d'acide rétinoïque aurait un effet antagoniste à FGF8 (Diez del Corral, R., *et al.* 2003). Une fois établis, seuls les somites ont la capacité de former du muscle squelettique, cette compétence étant acquise au cours de leur compartimentation, elle-même contrôlée par les signaux émanant des structures environnantes.

b. Compartimentation des somites et acquisition de l'identité myogénique

Les cellules des somites nouvellement formés sont multipotentes et, en plus du lignage myogénique, elles sont à l'origine de plusieurs types cellulaires. Leur destinée est orientée en réponse à des signaux émis ou exposés par les cellules des structures environnantes que sont le tube neural, la notochorde, l'ectoderme dorsal et le mésoderme latéral (Bryson-Richardson, R.J. et Currie, P.D. 2008, Buckingham, M. 2001, Christ, B. et Brand-Saberi, B. 2002). Ces signaux permettront la maturation et la différenciation des somites dans une orientation dorso-médiane et ventrolatérale. Parmi ces signaux, les protéines Wnts, FGFs, IGFs, Shh, TGFs et BMPs, contrôlent la destinée des cellules somitiques notamment en favorisant ou en inhibant la myogenèse (Figure 9).

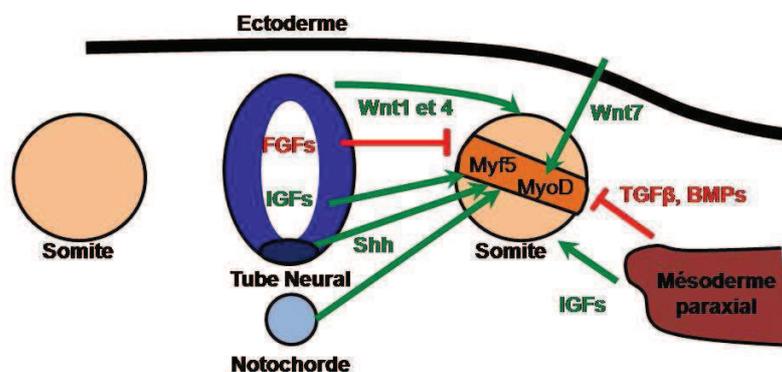


Figure 9. Signaux contrôlant la détermination des cellules somitiques en progéniteurs musculaires.

Les somites reçoivent de nombreux signaux régulateurs de la myogenèse émanant des structures environnantes (tube neural, notochorde, mésoderme, ectoderme). Ces signaux inhibent (FGFs, TGF β , BMPs, rouge), ou favorisent (Wnt1,4,7, Shh, IGFs, vert) la détermination des cellules somitiques en progéniteurs musculaires.

Cette compartimentation des somites (Figure 10) conduit à la formation du sclérotome en partie ventrale, à l'origine des vertèbres, des côtes, des tendons et des méninges (Yusuf, F. et

Brand-Saberi, B. 2006). La partie dorsale du somite correspond au dermomyotome. Elle abrite les précurseurs cellulaires de la lignée dermique et de la lignée myogénique (Buckingham, M., *et al.* 2003). Le dermomyotome est caractérisé par l'expression spécifique des gènes *Pax3* et *Pax7* (Jostes, B., *et al.* 1990, Williams, B.A. et Ordahl, C.P. 1994).

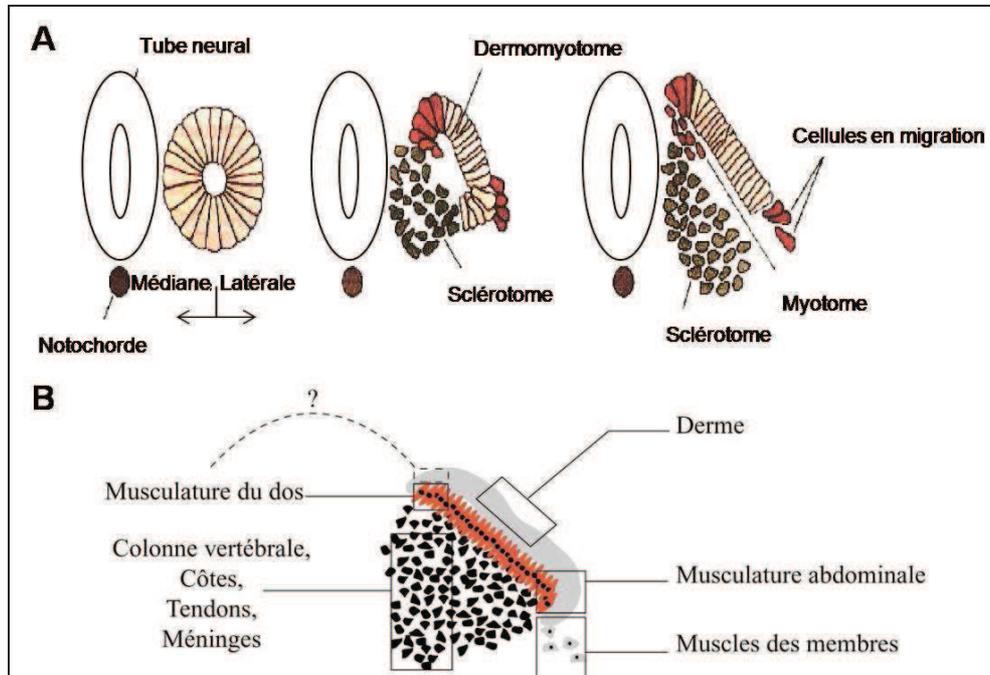


Figure 10. Devenir des cellules somitiques chez les mammifères.

A. Représentation schématique de coupes transversales d'embryon. Les somites se compartimentent en sclérotome et dermomyotome. Des cellules se décrochent ensuite de la bordure dorso-médiane du dermomyotome et migrent sous celui-ci pour former le myotome. D'autres se détachent de la bordure ventro-latérale. Elles seront à l'origine des muscles des membres. Leur migration est contrôlée par *Pax3*, *c-met*, *Lbx1* et *SF/HGF*. **B.** Les tissus engendrés par la compartimentation des somites sont à l'origine de différents lignages cellulaires, parmi lesquels le lignage myogénique. Le dermomyotome (gris), le myotome (rouge) et le sclérotome (noir) donneront naissance aux muscles et aux structures indiquées sur la figure. L'origine des muscles du dos est aujourd'hui controversée. (D'après Audfray, A. 2008).

Le dermomyotome se régionalise à son tour (Figure 10). Le dermomyotome dorsomédian donne naissance aux muscles épaxiaux (ou primaxiaux) dont les muscles profonds du dos. Le dermomyotome ventrolatéral donne naissance aux muscles hypaxiaux (ou abaxiaux) incluant la musculature des membres et de l'abdomen (Christ, B. et Ordahl, C.P. 1995, Dietrich, S., *et al.* 1999, Li, W.-C., *et al.* 2005). La première masse musculaire à se former, sous le dermomyotome, est le myotome (Figure 10). Il comprend des composantes épaxiale et hypaxiale qui seront plus tardivement intégrées dans la musculature du tronc (Tajbakhsh, S. et Buckingham, M. 2000). Cependant, une incertitude existe aujourd'hui quant

à l'origine de la musculature dorsale qui, pour certains auteurs, proviendrait uniquement de précurseurs du dermomyotome (Biressi, S., *et al.* 2007, Shih, H.P., *et al.* 2008). Les muscles appendiculaires et abdominaux, comme les muscles hypoglossaux de la langue et le diaphragme, dérivent donc de précurseurs appartenant au dermomyotome ventro-latéral (Alvares, L.E., *et al.* 2003, Dietrich, S., *et al.* 1999, Dietrich, S., *et al.* 1998).

c. Détachement et migration des progéniteurs musculaires

Les précurseurs myogéniques exprimant *Pax3/Pax7* se détachent de la bordure hypaxiale du dermomyotome ventro-latéral et migrent vers les bourgeons des membres. La délamination et la migration de ces cellules est un processus contrôlé par l'expression de nombreux facteurs. La migration des cellules peut notamment être induite de façon ectopique en greffant du mésoderme de bourgeon de membre au niveau du flanc d'un embryon aviaire, une région qui ne fournit normalement pas de cellules musculaires au membre (Hayashi, K. et Ozawa, E. 1995). Un des mécanismes moléculaires impliqués correspond à l'interaction entre le récepteur à activité tyrosine kinase *c-met* des cellules du dermomyotome et son ligand SF/HGF produit par les cellules mésenchymateuses des bourgeons des membres (Bladt, F., *et al.* 1995). En effet, la mutation des gènes *c-met* et *SF/HGF* résulte en une absence complète de muscles au niveau des membres, du diaphragme et de la langue chez la souris (Bladt, F., *et al.* 1995). De plus, l'absence de *Gab1*, un autre ligand de *c-Met*, réduit le détachement des cellules et provoque des malformations musculaires. Il a également été démontré que le ligand SF/HGF induisait la dissociation de cellules épithéliales en culture (Maulik, G., *et al.* 2002). L'interaction *c-Met*-SF/HGF permettrait donc le détachement des progéniteurs musculaires du dermomyotome et en conséquence leur migration. Le gène *c-met* est lui-même sous le contrôle de *Pax3*, exprimé fortement dans la partie latérale du dermomyotome. *Pax3* contrôlerait donc la délamination et la migration des précurseurs musculaires en activant *c-met* (Epstein, J.A., *et al.* 1996, Tajbakhsh, S., *et al.* 1997, Williams, B.A. et Ordahl, C.P. 1994, Yang, X.M., *et al.* 1996).

Lbx1 est un facteur de transcription à homéodomaine également impliqué dans la migration des cellules myogéniques. Il est exprimé exclusivement dans le dermomyotome latéral au niveau des sites de détachement et dans les précurseurs musculaires en migration (Dietrich, S., *et al.* 1998, Jagla, K., *et al.* 1995). Son expression est induite avant la délamination des cellules puis elle diminue lors de la différenciation myogénique (Mennerich,

D., et al. 1998). Cette fonction a été mise en évidence chez des souris mutées pour *Lbx1*, les précurseurs cellulaires se détachant des bordures latérales du dermomyotome tout en étant incapables de migrer vers les bourgeons des membres (Brohmann, H., et al. 2000, Gross, M.K., et al. 2000, Schafer, K. et Braun, T. 1999). L'expression de *Lbx1* serait elle aussi sous le contrôle de *Pax3*, puisque aucun transcrite de ce gène n'est détectable dans des souris invalidées pour le gène *Pax3* (Dietrich, S., et al. 1999, Mennerich, D., et al. 1998). Toutefois, des données plus récentes suggèrent aussi que *Lbx1* pourrait être activé de façon indépendante (Buckingham, M., et al. 2003). D'autres acteurs agissent sur la migration des précurseurs musculaires comme la fibronectine qui permettrait la migration des précurseurs dans les espaces intercellulaires (Brand-Saberi, B., et al. 1993). La glycoprotéine d'adhésion cellulaire N-cadhérine serait impliquée à la fois dans la migration et, comme nous le verrons plus tard, dans la différenciation des myoblastes. Elle est fortement exprimée dans le dermomyotome, dans les cellules précurseurs en migration et plus modérément dans les cellules mésenchymateuses des zones myogéniques (Brand-Saberi, B., et al. 1996). Le récepteur tyrosine kinase EphA4 est également fortement exprimé au niveau des zones de détachement des précurseurs musculaires et dans les cellules en migration (Corina, S., et al. 2001). Des études chez le poulet suggèrent que l'interaction de EphA4 et son ligand ephrin-A5 guiderait les cellules vers les territoires appropriés dans le membre (Swartz, M.E., et al. 2001).

La migration des précurseurs musculaires est ainsi une étape précoce de la myogenèse. Son importance est soulignée par les nombreux facteurs qui la régulent, qu'ils soient génétiques ou structuraux. Ainsi le récepteur c-met et ses ligands, et le facteur de transcription *Lbx1*, sont des acteurs cruciaux du détachement et de la migration des précurseurs musculaires. Dans ce cadre, *Pax3* serait un élément clé, en orchestrant leurs expressions. La MEC est aussi un élément indispensable, par l'intermédiaire de ses composants, comme la fibronectine. Enfin, les interactions cellulaires jouent également des rôles prépondérants, comme l'indiquent les études menées sur la N-cadhérine et le récepteur EphA4. Une fois leur migration effectuée, les précurseurs vont subir toute une série d'étapes de différenciation afin de progresser vers la fibre musculaire.

d. Progression myogénique

L'une des étapes cruciales de la myogenèse est la différenciation des myoblastes. Ce processus implique au préalable une phase de prolifération intensive des précurseurs musculaires dans les bourgeons des membres, suivie d'une sortie du cycle cellulaire. Ils

s'alignent alors et interagissent pour fusionner en myotubes multinucléés. La différenciation se poursuit par la maturation des myotubes en fibres musculaires fonctionnelles, elles-mêmes associées aux cellules satellites dont l'activation permet la régénération musculaire. La différenciation des cellules musculaires se déroule au cours de deux phases, la myogenèse primaire et secondaire. Ce sont ces différentes étapes qui sont présentées ici, ainsi que le rôle des MRFs dans la progression myogénique puisqu'ils constituent en effet des acteurs essentiels.

i Les MRFs, acteurs centraux de la différenciation myogénique

Arrivés au niveau des futures masses musculaires, les précurseurs musculaires vont proliférer puis l'activation du programme myogénique permettra leur fusion en myotubes et la maturation de ces derniers pour former les fibres musculaires. Ces différentes étapes dépendent de réseaux de facteurs de transcription, parmi lesquels les facteurs de régulation myogéniques (MRFs). Ces facteurs font partie de la super-famille des facteurs de transcription à domaine bHLH (basic-Helix-Loop-Helix) (Figure 11) (Olson, E.N. et Klein, W.H. 1994, Rudnicki, M.A. et Jaenisch, R. 1995, Weintraub, H., *et al.* 1991). Les MRFs comportent les protéines MyoD (Davis, R.L., *et al.* 1987), Myf5 (Braun, T., *et al.* 1989), Myogénine (Edmondson, D.G. et Olson, E.N. 1989) et Mrf4/Myf6/Herculin (Rhodes, S.J. et Konieczny, S.F. 1989). Ce sont des facteurs spécifiques du muscle squelettique. Le gène *MyoD* a été isolé le premier (Davis, R.L., *et al.* 1987), sa découverte étant liée à sa capacité à convertir des fibroblastes en cellules myogéniques. Par la suite, les trois autres MRFs ont été découverts, tous capables d'induire une conversion myogénique quand ils sont surexprimés dans différentes lignées cellulaires. Les MRFs sont donc capables d'initier le programme myogénique du fait de leur capacité à convertir des cellules non musculaires en cellules musculaires *in vitro* (Weintraub, H., *et al.* 1991), mais également *in vivo* (Santerre, R.F., *et al.* 1993).

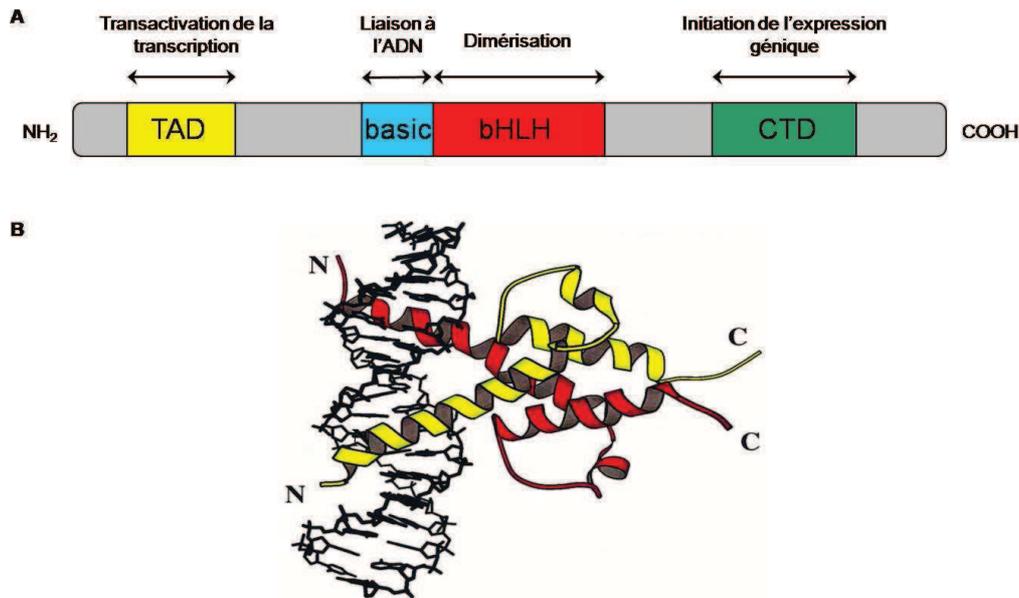


Figure 11. Représentation schématique d'un facteur à domaine bHLH.

A. En partie N-terminale, un domaine de transactivation est présent (TAD : Transactivation Amino-terminal Domain). Le domaine bHLH (Basic Helix-Loop-Helix) permet l'homo- ou l'hétérodimérisation avec d'autres facteurs à domaine HLH. Ce domaine est constitué de deux hélices α , dont la partie basique permet la fixation aux boîtes E (E-box) présentes dans les séquences promotrices de nombreux gènes. Le domaine C-terminal (CTD : C-terminal Domain) confère l'activité spécifique pour initier l'expression des gènes musculaires endogènes dans le cas des MRFs. **B.** Exemple de liaison d'un facteur bHLH à l'ADN. Ici le facteur est lié en tant qu'homodimère (molécules rouge et jaune). Cet homodimère peut se lier à l'ADN en reconnaissant la séquence consensus CANNTG (boîte E) des promoteurs de plusieurs gènes spécifiques du muscle squelettique. Chaque molécule comporte deux hélices séparées par une longue boucle qui contient également une région hélicoïdale. (D'après Shimizu, T., *et al.* 1997).

La région basique de ces facteurs (Figure 11) permet leur fixation à l'ADN, au niveau de la séquence consensus CANNTG, appelée boîte E (E-box), présente dans les promoteurs de plusieurs gènes spécifiques du muscle squelettique (Lassar, A.B., *et al.* 1989, Olson, E.N. et Klein, W.H. 1994, Sabourin, L.A. et Rudnicki, M.A. 2000). Le domaine bHLH des MRFs permet l'hétérodimérisation avec d'autres facteurs à domaine HLH, favorisant ou inhibant ainsi leur liaison à l'ADN (Blackwell, T.K. et Weintraub, H. 1990, Murre, C., *et al.* 1989, Olson, E.N. et Klein, W.H. 1994). En conséquence, les MRFs sont capables, avec des efficacités différentes, d'activer la transcription par hétérodimérisation avec des protéines E, qui sont exprimées de façon ubiquitaire et se fixent sur les boîtes E, comme par exemple les facteurs E12, E47 ou E2-5 (Lassar, A.B., *et al.* 1989, Shirakata, M., *et al.* 1993).

Les gènes codant les MRFs ont chacun un profil d'expression temporelle particulier (Figure 12). Des expériences d'hybridation *in situ* chez la souris ont montré que, dans le dermomyotome, *Myf5* était le premier gène à être transcrit, vers 8 jours post-coïtum (j.p.c.) avant d'être sous-exprimé après 14 j.p.c. (Ott, M.O., *et al.* 1991). L'activation de la

myogénine est observée à 8,5 j.p.c., suivie par celle de MyoD vers 10,5 j.p.c. (Sassoon, D., *et al.* 1989). L'expression de *Mrf4* est biphasique, avec une première période d'expression entre 9 et 12 jours j.p.c., puis une nouvelle expression après la naissance (Berkes, C.A. et Tapscott, S.J. 2005, Bober, E., *et al.* 1991). Dans le bourgeon du membre, *Myf5* est de nouveau le premier MRF à être exprimé, mais de façon transitoire, entre 10 et 12 j.p.c. Son expression est suivie de la co-expression de *myogénine* et *MyoD*, après 10,5 j.p.c. et *Mrf4* après 16 j.p.c. dans les fibres musculaires en maturation (Berkes, C.A. et Tapscott, S.J. 2005, Bober, E., *et al.* 1991, Ott, M.O., *et al.* 1991, Sassoon, D., *et al.* 1989).

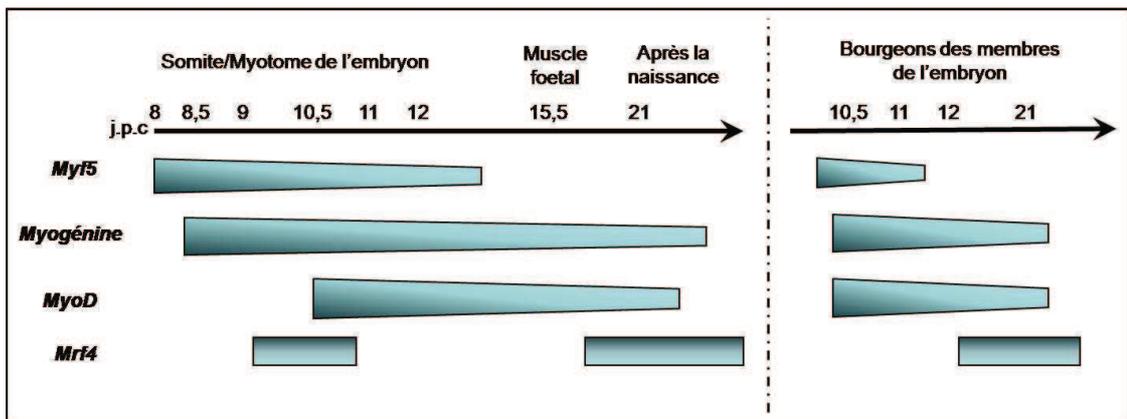


Figure 12. Représentation schématique de l'expression des MRFs au cours du développement musculaire murin.

Des expériences d'hybridation *in situ* sur des embryons murins ont permis de déterminer les profils d'expression temporelle des transcrits correspondants dans les somites et les bourgeons des membres. (D'après Buckingham, M. 1992, Loriol, C. 2006).

ii Détermination myogénique par les MRFs

Chez les mammifères, les myoblastes sont issus du mésoderme. Ce feuillet embryonnaire est la source de plusieurs types cellulaires, parmi lesquels les myoblastes squelettiques, les adipocytes et les chondrocytes (Cornelius, P., *et al.* 1994, Taylor, S.M. et Jones, P.A. 1979, Watt, F.M. 1991). Deux phases se distinguent dans la différenciation de précurseurs mésodermiques pluripotents (Hu, E., *et al.* 1995, Sager, R. et Kovac, P. 1982, Weintraub, H., *et al.* 1991). La première est la détermination cellulaire au cours de laquelle la cellule devient unipotente. La seconde est la différenciation terminale, la cellule devenant une cellule spécialisée fonctionnelle. *In vivo*, il existe souvent une relation inverse entre le développement du muscle squelettique et celui du tissu adipeux du fait de l'origine commune des précurseurs. Par exemple, lors de la dystrophie musculaire de Duchenne, la perte de myofibrilles s'accompagne d'une expansion de la masse adipeuse dans le muscle (Anderson,

M.S. et Kunkel, L.M. 1992). Un remplacement similaire de la masse musculaire par des cellules adipeuses est retrouvé chez des embryons murins « K.O. » pour les gènes *Myf5* et *MyoD* (Rudnicki, M.A., *et al.* 1993). *In vitro*, des adipocytes murins transfectés par *MyoD* présentent un phénotype musculaire, avec expression de protéines musculaires comme la myosine, ou présentent des goutellettes lipidiques, mais jamais les deux. La présence de graisse semble être incompatible avec celle de la myosine, les programmes de développement du muscle squelettique et du tissu adipeux seraient donc mutuellement exclusifs (Weintraub, H., *et al.* 1989). Toutefois, dans certaines conditions, les cellules C2C12 peuvent par exemple subir un mécanisme de transdifférenciation. Dans ce cas, la formation des myotubes est stoppée, l'expression de marqueurs spécifiques du muscle inhibée, tandis qu'en parallèle un programme de différenciation adipogénique est mis en place (Grimaldi, P.A., *et al.* 1997). Les myoblastes C2C12 peuvent également suivre un tout autre destin. Un traitement avec la protéine BMP-2 (Bone Morphogenic Protein 2) entraîne en effet un changement de la voie de différenciation musculaire des myoblastes vers celle des ostéoblastes, montrant le caractère pluripotent de ces cellules (Katagiri, T., *et al.* 1994, Kim, B.-G., *et al.* 2009). Ainsi, les myoblastes constituent une population cellulaire présentant une certaine plasticité quant aux destins qu'elle peut suivre, ce qui souligne l'importance des MRFs, les acteurs de la détermination myogénique.

Au cours de la myogenèse, les précurseurs musculaires migrent à partir du dermomyotome vers les bourgeons des membres. Ce n'est que lorsqu'ils atteignent cette destination qu'ils commencent à transcrire à la fois *Myf5* et *MyoD* (Tajbakhsh, S. et Buckingham, M.E. 1994). L'expression de *Myf5* et *MyoD* est une étape clé dans l'engagement des cellules dans le lignage myogénique, puisque supprimer l'expression de ces deux gènes résulte en l'absence de myoblastes squelettiques dans les embryons de souris (Rudnicki, M.A., *et al.* 1993). Les animaux correspondants, immobiles, meurent rapidement après leur naissance. Les fonctions associées à ces deux gènes semblent présenter un certain degré de redondance, puisque l'inactivation de *MyoD* ou de *Myf5* entraîne un développement musculaire apparemment normal. Toutefois, un examen plus poussé des embryons murins *Myf5*^{-/-} a permis de détecter de légers défauts dans la musculature du tronc, alors que chez les embryons *MyoD*^{-/-}, c'est le développement de la musculature des membres qui est retardé. Ces gènes contrôlent donc la spécification musculaire précoce des lignages épaxiaux et hypaxiaux (Kablar, B., *et al.* 1998). L'activation de ces deux gènes dépendrait de molécules de signalisation émises par les tissus environnants, comme les Wnts (Wnt7a) et Sonic Hedgehog (Buckingham, M. 2001). Pendant longtemps, les facteurs Myogénine et Mrf4 ont été

considérés comme agissant en aval de *Myf5* et *MyoD*, dans la différenciation en myotube et la formation des fibres musculaires, respectivement. Cependant une étude supplémentaire réalisée avec une série allélique de trois mutants *Myf5* a montré la présence de muscle squelettique en l'absence des facteurs *Myf5* et *MyoD* tant que l'expression de *Mrf4* n'est pas compromise. *Mrf4* est donc aussi capable d'induire la myogénèse (Kassar-Duchossoy, L., *et al.* 2004), ce qui est en accord avec son profil d'expression biphasique. Par ailleurs, les mutants *Mrf4* présentent une baisse très importante du niveau d'expression de *Myf5* (Arnold, H.H. et Braun, T. 1996), soulignant un rôle précoce dans la détermination des myoblastes. (Figure 13).

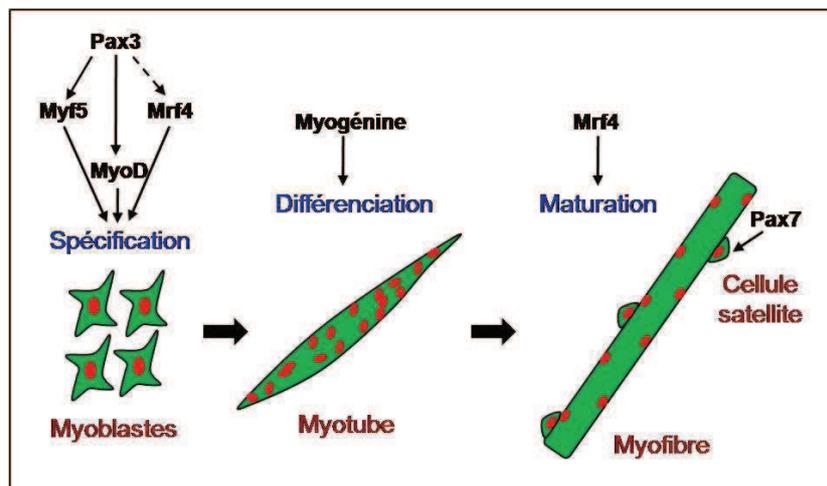


Figure 13. Expression et relations hiérarchiques des MRFs au cours de la myogénèse.

Les facteurs Pax3, *Myf5* et *Mrf4* activent *MyoD*. *Myf5*, *Mrf4* et *MyoD* peuvent agir en tant que gènes de détermination, alors que la myogénine est nécessaire à la différenciation des myoblastes déterminés en myotubes, et *Mrf4* est impliqué dans la formation des myofibres. Pax7 est nécessaire à la spécification des cellules satellites.

iii Prolifération des myoblastes

Avant que le muscle squelettique ne se forme, les précurseurs musculaires subissent une étape de prolifération intensive afin de suivre le rythme de la croissance embryonnaire et de générer un nombre suffisant de cellules musculaires pour la formation des muscles, les fibres musculaires complètement différenciées ne se divisant pas. De nombreux facteurs sont impliqués dans la régulation de cette étape. Différentes intégrines et facteurs de croissance présents dans l'environnement cellulaire illustrent cette diversité. Chez le poulet, la caille et la souris, il a été démontré que la nature de la sous-unité α des intégrines membranaires régulerait la prolifération des myoblastes. De même, le taux d'expression de l'intégrine impliquée pourrait également être essentiel à la décision des cellules de proliférer ou de se

différencier (Liu, J., *et al.* 2008, Menko, A.S. et Boettiger, D. 1987, Sastry, S.K., *et al.* 1996). Les intégrines se regroupent en effet au niveau des points focaux d'adhésion et permettent de relier et d'ancrer la cellule à la MEC (Berthier, C. et Blaineau, S. 1997). Or l'adhésion des cellules musculaires aux composants de la MEC influence la prolifération (McDonald, K.A., *et al.* 1995). Tout un ensemble de facteurs de transcription sont aussi acteurs de ce processus. Chez la souris, Myf5 et MyoD, exprimés dans les cellules musculaires en prolifération, interviendraient probablement dans la régulation du cycle cellulaire (Kitzmann, M. et Fernandez, A. 2001). Pax3, directement et *via* l'activation de *c-met*, serait impliqué dans le maintien de la phase proliférative (Buckingham, M., *et al.* 2003). Le facteur à homéodomaine Msx1, qui est présent dans les précurseurs en migration, réprime la différenciation musculaire et permet donc de conserver la division de myoblastes en culture (Houzelstein, D., *et al.* 1999). Son rôle d'activateur de la prolifération a également été démontré par sa surexpression dans des cellules musculaires différenciées qui provoque leur retour à un état prolifératif (Odelberg, S.J., *et al.* 2000). Parmi les facteurs de croissance, les TGF β sont capables d'inhiber, de façon dose-dépendante, l'expression de tous les marqueurs principaux de la différenciation myogénique et de stimuler la prolifération des cellules (Florini, J.R., *et al.* 1991). Ils peuvent également maintenir les myoblastes dérivés de culture primaire dans un état prolifératif et indifférencié (Brand-Saberi, B. et Christ, B. 1999). La signalisation par les récepteurs FGF favoriserait elle aussi la prolifération des myoblastes (Edom-Vovard, F., *et al.* 2001) de même que leur migration vers les bourgeons des membres (Webb, S.E., *et al.* 1997). FGF2, 4 et 6 sont ainsi impliqués dans la prolifération des myoblastes (Brand-Saberi, B. et Christ, B. 1999). Toutefois, FGFR1 est impliqué dans la prolifération et il est capable d'induire la différenciation (Templeton, T.J. et Hauschka, S.D. 1992). FGFR4, probablement avec FGF8 comme ligand, est nécessaire quant à lui à l'arrêt de la prolifération des myoblastes, qui est alors immédiatement suivie de l'expression des gènes musculaires (Marics, I., *et al.* 2002). Ces dernières données soulignent la relation étroite entre les phases de prolifération et de différenciation de la cellule musculaire (Figure 14).

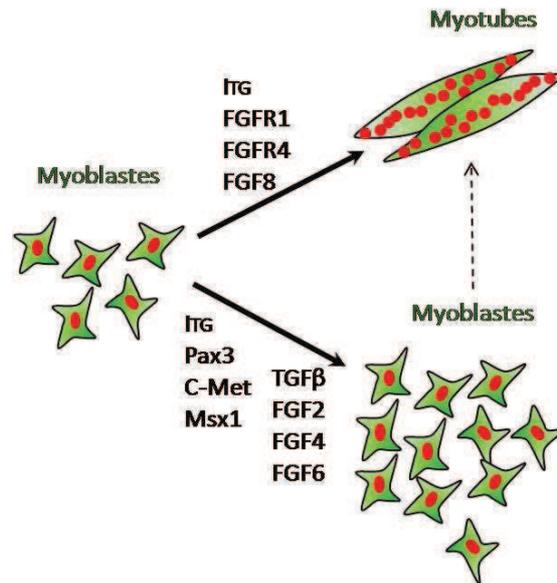


Figure 14. Exemples de facteurs impliqués dans la prolifération et la différenciation des myoblastes.

De nombreux facteurs sont impliqués dans la prolifération et la différenciation des myoblastes, et parfois l'équilibre entre ces deux processus est fragile, ils sont en effet étroitement liés dans le cadre de la myogenèse. Ainsi des facteurs de même famille peuvent jouer des rôles opposés.

iv Arrêt de la prolifération et levée de l'inhibition de la différenciation

La différenciation musculaire débute quand les myoblastes en prolifération sortent du cycle cellulaire et commencent à synthétiser des protéines spécifiques du muscle. Au sein des masses pré-musculaires, au début de la différenciation, un équilibre entre prolifération et différenciation est établi. La décision de savoir si les myoblastes doivent continuer de proliférer ou s'engager dans la voie de différenciation est régulée par la balance entre les régulateurs positifs ou négatifs du cycle cellulaire (Walsh, K. et Perlman, H. 1997). La sortie du cycle cellulaire est contrôlée par l'expression des gènes *Cdkn1a* (*p21*) et *Cdkn1c* (*p57*) (Zhang, P., *et al.* 1999). Ce sont des inhibiteurs de kinases dépendantes de la cycline (CKI). Ces deux CKI activent la protéine Rb, qui est phosphorylée et inactivée par les kinases dépendante de la cycline (CDK). La forme hypophosphorylée de Rb facilite de façon générale la différenciation cellulaire, dont la myogenèse (Zacksenhaus, E., *et al.* 1996). De la même façon, de nombreuses autres cyclines et CDK ont un profil d'expression qui est modifié au cours de la transition d'un état de myoblastes en prolifération à celui de myocytes post-mitotiques (Tableau 2). MyoD est également impliqué dans la sortie du cycle cellulaire, en contrôlant l'expression de cyclines et de CKI, dont *p21* (Kitzmann, M., *et al.* 1998).

Tableau 2. Régulation du niveau d'expression des protéines du cycle cellulaire au cours de la différenciation myogénique.

Les protéines du cycle cellulaire sont différenciellement exprimées au cours de la différenciation myogénique. Ici l'expression de Cdkn1c (p57) n'a pas été étudiée et n'apparaît donc pas dans ce tableau. (D'après Walsh, K. et Perlman, H. 1997).

Type d'expression	Protéine
sous-exprimés	Cycline A
	Cycline D1
	Cycline D2
	cdc2
	cdk2
légèrement sous-exprimé	p19
	p107
inchangés	Cycline E
	cdk4
	cdk6
	E2F
	Rb
surexprimés	p16
	Cycline D3
	p130
	p18
	p21

La transition vers la différenciation est aussi marquée par la sous-expression et l'inactivation de régulateurs négatifs de la différenciation myogénique, tels que le gène *Gdf8* qui code la Myostatine, une protéine de la famille des TGF β (Jouliia-Ekaza, D. et Cabello, G. 2006). En effet, des mutations de ce gène augmentent la masse musculaire chez de nombreux mammifères (Grobet, L., *et al.* 1998, McPherron, A.C., *et al.* 1997, Schuelke, M., *et al.* 2004). D'autres gènes exercent aussi une inhibition de la différenciation. L'exemple de la famille des gènes codant les protéines à homéodomaine Six est notamment bien décrit. Chez les mammifères, six membres composent cette famille. La sous-expression de *Six1* dans des embryons de poulet peut induire l'expression de gènes spécifiques du muscle comme ceux codant la myogénine et la MyHC (Heanue, T.A., *et al.* 1999, Kawakami, K., *et al.* 2000). Toutefois, il a aussi été montré que des souris mutées pour *Six1* présentent un défaut de myogenèse, ce qui indique aussi un rôle positif de Six1 durant le développement du muscle *in vivo* (Laclef, C., *et al.* 2003). La voie de signalisation de Notch a également un rôle important dans l'engagement des cellules myogéniques dans le processus de différenciation puisque son activation inhibe la différenciation *via* l'inhibition de l'expression de la Myogénine et de MyoD (Kuroda, K., *et al.* 1999, Shawber, C., *et al.* 1996). Les myoblastes où la voie de Notch

est activée ne sortent pas du cycle cellulaire, ce qui permet le maintien d'une population de progéniteurs cellulaires qui constituent la source cellulaire majeure de la croissance musculaire foetale et postnatale. Ces progéniteurs forment ensuite, à la fin du développement foetal, les cellules souches du muscle mature ou cellules satellites, impliquées dans la croissance et la régénération du muscle adulte (Schuster-Gossler, K., *et al.* 2007, Vasyutina, E., *et al.* 2007).

v Activation du programme myogénique

Les MRFs sont au cœur de la régulation de la différenciation myogénique. Comme nous l'avons vu précédemment, les myoblastes qui sortent du cycle cellulaire expriment déjà les facteurs Myf5 et MyoD. La myogénine et Mrf4 sont ensuite activés pour agir dans la différenciation musculaire, chacun ayant des rôles bien spécifiques (Figures 13 et 15).

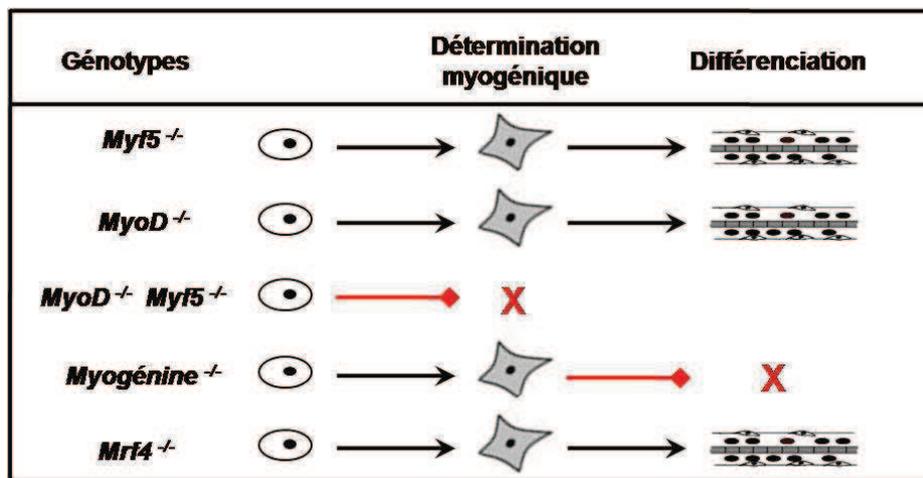


Figure 15. Résultats des invalidations des gènes MRFs chez la souris.

Une croix rouge indique un arrêt dans le processus de la myogenèse. (D'après Guernec, A., *et al.* 2003).

Il a ainsi été démontré que des souris dont le gène de la myogénine est invalidé ont des défauts de développement musculaire, dus à l'absence de myotubes. La myogénine jouerait donc un rôle crucial uniquement dans la différenciation terminale des myoblastes (Hasty, P., *et al.* 1993, Nabeshima, Y., *et al.* 1993). Absente avant l'induction de la différenciation, son expression augmente ensuite considérablement. En effet, le produit de ce gène n'est pas requis pour l'expression du gène de détermination *MyoD*, celui-ci étant normalement exprimé chez les souris mutantes *Myogénine^{-/-}* (Venuti, J.M., *et al.* 1995). Toutefois, alors que chacune des protéines MRFs peut initier la myogenèse *in vitro* quand elle est exprimée dans des cellules

non musculaires, la myogénine n'est pas aussi efficace que MyoD ou Myf5 pour initier l'expression de gènes spécifiques du muscle (Bergstrom, D.A. et Tapscott, S.J. 2001). La myogénine est donc indispensable à l'induction de la différenciation terminale des cellules musculaires, en aval des actions de Myf5 et MyoD (Figures 13 et 15).

Le facteur Mrf4 a été moins étudié que les autres MRFs mais son rôle dans la myogénèse semble être plus complexe. Comme nous l'avons vu précédemment, Mrf4 possède un profil d'expression biphasique, ce qui suggère des rôles potentiels à la fois dans la détermination musculaire et dans la différenciation terminale. De plus, il s'agit du facteur myogénique majoritairement exprimé dans la fibre musculaire adulte. Les transcrits de *Mrf4* s'accumulent uniquement dans les cellules en fin de différenciation, lorsque les gènes caractéristiques des fibres matures sont activés. L'expression de *Mrf4* serait donc nécessaire à la différenciation terminale des cellules musculaires (Tajbakhsh, S. et Buckingham, M. 2000, Valdez, M.R., *et al.* 2000). Des données sur son expression *in vivo* et *in vitro* ont suggéré un rôle dans la maturation des myocytes (Bober, E., *et al.* 1991). Les souris dont le gène *Mrf4* a été invalidé présentent en effet une diminution de l'expression de gènes spécifiques du muscle, comme par exemple celui de la chaîne lourde de la myosine embryonnaire dans les fibres rapides. Cependant, le phénotype de ces souris est très modéré par rapport à celui des mutants *myogénine*, et l'absence de Mrf4 pourrait être compensée par une augmentation du taux de myogénine (Zhang, W., *et al.* 1995). L'action des MRFs est complétée dans cette phase par des co-activateurs tels que les protéines E que nous avons décrites précédemment.

L'initiation de la différenciation est également marquée par l'expression de facteurs de la famille MEF2. Chez les vertébrés, quatre gènes appartiennent à cette famille : *mef2a*, *mef2b*, *mef2c* et *mef2d*. Les protéines correspondantes possèdent un motif MADS-box et un domaine MEF2 amino-terminal. Tout comme la myogénine, ces facteurs sont absents avant l'induction de la différenciation et leur expression augmente ensuite. Ils peuvent s'associer avec les facteurs myogéniques pour induire l'expression de gènes spécifiques du muscle et ainsi initier la différenciation terminale des myoblastes (Yun, K. et Wold, B. 1996). Ainsi, l'action des MRFs, de leurs co-activateurs, et des protéines MEF2 régule l'expression de protéines spécifiques de la différenciation terminale myogénique parmi lesquelles la créatine kinase musculaire (MCK), les sous-unités du récepteur à acétylcholine (AchR), ou encore les différentes myosines (Yun, K. et Wold, B. 1996).

vi Fusion des myoblastes en myotubes

Le processus de différenciation myogénique est aussi régulé, à de nombreuses étapes, par des molécules de signalisation extracellulaires, qui incluent des facteurs diffusibles, des composants de la MEC et des facteurs impliqués dans les contacts cellules-cellules. Ceci est d'autant plus marqué lors de l'étape de fusion des myoblastes, un processus qui, par définition, nécessite au préalable des contacts cellulaires. Avant la fusion, les myoblastes post-mitotiques s'alignent. Après reconnaissance et adhésion intercellulaires, les membranes plasmiques des myoblastes adjacents s'unissent puis fusionnent donnant naissance à des myotubes multinucléés (Wakelam, M.J. 1985). Les myotubes subiront ensuite une étape de maturation en fibres musculaires (Figure 13).

- Les interactions cellulaires

Pour fusionner, les myoblastes doivent atteindre une densité favorable aux contacts cellulaires. Ce phénomène est appelé « effet de communauté » (Gurdon, J.B., *et al.* 1993). Les facteurs qui modulent l'effet de communauté peuvent être aussi bien ancrés à la surface cellulaire que sécrétés. Ces facteurs ne sont pas connus chez les mammifères. Néanmoins, il existe des candidats décrits chez d'autres organismes. Par exemple, Chez le xénope, le eFGF constituerait un signal de communauté stimulant la différenciation. L'inhibition de cette étape empêche en effet la différenciation (Standley, H.J., *et al.* 2001).

Le contact cellulaire est évidemment important lors des phénomènes de fusion cellulaire (Krauss, R.S., *et al.* 2005). Durant les dernières années, plusieurs molécules d'adhésion cellulaires (CAM pour Cell Adhesion Molecule) ont été identifiées. Ces molécules « promyogéniques » appartiennent notamment aux familles des cadhérines, des immunoglobulines et des intégrines. Plusieurs cadhérines sont impliquées dans la régulation de la myogenèse (Wheelock, M.J. et Johnson, K.R. 2003). La N-cadhérine est exprimée tout au long de la myogenèse chez la souris, depuis le stade somites jusqu'au stade myofibres innervées, en passant par les myoblastes en fusion (Cifuentes-Diaz, C., *et al.* 1994, Linask, K.K., *et al.* 1998, Radice, G.L., *et al.* 1997). Sa neutralisation par des anticorps inhibe la différenciation de cellules musculaires aviaires et murines en culture (Charrasse, S., *et al.* 2002, George-Weinstein, M., *et al.* 1997, Knudsen, K.A., *et al.* 1990). De plus, l'expression de N-cadhérine exogène dans des fibroblastes BHK (Baby Hamster Kidneys), qui en sont dépourvus, entraîne l'expression de marqueurs musculaires et l'augmentation du taux de myosine (Redfield, A., *et al.* 1997). Cependant, des résultats obtenus *in vivo* indiquent que la

N-cadhérine ne serait pas essentielle pour la myogenèse, du fait probablement d'une compensation par d'autres cadhérines (Krauss, R.S., *et al.* 2005). Par exemple, les somites à 9 j.p.c de souris dépourvues de N-cadhérine sont capables d'exprimer la chaîne lourde de myosine spécifique du muscle (Radice, G.L., *et al.* 1997). De la même façon, les myoblastes obtenus à partir de souris hétérozygotes et sélectionnés en culture pour ne pas exprimer la N-cadhérine se différencient normalement (Charlton, C.A., *et al.* 1997). En effet, d'autres cadhérines comme les M- et R-cadhérines sont exprimées dans le myotome et dans les masses musculaires précoces (Moore, R. et Walsh, F.S. 1993, Rosenberg, P., *et al.* 1997). Ces cadhérines seraient également impliquées dans les interactions cellulaires. Des peptides ou des anticorps bloquant la capacité d'interaction de la M-cadhérine inhibent la formation de myotubes dans la lignée L6 de rat, un résultat similaire étant obtenu par l'utilisation d'ARNi spécifiques de ces ARNm (Zeschnick, M., *et al.* 1995). Dans des cultures primaires de myoblastes de rat, il a également été démontré que la M-cadhérine s'accumulait dans les zones de contact entre les myoblastes en fusion (Figure 16) (Wróbel, E., *et al.* 2007).

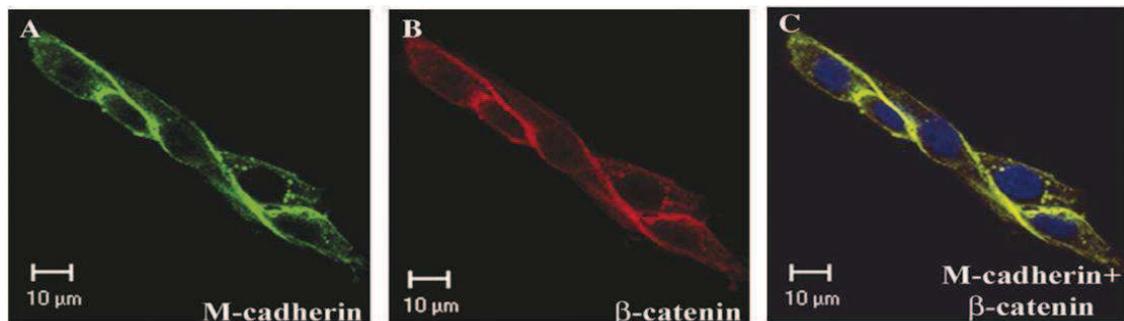


Figure 16. Distribution de la M-Cadhérine et de la β -caténine dans des myoblastes de rat en différenciation.

A. Immunolocalisation de la M-cadhérine (vert). **B.** Immunolocalisation de la β -caténine (rouge), protéine impliquée dans l'adhésion cellulaire. **C.** Immunolocalisation de la M-cadhérine et de la β -caténine, les noyaux sont marqués au DAPI. La M-cadhérine se complexe avec la β -caténine. Dans une culture primaire de myoblastes de rat, elles sont principalement localisées dans les zones de contact entre cellules, et dans une moindre mesure au niveau des feuillettes membranaires externes des myoblastes en fusion. (D'après Wróbel, E., *et al.* 2007).

Par ailleurs, une expression ectopique de la R-cadhérine dans des cellules ES dépourvues de E-cadhérine permet quand même la formation de muscle strié (Rosenberg, P., *et al.* 1997). Mais là encore, *in vivo*, les souris dépourvues de M- ou R-cadhérine sont viables et ne présentent pas de défauts dans le développement musculaire (Dahl, U., *et al.* 2002, Hollnagel, A., *et al.* 2002). Ce résultat était alors étonnant dans le cas de la M-cadhérine qui est la seule cadhérine classique spécifique du muscle. Là encore, une compensation par d'autres

cadhérines pourrait expliquer ce résultat (Hollnagel, A., *et al.* 2002, Moore, R. et Walsh, F.S. 1993).

Des protéines appartenant à la superfamille des immunoglobulines sont également impliquées dans la myogenèse. C'est le cas de Ncam1 dont la fonction dans les phénomènes d'adhésion neuronale est bien décrite (Seidler, D., *et al.* 2006). Il existe plusieurs isoformes de cette protéine, trois ayant été décrites dans le muscle : une isoforme à ancre GPI de 125kDa, et deux isoformes transmembranaires de 140 et 155 kDa (Walsh, F.S., *et al.* 1989). Dans le cadre de la myogenèse, il a été démontré chez la souris que l'isoforme de 125 kDa, qui possède un domaine spécifique du muscle (MSD), facilite la fusion des myoblastes (Suzuki, M., *et al.* 2003). La surexpression de certaines de ces isoformes dans les myoblastes de la lignée C2 favorise la sortie du cycle cellulaire et augmente la fusion des myoblastes (Dickson, G., *et al.* 1990, Peck, D. et Walsh, F.S. 1993). Il a également été démontré que Ncam1 se concentrait aux sites d'accolement des membranes cellulaires au cours de la myogenèse chez la souris et le poulet (Covault, J. et Sanes, J.R. 1986). *In vivo*, l'ARNm de *Ncam1* est présent dans les somites et son expression est régulée tout au long de la myogenèse (Lyons, G., E., *et al.* 1992), cette dernière étant d'ailleurs favorisée chez des souris exprimant un transgène de *Ncam1* (Fazeli, S., *et al.* 1996). Cependant, les souris « K.O. » pour *Ncam1* ne présentent pas là aussi de défaut significatif de la myogenèse (Charlton, C.A., *et al.* 2000, Cremer, H., *et al.* 1994, Rafuse, V.F., *et al.* 2000), ce qui suggère que Ncam1 ne jouerait qu'un rôle modéré dans la myogenèse ou que d'autres CAMs suppléeraient à sa fonction. Les récepteurs de surface de type CDO et BOC, autres molécules de la superfamille des immunoglobulines, participent également aux interactions cellulaires préalables à la fusion des myoblastes. La surexpression de ces molécules dans des lignées cellulaires myoblastiques accélère et augmente la différenciation, en favorisant l'expression de protéines spécifiques du muscle et la formation des myotubes (Kang, J.-S., *et al.* 2003, Kang, J.-S., *et al.* 1998, Kang, J.S., *et al.* 2002, Mulieri, P., J., *et al.* 2002). Ces récepteurs s'associent pour former un complexe transmembranaire. Par l'intermédiaire de cette structure, CDO stimulerait des facteurs myogéniques à domaine bHLH dont MyoD, Myf5 et la myogénine, en augmentant leur hétérodimérisation avec des protéines E (E12 et E47) (Cole, F., *et al.* 2004). Toutefois, chez les souris *cd0*^{-/-}, la myogenèse est retardée ce qui indique, par ailleurs, que CDO n'est pas essentiel pour le développement musculaire (Cole, F., *et al.* 2004). La néogénine, une autre protéine appartenant aux immunoglobulines, est un récepteur aux ligands de la famille de la nétrine (Kang, J.-S., *et al.* 2004). Les nétrines, surtout connues pour leur rôle de guidage des axones dans le tissu nerveux, sont des protéines sécrétées qui s'associent avec les membranes

cellulaires et la MEC (Manitt, C., *et al.* 2001, Serafini, T., *et al.* 1994). La surexpression de la néogénine dans les cellules murines C2C12 favorise la formation des myotubes, tandis que sa sous-expression l'inhibe (Kang, J.-S., *et al.* 2004). La néogénine augmente aussi la transcription des facteurs appartenant aux familles bHLH et NFAT, connus pour réguler de nombreuses étapes de la myogenèse dont la fusion des myoblastes (Horsley, V. et Pavlath, G.K. 2002, Kang, J.-S., *et al.* 2004). La néogénine ayant la possibilité de s'associer avec CDO, un modèle a été proposé dans lequel CDO, BOC et néogénine pourraient appartenir à un même complexe. Il permettrait, dans les myoblastes, la transduction des signaux initiés par la nétrine et donc l'activation de facteurs de transcription modulant l'expression de gènes spécifiques du muscle et comprenant des facteurs bHLH, des protéines E et des facteurs de la famille des NFAT (Figure 17) (Krauss, R.S., *et al.* 2005). Enfin, ce complexe pourrait coopérer avec d'autres facteurs issus de la MEC au cours de la myogenèse.

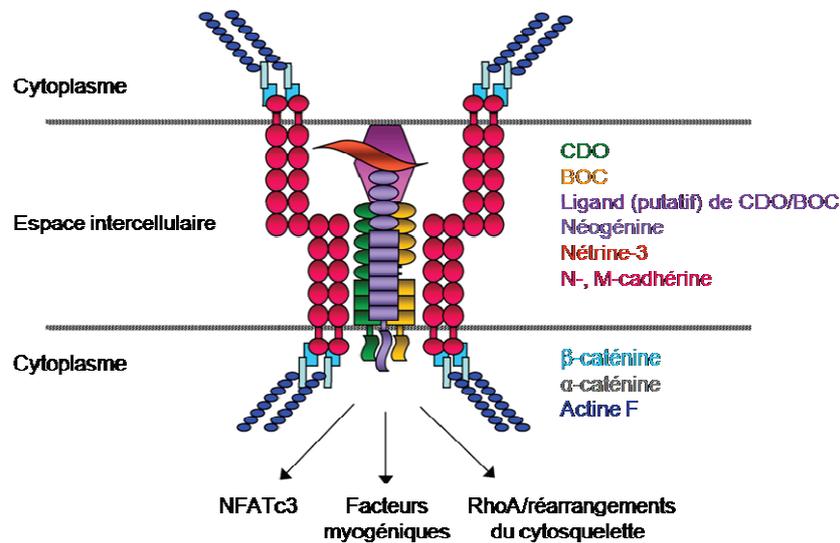


Figure 17. Modèle du complexe de surface "promyogénique" aux sites de contacts entre myoblastes.

Ce complexe comprend les récepteurs de surface cellulaires CDO et BOC. Ils interagissent avec les N- et M-cadhérines qui lient l' α et la β -caténine. Ils interagissent aussi avec la néogénine, récepteur de la nétrine 3. Des signaux multiples seraient envoyés par ce complexe, résultant en l'activation des facteurs myogéniques bHLH et des facteurs de transcription NFAT, et en la modification des filaments d'actine du cytosquelette en préparation à la fusion. (D'après Kang, J.-S., *et al.* 2004).

- Le remodelage du cytosquelette

Chez les mammifères, le remodelage du cytosquelette au cours de la fusion des myoblastes n'a pas été beaucoup étudié, mais de plus en plus de données tendent à démontrer son importance tout au long du processus de fusion. Ce remodelage a dans un premier temps été mis en évidence par l'observation, en microscopie électronique à transmission, de

myoblastes avant et après leur fusion (Fulton, A.B., *et al.* 1981). Plusieurs études récentes ont aussi montré que la migration des myoblastes, due à la dynamique des filaments d'actine (Kawamura, K., *et al.* 2004), est cruciale pour les événements de fusion entre myoblastes et entre myoblastes et myotubes (Bae, G.-U., *et al.* 2008, Bondesen, B.A., *et al.* 2007, Horsley, V. et Pavlath, G.K. 2003, Jansen, K.M. et Pavlath, G.K. 2006). Dans ce cas, la migration des myoblastes permet juste leur rapprochement et favorise donc les contacts cellulaires (Kang, J.-S., *et al.* 2003, Kang, J.-S., *et al.* 2004, Krauss, R.S., *et al.* 2005). Mais le remodelage du cytosquelette possède d'autres fonctions dans les étapes menant à la fusion des membranes. Ainsi, ajouter un inhibiteur de la polymérisation de l'actine au milieu de culture de myoblastes C2C12 en différenciation bloque leur fusion indépendamment des événements de migration (Dhawan, J. et Helfman, D.M. 2004, Richardson, B., E., *et al.* 2008) (Figure 18).

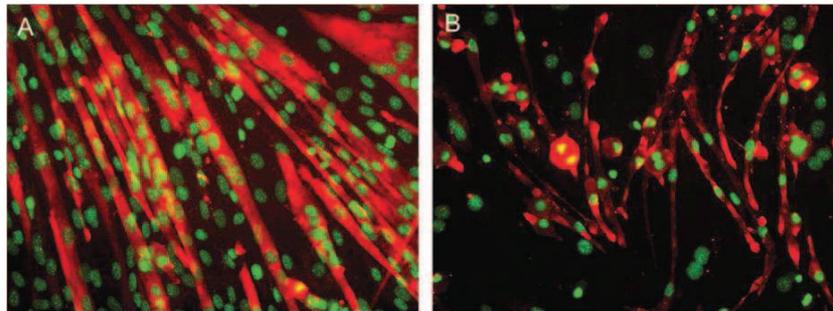


Figure 18. Le remodelage des filaments d'actine du cytosquelette est crucial pour la fusion des myoblastes chez les mammifères.

A. Immunomarquage de cellules C2C12 après 3 jours de différenciation. Un anticorps dirigé contre la chaîne lourde de la myosine marque les myotubes en rouge, le DAPI permet de visualiser les noyaux, en vert. **B.** Immunomarquage de cellules C2C12 en différenciation traitées par un inhibiteur du remodelage des filaments d'actine du cytosquelette, la cytochalasine D. Le traitement entraîne de sérieux défauts dans la fusion des myoblastes. (D'après Richardson, B., E., *et al.* 2008).

Les microtubules sont aussi impliqués, puisque des myoblastes traités par un agent causant leur dépolymérisation ne parviennent pas à former de myotubes (Musa, H., *et al.* 2003). Deux facteurs d'échange de nucléotides guaniliques (GEF), associés aux réarrangements du cytosquelette lors de la fusion des myoblastes chez la drosophile, pourraient également intervenir dans la fusion chez les mammifères. Les GEF permettent l'échange du GDP par le GTP, celui-ci étant impliqué dans la polymérisation des microtubules. La sous-expression des gènes orthologues des GEF *Dock180* (homologue de *Drosophila mbc*) et *Brag2* (homologue de *Drosophila loner*) dans les C2C12 provoque une inhibition de la fusion, défaut qui se retrouve aussi *in vivo* (Pajcini, K.V., *et al.* 2008). Des études récentes ont aussi montré que la sous-expression par shRNA de EB3, une protéine de

liaison aux microtubules, modifiait la morphologie des cellules en différenciation et diminuait leur taux de fusion (Straube, A. et Merdes, A. 2007).

De nombreuses études soulignent donc le rôle central des protéines de remodelage du cytosquelette au cours des évènements de fusion des myoblastes (Abramovici, H. et H. Gee, S. 2007). Cependant, seules, ces modifications du cytosquelette ne suffisent pas. La fusion étant un évènement membranaire, une réorganisation des membranes plasmiques est nécessaire. Il existerait même des liens entre la réorganisation des filaments d'actine du cytosquelette et le changement en contenu lipidique de la bicouche membranaire (Abramovici, H. et H. Gee, S. 2007).

- Les réarrangements membranaires

Les travaux réalisés chez la drosophile ont permis de mieux comprendre l'étape de fusion au cours de la myogenèse. Chez cette espèce, la musculature somatique exerce les mêmes fonctions que les muscles squelettiques des vertébrés et les changements cellulaires observés sont morphologiquement similaires (Chen, E.H. et Olson, E.N. 2004, Dworak, H.A. et Sink, H. 2002). Deux types de myoblastes ont été mis en évidence, les « cellules fondatrices du muscle », et les « cellules compétentes à la fusion » (Chen, E.H. et Olson, E.N. 2004). Pour former un précurseur musculaire bi- ou tri-nucléé, une cellule fondatrice fusionne avec une ou deux cellules compétentes à la fusion. Le précurseur ainsi formé fusionne ensuite avec d'autres cellules compétentes à la fusion pour former des myotubes multinucléés (Bate, M. 1990) (Figure 19). Lorsque les cellules compétentes à la fusion adhèrent aux cellules fondatrices, des vésicules denses en microscopie électronique se retrouvent au niveau du cytoplasme près des sites de contact cellulaire (Doberstein, S.K., *et al.* 1997). Dans ces « complexes de pré-fusion », des paires de vésicules s'alignent et se font face de chaque côté des membranes plasmiques. Chez la drosophile, comme chez les vertébrés, des plaques apparaissant denses en électrons en microscopie électronique se forment dans les zones de rupture de la membrane, certainement du fait de la fusion des vésicules avec cette dernière (Doberstein, S.K., *et al.* 1997, Engel, L.C. et David, J.D. 1985). Après cette étape, les myoblastes s'allongent et s'alignent, leurs membranes se rompent et des pores se forment, établissant ainsi une continuité cytoplasmique entre les cellules en cours de fusion. L'excès de membrane plasmique dans les aires de fusion est englobé dans des vésicules puis éliminé, alors que la membrane plasmique située en dehors des zones de fusion reste intacte, formant alors les myotubes multinucléés (Doberstein, S.K., *et al.* 1997, Kalderon, N. et Gilula, N.B. 1979, Rash, J.E. et Fambrough, D. 1973).

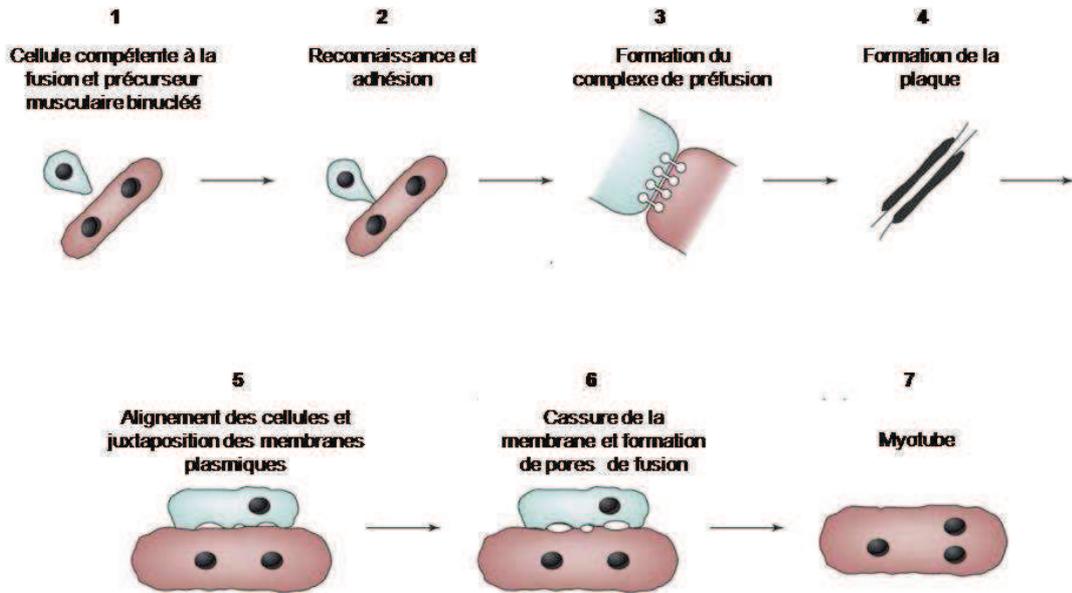


Figure 19. Fusion des myoblastes chez la drosophile.

1. Une cellule compétente pour la fusion (CCF, bleu) étend des filopodes jusqu'au précurseur musculaire binucléé (violet). 2. La CCF reconnaît et s'attache au précurseur. 3. Des vésicules se forment par paires (complexe de préfusion) le long des membranes des deux cellules. 4. Une plaque dense aux électrons se forme le long des membranes. 5. Les cellules s'alignent. 6. Les membranes se « cassent », ce qui s'accompagne de la formation de pores de fusion. 7. Un myotube multinucléé est formé. (D'après Chen, E.H. et Olson, E.N. 2004).

Même si les bases moléculaires de ce processus de fusion sont toujours peu documentées chez les vertébrés, des études *in vitro* ont montré que les événements de fusion des myoblastes comportaient aussi deux étapes. Au cours de la première étape, les myoblastes fusionnent entre eux pour donner un myotube multinucléé. La seconde étape de fusion correspond à la fusion de myoblastes avec les myotubes nouvellement créés (Horsley, V. et Pavlath, G.K. 2004) (Figure 20). Pour ces événements de fusion, les bicouches lipidiques des cellules subissent des modifications dans leur structure et leur composition. Il a ainsi été démontré qu'une augmentation de la fluidité membranaire doit précéder la fusion (Prives, J. et Shinitzky, M. 1977, Wakelam, M.J. 1983). Cette fluidité serait obtenue par une diminution de la quantité de cholestérol membranaire (Hirayama, E., *et al.* 2001, Nakanishi, M., *et al.* 2001). En effet, réduire la quantité de cholestérol dans les membranes de myoblastes de poulet augmente la reconnaissance, la différenciation et la fusion de ces cellules (Mermelstein, C.S., *et al.* 2005). Toutefois, un apport continu de ce composé serait également nécessaire à l'activité d'agrégation lors de la fusion (Cornell, R.B., *et al.* 1980).

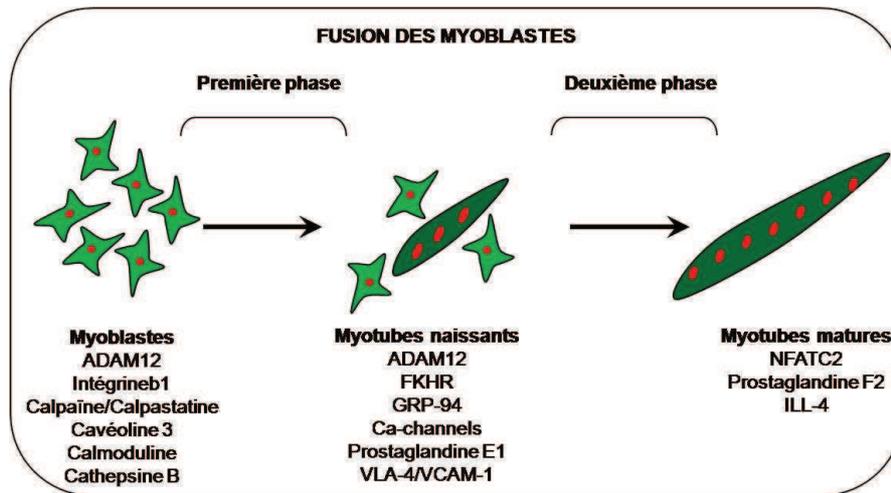


Figure 20. La fusion myoblastique chez les mammifères : un processus biphasique.

Dans un premier temps, les myoblastes fusionnent entre eux pour former un myotube à faible nombre de noyaux. Dans un second temps, les myotubes nouvellement formés fusionnent avec de nouveaux myoblastes et comportent de ce fait un nombre de noyaux plus important. Diverses molécules exprimées dans les myoblastes, myotubes naissants et matures ont été décrites comme régulant la fusion des myoblastes murins. Elles correspondent à des protéines membranaires, notamment des molécules d'adhésion (Intégrineβ1, VLA4, VCAM-1), des canaux, des chaperonnes (GRP94), des métalloprotéases (ADAM12) ou encore la cavéoline3. D'autres sont extracellulaires, comme la protéase cathepsine, ILL-4, et les prostaglandines E1 et F2. Enfin certaines sont intracellulaires, comme la calmoduline, la protéase calpaïne et son inhibiteur la calpastatine, et les facteurs de transcription NFATC2 et FKHR. (D'après Horsley, V. et Pavlath, G.K. 2004).

Des travaux ont également montré que la quantité de phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate ($PI_{(4,5)}P_2$) diminuait lors de l'initiation de la fusion et que celle du diacylglycérol (DAG) augmentait avec l'acide phosphatidique (PA) (Wakelam, M.J. 1983, Wakelam, M.J. et Pette, D. 1982). Le DAG et le PA étant connus pour activer des molécules de signalisation et pour moduler l'activité d'enzymes comme certaines kinases (Abramovici, H. et H. Gee, S. 2007), ces changements pourraient donc être à l'origine de l'activation de voies de transduction de signaux intracellulaires impliquées dans les événements de fusion.

- Diversité des acteurs de la fusion

Les interactions cellulaires, en particulier les processus d'adhésion cellulaire, le remodelage du cytosquelette et les réarrangements membranaires, qui permettent la fusion des membranes plasmiques, comptent parmi les principaux événements nécessaires à la fusion des myoblastes en myotubes. De nombreux acteurs, en plus de ceux déjà évoqués, ont aussi été décrits pour leur rôle dans cette étape fondamentale. Ils comprennent des composants des voies de signalisation du calcium, des protéines membranaires, des métalloprotéases de la surface cellulaires, des canaux ioniques, ou encore des signaux extracellulaires et des facteurs

régulant la mobilité des myoblastes (Richardson, B., E., *et al.* 2008). Des exemples de ces différentes protéines sont listés dans le tableau 3.

Tableau 3. Liste non exhaustive des protéines impliquées dans la fusion de myoblastes chez les mammifères et les vertébrés.

(D'après Horsley, V. et Pavlath, G.K. 2004, Richardson, B., E., *et al.* 2008).

Protéine	Fonction proposée	Localisation
Calmoduline	Réarrangement du cytosquelette – Activation de voies de signalisation	Cytoplasmique
Calpaïne	Destabilisation du sarcolème par protéase	Cytoplasmique
Calpastatine	Inhibition de la calpaïne	Cytoplasmique
Trio	Régulation de Rac1	Cytoplasmique
Crk/Crk like	Adaptateurs pour Dock1/Dock5, nécessaires à la fusion des fibres rapides	Cytoplasmique (fibres rapides du poisson zèbre)
Dock1/Dock5	Nécessaire à la fusion des fibres rapides	Cytoplasmique (fibres rapides du poisson zèbre)
NFATC2	Régulation de la croissance des myotubes	Cytoplasmique /nucléaire
IL-4	Favorise la fusion des myoblastes avec les myotubes en croissance	MEC
PGF _{2α}	Activation de NFATC2	MEC
ADAM12	Métalloprotéase	Membranaire
Canaux à Ca ²⁺ de type T	Induction de l'influx de Ca ²⁺ intracellulaire	Membranaire
Cavéoline-3	Requise pour la fusion entre myoblastes	Membranaire
CD164	Migration des myoblastes	Membranaire
CD9	Protéine de surface cellulaire - interaction	Membranaire
DGK-ζ	Régulation de la réorganisation de l'actine	Membranaire
GRP94	Interactions de surface cellulaire	Membranaire
intégrine β1	Récepteur de la MEC	Membranaire
M-cadhérine	Adhésion cellulaire et régulation de Rac1	Membranaire
Myoferline	Favorise la fusion des membranes	Membranaire
Néogenine	Récepteur de la nétrine – Favorise la formation des myotubes	Membranaire
Nétrine-3	Favorise la formation des myotubes	Membranaire
PGI ₂	Récepteur de la prostacycline	Membranaire
Récepteur mannose	Migration des myoblastes	Membranaire
VCAM-1	Adhésion cellulaire – Alignement des myoblastes par interaction avec VLA-4	Membranaire
VLA-4	Alignement des myoblastes par interaction avec VCAM-1	Membranaire
Kirrel	Reconnaissance cellulaire - Adhésion	Membranaire (précurseurs des muscles rapides du poisson zèbre)
FKHR	Régulation de l'expression de gènes	Nucléaire
Ca ²⁺	Régulation de l'activité de protéines extracellulaires – Activation de voies de signalisation intracellulaires	Sécrétée
Cathepsine B	Protéase	Sécrétée
ILL-4	Recrutement des myoblastes	Sécrétée
PGF2a	Activation de la voie NFATC2	Sécrétée
Prostacycline	Régulation de la mobilité et de la fusion des myoblastes	Sécrétée
Rac	Régulation du nombre et de la polarité des événements fusionnels	Ubiquitaire

vii Fibres I et II

Les fibres musculaires squelettiques sont formées par deux vagues successives de fusion : elles correspondent aux myogenèses primaire et secondaire (Ontell, M., *et al.* 1988) (Figure 21).

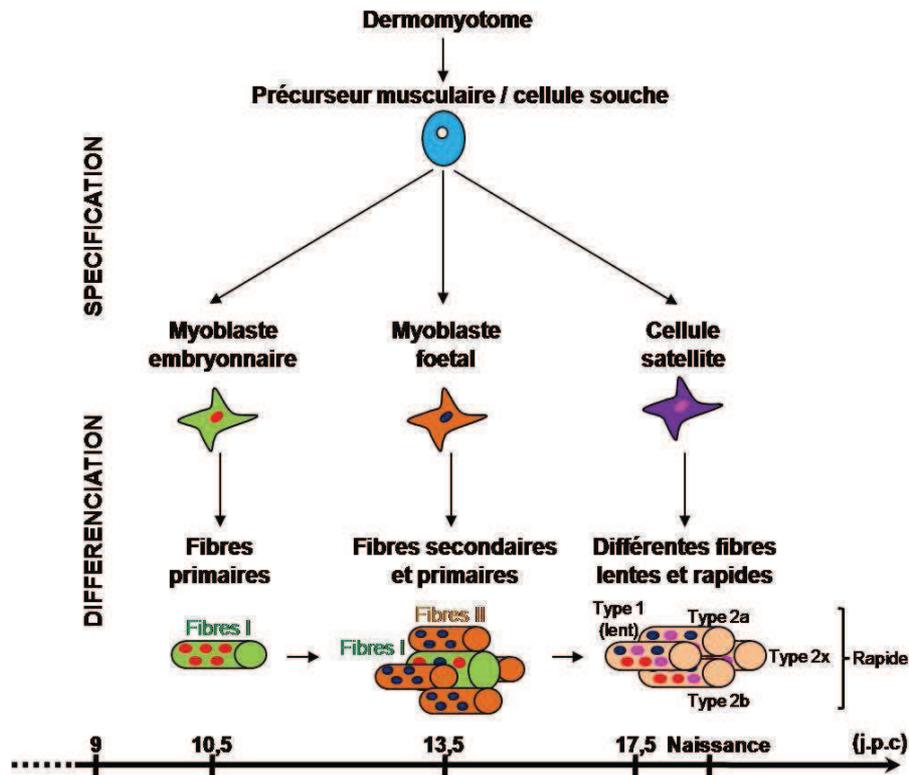


Figure 21. Myogenèse primaire et secondaire chez la souris.

Les précurseurs musculaires sont à l'origine des myoblastes embryonnaires, foetaux et des cellules satellites. Les myoblastes embryonnaires sont à l'origine des fibres primaires, tandis que les myoblastes foetaux sont à l'origine des fibres secondaires et de la croissance des fibres primaires. Les cellules satellites, apparaissant à la fin de la gestation, sont responsables de la croissance et de la régénération post-natale du muscle. (D'après Biressi, S., *et al.* 2007).

Au cours de la myogenèse primaire (11 j.p.c. chez la souris), les myoblastes embryonnaires fusionnent pour donner les myotubes puis les fibres embryonnaires primaires (Kelly, A.M. et Zacks, S.I. 1969). Ces fibres servent ensuite de support pour l'établissement de fibres secondaires générées lors de la myogenèse secondaire (14,5 à 17,5 j.p.c.). Cette phase secondaire implique la fusion de myoblastes foetaux entre eux, générant les fibres secondaires, plus petites et autour des fibres primaires (Duxson, M.J., *et al.* 1989). Au cours de cette phase, les myoblastes foetaux peuvent également fusionner avec les fibres primaires et permettre leur croissance (Dunlison, G.F., *et al.* 1999, Evans, D., *et al.* 1994). Les fibres primaires et

secondaires varient également pour ce qui est de leur métabolisme et de leur vitesse de contraction. Elles diffèrent en effet par l'expression d'isoformes spécifiques de la chaîne lourde de myosine. De ce fait, chez les mammifères, les fibres primaires sont généralement lentes, tandis que les fibres secondaires peuvent être lentes ou rapides (Wigmore, P.M. et Evans, D.J. 2002, Zhang, M. et McLennan, I., S. 1998). Le type de fibre générée peut être intrinsèque aux myoblastes d'origine (Nikovits, W., Jr., *et al.* 2001) ou être modulée par l'innervation, les hormones ou les facteurs de croissance, les fibres primaires pouvant être converties en fibres rapides (Blagden, C.S. et Hughes, S.M. 1999). Des différences dans l'initiation du programme myogénique sont également observées puisque Myf5, MyoD et Mrf4 peuvent indépendamment l'initier durant la myogenèse primaire, alors que seuls Myf5 ou MyoD le peuvent lors de la myogenèse secondaire (Biressi, S., *et al.* 2007, Kassarduchosoy, L., *et al.* 2004). Enfin, les cellules satellites sont responsables de la croissance et de la régénération post-natale du muscle et sont donc impliquées dans l'élaboration des différents types de fibres musculaires.

viii Cellules satellites et régénération musculaire

L'extraordinaire capacité régénérative du muscle squelettique a été décrite depuis bien longtemps. Dans les années 60, Studitsky a montré qu'après ablation d'un muscle de rat, celui-ci pouvait être régénéré (Studitsky, A.N. 1964). Les cellules responsables de la réparation et de la régénération des fibres musculaires sont les cellules satellites. Ce n'est qu'à la fin de la myogenèse secondaire qu'elles sont identifiables dans le muscle, vers 16 j.p.c. chez la souris (Bischoff, R. 1997). Ces cellules « souches » ont reçu leur nom du fait de leur localisation histologique : elles se retrouvent à la périphérie des myofibres, entre le plasmalemme et la lamina basale (Mauro, A. 1961) (Figure 22). Les cellules satellites représentent entre 2 et 5 % des noyaux d'une fibre musculaire mature (Figeac, N., *et al.* 2007). Elles génèrent les précurseurs myogéniques, ou myoblastes, qui peuvent ensuite proliférer avant de fusionner soit avec une myofibre existante, soit entre elles pour former des myotubes (Bischoff, R. 1975, Konigsberg, U.R., *et al.* 1975, Kuang, S., *et al.* 2007, Lipton, B.H. et Schultz, E. 1979).

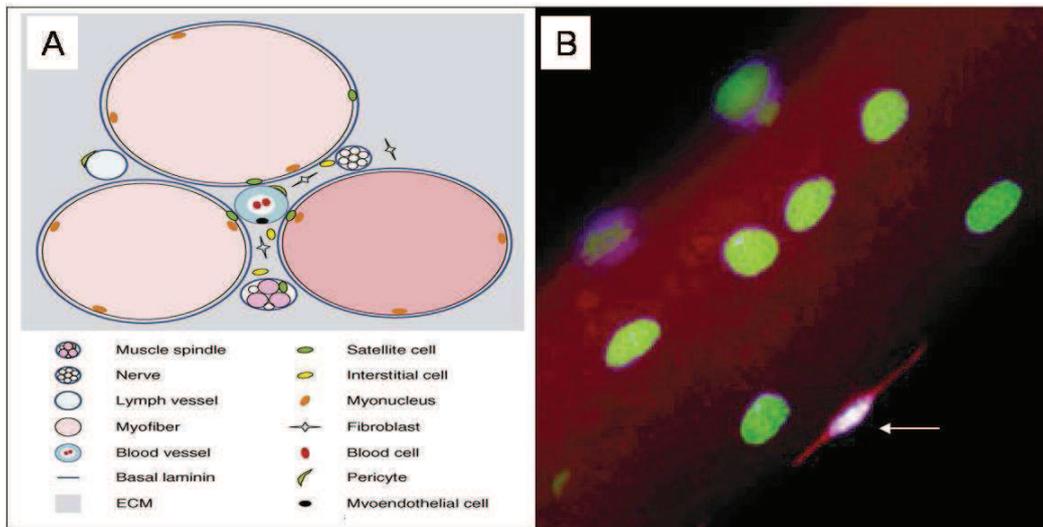


Figure 22. Les cellules satellites

A. Représentation schématique d'une coupe de muscle et de l'environnement des cellules satellites. Les cellules satellites, en vert, sont accolées aux myofibres, sous la lamina basale, en bleu. D'autres cellules souches résidentes du muscle, dont les péricytes et les cellules myoendothéliales associées à la vascularisation (sang et vaisseaux lymphatiques), de même que d'autres cellules interstitielles, existent à proximité des cellules satellites. En plus des myofibres, l'innervation et la vascularisation du muscle sont représentées. (D'après Kuang, S., *et al.* 2007). **B.** Observation en microscopie à fluorescence d'une myofibre. Les noyaux sont en vert, une cellule satellite, en rouge et blanc et indiquée par une flèche, est accolée à la myofibre.

Au cours du développement précoce post-natal, le rôle principal de ces cellules est de permettre la croissance du muscle squelettique. Dans le muscle adulte, elles constituent une source de cellules capables de réguler ou d'augmenter la masse musculaire, tout en constituant la source majeure de précurseurs myogéniques nécessaires à la régénération du muscle post-natal (Montarras, D., *et al.* 2005, Zammit, P.S., *et al.* 2006). Toutefois des mésangioblastes, cellules souches mésangioblastiques associées aux vaisseaux sanguins, pourraient intervenir aussi dans cette régénération (Minasi, M.G., *et al.* 2002).

Les cellules satellites du tronc trouvent leur origine dans le dermomyotome central (Gros, J., *et al.* 2005), et celles des membres dérivent de cellules du dermomyotome hypaxial (Schienda, J., *et al.* 2006). L'expression du marqueur Pax7 a permis de les caractériser et de les différencier des autres myoblastes (Figeac, N., *et al.* 2007, Seale, P., *et al.* 2000). Des marqueurs supplémentaires ont aussi été identifiés parmi lesquels c-met, CD34, MNF, VCAM1, NCAM, M-cadhérine ou encore les syndécanes 3 et 4 (Beauchamp, J.R., *et al.* 2000, Cornelison, D.D.W. et Wold, B.J. 1997, Hawke, T.J. et Garry, D.J. 2001, Illa, I., *et al.* 1992, Irintchev, A., *et al.* 1994, Rosen, G.D., *et al.* 1992). Initialement quiescentes, elles peuvent être activées par différents signaux, tels que le stress lié à l'étirement ou à la blessure d'un muscle qui induit la synthèse d'oxyde nitrique (Le Grand, F. et Rudnicki, M.A. 2007). Une

fois activées, les cellules satellites migrent hors de la lame basale et entrent en division. Elles co-expriment alors Pax7 et MyoD (Figure 23).

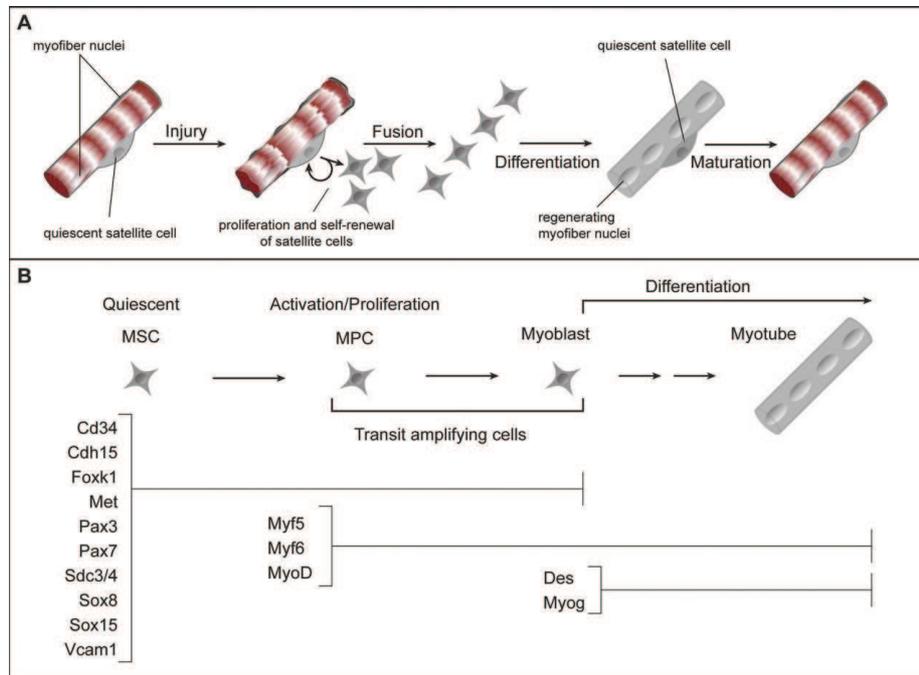


Figure 23. Régénération des fibres musculaires chez les Vertébrés.

A. Rôle des cellules satellites au cours de la régénération musculaire. En cas de dommage musculaire, la cellule satellite est activée par différents facteurs (dont les FGFs, HGF, Notch activé, TNF- α) et l'expression de *MyoD* augmente dans les deux heures. Selon des études récentes, les cellules satellites prolifèrent pour produire des myoblastes qui fusionnent pour régénérer des myofibres (caractérisées par la localisation centrale des noyaux) et s'auto-renouvellent. **B.** Représentation schématisée de l'expression de plusieurs gènes dans l'ensemble des cellules souches myogéniques (MSC ou cellules satellites), de progéniteurs myogéniques (MPC, caractérisés par l'expression de *MyoD*, *Myf5*, or *Myf6*), myoblastes (caractérisés par l'expression de la myogénine et de la desmine), et le myotube multinucléé. Les gènes *Sox8*, *15* et *Foxk1* codent pour des facteurs de transcription jouant des rôles clés dans le développement embryonnaire. (*Sdc3/4*) Syndécane 3 et 4; (*Cdh15*) M-cadhérine; (*Myog*) Myogénine; (*Des*) Desmine; (*Met*) c-met. (D'après Shi, X. et Garry, D.J. 2006).

Les myoblastes ainsi générés vont proliférer et la plus grande partie d'entre eux pourra, après diminution de l'expression de *Pax7* et augmentation de celle de la myogénine, se différencier en myotubes ou fusionner avec les myofibres existantes (Le Grand, F. et Rudnicki, M.A. 2007). Une petite partie de ces cellules conservera cependant l'expression de *Pax7*, perdra l'expression de *MyoD* et quittera le cycle cellulaire pour assurer le renouvellement des cellules satellites et donc conserver la capacité de régénération du muscle (Collins, C.A., *et al.* 2005, Olguin, H.C. et Olwin, B.B. 2004, Zammit, P.S., *et al.* 2004). Ainsi, leurs fonctions de différenciation myogénique, associées à celles de renouvellement, permettent de qualifier les cellules satellites de cellules souches adultes.

La myogenèse est donc un processus très ordonné et régulé, qui implique de nombreux et divers acteurs moléculaires. C'est un processus complexe qui repose grandement sur des interactions cellulaires. Ainsi, depuis la somitogenèse au cours de laquelle des interactions entre cellules et MEC ont lieu, jusqu'aux fibres musculaires des muscles, qui se contractent ensemble pour fournir le travail musculaire, les cellules agissent de concert. Ces contacts cellulaires sont les plus remarquables dans la phase qui précède la fusion des myoblastes pour donner les premiers myotubes. En effet, la MEC, les protéines membranaires et les membranes des cellules coopèrent, favorisant l'adhésion, puis la fusion des cellules entre elles. Ce sont donc les surfaces cellulaires qui jouent un rôle de premier plan, et par conséquent les acteurs moléculaires qui les composent. Or, c'est au niveau des surfaces cellulaires que se retrouvent en abondance diverses structures glycanniques. Ce sont des composantes à part entière de la MEC et de la membrane plasmique, puisque portées par de nombreux lipides et de nombreuses protéines, dont des acteurs de l'adhésion cellulaire comme les intégrines. Il est donc primordial de connaître plus en détail ces structures pour appréhender leurs fonctions au cours de la myogenèse, et plus particulièrement au cours de la fusion des myoblastes. La partie suivante s'articule donc autour des rôles précis des glycoconjugués dans le processus de myogenèse.

II. LES GLYCOCONJUGUÉS ET LA MYOGENÈSE

1. Les glycannes, constituants majeurs de la cellule musculaire

Dans la littérature, le rôle de certains glycoconjugués est admis à tous les stades de la myogenèse, depuis la somitogenèse jusqu'à la régénération musculaire. Il n'est pas étonnant de trouver de telles implications pour ces composés, qui sont en effet des constituants majeurs de toutes les cellules animales, les cellules musculaires (des myoblastes à la fibre musculaire) ne dérogeant pas à la règle.

Les glycannes constituent l'une des quatre classes majeures de macromolécules retrouvées dans les cellules animales. En premier lieu, les acides nucléiques ADN et ARN sont des éléments clés du paradigme central de la biologie moléculaire, selon lequel le flux de l'information génétique passe des acides nucléiques aux protéines. Ces dernières constituent la deuxième classe, à laquelle s'ajoutent les classes des lipides et des glycannes ou carbohydrates. Les glycannes correspondent à quelques ou plusieurs molécules organiques assemblées contenant chacune un groupement carbonyle (aldéhyde ou cétone) et plusieurs groupements hydroxyle (-OH). La diversité structurale des glycannes est beaucoup plus importante que celle des protéines et des acides nucléiques. Cette diversité est due d'une part à la variabilité des liaisons pouvant exister entre les monosaccharides des glycannes, et d'autre part à la diversité des monosaccharides eux-mêmes (Figure 24). En effet, tandis que les protéines et les acides nucléiques sont des polymères linéaires contenant chacun un seul type de liaison entre monomères, chaque monosaccharide peut théoriquement générer une liaison à anomérie α ou β sur n'importe lequel des 3 ou 4 sites d'attachement avec un autre monosaccharide, permettant la formation de structures linéaires ou ramifiées. Ainsi, alors que 3 nucléotides ou acides aminés ne peuvent générer que 6 trimères, 3 hexoses différents peuvent produire de 1056 à 27648 trisaccharides uniques (Varki, A., *et al.* 2008). Toutefois, même si tous les glycannes n'ont pas encore été découverts, les molécules présentes naturellement ne contiennent que peu d'unités de monosaccharides et en un nombre limité de combinaisons. De ce fait, le glycome, c'est à dire le répertoire des structures glycaniques, est estimé à quelques milliers de structures potentielles chez un mammifère (van Kooyk, Y. et Rabinovich, G.A. 2008).

		PROTEIN AND LIPID ACCEPTORS								SACCHARIDE ACCEPTORS							
		Ser/Thr (O-glycans, O-GlcNAc, glycosaminoglycans)	Asn (N-glycans)	hLys (Collagen-like domains)	Trp (FNase 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 β1-4	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

Figure 24. Liaisons glycosidiques produites par les glycosyltransférases de mammifères.

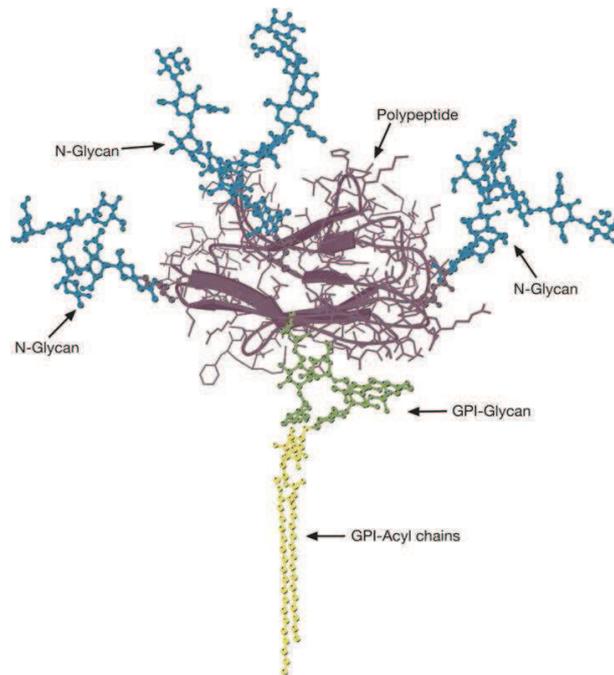
Les glycosyltransférases, enzymes catalysant le transfert des sucres, possèdent 9 nucléotides-sucres donneurs (colonne de gauche) et de multiples substrats accepteurs de natures protéiques ou lipidiques. Elles produisent ainsi 14 types de glycanes qui diffèrent par la nature du premier sucre et la configuration α ou β du carbone en position 1 (partie gauche du tableau). Les glycoconjugués ainsi générés deviennent souvent à leur tour des accepteurs pour l'une des 49 autres réactions catalysées par des glycosyltransférases (partie droite du tableau). Il en résulte des liaisons glycosidiques en configuration α ou β du donneur saccharidique lié par sa position 1 ou 2 à la position 2, 3, 4 ou 6 d'un accepteur saccharidique. La diversité des glycanes est la conséquence de ce potentiel enzymatique. Les liaisons qui n'ont pas été observées dans la nature sont indiquées par le symbole (-). La *N*-glycosylation (symbole *) est initiée par le transfert en bloc d'un précurseur oligosaccharidique préalablement synthétisé. Ser/Thr, sérine/thréonine; Asn, asparagine; hLys, hydroxylysine; Trp, tryptophane; Tyr, tyrosine; Cer, céramide; PI, phosphatidylinositol. (D'après Ohtsubo, K. et Marth, J.D. 2006).

Chez l'Homme, alors que des centaines de monosaccharides distincts sont connus dans la nature, seuls neuf monosaccharides de base, appartenant aux pentoses (D-xylose), hexoses (D-glucose, D-galactose, D-mannose), hexosamines (*N*-acétyl-D-glucosamine et *N*-acétyl-D-galactosamine), déoxyhexoses (L-fucose), acides uroniques (acide D-glucuronique) et acides sialiques (acide *N*-acétylneuraminique) sont couramment retrouvés (Figure 24).

Du fait de leur abondance, le métabolisme des carbohydrates a été étudié avec intensité dès le début du 20^{ème} siècle. Les glycannes étaient alors principalement considérés comme une source d'énergie et comme des éléments structuraux. Dans les années 60 et 70, l'étude des glycannes a relativement été laissée de côté, l'accent étant mis sur l'étude des acides nucléiques et des protéines. En effet, leur grande complexité, la difficulté à déterminer leur séquence et l'absence de matrice pour prédire leur biosynthèse, contrairement aux acides nucléiques et aux protéines, n'ont pas contribué à l'acquisition de beaucoup de données à leur égard. Depuis, le développement de nouvelles technologies a permis d'étudier la structure et la fonction des glycannes, ouvrant ainsi un nouveau champ à la biologie moléculaire, celui de la glycobiologie. Cette discipline est née de la rencontre entre la chimie et la biochimie traditionnelles des carbohydrates, et la biologie moléculaire et cellulaire des glycannes. Aujourd'hui, la glycobiologie est une discipline qui étudie la structure et la biosynthèse des glycannes, la fonction des glycoconjugués, les gènes et les protéines qui synthétisent les glycannes. Elle intègre donc l'étude des glycannes dans le contexte de la myogenèse. Les travaux antérieurs de glycobiologie ont montré que les glycannes pouvaient servir d'intermédiaires pour générer de l'énergie, de composants structuraux, d'effecteurs de la signalisation et de marqueurs de reconnaissance. Ils sont particulièrement importants pour les interactions entre les cellules et la MEC environnante qui conditionnent l'assemblage des organes multicellulaires complexes, et la formation des organismes. Leur importance est également évidente dans le cas de la myogenèse, dont le déroulement sollicite des interactions cellulaires impliquant les structures hautement glycosylées que sont la MEC et la membrane plasmique. En effet, les cellules musculaires, comme toutes les cellules animales, portent un réseau de sucres (monosaccharides) ou de chaînes de sucres (oligosaccharides et polysaccharides) attachés de façon covalente à des protéines ou des lipides. Les glycannes comprennent en effet tant des chaînes courtes de monosaccharides que des chaînes plus complexes contenues dans les glycoprotéines, les glycolipides et les protéoglycannes (Zhao, Y., *et al.* 2008) Chez les eucaryotes, environ 50% des protéines totales sont glycosylées (Apweiler, R., *et al.* 1999). Les glycannes peuvent de surcroît constituer la majeure partie de la taille d'un glycoconjugué. La contribution d'un glycanne à la taille totale d'un glycoconjugué est variable et peut être très faible ou au contraire correspondre à la partie dominante voire quasi exclusive de celui-ci. Le plus souvent, le glycanne constitue une part substantielle d'un glyconconjugué (Figure 25).

Figure 25. Représentation schématique de la glycoprotéine Thy-1.

Trois *N*-glycannes (bleu) et une ancre lipidique glycosylphosphatidylinositol (GPI, vert) sont visibles, de même que des chaînes acyl (jaune) normalement incluses dans la bicouche membranaire. Le polypeptide (violet) ne représente qu'une partie relativement petite de la masse totale de la protéine. (D'après Varki, A., *et al.* 2008).



Les glycannes se trouvant sur la face externe des cellules créent un maillage, le glycocalyx, c'est à dire un manteau glucidique qui entoure les cellules animales. Ce manteau cellulaire, observé par microscopie électronique, apparaît comme une couche dense en électrons (Figure 26).

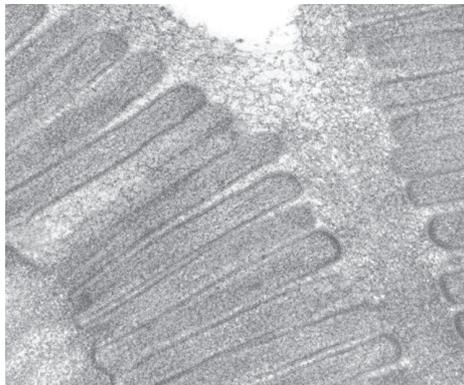


Figure 26. Micrographie électronique du glycocalyx à la surface de cellules épithéliales intestinales animales.

Le manteau glucidique de ces cellules est observable à la surface des microvillosités.

Le glycocalyx représente donc la surface la plus externe de la cellule, une position stratégique pour réguler un large éventail d'interactions cellule-cellule, cellule-matrice et cellule-molécule, cruciales pour le développement et le fonctionnement d'un organisme multicellulaire complexe. Le glycocalyx est ainsi le siège d'évènements de communication cellulaire, de signalisation et d'interactions cellulaires. De telles interactions sont indispensables à l'élaboration du tissu musculaire. Les glycannes peuvent aussi moduler des interactions entre organismes différents, telles que les interactions hôte-parasite et hôte-

symbiote. Ce chapitre discutera des implications connues des glycoconjugués au cours de la myogenèse et dans la physiologie musculaire.

2. Les glycannes et glycoconjugués impliqués dans le développement musculaire

De façon générale, la plupart des glycannes que nous évoquerons par la suite appartient à trois groupes : les glycannes associés aux protéines par le biais soit d'un atome d'azote (*N*-glycannes), soit d'un atome d'oxygène (*O*-glycannes), et ceux associés aux lipides. Les *N*-glycannes sont attachés de façon covalente à une protéine par une liaison *N*-glycosidique entre une *N*-acétylglucosamine et un résidu asparagine (GlcNAc β 1-Asn) (Figure 27). L'existence d'une séquence peptidique consensus de *N*-glycosylation, de type Asn-X-Ser/Thr où X peut être tout acide aminé sauf la proline, a été mise en évidence relativement tôt (Gavel, Y. et von Heijne, G. 1990). Les *O*-glycannes sont ajoutés sur l'atome d'oxygène de la chaîne latérale, le plus souvent, d'un résidu sérine ou thréonine (Figure 27).

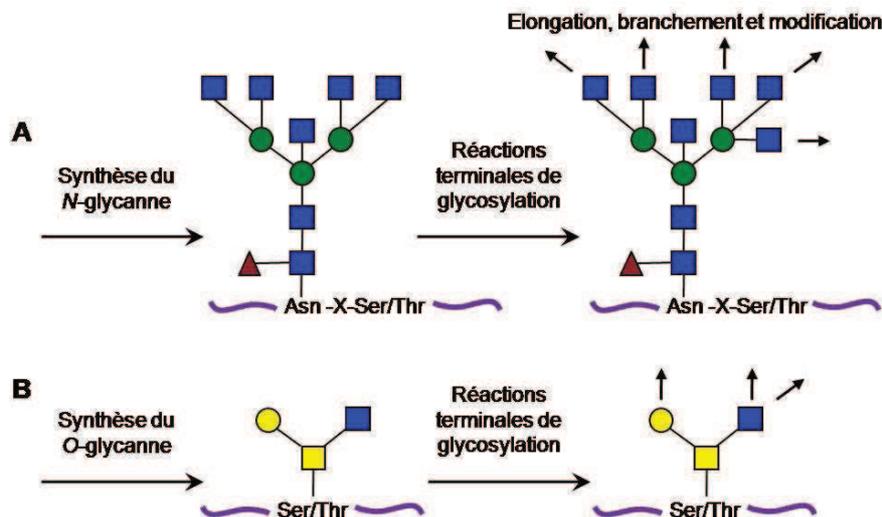


Figure 27. Exemples de *N*- et *O*-glycannes.

A. Les *N*-glycannes sont attachés à un résidu asparagine de la séquence consensus Asn-X-Ser/Thr. La synthèse des *N*-glycannes aboutit à la formation de structures (un *N*-glycane biantenné dans cet exemple) modifiées par branchements (flèches) dans des réactions qui peuvent être spécifiques du tissu, régulées au cours du développement ou même spécifiques de la protéine concernée. **B.** Les *O*-glycannes sont attachés à un résidu sérine ou thréonine. Leur synthèse passe par des structures (un coeur 1 dans cet exemple) qui sont ensuite modifiées par des enzymes dont beaucoup sont aussi impliquées dans la synthèse des *N*-glycannes. Les représentations symboliques des monosaccharides communs, qui seront utilisées tout au long de ce manuscrit, sont indiquées en annexe.

Quelques exceptions à cette règle sont en effet rencontrées, comme dans le cas des collagènes, où le *O*-glycane est porté par une hydroxyproline ou une hydroxylysine. Les glycosaminoglycannes (GAG) des protéoglycannes correspondent à un type particulier de *O*-glycosylation. Contrairement à la *N*-glycosylation, il n'y a pas de séquence peptidique consensus pour la plupart des types de *O*-glycosylation. La *O*-fucosylation et la *O*-glucosylation constituent toutefois des exceptions (Shao, L. et Haltiwanger, R.S. 2003, Shao, L., *et al.* 2002). Il existe d'autres formes plus rares de glycosylation des protéines telles que la *C*-mannosylation qui n'a été mise en évidence qu'assez tardivement (Hofsteenge, J., *et al.* 1994). Elle correspond à la liaison d'un sucre sur une protéine *via* une liaison carbone-carbone. Cette modification affecterait le repliement protéique et la signalisation cellulaire (Luther, K.B. et Haltiwanger, R.S. 2009), mais ses fonctions restent encore largement indéfinies. Enfin, les glycosphingolipides sont construits à partir d'un céramide, formé par l'attachement d'un acide gras à la sphingosine (Figure 28). Cette dernière tire son nom de la difficulté avec laquelle sa structure a pu être déterminée à la fin du 19^{ème} siècle, où on la nomma d'après l'énigmatique Sphinx égyptien.

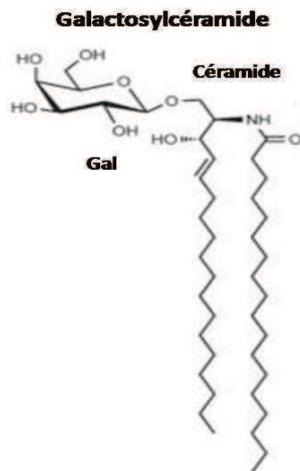


Figure 28. Structure des glycosphingolipides : exemple du galactosylcéramide.

Les glycosphingolipides, comme le galactosylcéramide, possèdent une partie lipidique, qui est constituée d'une longue chaîne amino alcool, la sphingosine, en liaison amide à un acide gras.

Ces différents glycoconjugués ont été intensivement étudiés dans les cellules animales, en particulier les *N*-glycoprotéines qui ont été très tôt isolées à partir de sérum. Dans les dernières années, des études ont aussi montré que des oligosaccharides libres peuvent jouer des rôles dans la signalisation cellulaire, comme les oligosaccharides de chitine qui seraient impliqués dans l'embryogenèse du xénope (Bakkers, J., *et al.* 1999). Plusieurs études ont démontré des rôles précis pour des glycoconjugués dans la myogenèse (Figure 29).

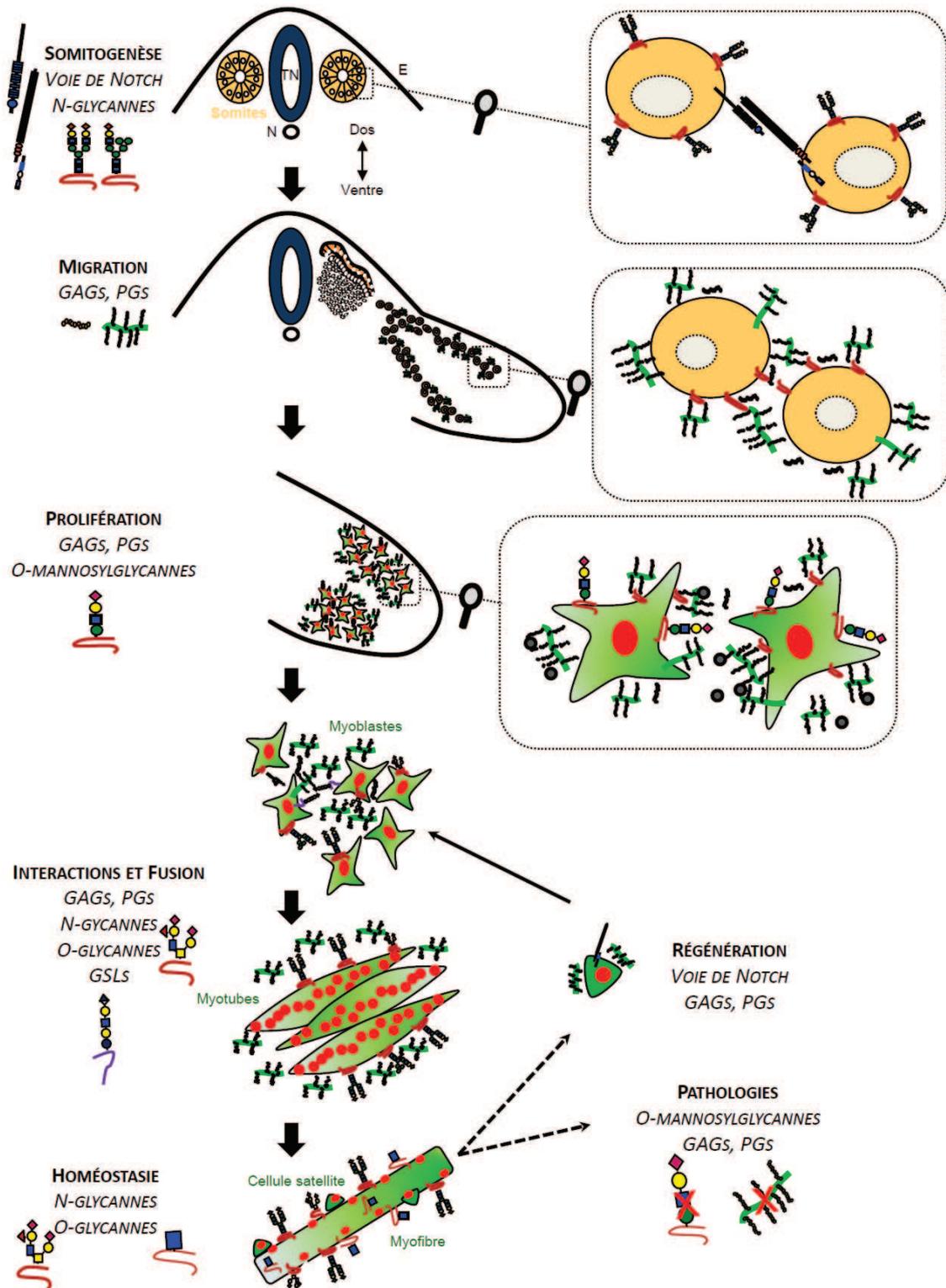


Figure 29. Représentation schématique de l'implication connue des glycanes dans la myogenèse squelettique du membre.

Les glycanes interviennent dans diverses étapes de la myogenèse et sont aussi impliqués dans l'homéostasie, la régénération et les pathologies musculaires. Les glycanes correspondants appartiennent à toutes les classes connues : *N*- et *O*-glycoprotéines, protéoglycannes (PGs) et glycosaminoglycannes (GAGs), glycosphingolipides (GSLs). Les principales classes de glycoconjugés et voies de signalisation régulées par la glycosylation impliqués dans la myogenèse, également cités dans la suite de cet exposé, sont notés en italique. E, Ectoderme ; N, Notochorde ; TN, Tube Neural.

Ainsi, comme cela a été présenté précédemment, la voie de Notch est impliquée à plusieurs niveaux de la myogenèse, dont la somitogenèse. Or, c'est la *O*-glycosylation du récepteur Notch qui régule sa fonction, *via* la présence de *O*-fucosylglycannes et de *O*-glucosylglycannes. Plusieurs protéines *N*- et *O*-glycosylées interviendraient également tout au long de ce processus de différenciation, jusque dans le fonctionnement normal et pathologique du muscle. Différents GAGs et protéoglycannes seraient de surcroît largement impliqués, que ce soit dans les étapes de migration, prolifération, fusion des myoblastes, ainsi que dans la physiologie musculaire. Enfin, bien que peu décrits, il semblerait que les glycolipides, en particulier les gangliosides, soient impliqués dans les étapes de fusion membranaire. La plupart du temps, les glycoconjugués impliqués dans la myogenèse appartiennent à la surface extracellulaire de la membrane plasmique et à la matrice extracellulaire (Figure 30).

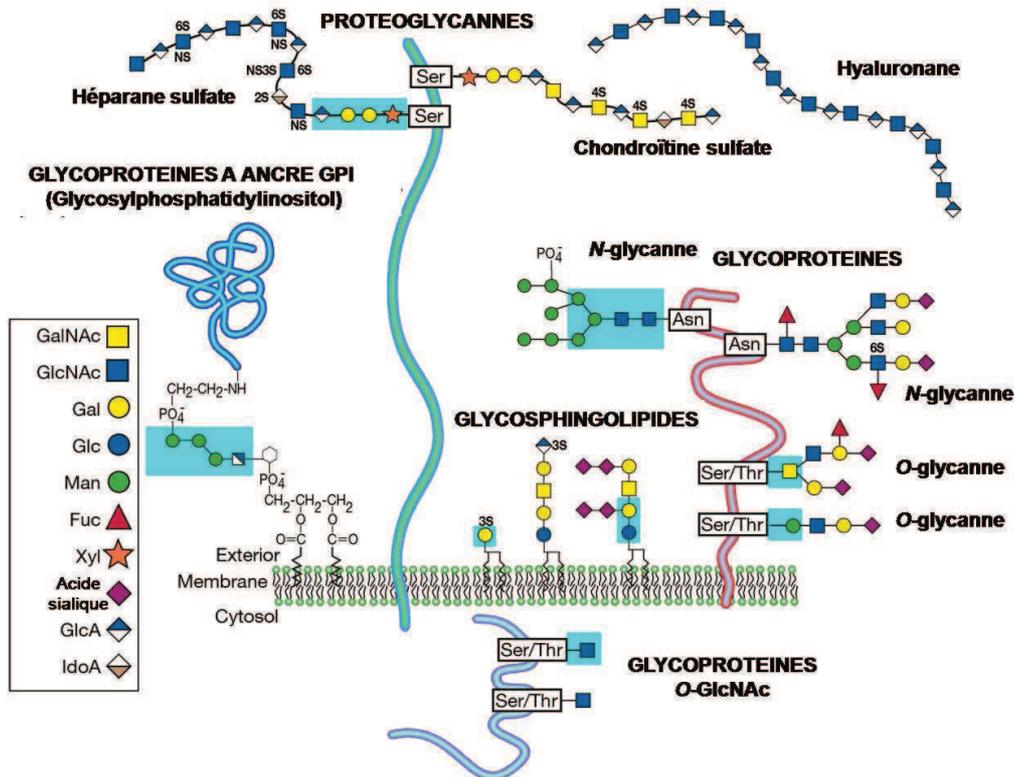


Figure 30. Classes communes de glycanes dans les cellules animales

Les *N*- et *O*-glycoprotéines, les GAGs et protéoglycannes, ainsi que les glycolipides se retrouvent à la surface extracellulaire de la membrane plasmique. Les glycoprotéines font aussi partie, avec les GAGs et protéoglycannes, de la MEC qui entoure les cellules. (D'après Varki, A., *et al.* 2008).

Des glycoconjugués sont également sécrétés dans les fluides biologiques comme le sérum. Certains se retrouvent aussi dans les compartiments intracellulaires comme le RE et le Golgi, d'autres dans le cytoplasme voire le noyau (Varki, A., *et al.* 2008). Les rôles des glycanes

musculaires sont étroitement associés à leur localisation. Ces fonctions sont de plus très souvent associées aux monosaccharides périphériques qui les composent. Par exemple, les acides polysialiques (PSA) de NCAM inhibent les interactions cellulaires en provoquant une répulsion entre les cellules, du fait de leur encombrement stérique, de leur volume d'hydratation et de leurs charges négatives (Yang, P., *et al.* 1994, Yang, P., *et al.* 1992). L'importance des glycannes terminaux est aussi soulignée par le fait qu'elles servent de ligands à la plupart des récepteurs qui les reconnaissent spécifiquement. Les structures terminales sont par exemple préférentiellement reconnues par les microorganismes pathogènes ou symbiotes. Les fonctions biologiques des glycannes sont donc principalement portées par les monosaccharides périphériques des glycoprotéines et des glycolipides, comme le galactose, la *N*-acétylgalactosamine, l'acide sialique et le fucose. Les fonctions associées aux glycannes peuvent ainsi être divisées en deux grandes catégories (Figure 31). La première correspond aux fonctions structurales et modulatrices impliquant les glycannes eux-mêmes ou la modulation des molécules auxquelles ils sont attachés. La seconde implique la reconnaissance spécifique des glycannes par des protéines de liaison, les lectines. La suite de cette partie a pour objectif de présenter les glycannes et glycoconjugués impliqués dans la différenciation myogénique et leurs implications biologiques dans ce processus.

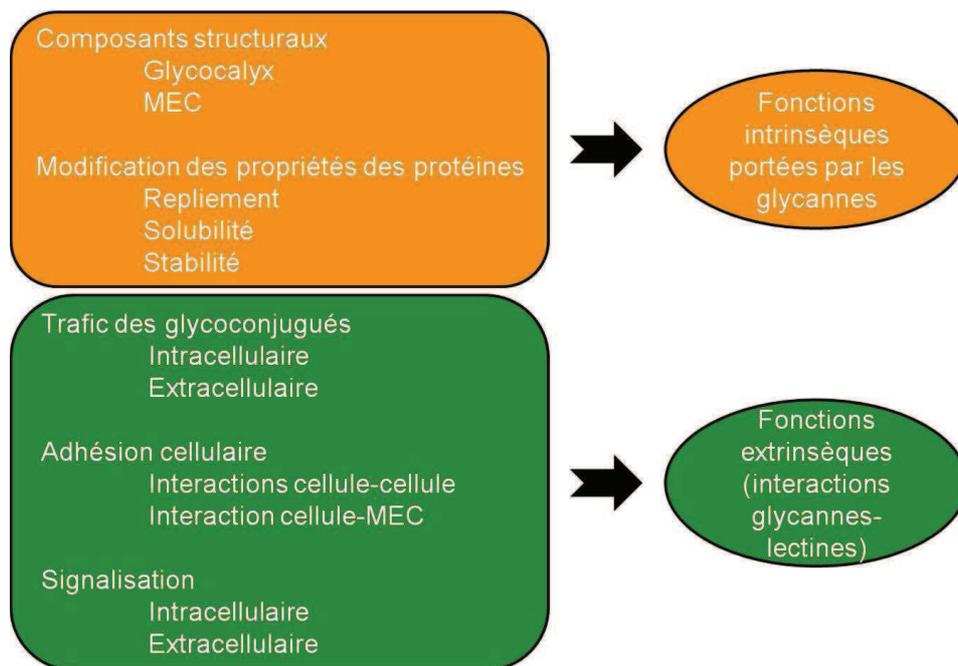


Figure 31. Fonctions générales des glycannes.

Les glycannes portent à la fois des fonctions intrinsèques, en tant qu'éléments structuraux et modificateurs des propriétés protéiques, et extrinsèques, liées à leurs interactions avec des lectines qui les reconnaissent spécifiquement. Ils participent ainsi à de nombreuses fonctions cellulaires telles que le trafic des glycoconjugués, l'adhésion cellulaire, ou la signalisation.

3. Implication des glycoconjugués dans la myogenèse

Les glycanes interviennent dans une multitude de processus biologiques, physiologiques, immunitaires et développementaux. Ainsi, nous avons vu dans le chapitre « myogenèse » qu'un grand nombre de glycoprotéines comme la laminine et la fibronectine intervenaient dans différentes étapes du développement musculaire. La glycosylation par son rôle général dans la conformation protéique pourrait donc être impliquée. De même, les glycosphingolipides sont des composants des microdomaines membranaires et pourraient donc intervenir dans les phénomènes de signalisation au niveau de la cellule musculaire, des événements auxquels devraient participer aussi les GAGs puisqu'ils ont la capacité de lier des facteurs de croissance. Enfin, les glycanes, intervenant dans les processus d'interactions et d'adhésions cellulaires, moduleraient de tels événements au cours de la différenciation myogénique. Le rôle des glycanes et glycoconjugués est alors indirectement souligné par l'implication de leurs récepteurs dans la myogenèse. Chez la souris, on peut ainsi citer l'exemple du récepteur à hyaluronane, CD44, qui contrôlerait la migration des myoblastes au cours de la myogenèse précoce (Mylona, E., *et al.* 2006), ou de la galectine 1, qui participe à la fusion des myoblastes et à la régénération de la fibre musculaire (Georgiadis, V., *et al.* 2007). Jusqu'à présent, les données relatives aux rôles spécifiques des glycanes dans la myogenèse restent relativement peu nombreuses. Néanmoins, les éléments exposés dans la suite de ce chapitre attestent de leur implication dans les différentes étapes de la myogenèse.

a. Implication des glycanes dans la somitogenèse

i Les *N*-glycanes

Chez les mammifères, les glycanes prennent part très tôt à la myogenèse, dès la formation des somites. En ce qui concerne les *N*-glycanes, leur implication dans ce processus n'est pas étonnante, puisque la plupart des glycoprotéines cellulaires portent ce type de modification (Vijay, I.K. 1998). Elle est de plus hautement conservée chez les métazoaires et indispensable à la vie cellulaire (Kukuruzinska, M.A. et Lennon-Hopkins, K. 1999). Des défauts dans cette voie métabolique sont responsables chez l'Homme d'un certain nombre de syndromes de type CDG (Congenital Disorder of Glycosylation) se traduisant par des problèmes mentaux et développementaux (Freeze, H.H. et Aebi, M. 2005). Les *N*-glycanes sont essentiels pour le repliement, le transport intracellulaire, la stabilité et la sécrétion des glycoprotéines (Helenius, A. et Aebi, M. 2001). Les *N*-oligosaccharides des glycoprotéines de

surface joueraient des rôles variés dont certains dans les interactions cellule-cellule et cellule-matrice. La *N*-glycosylation est ainsi la voie de modification co-et post-traductionnelle des protéines la plus décrite. La biosynthèse des *N*-glycannes est assez complexe, mais elle peut être divisée en trois grandes étapes (Figure 32) : la synthèse d'un précurseur oligosaccharidique de 14 sucres (Glc3Man9GlcNAc2), son transfert en bloc sur un résidu asparagine du polypeptide en cours de synthèse (Burda, P. et Aebi, M. 1999), puis son remodelage dans le RE et dans l'appareil de Golgi par l'élimination et l'ajout de sucres.

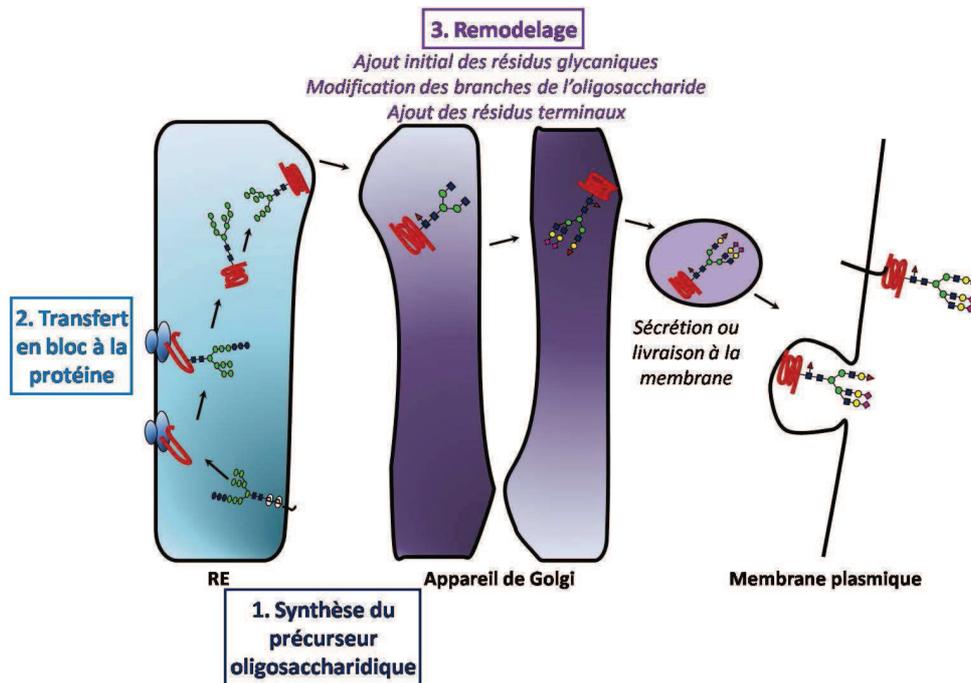


Figure 32. Représentation simplifiée des grandes étapes de la biosynthèse des *N*-glycannes dans la cellule.

Le précurseur oligosaccharidique de 14 sucres (Glc3Man9GlcNAc2) est assemblé sur le dolicholpyrophosphate dans le RE. Il est ensuite transféré en bloc sur un polypeptide en synthèse avant d'être remodelé dans le RE puis dans l'appareil de Golgi par élimination et ajout de sucres. Il est ensuite sécrété ou exposé à la membrane.

Bien que tous les *N*-glycannes partagent un noyau glucidique commun (Man3GlcNAc2-N-Asn), trois classes de *N*-glycannes sont définies (Figure 33) : (1) les *N*-glycannes oligomannosidiques, pour lesquels seuls des résidus mannoses sont attachés au noyau ; (2) les *N*-glycannes complexes, dans lesquels deux antennes glucidiques de taille variables sont attachées au noyau par des *N*-acétylglucosaminyltransférases ; ils peuvent être bi-, tri- ou tétra-antennés chez les mammifères ; (3) les *N*-glycannes hybrides, qui combinent les propriétés structurales des deux classes précédentes. Une grande variété de *N*-glycannes existe

dans chacune des ces catégories, qui se retrouvent majoritairement à la surface des cellules musculaires. Cette variabilité structurale a pour conséquence la grande diversité fonctionnelle des glycannes et des glycoconjugués qui les portent. Leur importance est en effet bien décrite dans le repliement correct, le trafic et la stabilisation des protéines membranaires, de même que dans les interactions cellulaires (Roth, J. 2002).

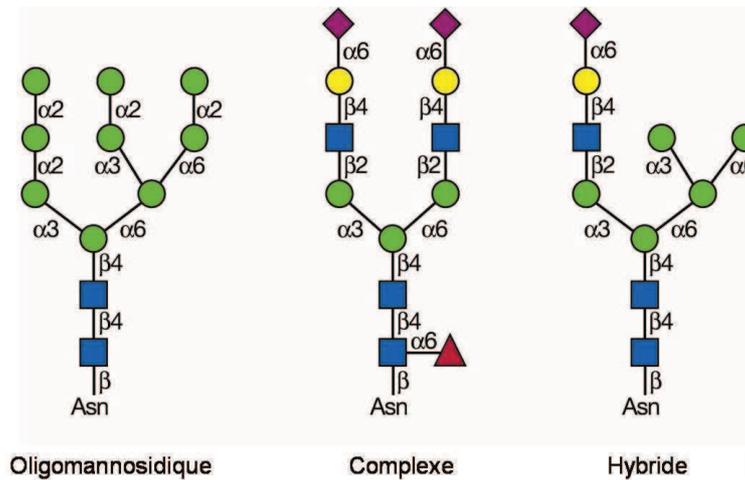


Figure 33. Les trois types de N-glycannes.

Les N-glycannes des glycoprotéines se répartissent en trois classes : oligomannosidiques, complexes, et hybrides. Chaque N-glycane comporte le coeur commun Man3GlcNAc2Asn. Les N-glycannes de type oligomannosidiques sont typiques des glycoprotéines résidentes du RE alors que les N-glycannes des deux autres classes correspondent à 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 établie (anomérisation alpha et beta, carbone impliqué dans la liaison).

Des expériences suggèrent que les N-glycannes complexes et hybrides interviendraient au cours de la myogenèse. En effet, lorsque le gène *Mgat1*, codant pour la GlcNAc transférase I impliquée dans la formation des antennes des N-glycannes complexes et hybrides, a été invalidé, les souris meurent *in utero* au bout du dixième jour *post coïtum* (10,5 j.p.c). Cette létalité est associée à des malformations du tube neural et à un mauvais développement des axes embryonnaires. Ces souris sont de surcroît plus petites que les sauvages et présentent un retard dans la somitogenèse (20 somites contre 26 chez les souris sauvages à 9,5 j.p.c) (Figure 34) (Metzler, M., *et al.* 1994).

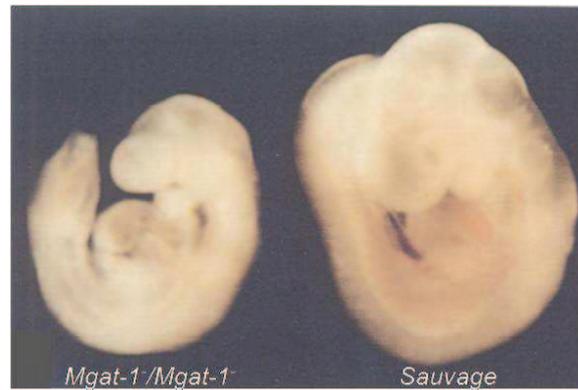


Figure 34. Phénotypes embryonnaires résultant de la perte des *N*-glycannes complexes.

A gauche, un embryon invalidé pour le gène *Mgat-1*, comportant 20 somites ; à droite, un embryon sauvage comportant 26 somites. Les deux embryons sont à 9,5 j.p.c. En l'absence de *N*-glycannes complexes, la taille de l'embryon est d'environ la moitié à deux tiers de celle d'un embryon sauvage. (D'après Metzler, M., *et al.* 1994).

La somitogénèse nécessite également des interactions entre cellules et MEC. Celle-ci détermine les caractéristiques physiques des tissus et les propriétés biologiques des cellules implantées en son sein, *via* notamment des adhésions entre cellules et MEC. La MEC est un mélange complexe de molécules, les composants majeurs étant des protéines fibreuses (comme les différents collagènes et les élastines) qui procurent résistance et élasticité, des glycoprotéines adhésives (comme la fibronectine, la laminine et la tenascine), ainsi que des GAGs libres ou inclus dans les protéoglycannes qui interagissent avec d'autres composants de la MEC pour fournir un gel hydraté résistant aux forces compressives (Bosman, F.T. et Stamenkovic, I. 2003, Scott, J.E. 1995). L'ensemble de ces éléments constitue un environnement régulant la prolifération et la différenciation cellulaires (Bosman, F.T. et Stamenkovic, I. 2003). Les *N*-glycannes portés par les intégrines, récepteurs transmembranaires impliqués dans l'adhésion cellulaire, sont importants pour la régulation des fonctions biologiques de ces lectines (Figure 35) (Gu, J. et Taniguchi, N. 2004). En effet, non seulement le traitement de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ avec la PNGase F, enzyme éliminant les *N*-glycannes, empêche sa liaison à la fibronectine (Zheng, M., *et al.* 1994), mais, de plus, les *N*-glycannes portés par la sous-unité $\alpha 5$ sont essentiels pour l'hétérodimérisation, l'adressage à la surface cellulaire et la fonction biologique de l'intégrine (Gu, J., *et al.* 2009, Zhao, Y., *et al.* 2008). Plusieurs intégrines seraient impliquées dans le bon déroulement de la myogénèse, dont *Itg $\alpha 4$* et *Itg $\alpha 7$* chez la souris, mais leur glycosylation n'a pas été étudiée au cours de ce processus (Mayer, U., *et al.* 1997, Yang, J.T., *et al.* 1996).

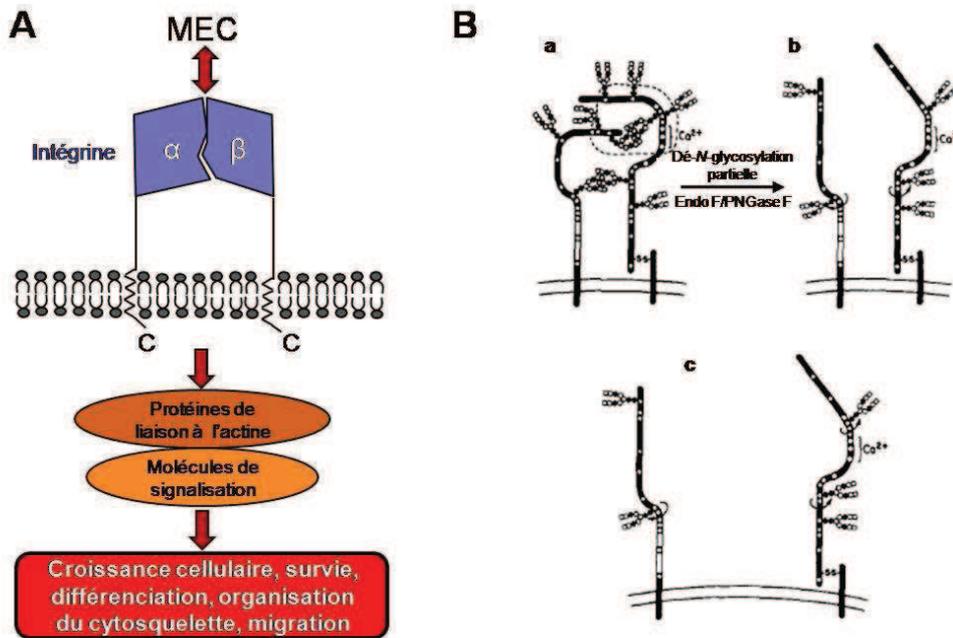


Figure 35. Les N-glycannes régulent les fonctions des intégrines.

A. Les intégrines sont des hétérodimères, chaque sous-unité possède une large région extracellulaire et une courte queue cytoplasmique (sauf les intégrines $\beta 4$). Les domaines N-terminaux des deux sous-unités s'associent pour former l'intégrine, nécessaire à la liaison à la MEC, tandis que le domaine C-terminal régule les interactions avec le cytosquelette et les molécules de signalisation. L'association des intégrines et de la MEC peut ainsi activer de nombreuses voies de signalisation, et affecter la forme cellulaire, la migration, la prolifération et la différenciation. **B.** Les N-glycannes permettraient l'association des intégrines $\alpha 5 \beta 1$ et le maintien de la conformation des deux sous-unités (a). Le site de liaison se forme entre les deux sous-unités et le site de liaison au calcium (pointillés). Une dé-N-glycosylation partielle provoque la rupture des interactions entre glycannes et leur changement d'orientation (flèches incurvées). Ceci entraîne un changement de l'orientation générale du récepteur et donc la dissociation des sous-unités (b et c). (D'après Zheng, M., *et al.* 1994).

ii Les O-glycannes de Notch

L'implication de la glycosylation dans la somitogenèse est particulièrement bien mise en avant par son rôle dans la voie de signalisation par le récepteur Notch. En effet, la présence de O-glucosyl et O-fucosylglycannes est impliquée dans la régulation de cette voie de signalisation qui elle-même régule plusieurs étapes de la myogenèse (cf. §I.2). Les O-fucosyl- et O-glucosylglycannes constituent des modifications protéiques rares ; ils sont ajoutés à des résidus Ser ou Thr contenus dans des séquences consensus spécifiques, contrairement aux autres types de O-glycosylation. Les sites de O-glucosylation se retrouvent sur des protéines comme par exemple les facteurs de coagulation VII et IX, la protéine Z, le récepteur Notch et son ligand Delta, ou la thrombospondine (Shao, L., *et al.* 2002). Ils sont portés par des domaines protéiques extracellulaires, les motifs EGF-like. La O-fucosylation a lieu aussi sur

des motifs EGF-like de protéines retrouvés sur, là encore, le récepteur Notch et de son ligand Delta, les facteurs de coagulation VII et IX et l'urokinase (Haltiwanger, R.S. 2002). Ces motifs EGF-like sont communs à des protéines sécrétées ou adressées à la surface cellulaire. Ils sont souvent impliqués dans le contrôle des interactions protéiques en particulier entre Notch et ses ligands. Le glucose est ajouté sur le groupement hydroxyle d'une sérine appartenant à une séquence consensus de type C^1 -X-S-X-P- C^2 , C^1 et C^2 étant les deux premières cystéines conservées du motif EGF-like (Shao, L., *et al.* 2002) (Figure 36). Ce glucose peut être allongé par le xylose.

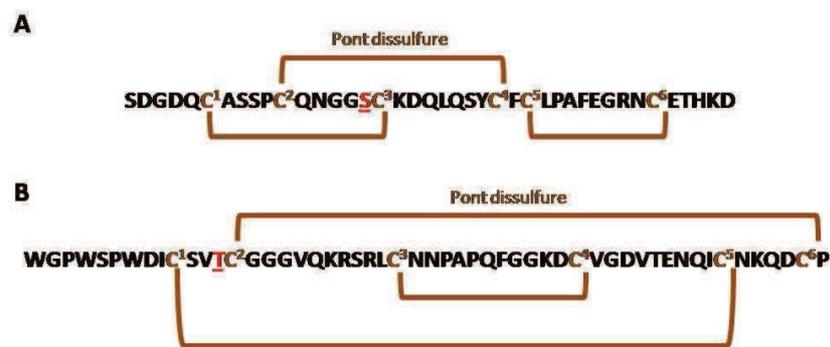


Figure 36. Représentation des domaines EGF et TSR.

A. Séquence du domaine EGF du facteur de coagulation IX humain. **B.** Séquence du domaine TSR3 de la thrombospondine I humaine. Le site de *O*-fucosylation (S ou T) est noté en rouge, les cystéines conservées et les ponts disulfures en marron.

La *O*-fucosylation a lieu quant à elle sur la séquence consensus C^2 -X₄₋₅-(S/T)- C^3 , C^2 et C^3 étant respectivement les deuxième et troisième cystéines (Harris, R.J. et Spellman, M.W. 1993, Panin, V.M., *et al.* 2002) (Figure 36). Le fucose peut aussi être allongé en tétrasaccharide de type NeuAc α 2,3/6Gal β 1,4GlcNAc β 1,3Fuc α 1-O-Ser/thr-EGF (Harris, R.J. et Spellman, M.W. 1993). Un second type de *O*-fucosylation a été identifié sur la protéine matricielle thrombospondine 1 (Hofsteenge, J., *et al.* 2001). L'addition du fucose est effectuée au niveau d'une sérine ou d'une thréonine appartenant à un motif TSR (ThromboSpondin type 1 Repeats). La séquence consensus de ce motif est W-X₅- C^1 -X₂₋₃-(S/T)- C^2 -X₂-G (Shao, L. et Haltiwanger, R.S. 2003). Le fucose est rallongé par un glucose pour aboutir au disaccharide Glc β 1-3Fuc α 1-O-Ser/Thr. Chez la souris, le *O*-fucose est ajouté par la *O*-fucosyltransférase Pofut1, sur les domaines EGF-like de la partie extracellulaire des récepteurs Notch (Moloney, D.J., *et al.* 2000). L'enzyme greffant le fucose sur les domaines TSR est différente, il s'agit de Pofut2 (Protein *O*-fucosyltransferase 2) (Luo, Y., *et al.* 2006a, Luo, Y., *et al.* 2006b). L'inactivation du gène *Pofut1* entraîne une létalité embryonnaire à 9,5 j.p.c suite à de

nombreux dysfonctionnements de somitogenèse, vasculogenèse, cardiogenèse et neurogenèse (Figure 37).

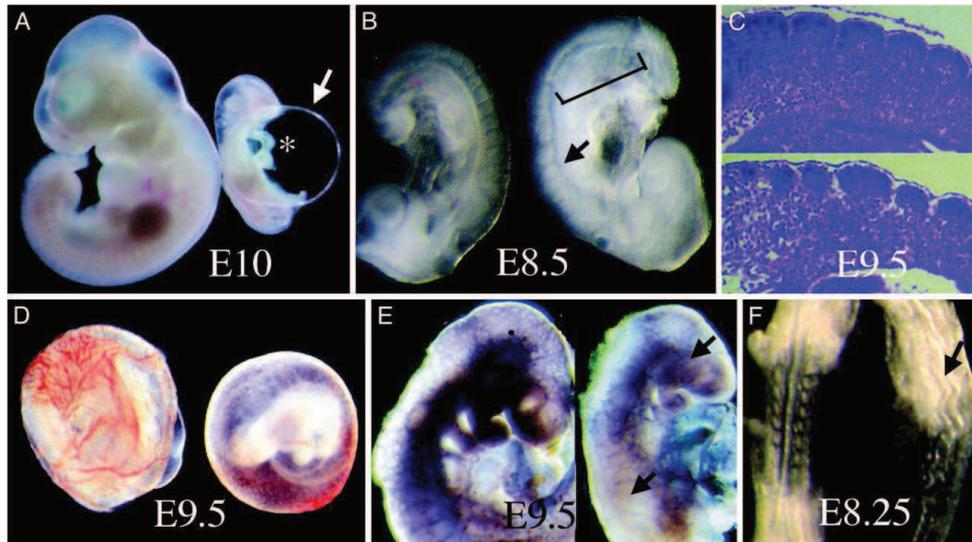


Figure 37. Défauts morphologiques des embryons *Pofut1*^{-/-}.

A. Embryon contrôle sauvage ou hétérozygote (à gauche) et embryon *Pofut1*^{-/-} (à droite) à 10 j.p.c. L'embryon mutant présente un sac péricardique distendu (flèche) et un coeur malformé (astérisque). **B.** Embryon contrôle (gauche) et *Pofut1*^{-/-} (à droite) à 8,5 j.p.c. L' accolade indique la région postérieure avec des somites fusionnés ; la flèche pointe un somite défectueux. **C.** Sections saggitales (7µm) de somites d'embryons contrôle (en haut) et mutant (en bas) à 9,5 j.p.c. **D.** Défaut vasculaire dans le vitellus des embryons *Pofut1*^{-/-} à 9,5 j.p.c. **E.** Marquage anti-PECAM-1 d'un embryon contrôle (à gauche) et mutant (à droite) à 9,5 j.p.c. PECAM-1 est absent du cerveau et des vaisseaux intersomitiques dans le mutant (flèches). **F.** Tube neural nouveau dans l'embryon *Pofut1*^{-/-} (flèche, vue dorsale). (D'après Shi, S. et Stanley, P. 2003).

Le phénotype des souris *Pofut1*^{-/-} est proche de celui qui résulte de l'inactivation des gènes impliqués dans la voie de Notch, comme le régulateur transcriptionnel *CBF1* (C-promoter Binding Factor 1) ou les présénilines 1 et 2, qui interviennent dans le clivage du récepteur activé (Donoviel, D.B., *et al.* 1999). Ces invalidations entraînent toutes une absence de signalisation par les quatre récepteurs Notch des mammifères (Shi, S. et Stanley, P. 2003). L'activité de *Pofut1* est donc indispensable au fonctionnement optimal de la voie de Notch. Par ailleurs, l'expression de la myogénine est elle aussi affectée dans cette lignée mutante, où elle est plus faible (Shi, S. et Stanley, P. 2003).

b. Implication des glycanes dans la migration des précurseurs musculaires

A la formation des somites succède leur compartimentation. Le dermomyotome qui en résulte renferme les précurseurs des cellules musculaires qui se détachent pour migrer vers les

bourgeons des membres. Peu de données relatives aux glycoconjugués des mammifères sont disponibles au cours de ces étapes. Néanmoins, quelques études tendent à démontrer l'implication des GAGs et protéoglycannes dans la migration chez la souris ; elles sont plus nombreuses chez le poulet.

i Structure et diversité des GAGs et des protéoglycannes

Les protéoglycannes sont des composants majeurs de la MEC des cellules animales. Ils se retrouvent également insérés dans la membrane plasmique, ou encore certains peuvent être stockés dans des grains de sécrétion. Ils sont constitués d'un squelette peptidique sur lequel sont greffés, par l'intermédiaire généralement du groupement hydroxyle d'un résidu Ser ou Thr, une ou plusieurs chaînes de GAGs (Figure 38). La liaison protéine-GAG s'effectue par l'intermédiaire d'un tétrasaccharide dit de liaison ($\text{GlcUA}\beta 1,3\text{Gal}\beta 1,3\text{Gal}\beta 1,4\text{Xyl-Ser/Thr}$).

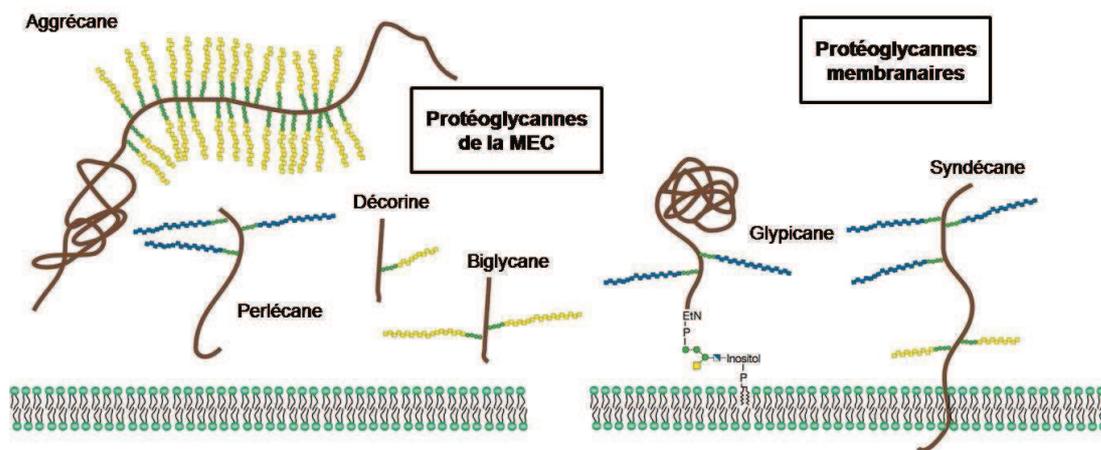


Figure 38. Exemples de protéoglycannes.

Les protéoglycannes sont synthétisés au niveau de l'appareil de Golgi. Ils comportent un coeur protéique (marron) sur lequel sont attachées de façon covalente une ou plusieurs chaînes de GAGs (en bleu les héparanes sulfates, en jaune les chondroïtines et dermatanes sulfates). Les protéoglycannes de la MEC sont habituellement sécrétés, mais certains peuvent être clivés de façon protéolytique et envoyés depuis la surface cellulaire (non présentés ici). Les protéoglycannes membranaires peuvent soit traverser la membrane plasmique, soit être liés par une ancre GPI. Les quatre membres de la famille des syndécans comptent parmi les plus connus. Ils comportent un court domaine intracellulaire cytoplasmique, suivi d'un domaine transmembranaire lié à un long domaine extracellulaire contenant les sites d'attachement des GAGs. Les six membres de la famille des glypicanes, protéoglycannes membranaires substitués également par des GAGs de type héparane sulfate, sont implantés dans le feuillet externe de la membrane plasmique par une ancre GPI, attachée à la protéine au niveau du groupement carboxyl terminal libre. Ils ne possèdent donc pas de queue cytoplasmique. (D'après Varki, A., *et al.* 2008).

Les GAG sont donc majoritairement des *O*-glycannes. Ils correspondent à de longs polysaccharides linéaires, formés d'unités disaccharidiques répétées, ces dernières consistant en un dérivé de sucre aminé et un dérivé d'hexose (Figure 39) (Gandhi, N.S. et Mancera, R.L. 2008).

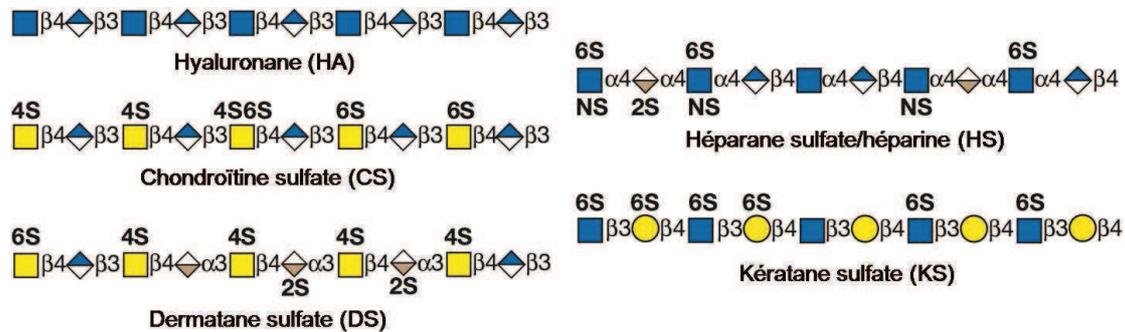


Figure 39. Les GAGs sont constitués d'unités disaccharidiques répétées.

Les unités disaccharidiques comportent un résidu hexosamine *N*-acétylé ou *N*-sulfaté et un acide uronique (acide glucuronique ou iduronique) ou un galactose. Les GAGs portent des sulfates en différentes positions sauf les hyaluronanes qui n'en contiennent pas. Les dermatanes sulfates se distinguent des chondroïtines sulfates par la présence d'acide iduronique. Les kératanes sulfates ont des résidus *N*-acétylglucosamines et galactoses sulfatés à la place des acides uroniques.

Des groupements sulfates sont généralement présents tout au long de la chaîne glycanique, procurant aux GAGs une forte charge négative. Les GAGs sont décrits selon les types de répétitions qui les composent, définissant quatre familles principales : les chondroïtines sulfates, les dermatanes sulfates, les héparanes sulfates et les kératanes sulfates. Le cas de l'acide hyaluronique est différent, il n'est pas lié de façon covalente aux protéines (Gandhi, N.S. et Mancera, R.L. 2008) (Tableau 4).

Tableau 4. Structures des GAGS et sites typiques d'expression.

Les GAGs tiennent leurs noms des tissus à partir desquels ils ont été isolés à l'origine. Ainsi, l'acide hyaluronique et le chondroïtine sulfate, le dermatane sulfate et le kératane sulfate dérivent des membranes hyalines, du cartilage et de la peau, respectivement.

GAG	Unité A	Unité B	Cœur protéique	Liaison	Tissu
Acide hyaluronique	GlcA	GlcNAc	Non	Aucune	Tissus connectifs, Peau, Cartilage, Fluide synovial
Chondroïtine sulfate	GlcA	GalNAc	Oui	O-Xylose	Cartilage, Cornée, Os, Peau, Artères
Dermatane sulfate	GlcA/IdoA	GalNAc	Oui	O-Xylose	Peau, Vaisseaux sanguins, Valves cardiaques
Héparane sulfate	GlcA/IdoA	GlcNAc	Oui	O-Xylose	Poumon, Artères, Surfaces cellulaires
Kératane sulfate	Gal	GlcNAc	Oui	<i>N</i> -GlcNAc (I) <i>O</i> -GalNAc (II)	Cartilage, Cornée, Disques vertébraux

La liaison des GAGs aux protéoglycannes fait intervenir une liaison *O*-glycosidique pour les protéoglycannes de type chondroïtine, dermatane et héparane sulfate (Kitagawa, H., *et al.* 1998). Le cas des kératane sulfates est particulier, puisque les kératane sulfates de type I sont liés à la protéine par une liaison *N*-glycosidique, contrairement aux kératane sulfates de type II qui sont liés par une liaison *O*-glycosidique (Figure 40). La plupart des protéoglycannes comportent également des *N*- et *O*-glycannes de type oligosaccharide, mais les chaînes de GAGs sont beaucoup plus longues (une chaîne de GAG contient environ 80 résidus de sucre, alors qu'un *N*-glycanne biantenné classique en contient de 10 à 12). Ainsi, les sucres peuvent représenter jusqu'à 95% du poids d'un protéoglycanne, alors qu'ils ne constituent que 1 à 60% du poids d'une glycoprotéine.

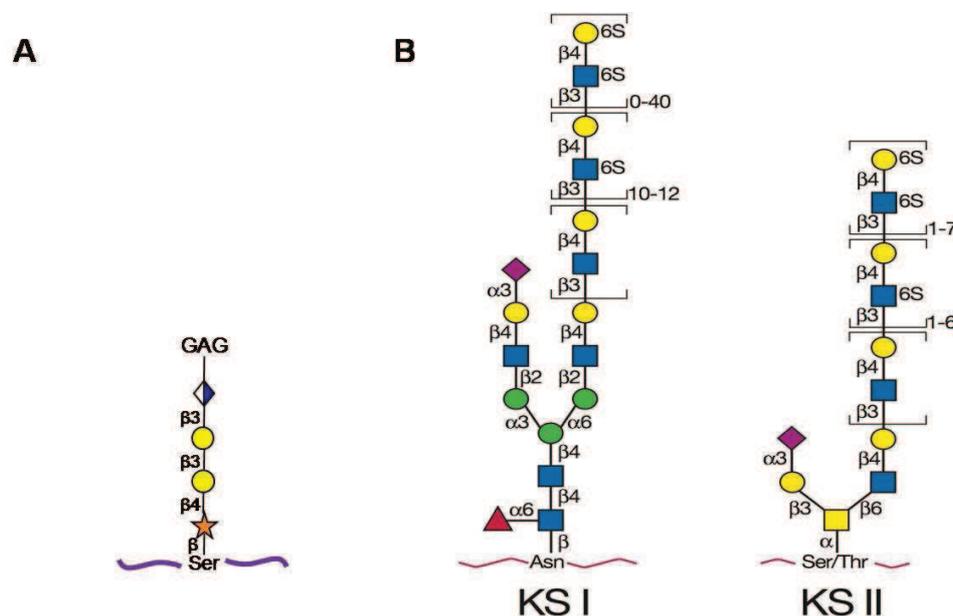


Figure 40. Liaison des GAGs au cœur protéique des protéoglycannes, représentation schématique.

A. Liaison des GAGs au cœur protéique des protéoglycannes. La liaison des GAGs aux protéoglycannes fait intervenir le tétrasaccharide $\text{GlcUA}\beta 1,3\text{Gal}\beta 1,3\text{Gal}\beta 1,4\text{Xyl}\beta 1\text{-O-S}$ pour les protéoglycannes de type chondroïtine, dermatane et héparane sulfate. (D'après Kitagawa, H., *et al.* 1998). **B.** Liaison et structure des kératanes sulfates. Les kératanes sulfates sont liés soit à un résidu asparagine (Asn), soit à un résidu sérine (Ser) ou thréonine (Thr). N représente la répétition des unités disaccharidiques.

La diversité des protéoglycannes tient à leur composante protéique et à sa substitution par un ou deux types de GAGs pouvant être en nombre variable. Ces caractéristiques font des protéoglycannes une large famille de glycoconjugués, chaque classe étant divisée en de nombreuses sous-familles (Tableau 5).

Tableau 5. Exemples de protéoglycannes

Chondroïtines sulfates (CS)			
Protéoglycanne	Protéine cœur (kDa)	Nombre de chaînes de GAGs	Distribution
Aggrécane	208–220	~100 CS	Sécrété, cartilage
Versicane	265	12–15 CS	Sécrété, tissu connectif, aorte, cerveau
Brévicane	96	0–4 CS	Sécrété, cerveau
Décorine	36	1 CS	Sécrété, tissu connectif
Biglycane	38	1–2 CS	Sécrété, tissu connectif
Léprécane	82	1–2 CS	Sécrété, membrane basale
Collagène type IX, chaîne $\alpha 2$	68	1 CS	Sécrété, cartilage,
CD44	37	1–4 CS	Membrane, lymphocytes
NG2	251	2–3 CS	Membrane, cellules neuronales
Serglycine	10–19	10–15 CS	Granules intracellulaires, cellules myéloïdes
Kératanes sulfates (KS)			
Protéoglycannes	Protéine cœur (kDa)	Type	Distribution
Lumicane	37	KS I	Sécrété, large
Kératocane	37	KS I	Sécrété, large, mais sulfaté uniquement dans la cornée
Claustrine	105	KS II	Membrane, SNC
Aggrécane (Homme)	200	KS II	Sécrété, cartilage
Héparanes sulfates (HS)			
Protéoglycanne	Protéine cœur (kDa)	Nombre de chaînes de GAGs	Distribution
Perlécane	400	1–3 HS	Sécrété, membrane basale, cartilage
Agrine	200	1–3 HS	Sécrété, jonctions neuromusculaires
Collagène type XVIII	147	2–3 HS	Sécrété, membrane basale
Syndécanes 1–4	31–45	1–3 CS 1–2 HS	Membrane Cellules épithéliales et fibroblastes
Glypicanes 1–6	~60	1–3 HS	Membrane, cellules épithéliales et fibroblastes
Serglycine	10–19	10–15 héparine/CS	Granules intracellulaires, cellules mast
Dermatanes sulfates (DS)			
Protéoglycanne	Protéine cœur (kDa)	Nombre de chaînes de GAG	Distribution
Décorine	40	1 DS	Sécrété, tissu connectif
Biglycane	40	2 DS	Sécrété, tissu connectif
Endocane	50	1 DS	Sécrété, cellules endothéliales

ii Fonctions des GAGs et protéoglycannes dans la migration

La grande diversité structurale des GAGs et des protéoglycannes reflète leur diversité fonctionnelle, qui est aussi associée à leur localisation à la surface cellulaire. Les GAGs et protéoglycannes de surface jouent en effet des rôles clés dans de nombreux événements cellulaires fondamentaux (Figure 41). Ils sont impliqués dans les processus de prolifération, migration, différenciation, interaction, adhésion et signalisation cellulaires ; ils jouent de ce fait des rôles prépondérants pour l'organisation, la structure et la maturation de tissus (Iozzo, R.V. 1998). Les GAGs et protéoglycannes interviennent aussi dans la réponse immunitaire et dans la liaison de pathogènes et contribuent de ce fait à différentes pathologies. Ils interviennent dans la viscosité et la résistance aux compressions des tissus (Schönherr, E., *et al.* 1995, Scott, J.E. 1995). Les protéoglycannes sont aussi des composants des membranes basales de la MEC (Kramer, J.M. 2005). Ils fournissent un support pour la migration cellulaire, la prolifération et la différenciation (Adams, J.C. et Watt, F.M. 1993, Sanes, J.R. 2003). Ils facilitent ainsi la migration des cellules au cours de la morphogenèse (Sanes, J.R. 2003, Spicer, A., P et Tien, J., Y. L 2004), comme le perlecane au cours du développement du cartilage (Gomes, R.R., Jr., *et al.* 2004, Knox, S.M. et Whitelock, J.M. 2006). Les protéoglycannes peuvent en effet coopérer avec des molécules d'adhésion pour faciliter l'attachement cellulaire, les interactions cellule-cellule, et la mobilité cellulaire, largement sollicités au cours de la myogenèse. Il a par exemple été démontré sur des cellules C2C12 que le dermatane sulfate favorisait la migration dépendante des HGFs (Villena, J. et Brandan, E. 2004). Chez le poulet, des études ont montré que la décorine participait à la régulation de la migration (Olguin, H.C., *et al.* 2003). Elle pourrait être impliquée dans l'inhibition de la migration pour l'obtention d'une densité cellulaire adéquate à la différenciation myogénique (Brandan, E., *et al.* 2008). Dans le même modèle, des micro-injections d'acide hyaluronique dans le bourgeon des ailes ont des effets positifs sur la migration des précurseurs musculaires (Krenn, V., *et al.* 1991).

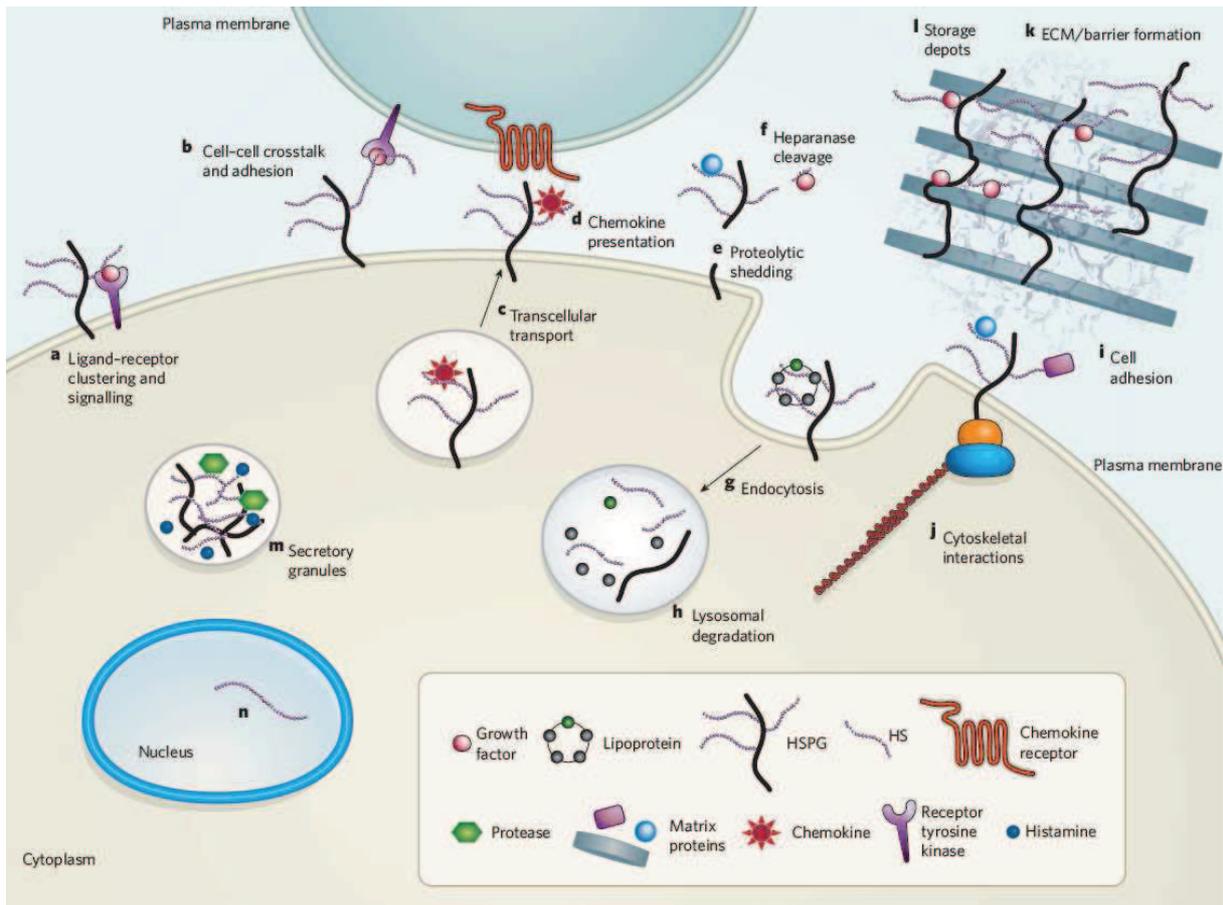


Figure 41. Rôles des protéoglycannes dans la physiologie cellulaire : exemple des héparanes sulfates.

Les protéoglycannes, comme les héparanes sulfates, peuvent fonctionner en tant que co-récepteurs pour des facteurs de croissance et leurs récepteurs tyrosine kinase, présents soit sur la même cellule (a) ou sur une cellule adjacente (b). Ils transportent des chémokines à travers les cellules (c) et les présentent au niveau de la surface cellulaire (d). Le clivage protéolytique entraîne la libération des syndécanes et des glypicanes à partir de la surface cellulaire (e), et l'héparanase clive les chaînes d'héparanes sulfates (f), libérant les ligands liés, comme les facteurs de croissance. Les héparanes sulfates de la surface cellulaire sont activement endocytés (g) et peuvent être recyclés à la surface ou dégradés dans les lysosomes (h). Les héparanes sulfates facilitent aussi l'adhésion cellulaire à la MEC (i) et constituent des liaisons avec le cytosquelette (j). Les héparanes sulfates sécrétés sont impliqués dans la formation de MECs organisées formant des barrières physiologiques (k) ; elles séquestrent également des facteurs de croissance et des morphogènes pour les libérer plus tardivement (l). Les chaînes d'héparine hautement sulfatées sont incluses dans des granules de sécrétion des cellules hématopoiétiques (m). Enfin, il semblerait que les chaînes d'héparanes sulfates existent dans le noyau (n), mais leur fonction y est inconnue. (D'après Bishop, J.R., *et al.* 2007).

c. La progression myogénique : prolifération et fusion

Une fois situés dans les bourgeons des membres, les précurseurs myogéniques vont débiter leur différenciation. Deux processus cruciaux vont alors intervenir des glycanes, la prolifération des myoblastes et leur fusion. Les données correspondantes restent parcellaires, en particulier chez les mammifères.

i Des glycoconjugués influencent la prolifération

Au sein de la MEC, les protéoglycannes interviendraient dans la régulation de la prolifération en interférant avec les fonctions des facteurs de croissance. Ils possèdent effectivement tant des rôles structuraux que des fonctions de signalisation cellulaire. Les protéoglycannes peuvent agir en tant que corécepteurs pour de nombreux facteurs de croissance (Figure 41) et coopérer avec des molécules d'adhésion pour faciliter l'attachement cellulaire, les interactions cellule-cellule, et la mobilité cellulaire. Leur organisation en gel hydraté dans la MEC permet le contrôle de la disponibilité de molécules de signalisation hydrosolubles. Ils peuvent en effet lier des cytokines, des facteurs de croissance et des morphogènes (Dreyfuss, J.L., *et al.* 2009, Gandhi, N.S. et Mancera, R.L. 2008, Jackson, R.L., *et al.* 1991), et les préserver de la protéolyse. Les protéoglycannes sont ensuite capables de les libérer par une dégradation sélective de la matrice. C'est le cas de certains facteurs de croissance de la famille des FGFs. Ces facteurs se lient aux héparines portées par des protéoglycannes de la surface cellulaire, à proximité des cellules qui doivent être stimulées (Figure 41). Cette liaison empêcherait la diffusion de ces facteurs loin du site d'action, tout en permettant leur relargage dans des conditions particulières (Bishop, J.R., *et al.* 2007, Mohammadi, M., *et al.* 2005). Ces interactions avec les FGFs, comme avec d'autres facteurs de croissance, initient les cascades de signalisation intracellulaire (Dreyfuss, J.L., *et al.* 2009). Des glycanes présents sous forme libre peuvent aussi induire des réponses spécifiques. Des fragments d'héparanes sulfates ou de dermatanes sulfates, relargués par certains types cellulaires, ont des effets biologiques majeurs comme dans le cas de la cicatrisation (Kosir, M.A., *et al.* 2000, Trowbridge, J.M. et Gallo, R.L. 2002, Yung, S. et Chan, T.M. 2007).

Des données montrent une implication des GAGs dans la prolifération des cellules musculaires. Chez le poulet, par exemple, la décorine se lie au TGF β 1, qui inhibe la prolifération et la différenciation des cellules musculaires. Elle induit également la prolifération et la différenciation des cellules satellites en régulant la réponse cellulaire au TGF β 1 (Li, X., *et al.* 2008). Le glypicane-1 régulerait chez la dinde la prolifération et la différenciation des cellules myogéniques cette fois par la voie de signalisation impliquant FGF2 (Velleman, S.G., *et al.* 2006). Bien que peu d'études sont disponibles chez les mammifères, il semblerait toutefois que la régulation de la signalisation par les TGF β , par des protéoglycannes de la MEC (décorine, biglycane), qui diminueraient leur disponibilité, soit également un mécanisme impliqué dans la formation du muscle (Droguett, R., *et al.* 2006). Plusieurs éléments, à l'échelle cellulaire, tendent aussi à montrer l'implication de la décorine

dans ce phénomène. Les cellules C2C12 surexprimant ce protéoglycane prolifèrent davantage et forment des myotubes de taille plus importante. L'activité de la myostatine est également inhibée. Au contraire, la sous-expression de la décorine bloque la croissance des myoblastes C2C12 et augmente la sensibilité à la myostatine exogène. La décorine augmenterait donc la prolifération et la différenciation des cellules myoblastiques C2C12 en inhibant l'activité de la myostatine (Kishioka, Y., *et al.* 2008). La CT (Cytotoxic T cell GalNAc transférase (Galgt2), enzyme impliquée dans la synthèse de l'antigène CT (GalNAc β 1,4[Neu5Ac(orGlc) α 2,3]Gal β 1,4GlcNAc β -) présent au niveau de la synapse neuromusculaire, pourrait aussi contrôler la croissance musculaire en régulant l'expression de la myostatine. Sa surexpression stimule en effet l'expression et la signalisation de la myostatine dans les cellules C2C12 (Chandrasheharan, K. et Martin, P.T. 2009). Enfin, le dermatane sulfate favorise également la prolifération des cellules C2C12, lorsque celle-ci dépend de la voie de signalisation par les HGFs et les FGF2 (Villena, J. et Brandan, E. 2004).

Indépendamment des protéoglycannes, chez la souris, muter l'enzyme POMGnT1 (Protein O-linked mannose β 1,2-N-acetylglucosaminyltransferase 1), qui transfère un résidu *N*-acetylglucosamine à du *O*-mannose sur les glycoprotéines, affecte aussi la prolifération de cellules satellites. Les mutations du gène *POMGnT1* sont connues pour être à l'origine de dystrophies musculaires, sur lesquelles nous reviendrons, mais *in vitro* les myoblastes ainsi mutés présentent aussi une diminution de la vitesse de prolifération des cellules satellites, *via* une glycosylation altérée de l' α -dystroglycane (Miyagoe-Suzuki, Y., *et al.* 2008).

ii D'autres glycoconjugués participent à la fusion des myoblastes

S'il est une étape à laquelle les glycannes peuvent être préférentiellement sollicités, c'est bien celle de la fusion des myoblastes en myotubes. En effet, elle implique des contacts cellulaires, avec des interactions et des processus d'adhésion cellulaires précédant la fusion des bicouches lipidiques. Ainsi, les nombreux glycannes présents au niveau des surfaces cellulaires, dans la MEC et sur la membrane plasmique, sont susceptibles de jouer des rôles cruciaux.

- Les GAGs et glycoprotéines de la surface cellulaire

Après prolifération, les myoblastes atteignent une densité qui les autorise à débiter leur différenciation en myotubes, *via* notamment leur fusion. Durant ce processus, la composition en glycannes de la surface cellulaire est modifiée. Chez la souris, il existe ainsi

pour les protéoglycannes une transition entre une MEC riche en chondroïtines sulfates avant la fusion et une MEC riche en dermatanes et héparanes sulfates lors de la fusion des myoblastes (Young, H.E., *et al.* 1990). L'implication des GAGs et des protéoglycannes dans les contacts cellulaires préalables à l'adhésion cellulaire a été décrite depuis fort longtemps. Les protéoglycannes de surface participent à la liaison transmembranaire des composants du cytosquelette à la matrice extracellulaire (LeBaron, R.G., *et al.* 1988, Woods, A., *et al.* 1986). Cette fonction est illustrée par les syndécanes, des protéoglycannes membranaires substitués notamment par des héparanes sulfates (Figure 42), qui modulent l'activité des intégrines lors de l'adhésion cellulaire au niveau des zones de contact focal *in vitro* chez les mammifères (Woods, A. et Couchman, J.R. 1994). Les syndécanes facilitent également les interactions cellulaires avec un grand nombre de ligands extracellulaires, tels que des facteurs de croissance et des molécules de la matrice (Bass, M.D. et Humphries, M.J. 2002, Streuli, C.H. et Akhtar, N. 2009). Grâce à leurs composantes membranaire et cytoplasmique, ils peuvent transmettre des signaux de l'environnement cellulaire vers l'intérieur de la cellule. Ces signaux permettent par exemple de recruter des kinases, comme la protéine kinase C, ou des protéines du cytosquelette, telle que l' α -actinine (Kuriyama, S. et Mayor, R. 2009, Okina, E., *et al.* 2009). De même, les glypicanes (Figure 42) lient un grand nombre de facteurs impliqués dans le développement et la morphogenèse, notamment le glypican 3 chez les mammifères (Song, H.H. et Filmus, J. 2002).

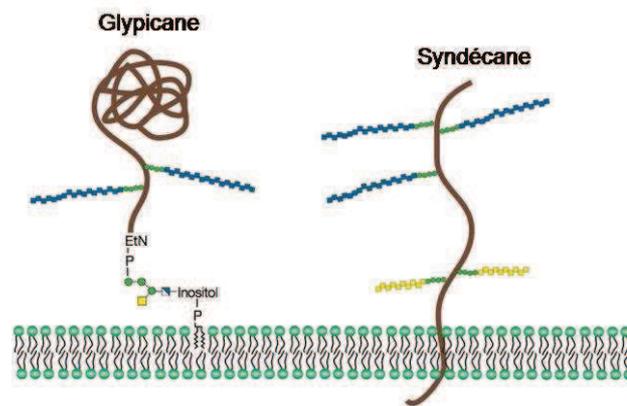


Figure 42. Les glypicanes et les syndécanes, protéoglycannes membranaires.

Les protéoglycannes membranaires peuvent soit traverser la membrane plasmique, soit être liés par une ancre GPI. (D'après Varki, A., *et al.* 2008).

Dès 1980, l'étude de la différenciation de myoblastes de rat L6 en myotubes a aussi montré une modification des glycopeptides de surface en termes de taille et de composition en carbohydrates (Wahrmann, J.P., *et al.* 1980). La composition en *N*-glycoprotéines de la membrane plasmique est modifiée (Senechal, H., *et al.* 1983, Weintraub, H., *et al.* 1989). Une étude récente en protéomique a identifié 184 protéines de surface *N*-glycosylées présentes sur les myoblastes C2C12 (Gundry, R.L., *et al.* 2009). Elle confirme aussi les changements de quantité de plusieurs *N*-glycoprotéines mis en évidence par des études ponctuelles, telles que la cadhérine 2 et le β -sarcoglycane. Toutefois, dès 1984, il a été montré que la tunicamycine, inhibiteur de la biosynthèse des *N*-glycannes, bloquait la fusion des myoblastes L6 en culture (Cates, G.A., *et al.* 1984b). Sur ces mêmes cellules, l'utilisation d'inhibiteurs de glucosidases ou de mannosidases montre respectivement que la fusion des myoblastes en myotubes est bloquée ou peu altérée (Holland, P.C. et Herscovics, A. 1986). Ces résultats démontrent que parmi les *N*-glycannes, ce sont ceux de types oligomannosidiques qui seraient requis pour la fusion myoblastique. L'absence de fusion des myoblastes peut être due à la présence anormale de résidus glucose à la périphérie des glycoprotéines de surface impliquées dans la fusion et qui, par conséquent, seraient non reconnues. Par ailleurs, l'analyse d'un mutant spontané de la lignée L6 incapable de fusionner a permis de déterminer qu'il était en fait déficient dans le transfert des résidus mannoses sur le dolicholpyrophosphate, provoquant une biosynthèse anormale des *N*-glycannes (Cates, G.A., *et al.* 1984a). Malgré tout, le rôle précis des *N*-glycannes reste à déterminer car des travaux contradictoires à ceux évoqués dans ce paragraphe suggèrent que les oligosaccharides de type oligomannosidique ne seraient peut être pas impliqués dans la différenciation des myoblastes (Clarke, E., *et al.* 1989).

Les études « globales » que nous venons de citer ont ouvert la voie à d'autres travaux plus ciblés sur l'importance des glycannes dans la régulation de la différenciation myogénique. Certains travaux permettent ainsi de préciser leur fonction dans la fusion des myoblastes. Ainsi, les PSA et les *O*-glycannes de type mucines portés par NCAM jouent un rôle dans la fusion des myoblastes murins. Les *O*-glycannes de type mucine sont liés *via* une *N*-acétylgalactosamine (GalNAc) à une sérine ou une thréonine. Cette *O*-glycosylation, très répandue et très variée chez les mammifères, tient son nom des protéines, les mucines, sur lesquelles elle a été mise en évidence (Figure 43).

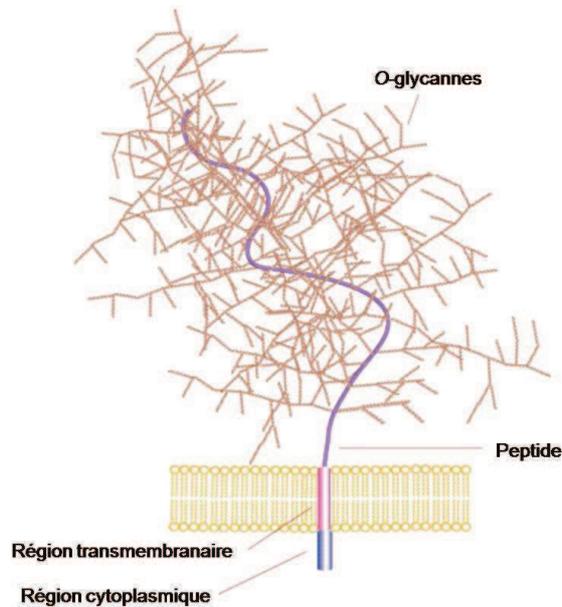


Figure 43. Représentation schématique d'une mucine.

Les séquences protéiques répétées en tandem, riches en sérine, thréonine et proline, sont hautement *O*-glycosylées par des glycannes *O*-GalNAc de structures variées.

Les *O*-glycannes peuvent représenter jusqu'à 80% de la masse moléculaire de ces glycoprotéines (Jan-Willem Van Klinken, B., *et al.* 1998). Elles se retrouvent dans les sécrétions des muqueuses ainsi que sous forme transmembranaire à la surface cellulaire, la partie glycanique étant exposée à l'environnement cellulaire. Les mucines ne sont pas les seules protéines possédant des glycannes liés par un résidu GalNAc. De façon générale, diverses protéines appartenant aux épithéliums (comme la podoplanine), à l'endothélium vasculaire (comme CD34 et GLYCAM-1) et à la surface des érythrocytes (antigènes sanguins ABO et tissulaires de type Lewis) en possèdent également. Il existe huit cœurs glycaniques communs pour la *O*-glycosylation de type mucine (Tableau 6).

Tableau 6. Structures des différents cœurs glycaniques retrouvés sur les O-glycannes de type mucine.

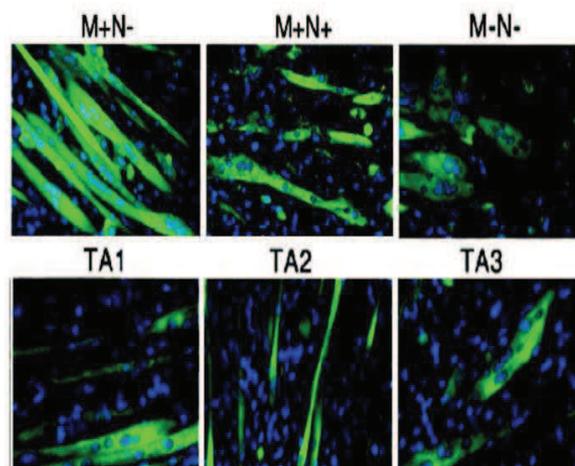
Le résidu GalNAc initial est indiqué en gras.

Coeur	Structure
Tn antigen	GalNAc α Ser/Thr
Sialyl-Tn antigen	Sia α 2-6 GalNAc α Ser/Thr
Coeur 1 ou antigène T	Gal β 1-3 GalNAc α Ser/Thr
Coeur 2	GlcNAc β 1-6(Gal β 1-3) GalNAc α Ser/Thr
Coeur 3	GlcNAc β 1-3 GalNAc α Ser/Thr
Coeur 4	GlcNAc β 1-6(GlcNAc β 1-3) GalNAc α Ser/Thr
Coeur 5	GalNAc α 1-3 GalNAc α Ser/Thr
Coeur 6	GlcNAc β 1-6 GalNAc α Ser/Thr
Coeur 7	GalNAc α 1-6 GalNAc α Ser/Thr
Coeur 8	Gal α 1-3 GalNAc α Ser/Thr

Dans le tissu musculaire, des O-glycannes de type mucine sont attachés au domaine MSD de NCAM (Walsh, F.S., *et al.* 1989). Lors de la transfection de NCAM dans les cellules C2C12, la mutation des sites de O-glycosylation du MSD diminue la fusion des myoblastes, tout comme l'expression forcée de PSA par la surexpression de la polysialyltransférase ST8SiaIV. Son inhibition induit au contraire la différenciation et la fusion (Figure 44). Les PSA et les O-glycannes de type mucines de NCAM régulent donc la fusion des myoblastes (Suzuki, M., *et al.* 2003).

Figure 44. Effet de la polysialylation et de la O-glycosylation de NCAM sur la fusion des C2C12.

Marquage immunofluorescent de la myosine (en vert) et des noyaux (en bleu). Différentes isoformes de NCAM ont été transfectées dans les C2C12. Elles correspondent à des formes avec ou sans le domaine MSD (M+ ou M-), avec ou sans les sites de N-glycosylation pour la polysialylation (N+ ou N-). D'autres formes sont mutées pour un, deux ou trois sites de O-glycosylation du domaine MSD (TA1, TA2 et TA3). Les mutations de ces sites réduisent la fusion des C2C12, de même que la présence de PSA sur NCAM ou l'absence complète du domaine MSD. (D'après Suzuki, M., *et al.* 2003).

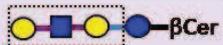


- Les glycosphingolipides

Jusqu'à présent, le rôle des glycosphingolipides dans la myogenèse n'a pas été évoqué. En effet, peu d'éléments sont connus sur leur implication dans ce processus. Chez les vertébrés, presque tous les glycolipides membranaires sont pourtant des glycosphingolipides. A titre d'exemple, ils représentent plus de 80% des glycoconjugués du cerveau chez les mammifères. *A contrario*, le muscle squelettique constitue chez les vertébrés le tissu qui en contient le moins (Muthing, J. et Cacic, M. 1997, Muthing, J., *et al.* 1994). Néanmoins, chez la souris et chez l'Homme, le lactosylcéramide et le GM3 sont respectivement le glycosphingolipide neutre et le ganglioside majeurs du muscle squelettique (Muthing, J. et Cacic, M. 1997, Muthing, J., *et al.* 1994).

- Caractéristiques générales des glycosphingolipides

La biosynthèse des glycosphingolipides débute dans le RE et se poursuit dans le Golgi, les sucres étant ajoutés de façon séquentielle par une série de glycosyltransférases, parfois identiques à celles ajoutant les sucres terminaux des glycoprotéines. Les glycosphingolipides partagent donc avec les glycoprotéines des structures terminales variées. Cette diversité s'ajoute à celle de la composante lipidique, conduisant à une très grande variabilité des glycosphingolipides. La structure du céramide des glycosphingolipides peut en effet considérablement varier en longueur, hydroxylation et saturation des composantes sphingosine et acide gras. Cette grande diversité structurale influe sur la présentation du glycanne au niveau des surfaces des membranes. La classification des glycosphingolipides repose principalement sur la partie glycanne. Deux sous-groupes sont ainsi définis, selon que le premier sucre attaché à la sphingosine est du galactose (GalCer) ou du glucose (GlcCer). Les galactolipides sont rarement étendus avec de longues chaînes saccharidiques, tandis que les glucosphingolipides sont généralement plus élaborés et se rapprochent des glycannes retrouvés sur les glycoprotéines. En fait, la plupart des glycosphingolipides chez les animaux supérieurs est construite à partir de GlcCer. En général, le glucose est substitué par un galactose pour donner le lactosylcéramide (Gal β 1-4Glc β Cer). Les extensions supplémentaires du glycanne génèrent une série de structures « cœurs » neutres servant de base à la nomenclature des glycosphingolipides (Figure 45). Sont ainsi distingués les ganglio-séries, les lacto-séries, les néo-lactoséries et les globoséries. Les glycosphingolipides peuvent aussi être classés selon qu'ils sont neutres, sialylés ou sulfatés.

Série	Structure	Abreviation
Lacto		Lc ₃ Cer
		Lc ₄ Cer
Neolacto		nLc ₄ Cer
		nLc ₆ Cer
Ganglio		Gg ₃ Cer
		Gg ₄ Cer
Globo		Gb ₃ Cer
		Gb ₄ Cer

— α 1,4 — β 1,3 — β 1,4

Figure 45. Structures "cœur" majeures des glycosphingolipides.
Les signatures structurales définissant chaque famille sont encadrées.

Les rôles des glycosphingolipides en tant qu'antigènes, récepteurs de toxines bactériennes, médiateurs de l'adhésion cellulaire et de la transduction du signal (Hakomori, S. 1981, Hakomori, S. 1998, Hakomori, S., *et al.* 1998) sont connus depuis longtemps (Tableau 7). Les rôles biologiques des glycosphingolipides sont désormais bien connus dans la régulation d'interactions cellulaires ou encore la modulation de fonctions protéiques (Lahiri, S. et Futerman, A. 2007). Nombre de ces fonctions résultent de la capacité des glycosphingolipides à se regrouper en microdomaines au niveau de la membrane. Ainsi rassemblés, les glycosphingolipides pourraient interagir avec des composants fonctionnels variés de la membrane cellulaire comme les intégrines, les récepteurs de facteurs de croissance, comme les récepteurs EGF, ou encore des protéines kinases. Ils participent de cette façon à la constitution des domaines contrôlant l'adhésion cellulaire, la croissance, ou la mobilité (Hakomori, S. 2004, Hakomori, S. et Handa, K. 2002). Leurs rôles sont souvent associés à ceux des rafts lipidiques des membranes plasmiques, qui regroupent en effet de nombreux glycosphingolipides (Hakomori, S. 2004). Un autre type de microdomaine impliquant les glycosphingolipides est la glycosynapse (Figure 46). Elle constitue une plateforme fonctionnelle pour la cellule. Du fait de leur composition et leurs propriétés, les glycosynapses sont différentes des rafts lipidiques, riches en cholestérol et sphingolipides, ou

des cavéoles. Celles-ci correspondent à des invaginations membranaires à composition proche des rafts mais comportant de la cavéoline (Todeschini, R.A. et Hakomori, S.-i. 2008).

Tableau 7. Exemples de fonctions des glycosphingolipides.

Les glycosphingolipides possèdent des fonctions variées, ils constituent des structures antigéniques (1), des récepteurs pour des pathogènes (2), ils régulent les phénomènes d'adhésion et de reconnaissance cellulaires (3) et contrôlent aussi la mobilité cellulaire et la transduction du signal (4). (D'après Todeschini, R.A. et Hakomori, S.-i. 2008).

(1) Antigènes

- groupes sanguins ABH; Lewis (Le^a, Le^b, Le^c, Le^d, etc); I/i; antigènes P, P^k et p
 - antigènes spécifiques du type cellulaire (CD15, CD76, CD75, CD71, CD57, CD65)
 - antigènes régulés au cours du développement [stage-specific embryonic antigen-1 (SSEA-1), Le^x, SSEA-3, SSEA-4, etc]
 - antigènes associés aux tumeurs [Gb3, Gal-Gb4, Globo-H, GD3, GD2, fucosyl GM1, sialosyl-Le^c, sialosyl-Le^a, etc]
-

(2) Récepteurs pour les agents microbiens et les toxines

- cholératoxine (GM1)
 - *E. coli* (globoséries GSL)
 - *Staphylococcus* (Gg4; asialo-GM1)
-

(3) Adhésion cellulaire, reconnaissance

- Adhésion des cellules neuronales à la gaine de myéline : gangliosides et glycoprotéines associées à la myéline
 - Interaction GM3-LacCer/Gg3 régulant l'adhésion des mélanomes aux cellules endothéliales (initiation des métastases)
 - Interaction Le^x-Le^x régulant l'embryogenèse murine
-

(4) Contrôle de la mobilité cellulaire et de la transduction du signal

- Complexe GM3/TSP CD9
 - Complexe GM2/GM3/CD82
-

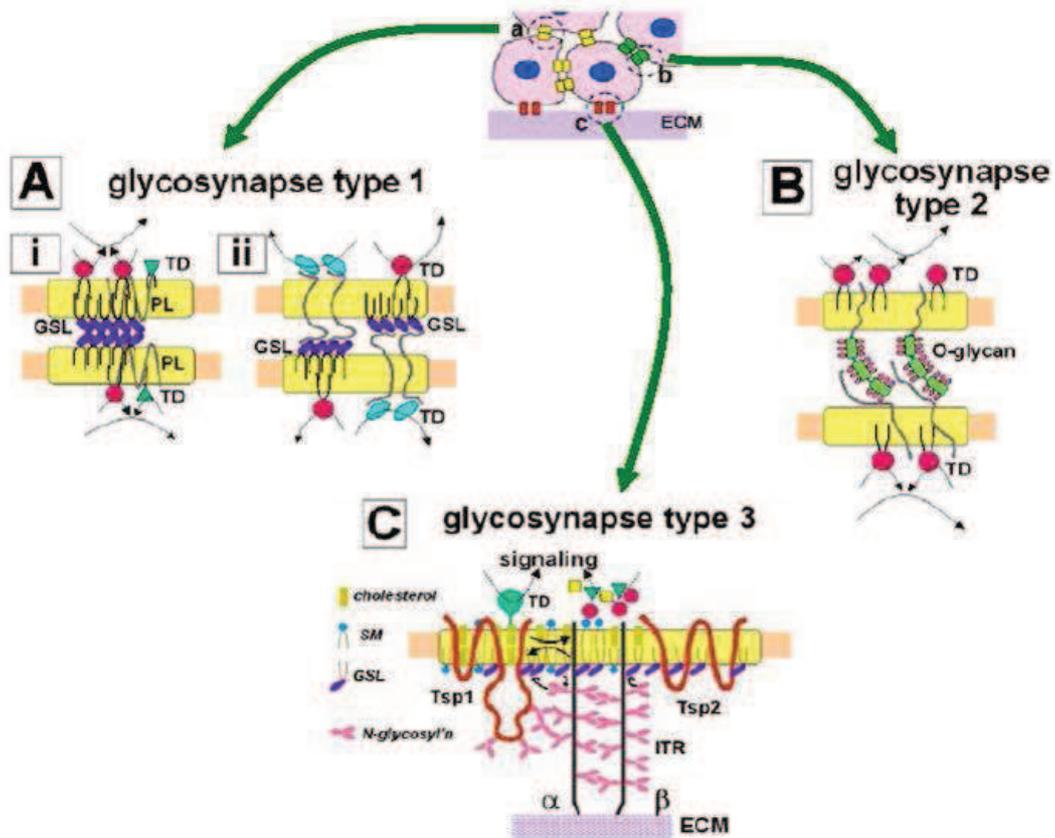


Figure 46. Les glycosynapses.

La glycosynapse est impliquée dans les phénomènes d'adhésion cellule-cellule et cellule-MEC. Les sites d'adhésion cellule-cellule (**a** et **b**, en haut) sont constitués de microdomaines qui se font face (en jaune et vert). Les adhésions cellule-MEC (**c**, en haut) impliquent un microdomaine de structure différente (en rouge). Actuellement, trois types différents de glycosynapses sont décrits. **(A)** La glycosynapse de type 1, exemple de sites d'adhésion (**a**), est basée sur des interactions **(A-i)** entre glycosphingolipides (GSL) ou **(A-ii)** entre glycosphingolipide et protéine de liaison, dans lesquelles les glycosphingolipides sont associés avec des transducteurs du signal (TD) et stabilisés par des protéolipides (PL). **(B)** La glycosynapse de type 2, un autre site d'adhésion cellule-cellule (**b**), est basée sur des glycoprotéines portant des glycanes de type mucines reconnues par des protéines. Les *O*-glycanes et les protéines qui les reconnaissent sont associés avec des transducteurs du signal. **(C)** L'adhésion cellule-MEC (fibronectine, collagène, laminine) implique un récepteur d'adhésion *N*-glycosylé, par exemple une intégrine (ITR), complexé avec la tétraspanine (TSP) et des gangliosides. L'adhésion cellulaire et la mobilité sont fortement inhibées quand le complexe intégrine/TSP/ganglioside est stabilisé par la glycosylation. (D'après Todeschini, R.A. et Hakomori, S.-i. 2008).

Les glycanes des glycosynapses interviennent dans les processus d'adhésion cellule-cellule et cellule-MEC. Un exemple est celui des motifs glycaniques Lewis x qui peuvent interagir entre eux (Handa, K., *et al.* 2007) ou avec d'autres épitopes portés par des molécules comme la E-cadhérine (Todeschini, R.A. et Hakomori, S.-i. 2008). De même, le complexe du

ganglioside GM3 et de la glycoprotéine membranaire tétraspanine CD9 régule les interactions de l'intégrine $\alpha3/\beta1$ et du récepteur FGF, provoquant l'inhibition de la mobilité cellulaire et de la prolifération de lignées cellulaires variées (Kawakami, Y., *et al.* 2002, Ono, M., *et al.* 2001, Toledo, M.S., *et al.* 2005). La signalisation de nombreux récepteurs de facteurs de croissance, comme le récepteur EGF ou de l'insuline, est aussi régulée par des glycosphingolipides (Kaucic, K., *et al.* 2006, Langeveld, M. et Aerts, J.M.F.G. 2009, Park, S.-Y., *et al.* 2009). Quelles que soient les configurations des microdomaines auxquels ils participent, les glycolipides peuvent interagir entre eux, formant ainsi des clusters de stabilisation. Dans cette configuration, ils peuvent réguler l'activité de protéines de la même membrane (*cis*-interaction), ou réguler les interactions cellulaires en se liant à des molécules complémentaires sur des membranes plasmiques voisines (*trans*-interaction) (Todeschini, R.A. et Hakomori, S.-i. 2008).

– Les glycosphingolipides et la fusion des myoblastes

Malgré leur contribution à la signalisation cellulaire, les glycosphingolipides ne sont pas essentiels à la vie cellulaire au stade adulte. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de la biosynthèse des glycosphingolipides a en effet démontré que les cellules correspondantes pouvaient tout de même survivre, proliférer et même se différencier (Brigande, J.V. et Platt, F.M. 1998). Cependant, ils sont essentiels au développement de l'organisme dans son ensemble. Des souris dont la synthèse de GlcCer est inhibée ne peuvent se développer (Yamashita, T., *et al.* 1999). Les glycosphingolipides sont donc impliqués dans la coordination intercellulaire et dans des processus de développement nécessitant des interactions cellulaires, leurs fonctions étant principalement de réguler celles des glycoprotéines de la membrane plasmique. Ainsi, au cours de la différenciation myogénique, quelques études assez anciennes ont montré que les contacts cellulaires et la fusion de myoblastes murins en culture s'accompagnaient d'une augmentation de la synthèse des glycolipides neutres et des gangliosides, en particulier du lactosylcéramide et du GM3 (Cambron, L.D. et Leskawa, K.C. 1994, Leskawa, K.C. et Hogan, E.L. 1990). Plus récemment, il a été montré que l'expression de la sialidase cytosolique Neu2, qui agit à la fois sur les glycolipides et les glycoprotéines, augmentait au cours de la différenciation et de la fusion des C2C12. Cette différenciation est également favorisée par la surexpression de *Neu2* dans les mêmes cellules (Figure 47), mais avec un retard de prolifération (Fanzani, A., *et al.* 2003). Dans ce même modèle cellulaire, l'hypertrophie musculaire s'accompagne aussi d'une augmentation de l'activité de Neu2, contrairement à l'atrophie où elle est diminuée (Fanzani,

A., *et al.* 2008). Vu ces éléments, ainsi que les participations bien décrites des glycosphingolipides aux plates-formes lipidiques de signalisation membranaire, il semble que l'implication de ces composés dans la différenciation des myoblastes mériterait une investigation plus poussée.

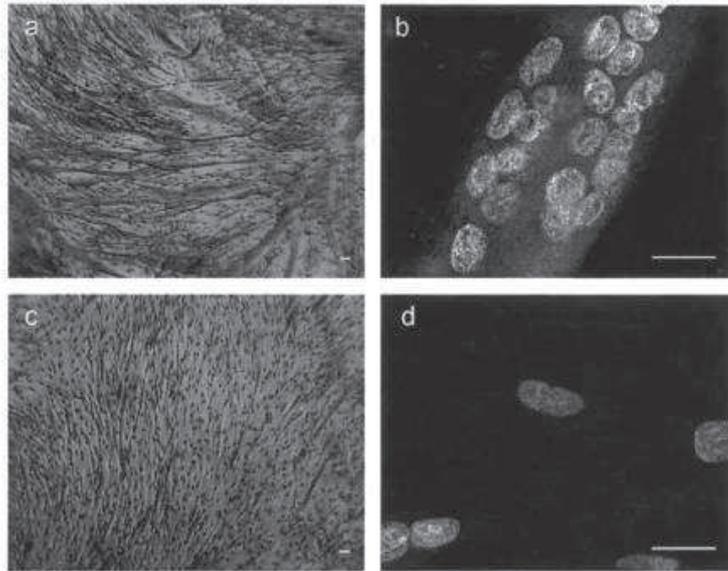


Figure 47. Effet de la surexpression de *Neu2* sur la différenciation des cellules C2C12.

Des cellules C2C12 en différenciation ont été marquées avec du GIEMSA (a et c) ou par un anticorps anti-myogénine (b et d). Les cellules qui surexpriment *Neu2* (a et b) forment des myotubes bien définis, positifs à la myogénine, alors que les cellules témoins (c et d) présentent une morphologie proche de celle de cellules indifférenciées. Echelle : 60 μm . (D'après Fanzani, A., *et al.* 2003).

d. Les glycoconjugués et la physiologie musculaire

Les glycannes et glycoconjugués sont également impliqués dans la physiologie musculaire. Ils participent au métabolisme musculaire et compromettre leur expression peut entraîner de sérieuses pathologies musculaires.

i Des glycannes régulent l'homéostasie de la cellule musculaire

Des travaux anciens, basés sur l'utilisation de la tunicamycine, inhibiteur de la *N*-glycosylation, ont montré l'implication de la glycosylation des protéines dans le fonctionnement de la cellule musculaire. Ainsi, l'utilisation de cet inhibiteur chez le poulet a permis d'établir son importance dans l'activité de la pompe à sodium et potassium (Alboim, S.V., *et al.* 1992), la stabilité des canaux à sodium voltage-dépendants (Bar-Sagi, D. et Prives, J. 1983), ou encore les propriétés biologiques du récepteur à acétylcholine (Prives, J. et Bar-

Sagi, D. 1983). De même, dans la lignée musculaire L6 de rat, les transporteurs de glucose Glut1 et Glut4 doivent être *N*-glycosylés au cours de la myogenèse pour être fonctionnels (Mitsumoto, Y. et Klip, A. 1992). Récemment, il a été montré chez la souris que la *O*-fucosylation de l'agrine par Pofut1, présente sur les lames basales des fibres musculaires, déterminait sa capacité à agréger les récepteurs à acétylcholine dans la jonction neuromusculaire (Kim, M.-L., *et al.* 2008). L'absence de *O*-fucosylation engendre un gain de fonction pour l'agrine musculaire se traduisant par une augmentation de l'agrégation des récepteurs à acétylcholine. L'enzyme Galgt2, déjà évoquée, aurait aussi un rôle dans le fonctionnement musculaire. En effet, l'antigène CT synthétisé modifierait l'expression de molécules synaptiques de la jonction neuromusculaire, comme la laminine $\alpha 4$ et NCAM, et aurait ainsi des rôles importants dans sa mise en place (Xia, B., *et al.* 2002).

D'autres travaux ont porté sur les rôles des glycannes de type *O*-GlcNAc dans le muscle. Ces derniers sont largement répandus dans la cellule, où ils assurent des fonctions primordiales. Ainsi, de nombreuses protéines musculaires nucléaires et cytosoliques portent couramment un résidu *O*-GlcNAc (Cieniewski-Bernard, C., *et al.* 2004), une modification qui se rapproche de la phosphorylation du fait de sa réversibilité. Les enzymes *O*-GlcNAc transférase et *O*-GlcNAcase interviennent dans l'addition et l'élimination de ce résidu sucré (Love, D.C., *et al.* 2003, Wells, L. et Hart, G.W. 2003). Le *O*-GlcNAc porté par certaines protéines constitue une modification dynamique qui joue des rôles clés dans de nombreuses voies de signalisation (Wells, L. et Hart, G.W. 2003). Elle concerne une multitude de protéines appartenant à pratiquement tous les compartiments cellulaires et à presque toutes les classes fonctionnelles de protéines (Figure 48). En fait, elle peut se retrouver sur toutes les sérines ou thréonines modifiées par *O*-phosphorylation, l'une de ses fonctions étant en effet d'empêcher la *O*-phosphorylation et ainsi de réguler transcription et signalisation (Chou, T.-Y., *et al.* 1995, Kamemura, K. et Hart, G.W. 2003, Wells, L., *et al.* 2003). Cette modification est particulièrement abondante dans le noyau, où elle affecte la machinerie de régulation de la transcription, dont le domaine carboxy-terminal de l'ARN polymérase II et de très nombreux facteurs de transcription (Hart, G.W. 1997). Elle affecte également des facteurs régulateurs de la traduction, des protéines du pore nucléaire, et des protéines impliquées dans la signalisation, la réponse au stress, et le métabolisme énergétique (Figure 48).

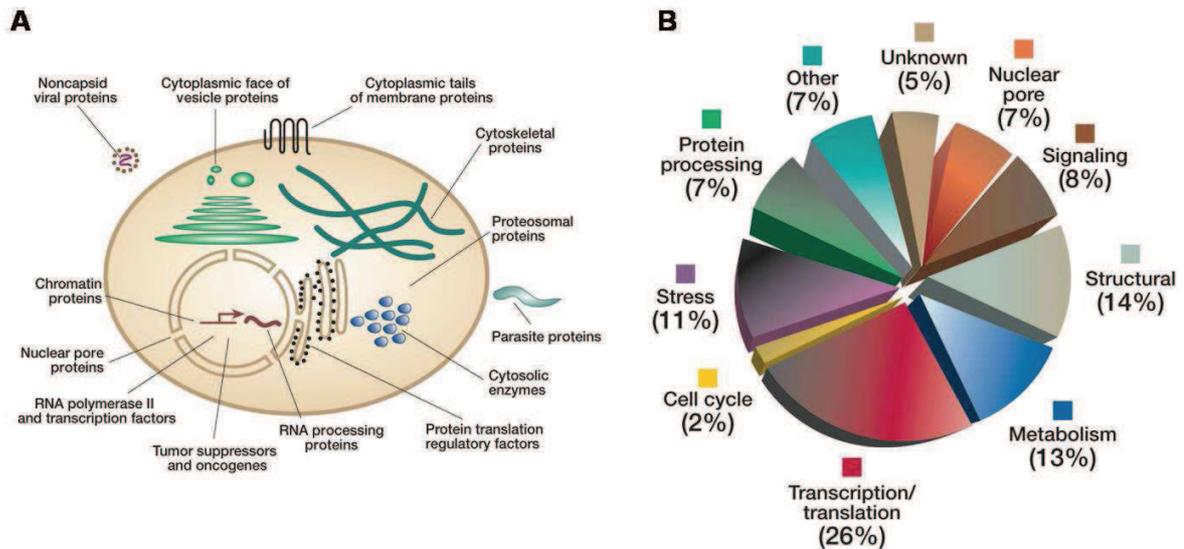


Figure 48. Les protéines O-GlcNAcylées sont présentes dans différents compartiments cellulaires et appartiennent à de nombreuses classes fonctionnelles.

A. Les protéines O-GlcNAcylées se retrouvent principalement dans le noyau, mais elles sont aussi présentes dans le cytoplasme et dans les virus qui infectent les cellules eucaryotes. La distribution subcellulaire des glycanes à O-GlcNAc est similaire à celle de la phosphorylation sur les sérines et thréonines. **B.** Les protéines O-GlcNAcylées appartiennent à des classes fonctionnelles variées. (D'après Varki, A., *et al.* 2008).

De nombreuses protéines régulatrices du cytosquelette sont aussi modifiées, comme celles régulant l'assemblage de l'actine (taline et ankyrine par exemple) (Hagmann, J., *et al.* 1992, Zhang, X. et Bennett, V. 1996). Cette forme de glycosylation, assez différente des formes classiques dans sa localisation cellulaire et sa dynamique, est ainsi cruciale pour tout un panel d'évènements cellulaires de signalisation. Les variations de O-GlcNAc pourraient également contrôler l'homéostasie protéique du muscle. Elles sont d'ailleurs impliquées dans l'atrophie musculaire (Cieniewski-Bernard, C., *et al.* 2006) et le métabolisme du glucose (Yki-Järvinen, H., *et al.* 1998). Chez le rat, les protéines impliquées dans le métabolisme du muscle et dans les processus de contraction portent en effet des O-GlcNAc (Cieniewski-Bernard, C., *et al.* 2004). Les protéines concernées sont des protéines de la glycolyse, du métabolisme énergétique, et des protéines contractiles (Tableau 8).

Tableau 8. Exemples de protéines porteuses de *O*-GlcNAc identifiées dans le muscle squelettique.(D'après Cieniewski-Bernard, C., *et al.* 2004, Hédou, J., *et al.* 2007).

Fonctions des protéines	Noms des protéines
Transduction du signal, transport nucléaire, protéines de structure	- Crystalline α B
	- Sous-unité régulatrice de la phosphoinositide-3-kinase, p85
	- Protéine phosphatase 2A
	- MAP kinase 8
	- Homologue de la protéine de localisation nucléaire 4
	- Inhibiteur de sérine protéase III
Protéines de la voie glycolytique et du métabolisme énergétique	- Enolase β spécifique du muscle
	- Fructose biphosphatase aldolase, spécifique du muscle
	- Créatine kinase, forme M
	- Triose phosphate isomérase
	- Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
	- Malate déshydrogénase mitochondriale
Protéines contractiles	- Anhydrase carbonique III
	- Chaîne lourde de myosine
	- Chaîne légère de myosine
	- Actine

Le passage d'un état oxydatif (lent) à un état glycolytique (rapide) d'un muscle squelettique s'accompagne, par exemple, d'une diminution du taux de *O*-GlcNAc (Cieniewski-Bernard, C., *et al.* 2004). Les *O*-GlcNAc sont retrouvés sur les chaînes lourdes et légères de myosine, et sur l'actine (Hédou, J., *et al.* 2007). Les sites de *O*-GlcNAcylation pourraient ainsi réguler les interactions entre actine et tropomyosine, suggérant leur implication dans la régulation des interactions entre protéines contractiles, et être impliqués dans la polymérisation des chaînes lourdes de myosine ou dans leurs interactions avec d'autres protéines contractiles (Hédou, J., *et al.* 2009).

ii Les défauts de glycosylation, causes de pathologies musculaires

- Les dystroglycanopathies et les *O*-mannosylglycannes

Le dystroglycane est l'élément central du complexe glycoprotéique DGC (Dystrophin-associated Glycoprotein Complex) dans le muscle squelettique. Ce complexe lie l'actine du

cytosquelette aux composants de la matrice extracellulaire *via* la dystrophine (Figure 49). Des défauts concernant la plupart des protéines de ce complexe provoquent des dystrophies musculaires (Blake, D.J., *et al.* 2002).

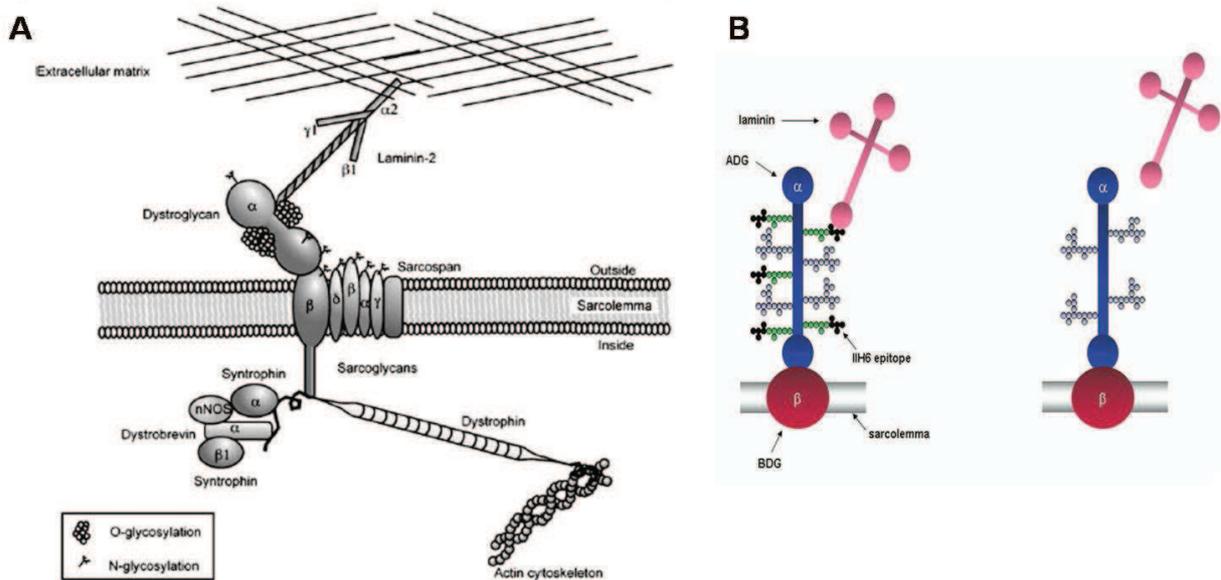


Figure 49. Représentation schématique du complexe DGC dans le muscle squelettique et de certaines des protéines associées.

A. Le complexe DGC relie la MEC aux filaments d'actine du cytosquelette de la cellule. Les glycoprotéines qui le composent peuvent être *O*- ou *N*-glycosylées. (D'après Moore, C. et Hewitt, J. 2009). **B.** Chez les patients souffrant d'une dystroglycanopathie, les glycanes de liaison à la laminine de l' α -dystroglycane (ADG) sont absents ou réduits. (BDG, β -dystroglycane) (D'après Muntoni, F., *et al.* 2008).

Le dystroglycane comporte deux sous-unités, la sous-unité α étant *O*-mannosylée (Figure 49) et la β *N*-glycosylée. Les *O*-mannosyl glycanes, qui correspondent à une modification peu commune, ont été mis en évidence sur un nombre limité de glycoprotéines du cerveau, des nerfs et du muscle squelettique (Wopereis, S., *et al.* 2006). Récemment, il a été montré qu'un groupe de dystrophies musculaires humaines ont en commun des défauts de glycosylation du dystroglycane (Muntoni, F., *et al.* 2004). Elles sont ainsi regroupées sous le terme de dystroglycanopathies. Elles correspondent le plus souvent à des dystrophies congénitales musculaires sévères (CMD pour Congenital Muscular Dystrophy), et sont également associées à des défauts neuronaux et des anomalies oculaires. A ce jour, six gènes associés à ces maladies ont été identifiés (Tableau 9) (Moore, C. et Hewitt, J. 2009). Ces gènes codent tous pour des glycosyltransférases qui seraient impliquées dans la synthèse du *O*-mannosylglycane NeuAc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc β 1,2Man α 1-*O*-S/T porté par l' α -dystroglycane. Les enzymes *O*-mannosyltransférases POMT1 et POMT2, et l'acétylglucosaminyltransférase

POMGnT1 sont impliquées dans la synthèse du *O*-mannosylglycane de l' α -dystroglycane. Les protéines fukutine, FKRP, et LARGE correspondent à des glycosyltransférases putatives (Moore, C. et Hewitt, J. 2009). Ce sont des mutations dans ces gènes qui sont à l'origine des pathologies humaines de type WWS (Walker Warburg Syndrome), MEB (Muscle-Eye-Brain disease), FCMD (Fukuyama Congenital Muscular Dystrophy), CMD1C et 1D (Congenital Muscular Dystrophy type 1C/1D), LGMD2I (Limb Girdle Muscular Dystrophy type 2I) (Grewal, P.K. et Hewitt, J.E. 2003). Chez la souris, une mutation du gène *Large* est à l'origine des animaux myd (Myodystrophy) (Grewal, P.K., *et al.* 2001). Plusieurs de ces six gènes affichent en conséquence une hétérogénéité génétique (Tableau 9). Le point commun de ces pathologies est la perte de *O*-mannosylation de la sous-unité α du dystroglycane, qui ne peut alors plus se lier correctement à la laminine (Holzfeind, P.J., *et al.* 2002, Kanagawa, M., *et al.* 2005, Michele, D.E., *et al.* 2002). L'absence de cette interaction déstabilise le lien entre cytosquelette et MEC.

Tableau 9. Gènes impliqués dans les dystroglycanopathies chez l'Homme.

WWS Walker–Warburg syndrome, MEB muscle–eye–brain disease, CMD congenital muscular dystrophy, RM retard mental, LGMD limb girdle muscular dystrophy, MDC1C congenital muscular dystrophy type 1C, MDC1D congenital muscular dystrophy type 1D. (D'après Moore, C. et Hewitt, J. 2009).

Gène impliqué	Pathologies associées
<i>POMT1</i>	WWS, MEB, CMD+RM, LGMD2K
<i>POMT2</i>	WWS, MEB, CMD+RM, LGMD2N
<i>POMGnT1</i>	MEB, LGMD
<i>Fukutin</i>	WWS, FCMD, CMD (pas de RM), LGMD2L
<i>FKRP</i>	WWS, MEB, CMD+RM, CMD (pas de RM), MDC1C, LGMD2I
<i>LARGE</i>	WWS, MDC1D

- Les glycanes sont associés à d'autres pathologies musculaires

Les dystroglycanopathies, bien qu'emblématiques, ne sont malheureusement pas les seules pathologies musculaires associées à des défauts de glycoconjugués. Le biglycane, de la famille des chondroïtines sulfates, serait lui aussi important pour l'organisation du complexe DGC. Il est présent sur les α - et γ -sarcoglycanes (Figure 49). Les souris ne synthétisant pas de biglycane présentent alors une diminution de l'expression des α - et γ -sarcoglycanes chez les juvéniles (Rafii, M.S., *et al.* 2006). Bien que les niveaux d' α - et γ -sarcoglycanes reviennent à la normale chez les adultes, ces animaux ont un léger phénotype dystrophique avec une

désorganisation du complexe DGC (Mercado, M.L., *et al.* 2006). Le biglycane régule l'expression des α - et γ -sarcoglycanes ; il jouerait ainsi un rôle important dans l'intégrité de la cellule musculaire (Brandan, E., *et al.* 2008). La myopathie héréditaire à inclusions, ou h-IBM (pour hereditary Inclusion-Body Myopathy), est causée par des mutations dans le gène codant l'UDP-*N*-acétylglucosamine 2-épimérase/*N*-acétylmannosamine kinase, une enzyme du métabolisme de l'acide sialique (Eisenberg, I., *et al.* 2001). Dans cette pathologie, la sialylation des glycoprotéines est anormale. La métallopeptidase néprilysine est une *N*-glycoprotéine sialylée qui clive la protéine β -amyloïde (A β) (Howell, S., *et al.* 1995, Johnson, A.R., *et al.* 1984). Dans les muscles affectés par l'h-IBM, elle est hyposialylée. Son expression et son activité enzymatique sont en conséquence réduites (Broccolini, A., *et al.* 2008). Cette hyposialylation empêcherait alors la dégradation d'A β , d'où l'accumulation de celle-ci et la dégénérescence musculaire (Askanas, V. et Engel, W.K. 2002). Un nombre croissant d'études lie aussi des myopathies à des défauts concernant les héparanes sulfates présents au niveau de l'interstitium musculaire (Tableau 10). Leurs niveaux d'expression sont effectivement couramment modifiés, comme dans la dystrophie musculaire de Duchenne où le syndécane 3 et le glypicane 1 sont surexprimés (Alvarez, K., *et al.* 2002).

Tableau 10. Défauts des héparanes sulfates des interstices musculaires résultant en des myopathies.

(D'après Jenniskens, G.J., *et al.* 2006).

Composant affecté	Myopathie
Agrine	Dystrophie musculaire congénitale Synaptogenèse neuromusculaire défectueuse
Glypicane 3	Syndrome de Simpson-Golabi-Behmel
Perlecane	Syndrome de Schwartz-Jampel Dysplasie dyssegmentale de Silverman-Handmaker
Syndécane 3	Dystrophie musculaire

e. Les glycanes participent à la régénération musculaire

Les cellules satellites, présentes entre la lame basale et la fibre musculaire, sont à l'origine de la régénération musculaire. Des signaux en provenance du tissu lésé permettent leur activation. Elles prolifèrent alors puis se différencient en myotubes avant de former de nouvelles fibres musculaires. Il est donc important pour l'organisme de disposer d'un stock de

ce type cellulaire. L'activation de la voie de signalisation par le récepteur Notch, elle-même régulée par la présence de *O*-fucosyl- et *O*-glucosylglycannes, est impliquée dans cette régénération puisqu'elle est à l'origine de la prolifération des cellules satellites (Vasyutina, E., *et al.* 2007). En effet, l'expression du ligand Delta1 de Notch augmente 24h après une lésion; il en est de même pour la forme activée de Notch. Il s'en suit une augmentation de la signalisation par cette voie qui induit à son tour la prolifération et l'expansion des cellules satellites filles. La diminution de la signalisation autorise ensuite la différenciation de certaines cellules satellites pour engendrer les myotubes (Conboy, I.M. et Rando, T.A. 2002).

Les glycannes pourraient aussi intervenir de façon plus directe. C'est le cas de certains protéoglycannes. En effet, après blessure, un traitement avec des héparanes sulfates synthétiques accélère la régénération musculaire *in vivo* chez le rat (Zimowska, M., *et al.* 2001). Dans des cultures primaires de cellules satellites chez le rat et dans les lignées murines C2.7 et C2C12, le même traitement favorise leur prolifération et leur différenciation (Papy-Garcia, D., *et al.* 2002). A l'inverse, l'inhibition de la synthèse de protéoglycannes à héparanes et chondroïtines sulfates, grâce à l'utilisation d'héparinases et de chondroïtinases, empêche la différenciation des myoblastes C2C12 en myotubes (Villena, J. et Brandan, E. 2004). De même, l'inhibition de l'expression du syndécane 3 lors de l'induction de la régénération musculaire par une greffe de myoblastes C2C12 provoque une diminution de la fusion et de la formation des fibres musculaires (Casar, J.C., *et al.* 2004a). Le syndécane 4 serait aussi impliqué dans la régénération musculaire, puisque les cellules satellites murines qui en sont dépourvues ne peuvent réparer un muscle endommagé (Cornelison, D.D.W., *et al.* 2004). Par ailleurs, chez des souris dépourvues de biglycane, la croissance des fibres musculaires est retardée, l'expression de la myosine est diminuée, tandis que celles de MyoD et de la myogénine sont normales (Casar, J.C., *et al.* 2004b). Enfin, un traitement empêchant la sulfatation des héparanes sulfates dans des myofibres issues de muscles murins provoque un retard de prolifération des cellules satellites ainsi qu'une modification de l'expression de MyoD (Cornelison, D.D.W., *et al.* 2001). Ces données démontrent non seulement que les protéoglycannes sont importants dans la régénération musculaire, probablement en régulant la disponibilité de facteurs de croissance, mais aussi qu'ils ont un rôle fondamental dans la progression du programme myogénique des cellules satellites.

4. Le glyco-génome

Les glycanes et les glycoconjugués, au travers des données exposées jusqu'à présent, sont donc des structures hautement diversifiées qui participent à de très nombreuses fonctions cellulaires (Figure 50). Dans la cellule, ils participent au contrôle du repliement protéique, au trafic intracellulaire, et ils interviennent également dans le contrôle de la transcription. Ils restent largement présents au niveau des surfaces cellulaires, dans la MEC et la membrane plasmique, une position cruciale pour réguler tout un ensemble de processus dont les interactions cellulaires et les événements de signalisation.

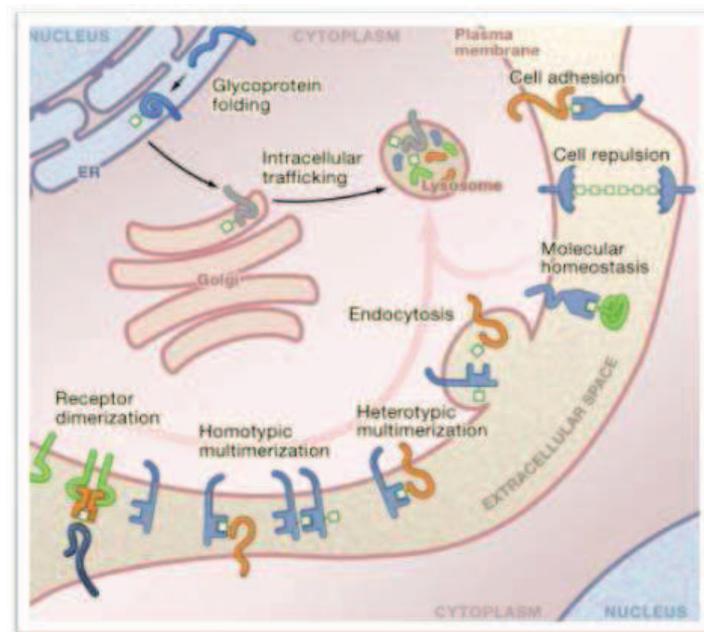


Figure 50. Mécanismes cellulaires impliquant les glycanes.

Les glycanes participent à de nombreux mécanismes cellulaires. Ils participent notamment au repliement des protéines en cours de biosynthèse, au trafic intracellulaire, à la communication entre cellules dans les compartiments extracellulaires. Là, la communication cellulaire est régulée par l'adhésion et l'homéostasie cellulaire et moléculaire, l'activation de récepteurs, la transduction du signal, et l'endocytose. (D'après Ohtsubo, K. et Marth, J.D. 2006).

Certains glycanes, le plus souvent sous forme de glycoconjugués, constituent ainsi des acteurs de la myogenèse. Le rôle de ces *N*- et *O*-glycanes, protéoglycanes et glycolipides a été présenté ci-dessus.

L'obtention d'une telle diversité de glycanes et glycoconjugués met en œuvre tout un ensemble de protéines et enzymes intervenant dans la biosynthèse et la reconnaissance des structures glycaniques. Ces protéines et enzymes liées à la glycosylation sont susceptibles

d'être largement sollicitées au cours de la myogenèse. Elles incluent des glycosyltransférases, enzymes qui catalysent le transfert d'un sucre à partir d'un nucléotide-sucré ou d'un lipide-sucré à un substrat, et des glycosidases, enzymes qui hydrolysent les liaisons glycosidiques des glycanes (van Kooyk, Y. et Rabinovich, G.A. 2008). A ces deux classes principales d'enzymes de la glycosylation s'ajoutent aussi les transporteurs de sucres, les translocases, les enzymes impliquées dans le métabolisme des sucres, les lectines, qui reconnaissent spécifiquement les épitopes glycosylés, et les sulfotransférases, qui participent à la modification des chaînes glycaniques.

Les substrats donneurs des glycosyltransférases, les monosaccharides activés ou nucléotides-sucres, sont synthétisés dans le cytoplasme ou le noyau à partir de précurseurs monosaccharidiques d'origine endogène ou exogène (Figure 51). Ils sont ensuite transportés activement et spécifiquement à travers la bicouche lipidique vers le lumen du RER et de l'appareil de Golgi. Dans ces organites, les glycosyltransférases transfèrent le sucre activé sur un accepteur spécifique en formant une liaison glycosidique (Breton, C., *et al.* 2006).

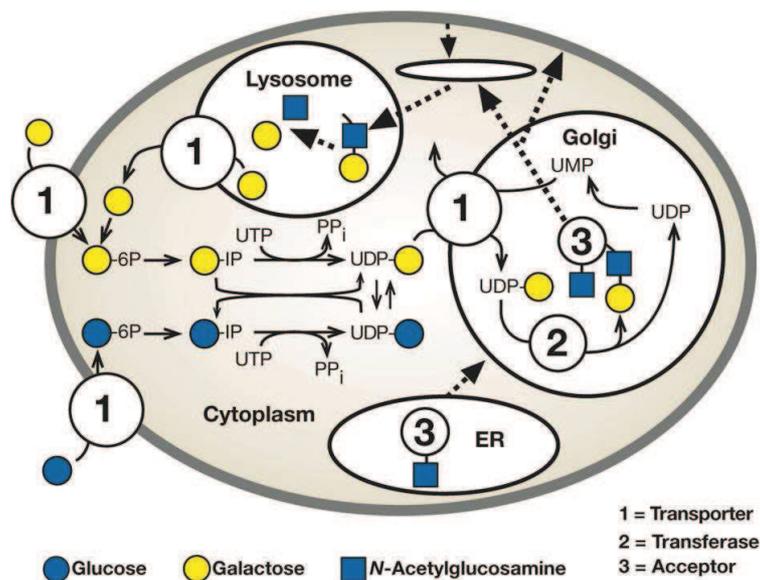


Figure 51. Biosynthèse, utilisation et "turnover" d'un monosaccharide commun, le galactose.

Ce schéma représente le parcours d'un monosaccharide commun des glycanes animaux, le galactose, dans la cellule. (1) De petites quantités de galactose peuvent être obtenues à partir du milieu extracellulaire, mais la plupart du galactose cellulaire est soit synthétisée *de novo* à partir du glucose ou recyclée suite à la dégradation des glycoconjugués dans le lysosome. (2) La production du nucléotide sucre UDP-Gal, son équilibre avec l'UDP-glucose, et son transport et son utilisation dans l'appareil de Golgi (3) pour la synthèse de nouveaux glycanes sont représentés de façon simplifiée. Traits pleins : voies biochimiques ; pointillés : voies de trafic des glycanes. (D'après Varki, A., *et al.* 2008).

Le processus de *N*-glycosylation illustre bien la grande variété des acteurs impliqués dans la glycosylation. Cette modification des protéines, comme déjà évoqué, comprend trois étapes principales, qui chacune fait intervenir différentes enzymes. Elle correspond donc à une cascade de réactions nécessitant des enzymes variées, principalement des glycosidases et des glycosyltransférases, qui permettent la synthèse et la maturation du *N*-glycane (Tableau 11). Ces enzymes sont en général spécifiques de l'accepteur, du donneur, et du type de liaison formée. Elles sont nommées d'après la nature du sucre transféré ou enlevé, et la molécule acceptrice peut être un autre sucre, un lipide, une protéine ou un acide nucléique (Lairson, L.L., *et al.* 2008). Des enzymes supplémentaires variées interviennent également (Tableau 11). Ainsi, étant donné que la biosynthèse du précurseur oligosaccharidique débute sur la face cytosolique et se poursuit sur la face luminale de la membrane du RER (Abeijon, C. et Hirschberg, C.B. 1992), une flippase est nécessaire pour permettre le basculement du dolicholpyrophosphate (Vishwakarma, R.A. et Menon, A.K. 2005). Le transfert du précurseur sur le polypeptide en cours de synthèse est catalysé par l'enzyme oligosaccharyltransférase (OST) (Geetha-Habib, M., *et al.* 1988, Kornfeld, R. et Kornfeld, S. 1985, Silberstein, S. et Gilmore, R. 1996). Au cours de la maturation du glycane, les *N*-glycoprotéines non résidentes du RER ou celles qui doivent y revenir par un mécanisme rétrograde (Mancias, J.D. et Goldberg, J. 2005) gagnent l'appareil de Golgi par un transport vésiculaire. Pour cela, elles interagissent avec la protéine membranaire ERGIC-53 (ER-Golgi intermediate compartment 53 kDa protein) qui reconnaît les résidus mannoses (Helenius, A. et Aebi, M. 2001).

Tableau 11. Acteurs de la biosynthèse des *N*-glycannes complexes et hybrides.

La biosynthèse des *N*-glycannes implique la synthèse d'un précurseur oligosaccharidique, son transfert sur la protéine en cours de synthèse (Burda, P. et Aebi, M. 1999), et son remodelage dans le RE et l'appareil de Golgi par l'élimination et l'ajout de sucres. L'assemblage du précurseur oligosaccharidique est réalisé sur un transporteur lipidique activé, le dolicholpyrophosphate et implique des glycosyltransférases qui transfèrent successivement chaque ose constitutif d'un nucléotide-sucres vers l'accepteur lipidique. La maturation des *N*-glycannes est réalisée par diverses glycosidases et glycosyltransférases. En particulier, la déglucosylation aboutit à un glycanne de type oligomannosidique. La maturation des *N*-glycannes se poursuit au cours du cheminement de la glycoprotéine dans les différents compartiments de l'appareil de Golgi générant différentes structures de 8 à 5 mannoses. Ces derniers constituent les précurseurs à partir desquels vont être élaborés les *N*-glycannes complexes et hybrides.

	Glycosyltransférases	Glycosidases	Autres protéines
Synthèse du précurseur oligosaccharidique (<i>Glc3Man9GlcNAc2</i>) (RER)	<i>N</i> -acétylglucosaminyltransférases Mannosyltransférases Glucosyltransférases		Flippase
Transfert du précurseur sur la protéine (RER)			OST
Maturation du <i>N</i>-glycanne (RER - Golgi)	<i>N</i> -acétylglucosaminyltransférases Fucosyltransférases Galactosyltransférases Sialyltransférases	Glucosidases Mannosidases	ERGIC 53

La *N*-glycosylation des protéines implique donc tout un ensemble de glycosyltransférases, glycosidases, translocases et transporteurs. Au préalable, elle implique aussi l'élaboration des nucléotides-sucres et leur transport vers leur site d'utilisation. Elle tient sa particularité dans le transfert en bloc du précurseur oligosaccharidique, mais parmi les différents acteurs cités ci-dessus, un grand nombre sont communs avec les autres types de glycosylation. Sept principales familles de glycosyltransférases sont décrites : les galactosyltransférases, les *N*-acétylgalactosaminyltransférases, les glucosyltransférases, les *N*-acétylglucosaminyltransférases, les mannosyltransférases, les sialyltransférases et les fucosyltransférases. Dans chacune, le type de liaison formée définit différents groupes d'enzymes. A ces familles s'ajoutent aussi des glucuronyltransférases, oligosaccharyltransférases, ribosyltransférases et les GPI-transférases. Les protéines à ancre GPI constituent en effet une catégorie particulière de glycoconjugués, puisque la partie glycanne permet l'ancrage de la partie peptidique à la membrane plasmique. Contrairement aux glycosphingolipides, ces glycolipides sont basés sur une structure comportant un diacylglycérol hydrophobe (Figure 52). La banque de données CAZy (Carbohydrate-Active EnZymes) regroupe les séquences correspondant à l'ensemble de ces

enzymes. A ce jour, elle comporte plus de 30000 séquences peptidiques réparties dans environ 90 familles, toutes espèces confondues.

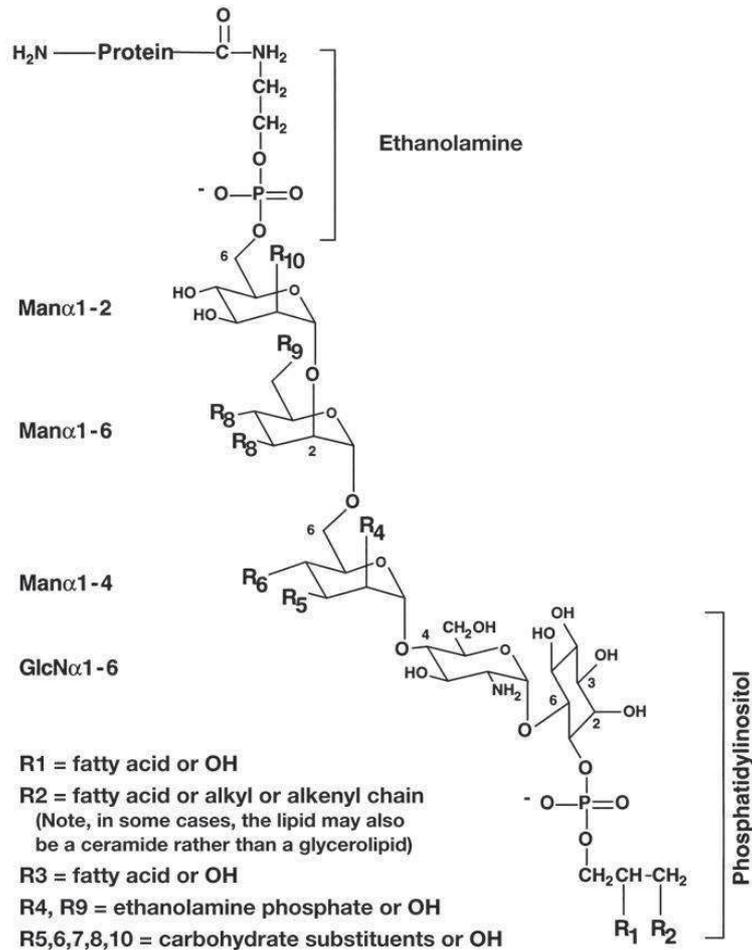


Figure 52. Structure générale des ancres GPI.

Les ancres GPI jusqu'à présent caractérisées partagent un cœur commun, éthanolamine-PO4-6Man α 1-2Man α 1-6Man α 1-4GlcN α 1-6myo-inositol-1-PO4-lipide, auquel s'ajoute une queue phospholipidique. L'hétérogénéité des ancres GPI dérive des substitutions variées de cette structure (groupes R), ainsi que de la queue lipidique. La partie réductrice de l'oligosaccharide n'est pas attachée à la protéine comme dans le cas des glycoprotéines classiques, mais à la tête inositol du lipide, par l'intermédiaire d'une liaison glycosidique d'un résidu glucosamine sur la position 6. Ce type de structure est l'un des rares exemples où l'on retrouve la glucosamine sans groupements acétyl, comme dans la plupart des glycoconjugués, et sulfates, comme dans les protéoglycannes. Le glycanne des ancres GPI contient également un cœur de trois résidus mannoses, le troisième étant lié à une molécule d'éthanolamine par une liaison phosphodiester. L'organisation générale de ce glycanne se rapproche de celle des *N*-glycannes complexes. L'ancre GPI est assemblée et ajoutée aux protéines dans le RE. C'est donc cette partie peptidique qui assure la fonction du glycoconjugué, elle pourra de surcroît porter d'autres glycannes aux fonctions identiques à ceux des *N*- et *O*-glycoprotéines classiques. (D'après Varki, A., *et al.* 2008).

De plus, comme tous les composants des cellules vivantes, les glycannes sont dégradés en permanence par des glycosidases, pour remplacer, par exemple, certaines unités monosaccharidiques. Pour ce qui est de leur dégradation complète, elle est réalisée, pour la plupart, par des glycosidases du lysosome, les monosaccharides qui en résultent pouvant être réutilisés par la cellule (Winchester, B. 2005). Les séquences correspondant aux glycosidases sont aussi regroupées dans la base de données CAZy, qui donne aussi accès aux différentes familles de molécules de liaison aux carbohydrates, dont les lectines. Celles-ci se répartissent dans différentes familles. Ainsi, les lectines de type C, dont font partie les sélectines, nécessitent du calcium pour la reconnaissance. De nombreuses galectines nécessitent des groupements thiols libres pour leur stabilité (autrefois dénommées lectines de type S). Les lectines de type P correspondent aux récepteurs à mannose 6 phosphate, impliqués dans transport sélectif des hydrolases lysosomales du *trans*-golgi vers le compartiment lysosomal périnucléaire (Kornfeld, S. 1990), et les lectines de type I, découvertes dans les années 1990, comprennent les « siglecs » qui reconnaissent spécifiquement les acides sialiques.

Nous avons regroupé l'ensemble des gènes qui codent toute cette machinerie de glycosylation ou de liaison aux glycannes sous le terme de « glycomé » (Tableau 12). A ce jour, chez la souris, pratiquement 300 gènes codant des glycosyltransférases et des glycosidases ont été identifiés d'après les bases de données mentionnées ci-dessus. En tenant compte des autres gènes impliqués dans la glycosylation, le glycomé comporterait environ 600 gènes. Le glycomé correspond donc à l'ensemble des gènes impliqués dans la biosynthèse, le métabolisme et la reconnaissance de structures glycaniques. Chez les mammifères, le glycome présente une très grande variabilité qui s'ajoute à celle générée par le protéome.

Tableau 12. Le glycoséome murin.

Le nombre de gènes connus a été déterminé dans les banques de données des sites MGI et CAZy. Les lectines de type C nécessitent du calcium pour la reconnaissance, les lectines de type I comprennent les « siglecs » qui reconnaissent spécifiquement les acides sialiques, les lectines de type P correspondent aux récepteurs à mannose 6 phosphate, les lectines de type S nécessitent des groupements thiols libres pour leur stabilité et les lectines de type M correspondent aux autres lectines (« miscellaneous »).

Fonction	Famille	Nombre
Glycosidase	Amylase	2
	Chitinase	6
	Chitobiase	1
	Fucosidase	2
	Galactosaminidase	1
	Galactosidase	5
	Acetylglucosaminidase	4
	Glucosidase	9
	Glucuronidase	1
	Heparanase	1
	Hyaluronidase	1
	Hyaluronoglucosaminidase	5
	Iduronidase	1
	Mannosidase	13
	Neuraminidase	4
Divers	19	
Total		75
Glycosyltransferase	Exostosine	5
	Fucosyltransferase	8
	Galactosyltransferase	18
	Glucuronosyltransferase	20
	Glucosyltransferase	6
	Glycosyltransferase	15
	Hyaluronane synthase	3
	Mannosyltransferase	11
	<i>N</i> -acetylgalactosaminyltransferase	22
	<i>N</i> -acetylglucosaminyltransferase	23
	Oligosaccharyltransferase	6
	Synthèse de l'ancre GPI	10
	Ribosyltransferase	6
	Sialyltransferase	20
	Xylosyltransferase	2
Divers	34	
Total		209
Lectine	Type C	46
	Type I (Siglec)	12
	Type M et P	122
	Type S (Galectine)	13
Total		193
Sugar carrier		34
Sugar metabolism		28
Sulfotransferase		53
Translocase		2
TOTAL		594

Ainsi, même si bien des éléments sont encore manquants, les glycanes semblent essentiels au déroulement de la myogenèse et au fonctionnement du muscle adulte chez les mammifères. Toutes les classes de glycoconjugués, glycoprotéines, protéoglycannes et glycolipides, seraient impliquées plus ou moins directement. Ainsi, le profil de glycosylation des myoblastes change au cours de leur différenciation myogénique. Plus particulièrement, les O-fucosylglycannes interviendraient dans la somitogenèse et la régénération musculaire via la voie de Notch. Les N- et O-glycannes, en régulant la fonction de protéines musculaires variées, participeraient à la physiologie musculaire. L'importance des glycanes dans la physiologie musculaire est aussi mise en relief par l'existence de pathologies liées à des défauts de glycosylation. Les protéoglycannes seraient eux impliqués à des étapes variées de la différenciation myogénique. Des données soulignent leur rôle dans la prolifération, la fusion des myoblastes et la régénération musculaire. Enfin, les glycolipides sont encore aujourd'hui peu décrits dans la myogenèse malgré leur implication probable dans la fusion des myoblastes. Toutes ces informations attestent d'un rôle central des glycanes dans la myogenèse. Elles soulignent donc l'importance de leur étude pour mieux comprendre ce processus et les pathologies associées. Pour cela, il est également essentiel de s'intéresser à l'ensemble des gènes qui codent pour les protéines impliquées dans l'élaboration, la modification, le métabolisme et la reconnaissance des glycanes, c'est à dire le glycomé et son comportement au cours de la myogenèse.

RÉSULTATS-DISCUSSION

I. EXPRESSION DU GLYCOGÉNOME AU COURS DE LA DIFFÉRENCIATION MUSCULAIRE

Les données de la littérature qui viennent d'être présentées font état du rôle conséquent des glycoconjugués dans la différenciation myogénique. Ces informations restent ponctuelles dans la mesure où, jusqu'ici, aucune approche globale en glycobiologie n'a permis d'avoir une vision plus large sur la fonction des glycannes dans un tel processus de différenciation. Des études à haut débit ont bien été réalisées. Elles correspondaient à l'utilisation de puces pangénomiques. Cependant, les gènes de la glycosylation sont pour la plupart faiblement exprimés et, par conséquent, ne sont que rarement détectés par ces puces. Des analyses globales ont aussi été réalisées au niveau protéomique et ont confirmé certaines données obtenues par les études transcriptomiques (Kislinger, T., *et al.* 2005, Puente, L.G., *et al.* 2004, Tannu, N.S., *et al.* 2004). Mais là-encore, les études correspondantes ne permettent pas d'obtenir des informations sur le rôle global des glycannes dans la myogenèse. D'autres études protéomiques ciblées sur les glycoprotéines ont donné des informations sur l'état de *N*-glycosylation des myoblastes C2C12 mais pas sur le remodelage global des glycannes au cours de la différenciation myogénique (Gundry, R.L., *et al.* 2009). Or, comme exposé précédemment, le rôle des glycannes semble évident dans des étapes variées du processus de myogenèse. Les glycoconjugués impliqués sont très diversifiés, comptant parmi les *N*-, *O*-glycoprotéines, protéoglycannes et glycosphingolipides. L'élaboration de ces composés implique donc un nombre conséquent de protéines et d'enzymes codées par le glycogénome. Nous avons donc choisi de réaliser une étude ciblée cette fois sur le glycogénome, afin de déterminer quelles pourraient être ses implications, et par conséquent celles des glycannes et glycoconjugués, dans la myogenèse.

1. Analyse transcriptomique de glyco-gènes au cours de la différenciation des myoblastes murins C2C12 par TLDA

L'analyse transcriptomique qui a été réalisée a porté sur l'étude de 375 gènes murins de la glycosylation, soit environ 60% du glycogénome connu, au cours de la différenciation

des myoblastes murins C2C12 en myotubes. Ce modèle a été choisi du fait de la difficulté d'étudier les processus de différenciation myogénique *in vivo*, où différents types cellulaires coexistent, tandis que cette lignée est bien caractérisée par la communauté scientifique et relativement aisée à utiliser. Pour cette étude, nous avons utilisé la technique de RT-PCR quantitative en temps réel « TLDA » (TaqMan Low Density Array), qui permet une analyse simultanée de 381 gènes, gènes de référence compris. La PCR quantitative en temps réel constitue dans cette approche un outil adapté dans la mesure où c'est une technique suffisamment sensible pour détecter des variations d'expression de gènes faiblement exprimés, ce qui est le cas de la plupart des glyco-gènes.

La configuration de la « TLDA » a nécessité de répertorier les glyco-gènes murins à partir des banques de données (GenBank, CAZY et MGI). Au moment de la réalisation de ce travail, le glycogénome murin rassemblait environ 600 gènes alors que la capacité maximale d'une TLDA est de 381 gènes. Toutefois, pour ces 600 glyco-gènes, seules 389 sondes TaqMan, permettant une quantification, étaient disponibles. Cette contrainte technique a constitué *de facto* une première sélection. Il a donc été nécessaire de faire des choix pour certaines classes de gènes afin de restreindre notre analyse à 375 gènes, 6 gènes de références ayant été au préalable sélectionnés. Nous avons choisi d'analyser l'ensemble des gènes codant pour des glycosyltransférases, glycosidases, translocases, transporteurs de sucres, enzymes du métabolisme des sucres et enfin des lectines. En effet, l'objectif de cette étude étant d'obtenir des informations sur le rôle des glycanes dans la différenciation myogénique, nous avons choisi de retenir tous les gènes codant les enzymes impliquées dans leur biosynthèse et leur reconnaissance. Ceci impliquait par conséquent de faire un choix sur la classe des sulfotransférases. Ainsi, 70 et 71 % des gènes alors connus pour les glycosyltransférases et les glycosidases ont été analysés alors que seuls 42% des gènes codant des enzymes sulfatant les glycanes ont été étudiés. Le nombre plus restreint de gènes concernant les classes des transporteurs, translocases et enzymes du métabolisme des sucres a permis une couverture plus complète, à 76%, 100% et 86%, respectivement. Enfin, du fait du grand nombre de lectines, seulement 53% de sondes étaient disponibles et ont donc pu être analysées. En complément du choix des glyco-gènes, existe celui des gènes de référence, un point crucial car les valeurs d'expression (Ct) de ces gènes permettent de calculer les quantités relatives d'ARNm des gènes d'intérêt. Dans notre cas, neuf sondes ont été dédiées à ces gènes de référence. Elles correspondent à six gènes usités généralement dans ce type d'étude. Ce sont les gènes *Tbp* (pour TATA-box-binding protein) et *Tceal* (pour Transcription elongation factor A protein 1), des gènes codant des facteurs de transcription, les gènes *G6pdx* et *Gapdh*,

codant des enzymes du métabolisme cellulaire primaire (Glucose-6-phosphate 1-déshydrogénase X et Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, respectivement), le gène *Actb* qui code l'actine β , et le gène codant pour l'ARN ribosomal 18S, 4 sondes pour celui-ci étant imposées par le fournisseur. Les quantités relatives d'ARNm ont été déterminées à partir des valeurs obtenues pour le gène codant l'ARN ribosomal 18S, puisqu'il était celui dont l'expression est la plus stable dans cette étude.

Les résultats obtenus dans cette approche, et leur interprétation, ont fait l'objet d'une publication dans le journal BMC Genomics :

Glycogenome expression dynamics during mouse C2C12 myoblast differentiation suggests a sequential reorganization of membrane glycoconjugates.

Janot M, Audfray A, Loriol C, Germot A, Maftah A, Dupuy F.

BMC Genomics. 2009, 10(1):483.

Cette étude souligne, comme attendu, le rôle majeur des glycanes dans la myogenèse. En effet, au travers de l'analyse de l'expression des gènes codant les acteurs de la biosynthèse des glycanes et de leur reconnaissance, nous mettons en évidence parmi les 375 glyco-gènes analysés, 276 gènes exprimés dont 95 avec des facteurs de variations en quantité d'ARNm compris entre 2 et 4 fois et 37 gènes avec des variations supérieures à 4 fois au cours de la différenciation.

Elle apporte également des informations nouvelles relatives aux gènes qui contrôlent la biosynthèse des glycanes au cours de la myogenèse squelettique. Parmi ces informations, le nombre de glyco-gènes dérégulés est relativement important puisqu'il représente ~75% des gènes analysés. De plus, un tiers des gènes analysés présente des variations de leur expression transcriptionnelle supérieures à un facteur 2. Ce nombre conséquent de gènes exprimés et régulés suggère un rôle essentiel des glycanes dans la différenciation myogénique. Par ailleurs, les résultats obtenus pour les 37 gènes à forte variation ont permis de construire un modèle qui illustre le rôle des glycanes dans la myogenèse. Notamment, les 37 gènes hautement dérégulés codent principalement pour des molécules d'adhésion cellulaire et des enzymes clés de la biosynthèse des glycosaminoglycanes et des glycolipides (néolactoséries, lactoséries et ganglioséries). Ceci suggère que la membrane plasmique et la MEC seraient profondément et précisément modifiées avant la fusion cellulaire. En particulier, elle apporte des informations concernant les voies de signalisation affectées au cours de la différenciation myogénique, dans lesquelles interviendraient donc des glycanes.

2. Voies de signalisation impliquant des glycanes activées au cours de la myogenèse

Les résultats de notre étude suggèrent que les glycanes pourraient réguler des processus de signalisation au début de la différenciation des cellules C2C12. Le profil d'expression des gènes obtenu serait favorable aux voies de signalisation contrôlant la myogenèse et défavorable aux voies de signalisation qui conduiraient les cellules vers d'autres programmes de différenciation. En effet, les myoblastes peuvent se différencier en ostéocytes ou adipocytes après traitement avec des facteurs BMPs (Bone Morphogenic Protein) ou des inducteurs de l'adipogenèse, respectivement (Asakura, A., *et al.* 2001). Au cours de l'adipogenèse, des préadipocytes se différencient en adipocytes riches en lipides et sensibles à l'insuline. Ce processus fait intervenir plusieurs étapes. Les adipocytes dérivent de précurseurs mésenchymateux multipotents, qui prolifèrent puis acquièrent une identité adipogénique. Ce sont les pré-adipocytes, qui cessent leur croissance par inhibition de contact. Lors d'une stimulation hormonale, ces cellules subissent une phase d'expansion clonale, avec induction de l'expression des facteurs C/EBP β et γ (CCAAT/enhancer-binding proteins). Leur différenciation terminale se traduit par un nouvel arrêt du cycle cellulaire, l'induction des facteurs C/EBP α et PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma), et l'activation des gènes spécifiques des adipocytes (comme les gènes du métabolisme des lipides ou des carbohydrates) (Lefterova, M.I. et Lazar, M.A. 2009). Ce processus de différenciation implique donc une cascade de facteurs de transcription. Parmi eux, les facteurs PPAR γ et C/EBPs sont considérés comme des déterminants cruciaux de la voie adipogénique. Dans notre étude, les gènes impliqués dans l'adipogenèse comme *Olr1* et *Lgals12* sont effectivement sous-exprimés. *Olr1* (Oxidized low-density lipoprotein receptor 1) code une lectine activée par la signalisation des PPAR γ dans les adipocytes. *Olr1* constitue un récepteur de reconnaissance, d'internalisation et de dégradation des LDL oxydés (oxLow Density Lipoprotein). Son induction est un moyen par lequel les PPAR γ réguleraient le métabolisme lipidique et la sensibilité à l'insuline dans les adipocytes (Chui, P.C., *et al.* 2005). Ces mécanismes n'ayant pas raison d'être activés dans l'établissement des myotubes, une sous-expression d'*Olr1* est cohérente avec la différenciation myogénique des C2C12. La situation est la même pour le gène *Lgals12* qui est sous-exprimé en début de différenciation myogénique. Ce gène code la galectine 12. Il est exprimé dans les préadipocytes murins et surexprimé lorsque ces cellules quittent le cycle cellulaire et acquièrent leur compétence à la

différenciation adipogénique (Yang, R.Y., *et al.* 2004). Des travaux par ARN interférence ont montré que sa sous-expression diminue l'expression des facteurs de transcription adipogéniques C/EBPs et PPAR γ , et inhibe par conséquent la différenciation adipogénique (Buas, M.F., *et al.* 2009). La galectine 12 semble donc être un important régulateur de l'adipogenèse ; sa faible expression en début de cinétique de différenciation des C2C12 est là aussi en accord avec l'accomplissement du programme myogénique. Néanmoins, l'expression de ce gène augmente en fin de cinétique de différenciation, ce qui suggère de nouvelles fonctions plus tardives dans la myogenèse.

Comme cela a été évoqué, la voie de signalisation par le récepteur Notch contribue à plusieurs aspects de la différenciation myogénique. Dans notre étude, un gène codant un acteur de la voie de Notch, *Lfng* (Lunatic fringe), est sous-exprimé. *Lfng* est une enzyme qui allonge le *O*-fucose de domaines EGF-like du récepteur Notch par une *N*-acetylglucosamine (GlcNAc). Ceci le rend plus sensible à une activation par son ligand Delta (Panin, V.M., *et al.* 1997). Cette enzyme appartient à la famille Fringe (Moran, J.L., *et al.* 1999) avec ses paralogues *Rfng* (Radical fringe) et *Mfng* (Manic fringe) ; ce sont des modulateurs de la voie de Notch (Haines, N. et Irvine, K.D. 2003). L'expression de *Lfng* contrôlerait la segmentation des somites au cours du développement embryonnaire précoce (Cinquin, O. 2007). Notch régule le processus de myogenèse (Buas, M.F., *et al.* 2009), par conséquent la sous-expression de *Lfng*, mise en évidence dans notre étude, est à mettre en relation avec la différenciation myogénique. En effet, l'absence d'allongement des *O*-fucoses de Notch pourrait inhiber son activation par Delta, et ainsi promouvoir la différenciation. La sous-expression de *Lfng* a également été observée dans une autre étude, menée par notre équipe (Audfray, A. 2008), et qui a porté sur la détermination du profil d'expression des acteurs de la voie de Notch au cours de la différenciation myogénique des C2C12. Les résultats affichent des différences d'expression de *Lfng* entre les cellules de réserve, non différenciées, et les myotubes.

3. Des rôles pour les glycanes dans la maturation des myotubes

Selon le modèle obtenu à l'issue de l'analyse de l'expression des glyco-gènes au cours de la différenciation des cellules C2C12, l'établissement des premiers myotubes (48-72 heures de différenciation) s'accompagne de la surexpression de glyco-gènes impliqués dans des fonctions associées à la physiologie musculaire, comme *Glut4* et *Glut5* qui codent des

transporteurs de sucres. Chez l'Homme, le transporteur de glucose GLUT4 est exprimé dans les tissus sensibles à l'insuline comme dans le cas des tissus adipeux et musculaire. La stimulation par l'insuline permet sa translocation rapide et réversible au niveau de la membrane plasmique à partir de vésicules de stockage (Lisinski, I., *et al.* 2006). Nous avons ici vérifié la surexpression de Glut4 dans les C2C12 en différenciation, jusqu'à 48 heures après son induction (Figure 53).

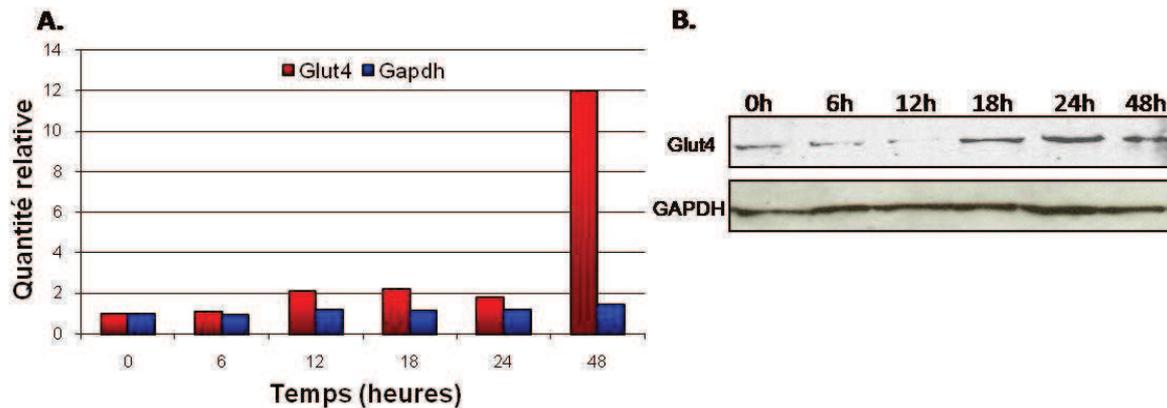


Figure 53. Analyse de l'expression de *Glut4* dans les myoblastes C2C12 en différenciation.

A. Quantité relative des transcrits *Glut4* et *Gapdh* de 0 à 48 heures après l'initiation de la différenciation. **B.** Analyse en Western Blot de *Glut4* et *Gapdh*.

Les résultats obtenus par immuno-marquage à l'aide d'un anticorps anti-Glut4 montrent que la quantité de ce transporteur de glucose est bien corrélée avec les niveaux de transcrits correspondants au cours de la différenciation des C2C12. Un marquage plus important est en effet visible dès 18h de différenciation et demeure constant. Cette expression protéique est cohérente avec les variations de quantités d'ARNm qui augmentent dès 12h de différenciation. La *Gapdh* ne présente pas de variation significative, à l'image des quantités relatives d'ARNm correspondantes. Les myotubes sont des cellules spécialisées qui présentent un métabolisme spécifique souligné par une augmentation de l'expression de certains gènes, voire une nouvelle expression pour certains. Ainsi, le transporteur *Glut4* est présent dans le muscle squelettique (Stuart, C.A., *et al.* 2006). C'est en effet un transporteur de glucose dont la fonction est régulée par l'insuline, son expression musculaire est contrôlée entre autres par les facteurs *MyoD* et *MEF2A* (Im, S.S., *et al.* 2007). L'augmentation de l'expression de *Glut4*, détectée au cours de la différenciation des C2C12, est à corrélérer avec le besoin d'une importation accrue de glucose par les nouveaux myotubes. Ceci semble aussi être le cas pour *Glut6*, codant également pour un transporteur de glucose, qui présente une augmentation de son expression transcriptionnelle. Son expression a déjà été décrite dans le

cerveau, la rate, les leucocytes et les adipocytes (Lisinski, I., *et al.* 2001) mais jusqu'à présent aucun ARNm n'avait été décrit dans les cellules musculaires. Enfin, l'expression transcriptionnelle de *Glut5* augmente. Ce gène code cette fois pour un transporteur de fructose. Sa quantité et son activité sont régulées par l'insuline dans la lignée musculaire de rat L6 (Hajdich, E., *et al.* 2003).

Dans les myotubes puis les myofibres, les transporteurs de sucres sont ainsi des acteurs clés autorisant la génération de l'énergie nécessaire à la contraction musculaire. Mais le métabolisme énergétique ne suffit bien sûr pas à la physiologie musculaire. L'intégrité de la structure et de l'ancrage des myotubes puis des myofibres sont eux aussi primordiaux. Divers acteurs y sont essentiels et participent aussi à la maturation des myotubes. Parmi eux, des intégrines pourraient intervenir, en plus de leur rôle dans l'adhésion cellulaire. Dans notre étude, plusieurs intégrines présentent une augmentation de leur expression transcriptionnelle. Parmi elles, des études montrent un rôle pour *Itgb1bp2* dans la maturation et/ou l'organisation des cellules musculaire (Brancaccio, M., *et al.* 1999). Egalement, la surexpression transcriptionnelle d'*Itga7* est à relier au rôle de récepteur de la protéine codée à la laminine des myoblastes et des myofibres adultes. Au cours de la différenciation myogénique, elle faciliterait la localisation des myoblastes aux sites riches en laminine pour permettre la formation des fibres secondaires (Blanco-Bose, W.E. et Blau, H.M. 2001, Schober, S., *et al.* 2000). Elle est impliquée dans le maintien de l'architecture cellulaire et son ancrage. Son importance est soulignée par des expériences d'invalidation d'*Itga7* chez la souris qui provoquent une dystrophie musculaire progressive (Mayer, U., *et al.* 1997).

4. Conclusion

L'étude transcriptomique que nous avons effectuée constitue à ce jour la seule étude ciblée sur l'expression d'une partie d'un génome, ici le glycogénome, au cours de la différenciation myogénique. Non seulement elle souligne l'implication des glycanes dans l'établissement des myotubes, mais elle permet de mieux comprendre la façon dont les glycanes pourraient intervenir dans un tel processus développemental. Vu le grand nombre de glyco-gènes analysés (375), exprimés (276) et hautement variants (37), nous n'avons pas cherché à confirmer systématiquement ces données transcriptomiques par des analyses à l'échelle protéique et/ou du produit synthétisé. En effet, cette étude constituait en premier lieu un crible afin de déterminer les gènes dérégulés et par extrapolation les structures

glycanniques impliquées dans les étapes précoces dans la myogenèse. Ainsi, plusieurs pistes ont donc été dégagées et présentées dans un modèle hypothétique. Nous proposons que des processus d'adhésion cellulaire, de remodelage de la membrane plasmique et de la MEC, ainsi que des voies de signalisation seraient régulés par glycosylation au cours de la myogenèse. Cette étude a par conséquent constitué le point de départ de nouvelles analyses plus spécifiques.

II. RÔLE DES GLYCOSPHINGOLIPIDES DANS LA MYOGENÈSE

Parmi les 37 gènes présentant de fortes variations dans leur expression transcriptionnelle au cours de la différenciation myogénique, 29 n'ont jusqu'à présent jamais été associés à ce processus. Les voies de biosynthèse dans lesquelles les protéines qu'ils codent interviennent permettent de proposer de nouvelles structures glycaniques comme acteurs potentiels de la myogenèse. J'ai logiquement choisi de m'intéresser à ces 29 gènes, avec l'objectif de déterminer leur implication dans la différenciation myogénique. D'un point de vue pratique, le modèle pour ces expérimentations reste les myoblastes C2C12. En effet, non seulement les résultats précédents ont été obtenus avec cette lignée, mais de nombreux outils utiles à son étude sont disponibles dans notre équipe. La première étape était de voir en quoi la modulation de l'expression de gènes candidats dans les cellules C2C12 modifiait leur différenciation en myotubes, avec un intérêt tout particulier pour l'étape de fusion. Comme il n'était pas possible d'analyser les effets de la modulation de l'expression des 29 gènes identifiés, nous avons restreint le nombre de gènes à étudier. Dans la suite de cet exposé, les démarches suivies pour choisir les gènes d'intérêt, les méthodes utilisées pour moduler leur expression et les premiers résultats associés seront présentés.

1. Choix des gènes d'intérêt

Nous avons choisi de privilégier l'étude des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des glycosphingolipides car ils figurent parmi les plus représentés lors de la différenciation des myoblastes en myotubes (Figure 54), et de plus, ils n'ont jamais été décrits en relation avec la myogenèse.

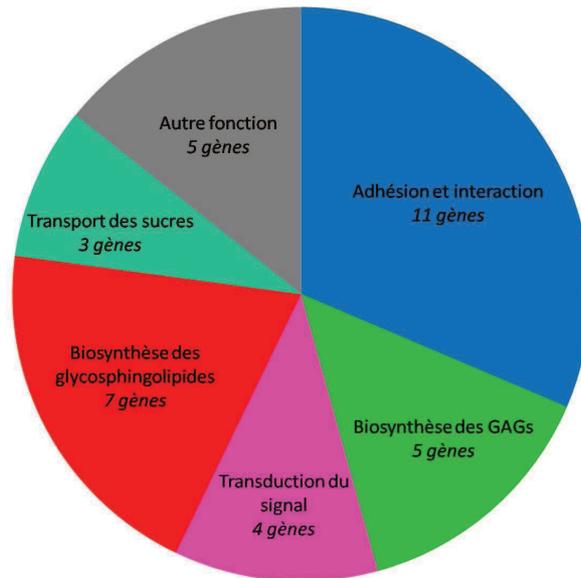


Figure 54. Fonctions associées aux 37 gènes hautement variants.

L'analyse fonctionnelle des 37 gènes hautement variants souligne l'implication des protéines correspondantes dans les processus d'adhésion et d'interaction, de biosynthèse des glycosphingolipides et des GAGs, de transduction du signal et de transport des sucres.

Ainsi, sept gènes appartenant à la voie de biosynthèse des glycosphingolipides ont été sélectionnés (Figure 55A). Le choix a notamment tenu compte du fait de leur positionnement à des points cruciaux de cette voie, c'est-à-dire qu'ils interviennent en orientant la synthèse vers certains composés, comme les gènes *β3galt1* et *β3galt5* qui codent pour des galactosyltransférases intervenant dans le basculement vers la voie des lactoséries, et du fait qu'ils interviennent dans la synthèse de motifs glycaniques terminaux comme les gènes de fucosyltransférases *Fut1*, *Fut2*, *Sec1* et *Fut4* (Figure 55B).

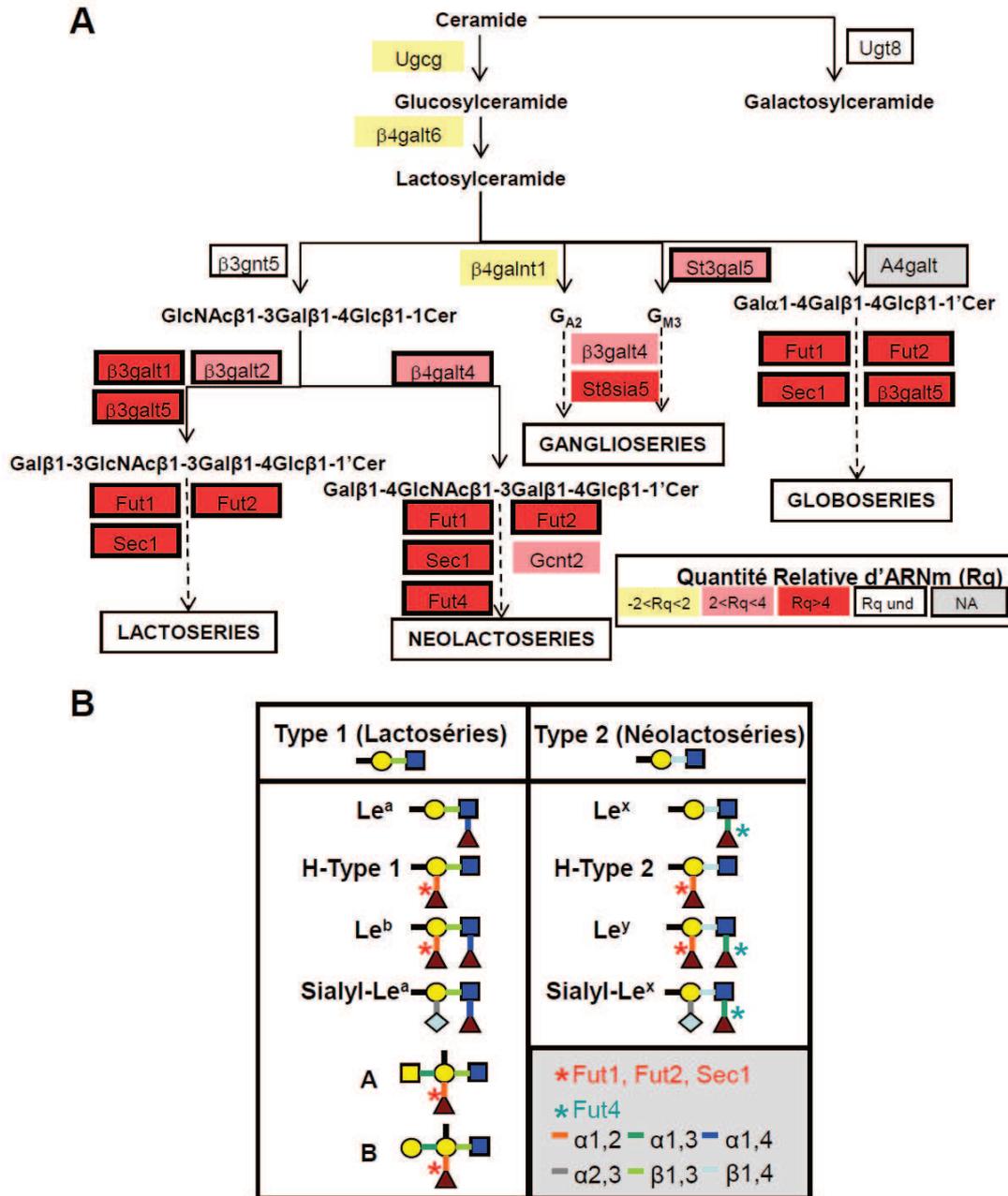


Figure 55. Représentation schématique (A) de la voie de biosynthèse des glycosphingolipides et (B) des déterminants antigéniques principaux des groupes sanguins et tissulaires ABO et Lewis.

A. Les variations des niveaux d'expression des gènes correspondants au cours de la différenciation des cellules C2C12 (quantité relative d'ARNm) sont indiquées, les gènes retenus pour des analyses supplémentaires sont encadrés en noir. NA: Non Analysé ; RQ: Quantité Relative; und: Indéterminé. B. Les structures des déterminants antigéniques principaux des groupes sanguins et tissulaires ABO et Lewis sont présentées.

Nous avons également choisi de retenir pour analyse le gène *β3galt2*, qui code pour une enzyme intervenant au même niveau que *β3galt1* et 5, même s'il présente des modifications de son expression inférieures à un facteur 4 (3,58). L'objectif était en effet d'analyser

l'ensemble des gènes codant les galactosyltransférases permettant l'orientation de la synthèse des glycolipides vers la voie des lactoséries. Pour la même raison, nous avons aussi retenu le gène *β4galt4* codant pour une enzyme qui permet le basculement vers la voie des néolactoséries et dont les variations en quantité relative d'ARNm sont peu éloignées de 4 (3,15). Le gène *St3gal5* a lui aussi été sélectionné, puisqu'il code pour la GM3 synthase, élaborant le GM3, précurseur de la quasi-totalité des gangliosides (Figure 56).

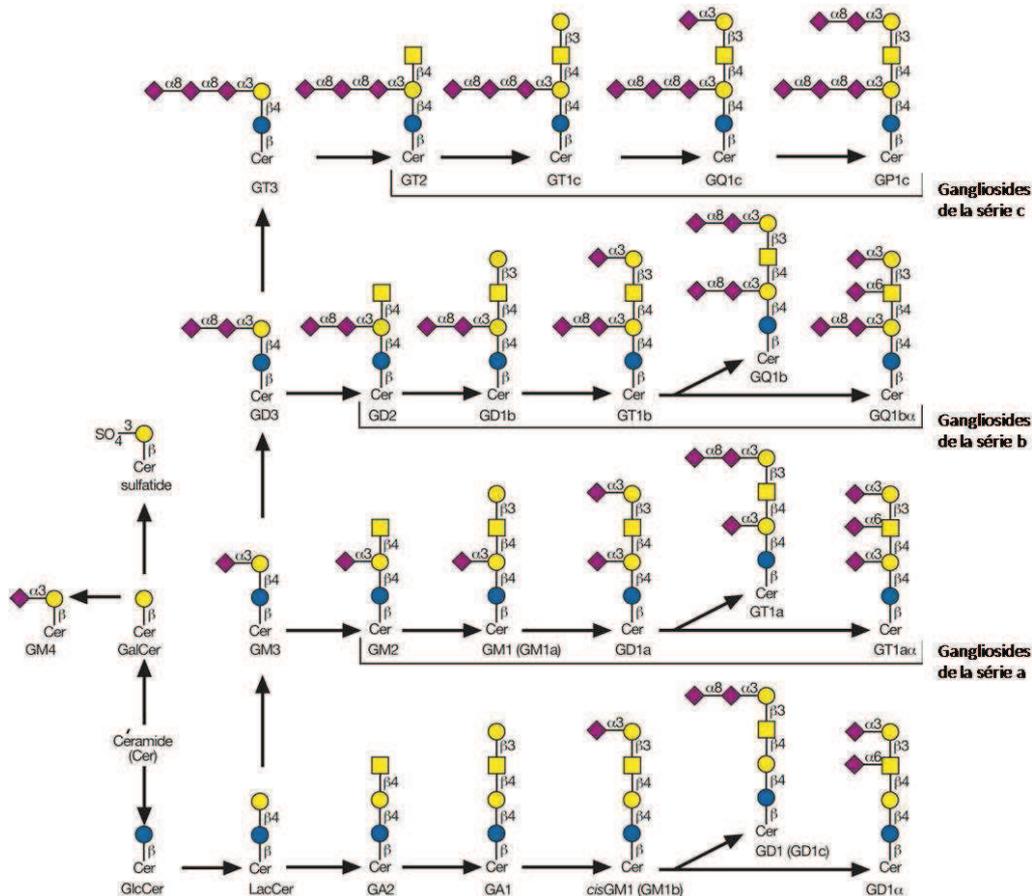


Figure 56. Voie de biosynthèse des gangliosides.

Les gangliosides sont synthétisés à partir du céramide auquel sont ajoutés des sucres pour former les glycosphingolipides. Le GM3 est le ganglioside le plus simple, il dérive du lactosylcéramide (LacCer) et constitue le précurseur commun des gangliosides des séries a, b et c. Chaque espèce de ganglioside est constituée par un squelette céramide (Cer) et une chaîne glycanne contenant un ou plusieurs acides sialiques. (D'après Varki, A., *et al.* 2008).

Les variations de son expression transcriptionnelle, proches de 4 (3,66), sont, de plus, corrélées à l'activité de l'enzyme codée (Janot, M., *et al.* 2009). Enfin, tous les gènes sélectionnés jusqu'ici présentent des variations transcriptionnelles positives au cours de la différenciation des cellules C2C12, c'est pourquoi nous avons également choisi de retenir un gène présentant cette fois des variations négatives. Notre choix s'est arrêté sur le gène *Lfng*, pour lequel des outils d'analyse sont accessibles dans notre laboratoire. Il présente en effet un

intérêt tout particulier au sein de notre équipe, puisqu'il code pour une glycosyltransférase participant à l'élaboration des *O*-fucosylglycannes portés par le récepteur Notch. Ces glycannes et les enzymes correspondantes sont étudiés au laboratoire dans le cadre de la myogenèse. Le tableau 13 récapitule les éléments de choix pour les 10 gènes mentionnés ci-dessus.

Tableau 13. Eléments généraux ayant contribué au choix d'une liste de 10 gènes d'intérêt. « Orientation » indique une fonction de l'enzyme codée dans le basculement vers une voie de biosynthèse donnée alors que « Motif terminal » implique une fonction dans la biosynthèse des motifs glucidiques périphériques. * Le gène *Lfng* a été retenu du fait des variations transcriptionnelles négatives au cours de la différenciation des C2C12 et de son intérêt pour un projet de l'équipe mené en parallèle.

Gène retenu	Variations transcriptionnelles		Position des enzymes codées dans la voie de biosynthèse des glycosingolipides	
	2<x<4	>4	Orientation	Motif terminal
<i>β3galt1</i>		+	x	
<i>β3galt2</i>	+		x	
<i>β3galt5</i>		+	x	
<i>β4galt4</i>	+		x	
<i>Fut1</i>		+		x
<i>Fut2</i>		+		x
<i>Fut4</i>		+		x
<i>Lfng*</i>		-		
<i>Sec1</i>		+		x
<i>St3gal5</i>	+		x	x

2. Conséquences de la modification de l'expression des gènes d'intérêt

Afin de mieux comprendre le rôle de ces 10 gènes, précédemment choisis, dans la différenciation myogénique, nous avons choisi de débiter l'analyse en modifiant leur expression, par sur- et sous-expression dans les cellules C2C12. L'objectif était de déterminer les effets de ces dérégulations sur la différenciation des myoblastes et sur leur fusion en myotubes. Pour cela, des cellules ont d'abord été transfectées transitoirement par des vecteurs

de surexpression et des siRNA. L'état de différenciation des cultures correspondantes a été suivi par l'établissement de courbes de fusion.

a. Résultats de la surexpression transitoire des gènes d'intérêt

i Surexpression des gènes d'intérêt dans les cellules C2C12

La surexpression transitoire a été réalisée en utilisant un vecteur d'expression eucaryote, le vecteur pcDNA3.1 (Figure 57), contenant la séquence codante d'une des 10 protéines murines d'intérêt, à l'exception de celle de *Sec1* que nous n'avons pas réussi à cloner. Cette séquence est sous le contrôle du promoteur fort du CytoMégaloVirus (CMV) qui permet une expression constitutive du gène d'intérêt, le codon originel d'arrêt de la traduction étant conservé.

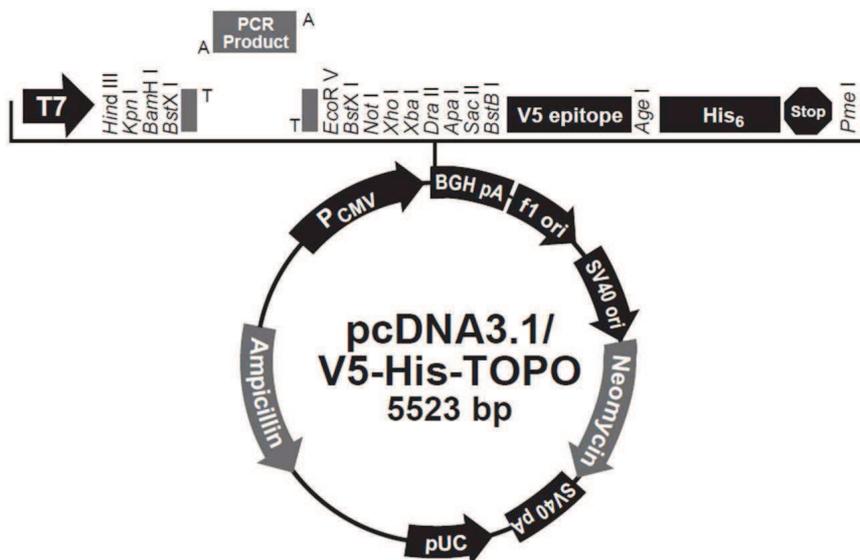


Figure 57. Carte du vecteur pcDNA3.1.

La séquence codante de chacun des gènes analysés a été clonée dans le vecteur pcDNA3.1 sous le contrôle du promoteur fort du cytomégaloVirus (P_{CMV}). La présence de la séquence codant la néomycine rend possible une sélection des clones transfectés par ce composé.

Les cellules C2C12 ont été transfectées par lipofection, en utilisant le FUGENE[®]6 (Roche Applied Science, Indianapolis, USA) selon un protocole développé au laboratoire pour les cellules C2C12 (Audfray, A. 2008). Le témoin positif de cette expérience est effectué avec le gène de la neuraminidase 2 (*Neu2*) car il a déjà été démontré que sa surexpression dans les

myoblastes C2C12 favorise leur différenciation (Fanzani, A., *et al.* 2003). Le témoin négatif correspond, quant à lui, au vecteur pcDNA3.1 ne comportant pas de séquence codante (vecteur vide). Suite aux transfections, nous avons vérifié les niveaux d'expression des transcrits par PCR quantitative en temps réel grâce à l'utilisation de sondes spécifiques (Sondes TaqMan, Applied Biosystems, Norwalk, USA) après 36h de différenciation (Figure 58).

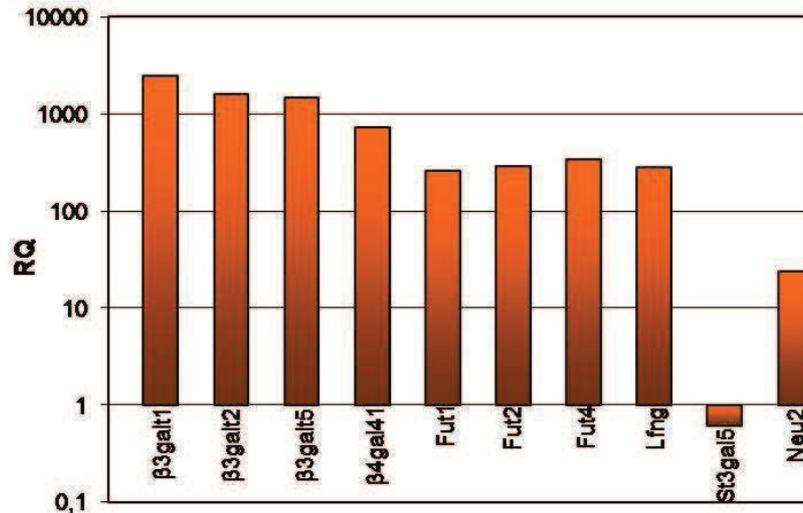


Figure 58. Résultats de la quantification de l'expression des glyco-gènes d'intérêt dans les C2C12 après transfection transitoire.

Les valeurs correspondent aux quantités relatives d'ARNm (RQ) après 36h de différenciation, le témoin négatif servant de calibrateur (vecteur vide pour lequel le RQ est de 1) et le gène *18S* de référence.

Ces résultats montrent que la transfection transitoire permet bien de surexprimer les gènes d'intérêt (à l'exception de *St3galt5*) jusqu'à au moins 36 heures de différenciation. Les modifications sont de l'ordre d'un facteur 1000 pour les gènes *$\beta 3galt2$* , *$\beta 3galt5$* et *$\beta 4galt4$* et même de 2500 pour *$\beta 3galt1$* . Ces variations sont néanmoins à relativiser du fait de la très faible expression des gènes correspondants dans le témoin négatif (vecteur vide, Ct d'environ 35) et qui par conséquent donne des différences importantes. *A minima*, ces valeurs sont le reflet d'une expression significative dans une condition et d'une très faible, voire une absence, d'expression dans la condition témoin. Les gènes *Fut1*, *Fut2*, *Fut4* et *Lfng* sont surexprimés d'un facteur compris entre 250 et 300, tandis que *Neu2* présente un facteur de surexpression de 23. Afin de vérifier que la surexpression est effective durant l'établissement des premiers myotubes, soit vers 48-72h de différenciation, l'expression transcriptionnelle de certains

gènes, *Fut1*, *Fut2* et *Neu2*, a ainsi été déterminée par PCR quantitative à différents temps de différenciation (Figure 59).

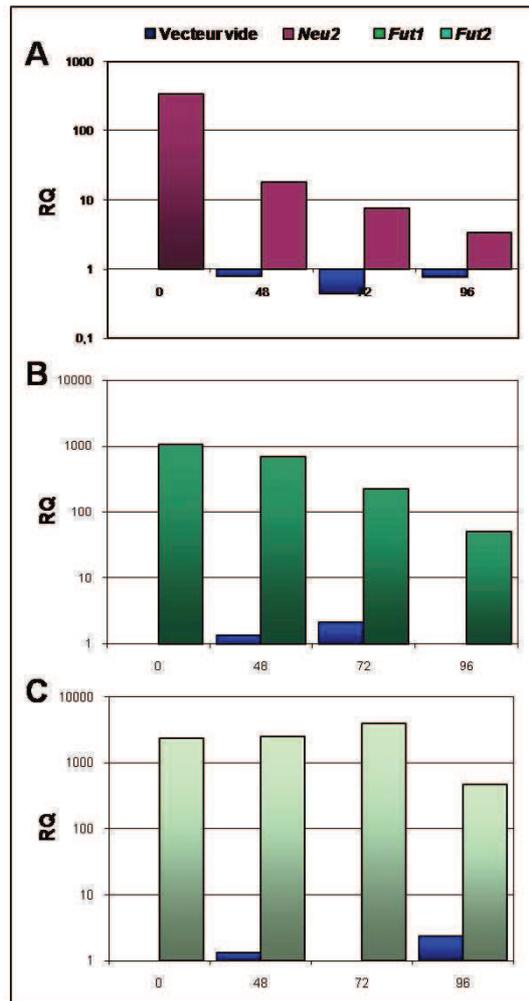


Figure 59. Résultats de l'analyse par PCR quantitative de l'expression des gènes *Neu2* (A), *Fut1* (B) et *Fut2* (C) au cours de la différenciation myogénique des cellules C2C12 transfectées transitoirement par les vecteurs correspondants.

Les valeurs de RQ ont été obtenues par calibration sur le temps 0 de différenciation des cellules transfectées par le vecteur vide, le gène de référence étant le gène *18S*.

Ainsi, la surexpression du gène *Neu2* est effective jusqu'à 96h de différenciation, bien que les quantités relatives d'ARNm décroissent rapidement au cours de la cinétique. En effet, à 96h de différenciation, la surexpression n'est plus que d'un facteur 3 contre 340 au temps 0. Les valeurs concernant *Fut1* et *Fut2* restent élevées jusqu'à 96h de différenciation, malgré une tendance à la diminution. Ces diminutions de l'expression observée par PCR quantitative peuvent s'expliquer par plusieurs éléments. Tout d'abord, au cours de la différenciation persiste une population conséquente de cellules de réserve qui ne quittent pas le cycle

cellulaire. Or la transfection est ici transitoire et au cours des divisions cellulaires, seule une des deux cellules filles contient le plasmide. Mais surtout, des mécanismes de dégradation de l'ADN peuvent contribuer à cette baisse (Primrose, S.B., *et al.* 2001), en affectant notamment les cellules en cours de différenciation. Ces résultats montrent également une différence dans le maintien d'une surexpression forte entre le gène *Neu2* et les gènes *Fut1* et *Fut2*, pour lesquels la surexpression semble être plus efficace dans la durée. Ceci pourrait refléter une nécessité de régulation de l'expression de *Neu2* plus importante dans les cellules transfectées. Toutefois, ces résultats montrent que la transfection transitoire des C2C12 remplit les conditions nécessaires pour l'étude des conséquences de la surexpression des gènes d'intérêt lors du processus de différenciation des C2C12, et plus précisément lors de l'établissement des premiers myotubes. Il aurait été nécessaire de vérifier que ces variations d'expression en ARNm sont corrélées aux quantités des protéines correspondantes et/ou de leurs produits. Nous avons privilégié de poursuivre les analyses dans le but d'identifier, parmi les neuf gènes testés, ceux engendrant des modifications dans la différenciation des myoblastes murins C2C12, l'objectif final étant de cibler 1 ou 2 gènes pour effectuer des investigations plus poussées.

ii Conséquences sur la différenciation des cellules C2C12

Dans un premier temps, nous avons vérifié si la transfection avait un effet sur la différenciation. Pour cela, des cellules transfectées par le vecteur vide et les cellules non transfectées ont été mises en différenciation. Des courbes de fusion ont été réalisées au cours d'une cinétique de différenciation. A chaque temps de la cinétique, le nombre total de noyaux et celui des noyaux contenus dans des myotubes ont été dénombrés dans 12 champs microscopiques. Un index de fusion a ainsi été obtenu et a donné un indice de l'état de fusion, et donc de différenciation (Figure 60). Les courbes de fusion correspondantes permettent de constater que les cellules transfectées par le vecteur vide se comportent de façon similaire aux cellules non transfectées. Les premiers myotubes apparaissent aux alentours de 48h de différenciation, puis leur nombre et leur taille augmentent, avant d'atteindre un plateau vers 144h de différenciation. Il persiste en effet un nombre conséquent de cellules de réserve associées aux myotubes, qui peuvent représenter jusqu'à 50% des cellules présentes dans la culture.

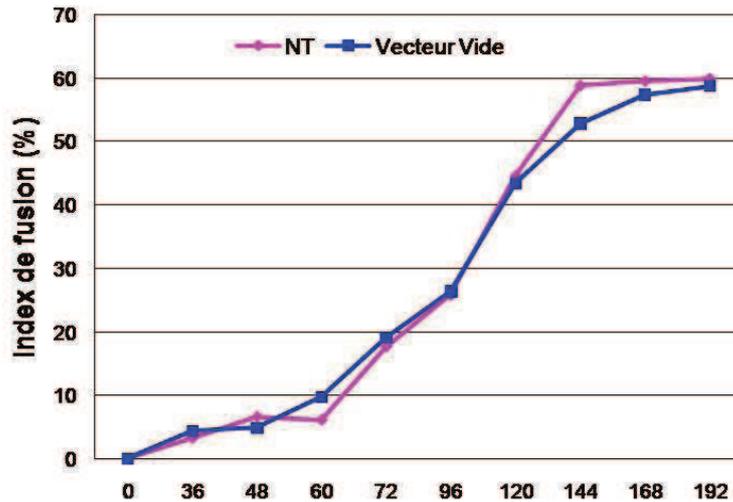


Figure 60. Résultats de l'analyse des index de fusion des cellules C2C12 et des mêmes cellules transfectées transitoirement par le plasmide pcDNA3.1/Amp.

Les cellules ont été transfectées à 80% de confluence pendant 8h puis mises en différenciation. Les cellules non transfectées ont été parallèlement mises en différenciation. A chaque temps de la cinétique de différenciation, un index de fusion, reflétant le pourcentage de myotubes, est déterminé.

Les courbes de fusions obtenues avec des cellules C2C12 transfectées par les vecteurs comportant les séquences codantes de chacun des gènes d'intérêt, ou par le vecteur vide, ne présentent aucune différence au cours des cinétiques de différenciation, même pour la transfection avec le vecteur comportant la séquence codante de *Neu2* (Figure 61). L'observation microscopique des cellules durant les phases précoces de différenciation (jusqu'à 48h) ne permettent pas non plus de distinguer de différences significatives entre les cellules transfectées par un vecteur vide et les cellules surexprimant un des gènes cibles (Résultats non présentés).

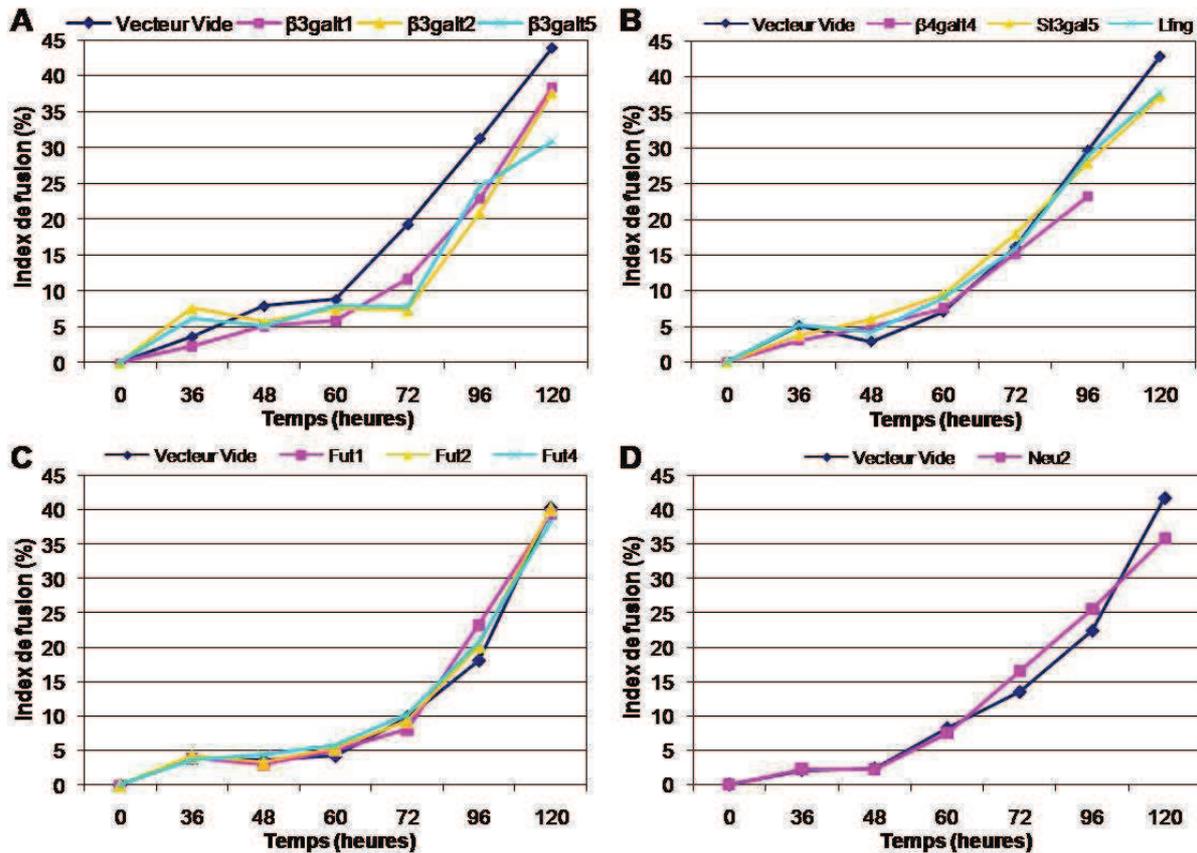


Figure 61. Représentation des index de fusion obtenus après transfection et différenciation des cellules C2C12 par différentes constructions.

A. Vecteur vide, $\beta 3\text{gal}1$, $\beta 3\text{gal}2$, $\beta 3\text{gal}5$; **B.** Vecteur vide, $\beta 4\text{gal}4$, St3gal5, Lfng ; **C.** Vecteur vide, Fut1, Fut2, Fut4 ; **D.** Vecteur vide, Neu2.

Plusieurs éléments peuvent expliquer ces résultats. Tout d'abord, il est possible que la surexpression n'ait été effective qu'au niveau des ARNm. Mais il semble peu probable que la même régulation de l'expression protéique ait pu avoir lieu pour l'ensemble des gènes testés. Ensuite, comme les résultats pour le témoin positif, le gène *Neu2*, sont négatifs, il se peut que les effets des gènes étudiés n'aient également pas pu être observés. En effet, la transfection transitoire des C2C12 est peu efficace. Des travaux de thèse au sein de l'équipe (Loriol, C. 2006) ont par exemple montré que l'efficacité des transfusions des C2C12 avec d'autres vecteurs d'expression, comportant la séquence codant la GFP, n'excédait pas les 10%. Ici, les cellules transfectées ne sont pas triées, c'est donc une population cellulaire hétérogène qui est analysée. Les cellules non transfectées, beaucoup plus nombreuses, se différencient de façon normale en masquant les effets potentiels de la surexpression des gènes d'intérêt. Les valeurs d'expression observées pour les gènes d'intérêt correspondent en fait à une moyenne de l'expression de toutes les cellules de la culture. L'analyse de l'ensemble des cellules en

culture n'est donc pas suffisamment sensible pour détecter des variations significatives dans le déroulement de la différenciation. C'est pourquoi nous avons privilégié de réaliser des lignées stables surexprimant nos gènes d'intérêt, afin d'éviter les écueils liés à cette technique.

b. Résultats de la sous-expression des gènes d'intérêt par siRNA

Bien que la surexpression d'un gène d'intérêt puisse apporter de nombreuses informations sur sa fonction, notamment lorsque les gènes concernés sont faiblement exprimés en conditions normales dans la cellule, la sous-expression, voire l'extinction totale d'un gène, reste la méthode la plus efficace pour appréhender sa fonction. Ceci est d'autant plus vrai dans notre cas, où tous les gènes sélectionnés, mis à part *Lfng*, présentent des variations d'expression positives au cours de la différenciation myogénique. Nous avons donc débuté une étude pour sous-exprimer nos glyco-gènes d'intérêt en utilisant le principe de l'interférence par ARN. Il repose sur l'apport à la cellule de petits ARN double brin ayant des séquences complémentaires à certaines portions de l'ARNm à dégrader. Dans ce cadre, nous avons choisi d'utiliser la technique des siRNA (Small Interfering RNA). Ces siRNA sont de petits ARN double brin de 21 nucléotides. Leur transfection dans les cellules a pour conséquence la destruction spécifique des ARNm ciblés, empêchant toute nouvelle traduction de la protéine codée. Cette technique n'avait jamais été utilisée auparavant au sein du laboratoire. Elle a donc nécessité une mise au point. Les siRNA utilisés dans notre étude proviennent de la société Applied Biosystems, il a été nécessaire, dans un premier temps, de vérifier la non cytotoxicité du lipofectant associé, le siPortNeoFx (Résultats non présentés). Dans un deuxième temps, l'efficacité de l'extinction associée aux siRNA après leur transfection dans les C2C12 en prolifération a été évaluée (Figure 62). Les résultats obtenus, en transfectant 5nM du siRNA ciblant les ARNm de *Fut1*, *Fut2*, *Fut4*, *Sec1* et *St3gal5*, n'ont pas permis de détecter une sous-expression efficace en RT-PCR quantitative, la sous-expression maximale étant d'environ 40% pour le gène *Fut1*. Des tests similaires ont ensuite été effectués en utilisant comme transfectant le FUGENE®6 et ont donné des résultats similaires (Résultats non présentés).

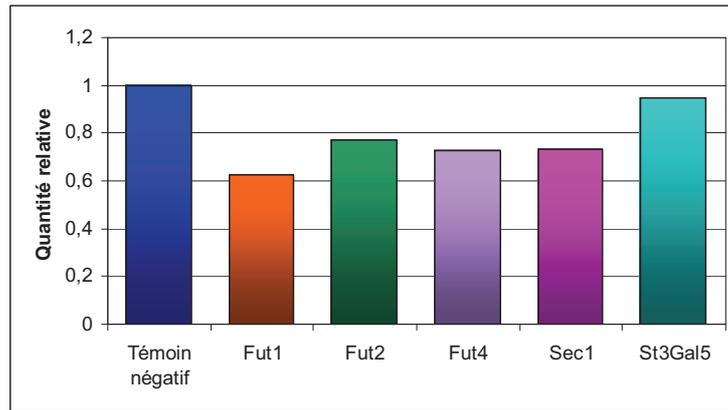


Figure 62. Résultats de RT-PCR quantitative lors de la sous-expression de 5 gènes d'intérêt par siRNA.

La transfection des cellules C2C12 est réalisée par 5 nM de siRNA ciblant les gènes *Fut1*, *Fut2*, *Fut4*, *Sec1* et *St3gal5* en utilisant le siPortNeoFx. En parallèle un siRNA ne ciblant aucun ARNm a été utilisé comme témoin négatif. Les ARNm ont été extraits après 24h de transfection puis les ADNc correspondants ont été analysés par RT-PCR quantitative en temps réel. Les quantités relatives d'ARNm sont déterminées par rapport au témoin qui sert d'échantillon calibrateur, et le gène 18S qui sert de gène de référence. Des résultats similaires ont été obtenus après 48h de transfection (données non présentées).

Pour optimiser le taux d'extinction, des quantités croissantes de siRNA avec le siPortNeoFx ont été testées. Les résultats obtenus pour le gène *Fut4* (Figure 63), ne montrent aucune différence significative d'expression.

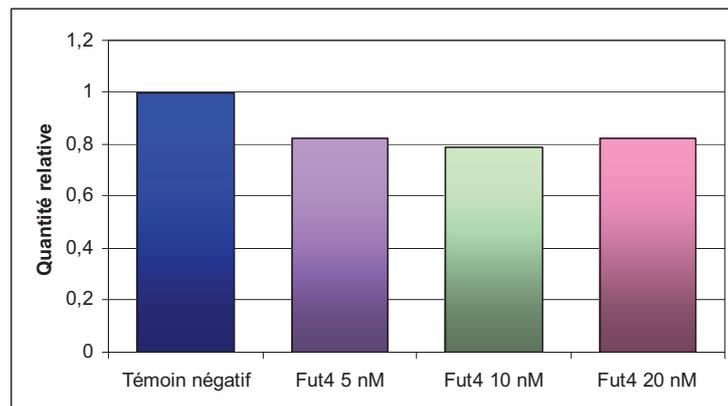


Figure 63. Résultats de RT-PCR quantitative lors de la sous-expression de *Fut4* par siRNA.

La transfection des cellules C2C12 est réalisée avec des concentrations croissantes en siRNA (5, 10 et 20 nM) ciblant *Fut4* et en utilisant le siPortNeoFx. En parallèle 5nM de siRNA ne ciblant aucun ARNm ont été transfectés (Témoin négatif). Les ARNm ont été extraits après 24h de transfection puis les ADNc correspondants ont été analysés par RT-PCR quantitative en temps réel.

Les différents résultats obtenus lors des tests préliminaires d'extinction de l'expression de gènes par des siRNA sembleraient tout de même indiquer une légère sous-expression, mais elle reste insuffisante pour permettre des analyses ultérieures. Ceci peut s'expliquer, à l'image de ce qui a déjà été évoqué, par un faible taux de transfection des cellules C2C12. Ce protocole reste donc à optimiser. Il peut être envisagé par exemple de marquer les siRNA avec un fluorophore afin de connaître l'efficacité de transfection, ou encore de réaliser celle-ci par électroporation. Cependant, pour les analyses futures, nous privilégions l'utilisation de la technique de shRNA. Elle permet en effet d'éteindre l'expression d'un gène d'intérêt de façon plus stable et plus durable, même si elle est également plus complexe à mettre en œuvre. Il est néanmoins important de poursuivre dans cette voie. Des résultats préliminaires concernant le GM3 sont en effet encourageants. Dans ce cas, l'utilisation d'un anticorps anti-GM3 dans le milieu de culture de cellules en différenciation, afin de masquer ce ganglioside, a permis de montrer qu'au niveau phénotypique, les cellules au contact de l'anti-GM3 affichent un certain retard de différenciation par rapport au témoin où un anticorps isotypique a été ajouté. (Figure 64).

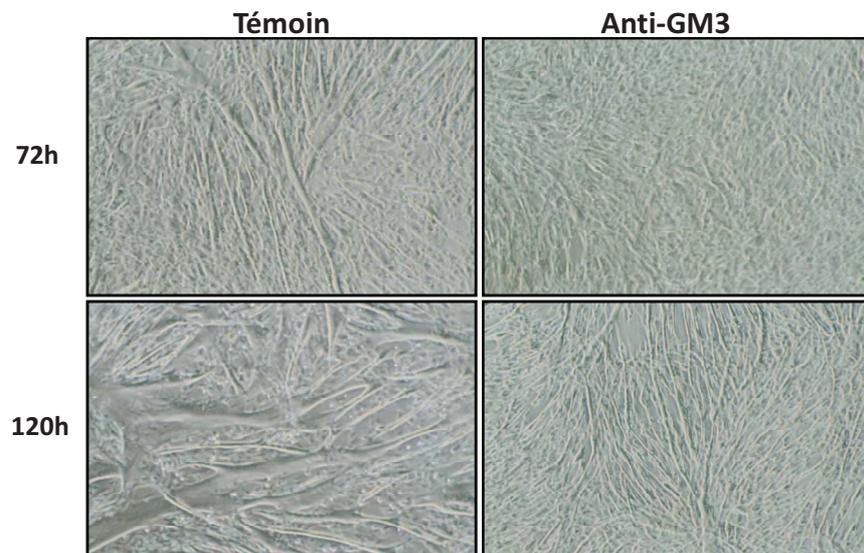


Figure 64. Observations microscopiques de cellules C2C12 en cours de différenciation lors du masquage des gangliosides GM3.

Les cellules C2C12 ont été mises en différenciation et incubées soit avec l'anti-GM3 (Seikagaku Corporation, Japon), soit avec un anticorps isotypique (Témoin). Les cellules ont été observées à différents temps de cinétique, les temps 72 et 120h étant présentés ici.

Les myotubes semblent moins développés dans les cellules où les gangliosides GM3 sont masqués que dans la culture témoin. Cet effet pourrait s'expliquer par l'association possible entre glycosphingolipides et cytosquelette, ce qui a déjà été démontré pour les cellules

musculaires (Gillard, B.K., *et al.* 1991, Gillard, B.K., *et al.* 1992). En effet, le GM3 est le ganglioside majeur synthétisé par les myoblastes (Cambron, L.D. et Leskawa, K.C. 1994, Leskawa, K.C., *et al.* 1988). Il interagit avec la vimentine des filaments intermédiaires (Gillard, B.K., *et al.* 1992). Sa régulation pourrait donc correspondre à une étape précoce du remodelage du cytosquelette avant la fusion cellulaire et donc à un signal pour débiter la différenciation myogénique. Ces résultats restent toutefois préliminaires et nécessitent la réalisation de nouveaux tests dont notamment une détermination des index de fusion au cours d'une cinétique de différenciation.

Ainsi, que ce soit en surexpression ou en sous-expression, les transfections transitoires n'ont pas permis d'obtenir de résultats concluants, certainement à cause d'un taux de transfection insuffisant des cellules C2C12. C'est pourquoi nous avons poursuivi notre démarche en établissant des lignées cellulaires stables pour optimiser les modifications d'expression dans les cellules C2C12.

c. Résultats de la surexpression stable des gènes d'intérêt

Dans cette étude, des lignées exprimant de façon constitutive les gènes d'intérêt ont été établies. Pour ce faire, les vecteurs utilisés au cours de la transfection transitoire ont été introduits par électroporation dans des cellules C2C12. Les cellules ayant incorporé le plasmide, contenant également un gène de résistance à la néomycine, ont été sélectionnées par l'ajout de G418 dans le milieu de culture. Mis à part le cas de la transfection par *St3gal5*, où seuls deux clones ont pu être obtenus, au moins quatre clones isolés ont ensuite été prélevés et amplifiés avant d'être caractérisés par PCR quantitative. En parallèle, l'ensemble des clones en culture a aussi été prélevé (« Pool »), dans le but d'obtenir une population cellulaire où les variations inter-clones (dues au site d'insertion de l'ADN) sont minimisées.

- Aspects phénotypiques

Au cours de l'amplification des clones obtenus, les cellules en prolifération ont parfois affiché des caractéristiques phénotypiques remarquables en termes de taille, de forme cellulaires et d'organisation intracellulaire (Figure 65).

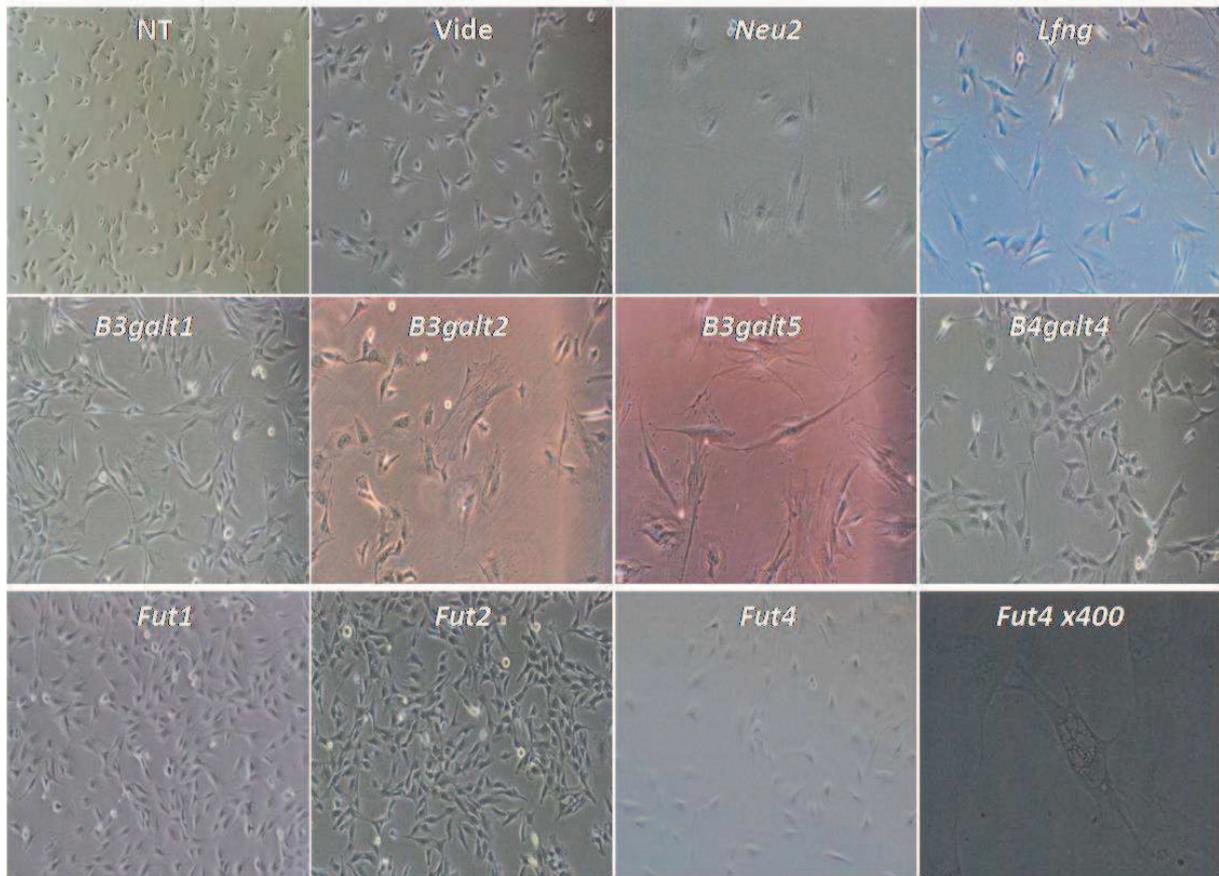


Figure 65. Observations microscopiques de cellules C2C12 en prolifération exprimant stablement des glyco-gènes d'intérêt.

Les cellules C2C12 ont été transfectées avec l'un des vecteurs d'intérêt ou par le vecteur vide. Après sélection au G418, différents clones ont été obtenus et amplifiés dans du milieu de croissance. Les clones transfectés avec le vecteur contenant la séquence codante du gène *Neu2* présentent des cellules de grande taille, de même que ceux transfectés avec avec le vecteur contenant la séquence codante du gène *$\beta 3galt1$* , *$\beta 3galt2$* ou *$\beta 3galt5$* qui présentent de surcroît d'importantes extensions cellulaires. Ce phénotype est d'autant plus marqué pour *$\beta 3galt5$* . Les clones transfectés par le vecteur *Lfng* affichent aussi des cellules comportant des extensions cytoplasmiques, tandis que le cytoplasme de certaines cellules transfectées par *Fut4* semble être occupé par une grande proportion de globules lipidiques. Les cellules transfectées par le vecteur comportant la séquence codante de *St3gal5* ne sont pas présentées ici car elles sont actuellement en cours d'analyse. NT, non transfecté.

Parmi les phénotypes les plus remarquables, les clones transfectés avec le vecteur contenant la séquence codante du gène *$\beta 3galt5$* présentent des cellules de grande taille, comme « étalées » sur le support de culture. Leur forme générale s'éloigne de l'aspect fusiforme habituel des C2C12 en prolifération, elles présentent de surcroît d'importantes extensions cellulaires. Leur cytoplasme semble donc désorganisé, peut être suite à une désorganisation du cytosquelette, et leur prolifération, bien que non quantifiée précisément, apparaîtrait beaucoup plus lente que celle des cellules témoins (non transfectées ou transfectées par le vecteur vide). Les cellules transfectées par *$\beta 3galt1$* et *$\beta 3galt2$* ont un phénotype moins marqué, même si des cellules

similaires, beaucoup moins nombreuses, sont parfois présentes. Les phénotypes affichés par les cellules transfectées par *Neu2* sont eux aussi remarquables, avec des cellules là encore de très grande taille. Leur croissance semble également plus lente que celle des cellules témoins. Cet élément avait également été observé par Fanzani et ses collaborateurs en 2003. Parmi les clones transfectés par *Lfng*, on retrouve aussi des cellules présentant des extensions cytoplasmiques fines et de grande taille. Quant aux cellules transfectées par les vecteurs *Fut1*, *Fut2* ou *β 4galt4*, elles ne présentent pas de différences phénotypiques significatives avec les cellules témoins. Enfin, les cellules transfectées par *Fut4* ne présentent généralement pas de différences significatives avec les cellules témoins, toutefois les cultures correspondantes comportent de nombreuses cellules renfermant en grande proportion cytoplasmique ce qui semble être des globules lipidiques. Ce phénotype est très rarement observé dans les cultures témoins.

- Aspects quantitatifs

Les clones amplifiés ont également été analysés par PCR quantitative afin de déterminer les niveaux de surexpression des gènes correspondants (Tableau 14). Pour chacune des transfections réalisées, le clone présentant la meilleure surexpression a été sélectionné pour faire l'objet d'études supplémentaires. Pour chacun des clones sélectionnés, les analyses ultérieures consistent en une vérification de l'expression du gène d'intérêt au niveau protéique et/ou des produits formés par l'enzyme codée, et bien sûr en une étude de l'effet de la surexpression de ce gène sur la différenciation des cellules C2C12. Pour cela, des courbes de fusion et des mesures d'expression des MRFs dans des cellules en différenciation ont été effectuées. En parallèle des analyses réalisées sur les clones sélectionnés, des expérimentations similaires ont aussi été menées sur le pool des clones obtenus afin d'éliminer la variabilité entre clones.

Tableau 14. Niveaux d'expression des gènes d'intérêt déterminés par PCR quantitative dans les différents clones amplifiés (en bleu).

Les valeurs correspondent aux quantités relatives d'ARNm (RQ, en rouge) comparativement à la moyenne obtenue pour chacun des gènes dans les 7 clones obtenus pour le vecteur vide. Les clones sélectionnés sont surlignés. Malgré le RQ du clone 2 *β3galt5*, il n'a pas été sélectionné car il présentait une expression aberrante du gène de référence *Gapdh*.

Gènes	Clones et valeurs de RQ correspondantes										
	<i>β3galt1</i>	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	Pool		
	1,96	4,18	4,21	8,56	1,68	1,22	1,67	2,05			
<i>β3galt2</i>	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	Pool			
	6,24	2,37	13,58	6,66	4,26	4,17	6,39	1,57			
<i>β3galt5</i>	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11
	0,90	39,99	1,41	1,76	0,78	3,89	1,74	2,56	20,93	2,63	2,41
<i>β4galt4</i>	C2	C3	C4	C5	C6	Pool					
	2,37	4,38	2,88	0,65	1,32	1,91					
<i>Fut1</i>	C1	C3	C4	C5	Pool						
	4,23	11,32	23,18	35,93	13,19						
<i>Fut2</i>	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	Pool		
	42,86	5,36	36,43	5,59	61,35	53,55	32,18	19,94	36,24		
<i>Fut4</i>	CA	CB	C1	C2	C4	CIV	Pool				
	0,86	2,59	15,26	0,62	0,41	1,85	3,15				
<i>Lfng</i>	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	Pool		
	4,75	4,17	3,91	7,37	2,62	1,60	2,51	4,15	1,96		
<i>Neu2</i>	C1	C2	C4	C6	C7	C8	C9	Pool			
	1,07	26,85	38,45	22,93	26,79	38,09	38,84	29,80			
<i>St3gal5</i>	C3	C4	Pool								
	4,42	2,02	2,18								

Les premiers résultats, présentés dans la suite de ce manuscrit, ont été obtenus avec les lignées cellulaires exprimant les gènes *Fut1* ou *Fut2*. En effet, outre le fait que ces lignées ont été les premières établies, *Fut1* et *Fut2* appartiennent à une famille multigénique et codent pour des α 1,2-fucosyltransférases, impliquées dans l'établissement de motifs glycaniques terminaux (antigène H, Lewis B, Lewis Y) (Ma, B., *et al.* 2006). Or, ce sont les sucres terminaux des glycoprotéines et des glycolipides qui portent principalement les fonctions biologiques des glycannes, de part leur propriétés intrinsèques ou leur reconnaissance par d'autres molécules. Les motifs synthétisés par les α 1,2-fucosyltransférases pourraient ainsi être directement impliqués dans les événements d'interaction et d'adhésion cellulaires préalables à la fusion des myoblastes. L'expression transcriptionnelle de *Fut1* et *Fut2* augmente d'ailleurs de façon

concomittante avec l'établissement des premiers myotubes au cours de la différenciation des cellules C2C12.

Pour conclure (Figure 66), l'analyse de 375 glyco-gènes présentée dans les travaux précédents a constitué un crible permettant d'identifier 95 gènes dont l'expression transcriptionnelle variait au cours de la différenciation des cellules C2C12, 37 étant hautement régulés. Parmi eux, 29 n'avaient jamais été décrits dans la différenciation myogénique, et beaucoup sont associés à la biosynthèse des glycosphingolipides. Ceci nous a amené à choisir des gènes d'intérêt principalement associés à cette voie, en privilégiant les 29 gènes nouvellement décrits. Nous avons ainsi établi une liste restreinte à 10 gènes sur lesquels réaliser des analyses supplémentaires. Les transfections stables réalisées nous ont conduit à l'étude de deux gènes, *Fut1* et *Fut2*, et donc de la fonction de l' α 1,2-fucosylation, modification glycanique périphérique, dans la différenciation myogénique des C2C12.

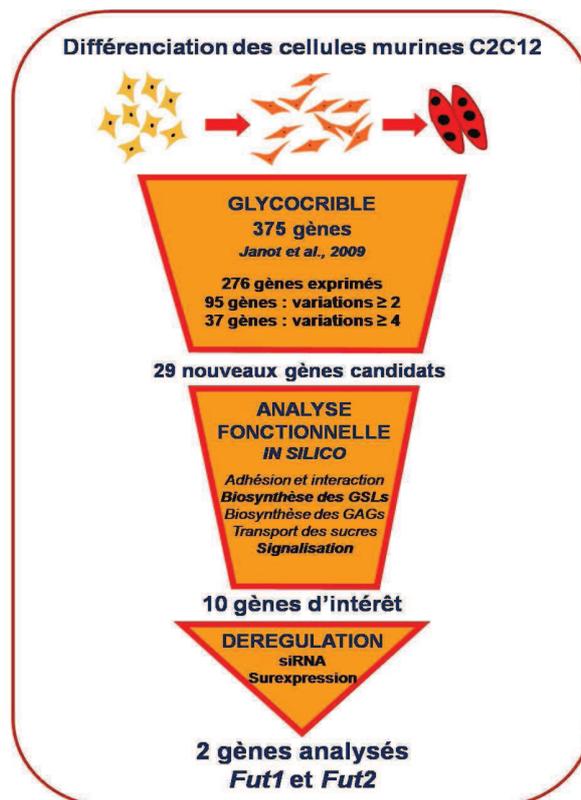


Figure 66. Stratégie suivie pour le choix des gènes à étudier.

A partir de l'analyse transcriptomique des 375 glyco-gènes au cours de la différenciation des C2C12, 29 nouveaux gènes candidats présentant d'importantes variations de leur expression transcriptionnelle ont été mis en évidence. L'analyse fonctionnelle de ces gènes a permis la sélection de 10 gènes d'intérêt principalement associés à la voie de biosynthèse des glycosphingolipides. L'expression de ces gènes a été dérégulée transitoirement, et des lignées stables ont été établies. Deux d'entre elles ont fait l'objet d'analyses supplémentaires (*Fut1*, *Fut2*). GSLs, glycosphingolipides.

Au cours de ce travail, 10 lignées exprimant constitutivement des gènes d'intérêt, ainsi qu'une lignée témoin, ont été établies. Le temps imparti pour ma thèse ne m'a pas permis d'analyser toutes ces lignées. Le profil particulier d'expression de Fut1 et Fut2, présentant une augmentation d'expression à 24-48h de différenciation, m'a amenée à m'intéresser aux effets de la dérégulation de ces deux gènes. Les résultats qui suivent portent sur l'examen de la différenciation des lignées Fut1 et Fut2. Dans le contexte de la prolifération et de la différenciation des cellules C2C12, les autres lignées présentes au laboratoire constituent à présent des outils pour aborder le rôle des gènes de la glycosylation correspondants dans la différenciation myogénique.

III. L' α 1,2-FUCOSYLATION ET LA DIFFÉRENCIATION DES C2C12

Les travaux évoqués précédemment ont montré qu'au cours de la différenciation précoce des myoblastes C2C12, *Fut1* et *Fut2* étaient surexprimés de plus d'un facteur 4 (Janot, M., *et al.* 2009). Ceci suggère que des épitopes synthétisés par les protéines correspondantes sont requis pendant la myogenèse. Les enzymes codées par *Fut1* et *Fut2* sont des α 1,2-fucosyltransférases transmembranaires de type II. Dans la plupart des génomes de mammifères, une troisième α 1,2-fucosyltransférase est codée par le gène *Sec1*. Ces trois gènes homologues sont généralement organisés en tandem dans le génome (Oriol, R., *et al.* 2000). Ainsi, chez la souris, *Sec1* est un gène actif (Domino, S.E., *et al.* 2001) tandis que chez l'Homme *SECI* est considéré comme un pseudogène puisqu'il code pour une protéine tronquée. Les α 1,2-fucosyltransférases sont nécessaires à la synthèse du motif glycanique Fuc α 2-Gal β -R retrouvé dans les antigènes histo-sanguins ABH et Lewis. Elles présentent une expression spatio-temporelle spécifique. L'enzyme FUT1 est principalement détectée dans les érythrocytes mais aussi dans les endothéliums vasculaires (Mollicone, R., *et al.* 1995) alors que FUT2 est retrouvée dans les épithéliums et les fluides biologiques comme la salive (Avent, N.D. 1997). Chez la souris, l'expression transcriptionnelle de *Fut1* a été détectée par Northern blot principalement dans l'épididyme, tout comme celle de *Sec1* également retrouvée dans les testicules et le thymus. Des transcrits *Fut2* ont été détectés dans des tissus variés dont le coeur, le foie, les reins, les testicules, l'épididyme, l'utérus, l'estomac, l'intestin et le colon (Domino, S.E., *et al.* 2001, Lin, B., *et al.* 2001). *Fut2* et *Sec1* sembleraient donc présenter des patrons d'expression distincts dans les tissus adultes. Les motifs glycaniques synthétisés par les α 1,2-fucosyltransférases sont impliqués dans plusieurs fonctions comme le développement du système olfactif, les interactions entre les cellules dendritiques et l'endothélium, l'angiogenèse et la régulation de l'apoptose (Garcia-Vallejo, J.J., *et al.* 2008, Halloran, M.M., *et al.* 2000, Moehler, T.M., *et al.* 2008, St John, J.A., *et al.* 2006).

L'inactivation des gènes *Fut1* et *Fut2* a été réalisée chez la souris, les animaux correspondants présentent un phénotype essentiellement normal. Néanmoins un certain nombre de systèmes anatomiques est affecté (Tableau 15).

Tableau 15. Données relatives à l'invalidation des gènes murins *Fut1* et *Fut2*.

Systèmes anatomiques affectés	Gène	
	<i>Fut1</i>	<i>Fut2</i>
Système digestif/alimentaire	Physiologie pancréatique anormale	Physiologie du système digestif anormale
Glandes endocrines/ exocrines	Physiologie pancréatique anormale	-
Système reproductif	Physiologie anormale du système reproductif mâle	Physiologie anormale du système reproductif femelle, environnement utérin anormal
Système immunitaire	-	Susceptibilité augmentée aux infections fongiques
Système olfactif	Développement anormal du bulbe olfactif principal	-
Références	(Domino, S.E., <i>et al.</i> 2001, Hurd, E.A. et Domino, S.E. 2004, Iwamori, M. et Domino, S.E. 2004, St John, J.A., <i>et al.</i> 2006)	(Domino, S.E. et Hurd, E.A. 2004, Domino, S.E., <i>et al.</i> 2001, Hurd, E.A. et Domino, S.E. 2004, Iwamori, M. et Domino, S.E. 2004, St John, J.A., <i>et al.</i> 2006)

Le système musculaire squelettique ne présente pas de défauts apparents. Le maintien de phénotypes pourrait s'expliquer par une redondance ou une compensation des fonctions associées à ces gènes lors du développement de ces systèmes. Ceci a d'ailleurs été suggéré par l'analyse de l' α 1,2-fucosylation de glycosphingolipides dans certains tissus murins, puisqu'elle était conservée en cas d'invalidation de *Fut1* ou de *Fut2* (Iwamori, M. et Domino, S.E. 2004). Ainsi, pour obtenir des données sur leur implication, et celle des épitopes correspondants, dans la différenciation myogénique, des lignées surexprimant *Fut1* et *Fut2* dans les C2C12 ont été générées.

1. Caractérisation des clones transfectés par *Fut1* ou *Fut2*

Pour générer des lignées surexprimant le gène *Fut1* ou *Fut2*, les cellules C2C12 ont été transfectées par le vecteur d'expression pcDNA3.1 contenant les séquences codantes de *Fut1* ou *Fut2*. Après sélection des cellules ayant intégré dans leur génome la construction plasmidique, plusieurs clones résistants ont été caractérisés.

a. Analyse de l'expression transcriptionnelle des gènes *Fut1* et *Fut2*

La surexpression des gènes *Fut1* et *Fut2* dans les clones résistants au G418 a été vérifiée par PCR quantitative, en utilisant des sondes TaqMan. Le but était de sélectionner les clones qui surexpriment le mieux le gène d'intérêt pour la suite des analyses. Pour le gène *Fut1*, les résultats d'expression montrent que les clones sélectionnés présentent effectivement une surexpression de l'ARNm de *Fut1* (Figure 67), avec cependant une variabilité, (RQ de 4 à 36) qui peut être liée au site d'intégration.

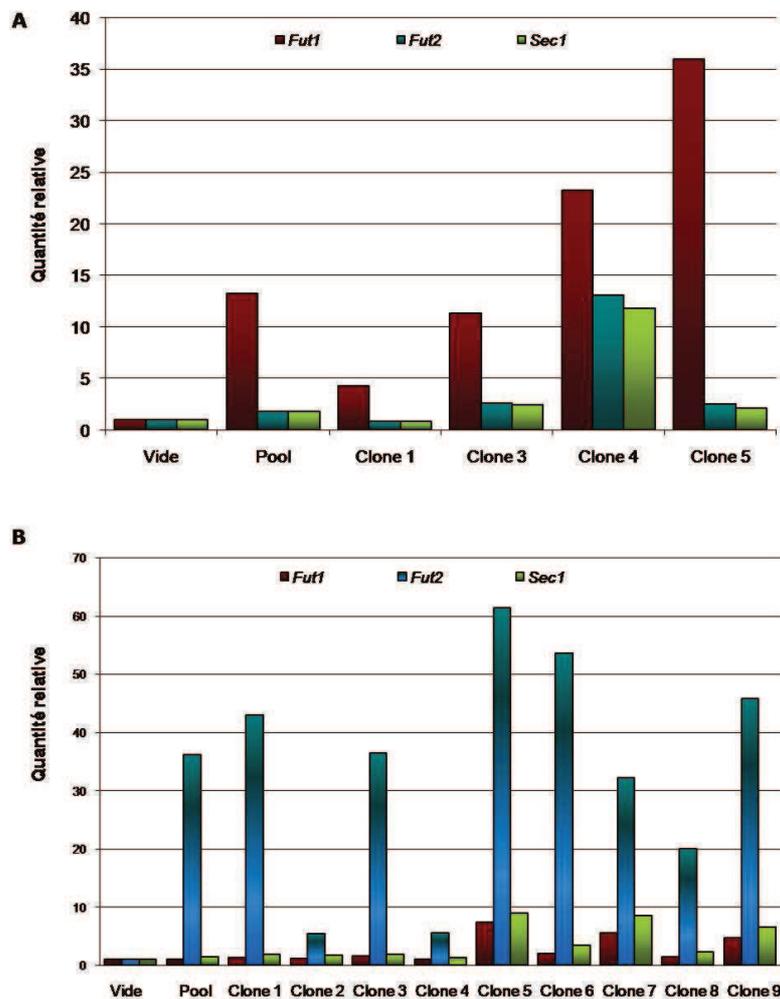


Figure 67. Analyse par RT-PCR quantitative de l'expression des gènes murins d' α 1,2-fucosyltransférases dans des clones de cellules C2C12 transfectées stablement par le gène *Fut1* ou *Fut2*.

L'analyse a été réalisée pour les clones issus de la transfection des cellules C2C12 par les vecteurs comportant la séquence codante du gène *Fut1* (A) ou celle du gène *Fut2* (B). Les valeurs correspondent à des quantités relatives (RQ) d'ARNm, déterminées par rapport aux cellules témoins, transfectées par le vecteur vide. Le pool correspond à l'analyse sur un mélange cellulaire issu de l'ensemble des clones.

Ces effets de position dépendent notamment de la configuration de la chromatine au niveau du site d'insertion. Etant donné que les gènes *Fut1*, avec *Sec1* et *Fut2*, constituent une famille multigénique, l'expression de ces deux derniers a aussi été examinée. En effet, il est important de choisir un clone dans lequel l'augmentation potentielle de l' α 1,2-fucosylation ne puisse être attribuée qu'à *Fut1* ou *Fut2*, dans la mesure où la dérégulation de l'expression d'un gène a parfois des conséquences sur la régulation de l'expression d'autres gènes. Parmi les quatre clones analysés, le clone 5 a été retenu pour les expérimentations suivantes étant donné qu'il surexprimait le gène *Fut1* le plus fortement (X36) sans toutefois présenter d'importantes variations pour l'expression transcriptionnelle des gènes *Fut2* et *Sec1* (RQ *Fut2* = 2,5, RQ *Sec1* = 2,1). En parallèle, les expérimentations ont aussi été menées sur un mélange de cellules issues des quatre clones (nommé « pool ») afin de limiter les variations dues au site d'insertion. De plus, il se trouve qu'au sein du « pool » c'est essentiellement le gène *Fut1* qui est surexprimé.

Pour les cellules transfectées stablement par la construction *Fut2*, les clones obtenus surexpriment également *Fut2* d'un facteur compris entre 5 et 62 (Figure 67). L'expression de *Fut1* et *Sec1* a également été analysée. Certains clones (5, 7 et 9), présentent d'importantes variations dans l'expression de ces gènes. Afin de n'étudier que les effets de la dérégulation du gène *Fut2*, le clone 1 a été retenu puisqu'il présentait la plus importante expression de *Fut2* sans variation significative de celles de *Fut1* et *Sec1*. De plus, son niveau de surexpression est proche de celui du clone 5 transfecté par *Fut1*, ce qui facilite les comparaisons des conséquences de ces surexpressions. Tout comme précédemment, les expériences ont été réalisées en parallèle sur le « pool » de l'ensemble des clones obtenus pour *Fut2*. C'est essentiellement le gène *Fut2* qui est surexprimé au sein de ce « pool ».

b. Analyses des phénotypes des cellules surexprimant *Fut1* ou *Fut2*

L'analyse des phénotypes cellulaires obtenus pour les cellules transfectées par le gène *Fut1* ou *Fut2* n'a pas permis d'observer de différences par rapport aux cellules non transfectées ou transfectées par le vecteur vide (Figure 65). La taille et la morphologie cellulaire sont en effet similaires à celles des cellules témoins. Une analyse supplémentaire n'a pas montré non plus de modification de la vitesse de prolifération et de doublement des cellules transfectées par *Fut1* ou *Fut2* (données non présentées).

2. La surexpression de *Fut1* ou *Fut2* diminue la différenciation des cellules C2C12

Quand ils sont cultivés *in vitro* et privés de sérum, les myoblastes C2C12 se différencient en myotubes, les premiers apparaissant 48 heures après l'induction de la différenciation. Leur croissance s'arrête quand environ 50% des noyaux ont été incorporés dans des myotubes. Afin de suivre l'état de différenciation des lignées transfectées par le gène *Fut1* ou *Fut2* (*Fut1* : clone 1 et pool, *Fut2* : clone 5 et pool), les index de fusion ont été calculés, le témoin correspondant à des cellules transfectées par un vecteur vide (Figure 68). Les index de fusion ont ainsi été déterminés pour les temps 0, 24, 48, 72, 96, et 120 heures après initiation de la différenciation.

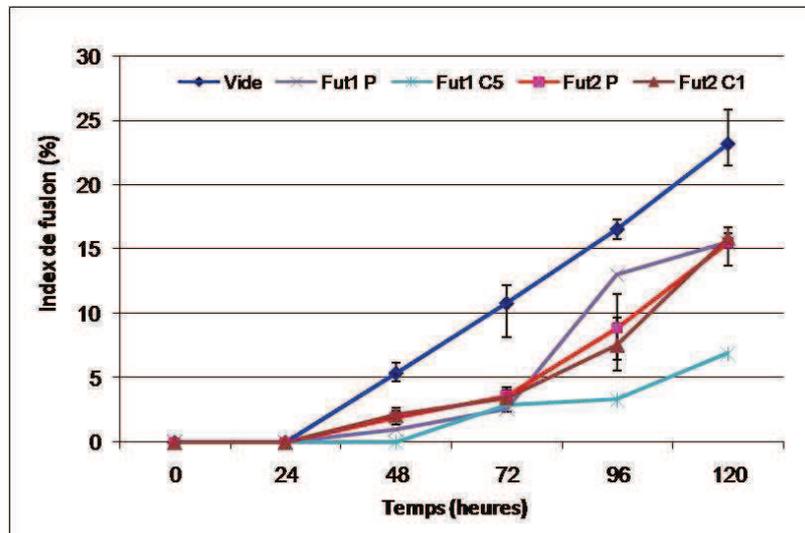


Figure 68. Evolution de l'index de fusion des cellules C2C12 surexprimant les gènes murins *Fut1* ou *Fut2*.

L'index de fusion a été calculé pour les cellules surexprimant le gène *Fut1* (pool (P) et clone 5) ou *Fut2* (pool (P) et clone 1) et pour des cellules transfectées par un vecteur vide (vide) de 0 à 120 heures de différenciation. Les données concernant le gène *Fut1* restent préliminaires puisque une seule cinétique de différenciation a été réalisée jusqu'à présent.

Dans tous les cas, les premiers myotubes sont apparus 48 heures après l'induction de la différenciation. Mais par la suite, les résultats montrent une diminution de l'index de fusion, et donc de la vitesse de différenciation des cellules C2C12 transfectées par *Fut1* ou par *Fut2*. Phénotypiquement, ce retard est illustré par la diminution de la taille et du nombre de myotubes dans les cultures correspondant aux cellules du pool et du clone 5 pour *Fut1*, et du pool et du clone 1 pour *Fut2* (Figure 69). Ce retard est visible dès 48h, stade où le

pourcentage de fusion n'excède pas 2% dans les cultures transfectées par *Fut2*, voire 1% dans les cultures transfectées par *Fut1* alors qu'il est de plus de 5% dans les cultures témoins. Ces cultures témoins présentent d'ailleurs à tous les stades analysés un index de fusion plus élevé. Au temps 120 heures, il est d'environ 23% tandis qu'il n'excède pas 16% dans les cellules transfectées par le gène *Fut1* ou *Fut2*. Ces résultats sont d'autant plus marqués pour la différenciation des cellules issues du clone 5 - *Fut1*. Les cellules de ce clone semblent présenter un retard de différenciation plus important, l'index de fusion n'étant que d'environ 7% à 120 heures de différenciation. Il est intéressant de noter que le clone 5 - *Fut1* présente un niveau de surexpression de ce gène plus important que celui du pool correspondant. Dans celui-ci, les index de fusion sont aussi plus élevés. En revanche, concernant les transfections par *Fut2*, le clone 1 et le pool donnent des valeurs d'index de fusion semblables et leurs niveaux de surexpression sont similaires. Il semblerait donc que le niveau de surexpression puisse être relié à l'intensité du retard de différenciation, même s'il convient de le vérifier par des expérimentations supplémentaires. Néanmoins, *Fut1* et *Fut2* présentent des niveaux d'expression transcriptionnelle semblables dans les clones 5 et 1, respectivement. Or le retard de fusion est plus important lors de la différenciation des cellules issues du clone 5 - *Fut1*. Sous réserve de modifications traductionnelles modifiant le niveau d'expression des protéines correspondantes, ceci pourrait être dû à des fonctions différentes pour les enzymes codées par *Fut1* et *Fut2* qui présentent d'ailleurs, comme évoqué plus haut, des patrons d'expression distincts (Avent, N.D. 1997, Mollicone, R., *et al.* 1995).

Dans ces expériences, la différence dans l'état de différenciation est visible par microscopie dès 72 h de différenciation, témoignant d'un retard de différenciation conséquent (Figure 69). Ainsi, lors de leur culture dans le milieu de différenciation, les cellules surexprimant *Fut1* et *Fut2* présentent une capacité réduite à former des myotubes. La surexpression de *Fut1* et *Fut2* semble donc diminuer la différenciation myogénique des cellules C2C12. Il est intéressant de voir que les effets observés sont similaires pour les transfections par *Fut1* et *Fut2*. Ce résultat est cohérent avec le fait que les enzymes correspondantes ont des fonctions catalytiques identiques, même si dans le cas de *Fut1*, les résultats restent préliminaires et nécessitent d'être confortés par la réalisation de cinétiques de différenciation supplémentaires.

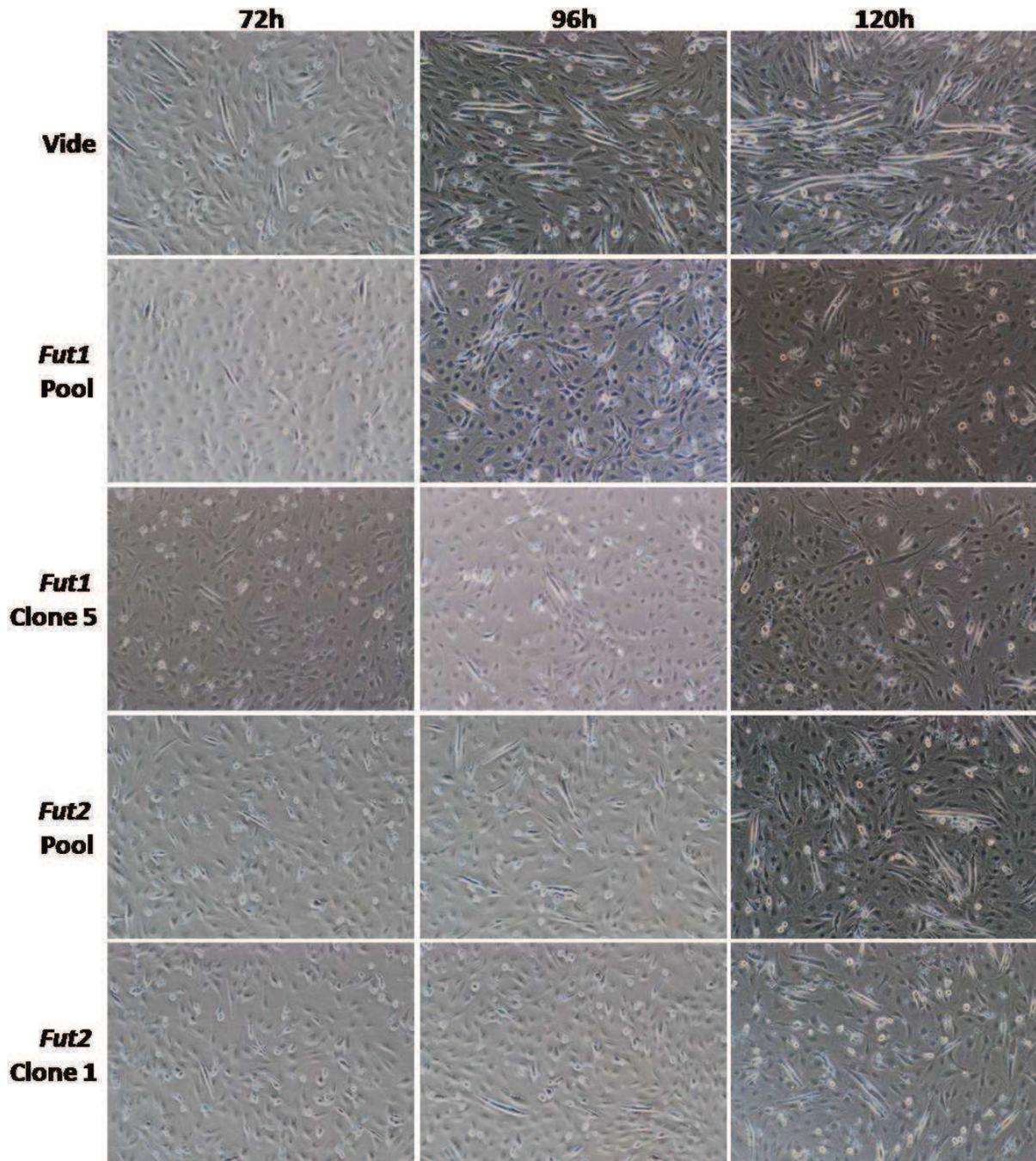


Figure 69. Observations microscopiques de cellules C2C12 stablement transfectées par le gène *Fut1* ou *Fut2*, à différents stades de différenciation.

Les cellules transfectées par les vecteurs contenant la séquence codante de *Fut1* ou *Fut2*, ou transfectées par le vecteur vide, ont été privées de sérum puis observées à différents temps de différenciation. Les résultats présentés concernent les temps 72, 96 et 120h de différenciation et montrent une diminution en nombre et en taille des myotubes dans les cellules surexprimant le gène *Fut1* ou *Fut2*, comparativement aux cellules témoins.

3. Le retard de différenciation des cellules C2C12 dans les lignées surexprimant le gène *Fut2* n'est pas lié à une modification de l'expression des MRFs

Les lignées obtenues après transfection des cellules C2C12 par le vecteur comportant la séquence codante du gène *Fut2* ont fait l'objet d'analyses supplémentaires. Ces analyses ont été réalisées sur le mélange cellulaire issu de l'ensemble des clones (pool) afin de limiter les effets liés au site d'intégration. Préalablement au test de l'expression des MRFs, la surexpression de *Fut2* a été vérifiée à différents stades de la différenciation. Les résultats (Figure 70) montrent que la surexpression de *Fut2* est bien effective tout au long de la cinétique de différenciation étudiée.

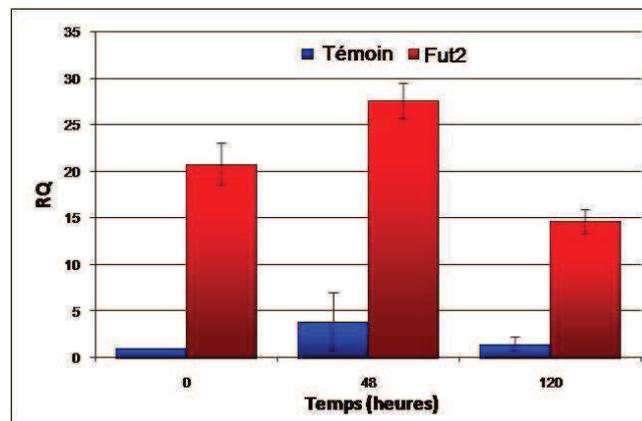


Figure 70. Résultats de la quantification de l'ARNm du gène *Fut2* lors de la différenciation de cellules C2C12 transformées stablement par la séquence codante du gène *Fut2*.

L'expression du gène *Fut2* est exprimée en quantité relative d'ARNm (RQ). Elle a été suivie au cours de la différenciation dans les cellules transfectées par le vecteur comportant la séquence codante du gène *Fut2* (pool). Le témoin représente des cellules transfectées par un vecteur vide.

Ensuite, afin de déterminer si le retard de différenciation des lignées transfectées par le gène *Fut2* était lié à une modification de l'expression des MRFs, leur expression a été quantifiée par PCR quantitative (Figure 71).

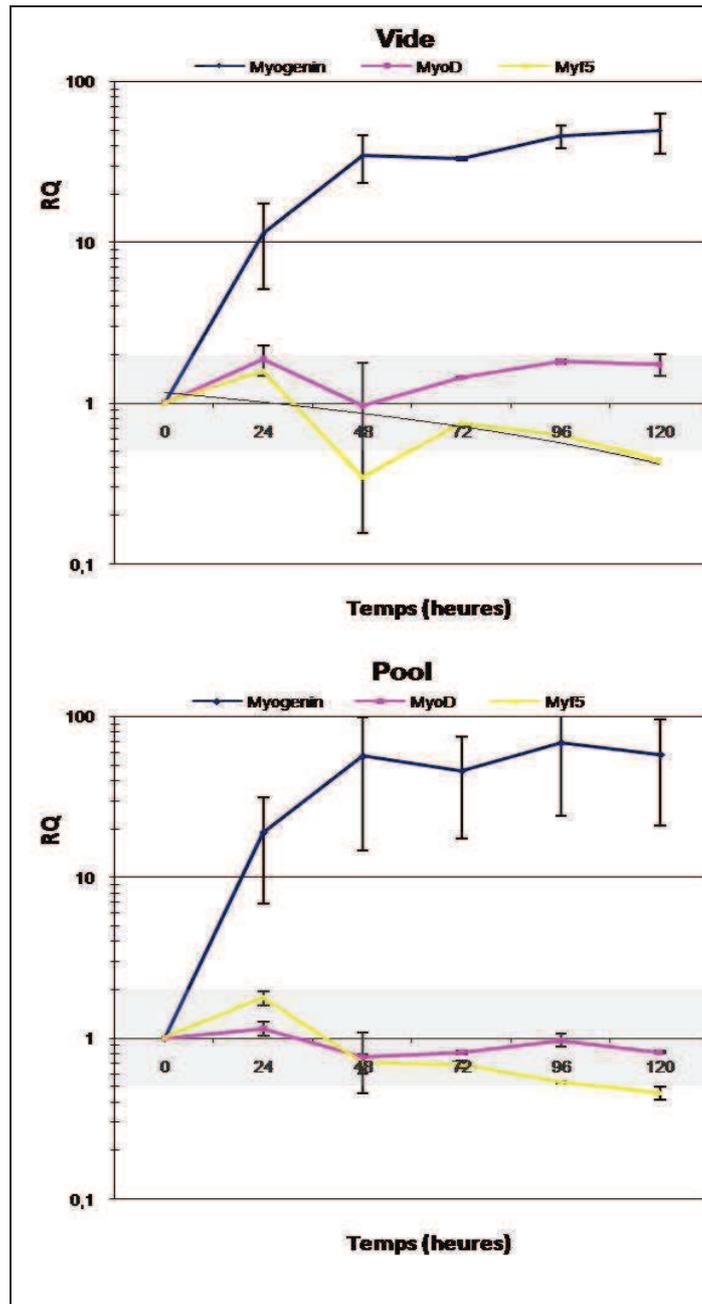


Figure 71. Expression transcriptionnelle des gènes de MRFs.

L'expression transcriptionnelle des MRFs est exprimée en quantité relative (RQ) par rapport au temps 0h des cellules C2C12 témoins ou transfectées par le gène *Fut2* au cours de la différenciation.

Dans les cellules transfectées comme dans les cellules témoins, les gènes *MyoD*, *Myf5* et *Myog* sont exprimés tout au long de la différenciation des cellules C2C12. Les quantités d'ARNm de *MyoD* ne présentent pas de variation significative au cours de la différenciation des C2C12. L'expression de *Myf5* diminue plus de deux fois et reste sous-réglée, tandis que celle du gène *myogénine* augmente dès 24 heures de différenciation. Ainsi, les profils

d'expression des gènes *Myog*, *Myf5* *MyoD* au cours de la différenciation des cellules témoins et transfectées par le gène *Fut2* sont similaires, et cohérents avec leur patron d'expression décrits dans la littérature (Dedieu, S., *et al.* 2002, Delgado, I., *et al.* 2003, Ferri, P., *et al.* 2009, Shimokawa, T., *et al.* 1998, Tomczak, K.K., *et al.* 2004) et déjà observés au cours de nos propres expérimentations (Janot, M., *et al.* 2009). Ceci suggère que le retard de différenciation observé, probablement dû à une altération du patron de glycosylation des glycoconjugués de la membrane plasmique, serait indépendant du programme myogénique. Une telle modification pourrait en effet affecter les phénomènes d'adhésion cellulaires et de fusion qui en résultent. Des observations antérieures ont montré que la formation des myotubes *in vitro* était accompagnée par des changements dans le métabolisme des glycosphingolipides (Leskawa, K.C. et Hogan, E.L. 1990). Ces éléments, associés à nos observations, soulèvent l'hypothèse que *Fut1* et *Fut2*, et donc que l' α 1,2-fucosylation, pourrait participer à la régulation de la différenciation myogénique. Cette régulation pourrait être réalisée par la fucosylation de protéines ou lipides spécifiques qui, en conditions normales, favoriseraient la fusion des myoblastes. La surexpression pourrait provoquer une fucosylation anormale d'autres molécules, et ainsi inhiberait les phénomènes de fusion. Il pourrait être envisagé que de tels événements interviennent au sein des glycosynapses, où une glycosylation anormale des glycoconjugués pourrait déréguler les interactions conditionnant l'adhésion cellulaire et la signalisation.

4. Conclusion/ Perspectives

L'utilisation des lignées stables surexprimant le gène *Fut1* ou *Fut2* a apporté des informations quant au rôle de ces gènes dans la différenciation des cellules C2C12. Ces données restent pour le moment préliminaires, dans la mesure où la vérification de la surexpression des gènes *Fut1* et *Fut2* n'a été réalisée qu'au niveau transcriptomique et nécessite bien sûr une validation protéique. Néanmoins, les premiers résultats obtenus montrent que ces lignées présentent un retard de différenciation par rapport aux cellules transfectées par le vecteur vide. De plus, concernant *Fut2*, l'étude des profils d'expression de certains gènes de MRFs ne présente aucune variation par rapport à ceux de la lignée témoin. Les profils correspondent à ce qui est habituellement observé dans la littérature. Ceci suggère que le retard de différenciation ne serait pas dû à un défaut dans le programme myogénique mais plutôt à un défaut du remodelage membranaire dépendant du patron de fucosylation. En

effet, *Fut1* et *Fut2* interviennent dans l'élaboration de structures glycaniques α 1,2-fucosylées localisées majoritairement à la surface cellulaire. Par conséquent, les épitopes correspondants pourraient être impliqués dans la régulation de la différenciation des C2C12, plus particulièrement dans les interactions cellulaires, voire la fusion des bicouches phospholipidiques. Ce rôle doit donc être à présent déterminé. Pour cela, il serait intéressant de vérifier la localisation cellulaire de ces épitopes, en particulier de voir par microscopie confocale s'ils sont présents dans les zones de fusion ou de contact cellulaire entre myoblastes, et également s'ils colocalisent avec des acteurs de la fusion cellulaire. Par la suite, l'identification des molécules fucosylées pourrait apporter des informations supplémentaires sur le rôle de l' α 1,2-fucosylation. Il serait également intéressant de vérifier ces résultats dans des cultures primaires de myoblastes ou *in vivo*, notamment par des expériences d'hybridation *in situ* et d'immunofluorescence sur des embryons de souris, de manière à valider les résultats obtenus avec le modèle C2C12. En attendant, un travail est également en cours dans notre équipe pour compléter les données obtenues pour la lignée *Fut1*. De nouvelles cinétiques de différenciation des C2C12 transfectés par *Fut1* sont en effet envisagées et l'expression des MRFs par RT-PCR quantitative est prévue. Cette étude sera complétée par une analyse des lignées stables par microscopie confocale par le suivi d'un marqueur de la différenciation (myosine) et du cycle cellulaire (p21). Le but serait alors d'obtenir plus de détail sur le déroulement de la prolifération, et sur le retard de différenciation observé. L'ensemble des éléments obtenus sur la surexpression de *Fut1* et *Fut2* fait l'objet d'un article en préparation.

Les résultats obtenus pour les deux gènes *Fut1* et *Fut2* soulignent aussi l'importance d'étudier les effets de leur sous-expression. Pour cela, nous envisageons l'établissement de lignées stables par l'utilisation de shRNA. Cette approche pourrait aussi s'appliquer au gène *Sec1*, qu'il est regrettable de n'avoir pu étudier. Il serait ainsi possible de déterminer les effets de la sous-expression de ces gènes sur la différenciation myogénique par le suivi des index de fusion et de l'expression des MRFs. Enfin, il serait aussi pertinent d'établir des lignées inductibles, afin de ne provoquer la surexpression qu'au moment de la mise en différenciation des cellules. Cette technique permettrait de s'affranchir du biais induit par la surexpression au cours de la prolifération. Ces différentes études feront sans doute suite au travail que j'ai initié au cours de ma thèse.

IV. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Matériel biologique

Les myoblastes murins C2C12 (souche C3H, American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA) sont cultivés dans du DMEM (Dabelco's Modified Eagle's Medium, Eurobio, Courtaboeuf, France) comportant 10% de sérum de veau foetal (Eurobio), 2mM de L-glutamine, 50 unités/mL de pénicilline et 50µg/mL de streptomycine. Les cellules sont cultivées jusqu'à ~80% de confluence et mises en différenciation avec du DMEM comportant 2% de sérum de cheval (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Les cellules sont prélevées pour analyse après rinçage au PBS et trypsination (1X PBS, 1mM EDTA, 0.05% (p/v) trypsine).

2. PCR quantitative en temps réel

Les ARN totaux sont extraits à partir des cellules C2C12 (RNeasy kit, Qiagen, Hilden, Allemagne) puis leur qualité contrôlée par le système Agilent (Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Biotechnologies, Allemagne). Leur concentration est déterminée également par dosage au NanoDrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA). La synthèse d'ADNc est réalisée à partir de 5µg d'ARN et catalysée par la MultiScribe™ Reverse Transcriptase (25U dans 50 µL) à partir d'hexamères aléatoires 10 min à 25°C puis 2h à 37°C (High-Capacity cDNA Archive Kit, Applied Biosystems). La quantité de chaque ARNm est déterminée par PCR quantitative en temps réel (ABI Prism 7900 Sequence Detector System) en utilisant la chimie des sondes TaqMan (Applied Biosystems). La 6-carboxyfluorescéine (FAM) est utilisée comme rapporteur. La quantification repose sur l'utilisation des gènes de référence *18S RNA* et *Gapdh*.

3. Détermination des quantités relatives en ARNm

Les données relatives à l'expression transcriptionnelle des gènes sont collectées et analysées par le logiciel SDS 2.2.2 (Applied Biosystems). Les quantités mesurées d'ARNm

sont considérées comme significatives quand le Ct (Threshold Cycle) est inférieur à 33. La méthode comparative des $\Delta\Delta Ct$ est utilisée pour quantifier les quantités relatives en ARNm (Figure 72). Cette méthode utilise un échantillon calibrateur pour permettre la comparaison des niveaux d'expression d'un gène dans différents échantillons. Les valeurs obtenues indiquent des changements d'expression dans l'échantillon d'intérêt par comparaison avec l'échantillon calibrateur après normalisation aux gènes de référence *ARN 18s* ou *Gapdh*.

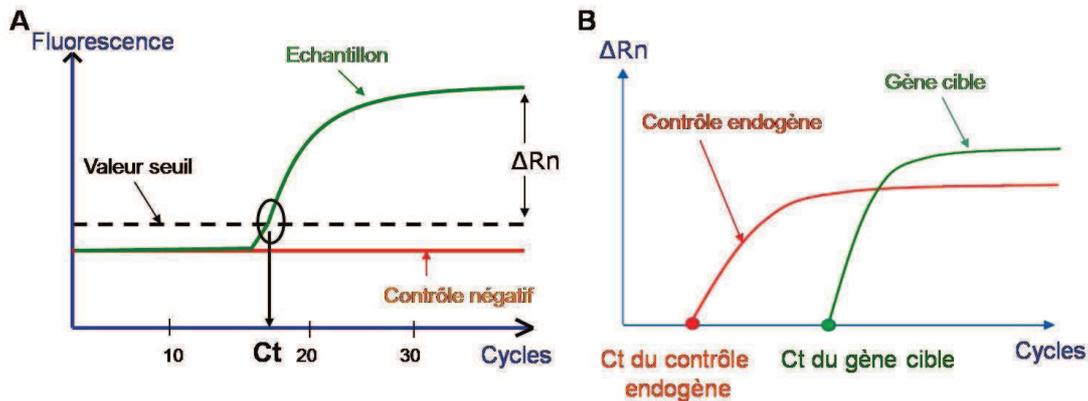


Figure 72. Méthode des $\Delta\Delta Ct$ de quantification relative en RT-PCR semi-quantitative en temps réel.

A. La fluorescence libérée par les sondes TaqMan[®] au cours de la RT-PCR est proportionnelle à la quantité d'ARN de l'échantillon testé. Lorsqu'elle atteint une valeur seuil, il est possible de déterminer le Ct (Threshold Cycle) de l'échantillon, c'est-à-dire le nombre de cycles PCR nécessaire pour atteindre cette valeur. Le ΔRn indique l'amplitude de l'intensité du signal généré par des conditions PCR données. **B.** Une fois le Ct obtenu, la méthode de quantification relative des $\Delta\Delta Ct$ peut être appliquée :

1 – Normalisation par rapport au contrôle endogène

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gène cible}} - Ct_{\text{contrôle endogène}}$$

2 – Normalisation par rapport à l'échantillon calibrateur

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{échantillon}} - \Delta Ct_{\text{calibrateur}}$$

3 – Calcul de la quantité relative :

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

4. Immunodétection par la technique de Western Blot

Les protéines de cellules C2C12 sont extraites dans du tampon de lyse (Triton X-100 1% (v/v), cacodylate de sodium 10 mM (pH 6), glycérol 20% (v/v), et 1 mM de dithiothréitol) pendant 2 h à 4°C sous agitation douce. Le lysat cellulaire est centrifugé 10 min à 12,000g et à 4°C. Les protéines du surnageant sont dosées par la méthode de Bradford (Bio-Rad

Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) avec la BSA (Bovine Serum Albumin) comme standard. 50 µg des protéines totales sont portées à 100°C pendant 5 min après ajout β-mercaptoéthanol (5% v/v) et de bleu de bromophénol (0,02% w/v). La séparation des protéines est réalisée en gel SDS-PAGE à 10,5% de polyacrylamide, dans un tampon Tris/Tricine. Les protéines séparées sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Hybond-C Extra, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). La membrane est lavée au TBS 1X (Tris Buffer Saline), placée 1h dans une solution de saturation (BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD), ROCHE, Mannheim, Germany), et incubée 12 h à 4°C avec un anticorps primaire polyclonal anti-Glut4 (H-61) ou anti-Gapdh (V-18) à 4 µg/mL (Santa Cruz Biotechnologies, Inc., Santa Cruz, CA, USA). Après lavages de 2x10 min au TBST (0,1% (v/v) de tween 20) et de 2x10 min "Blocking Buffer" 0,5%, la membrane est incubée 30 min avec un anticorps secondaire (1/1000^{ème}) (Dako, Glostrup, Denmark) couplée à la peroxydase (POD-HRP). Suite à 4 lavages de 15 min au TBST, la présence de la protéine d'intérêt, au travers de l'activité HRP portée par les anticorps secondaires, est révélée grâce à une solution luminescente, les membranes étant exposées à des films KODAK BioMax MR Films (Kyoto, Japan) pour la détection de cette chimiluminescence.

5. Clonage dans le vecteur d'expression pcDNA3.1

La séquence codante de chacun des gènes d'intérêt a été obtenue par amplification sur ADNc isolé à partir de cellules C2C12. Les amorces ont été choisies pour apporter le codon d'initiation de la traduction en 5' et le codon d'arrêt de la traduction en 3'. L'amplifiat purifié (QIAquick gel extraction Kit, QIAGEN, Hilden, Germany) est ligaturé dans le vecteur d'expression eucaryote pcDNA3.1/V5-His TOPO TA (Invitrogen, Carlsbad, CA). Après criblage par PCR des bactéries *Escherichia coli* TOP10 transformées par le produit de ligature, la construction plasmidique est vérifiée par séquençage (ABI Prism 3100, Applied Biosystems).

6. Transfection des cellules C2C12

a. Surexpression transitoire par lipofection des cellules C2C12

Les cellules C2C12 à 80% de confluence, cultivées en plaques 6 puits (Greiner), sont mises en présence pendant 8h de 20 μ l de FUGENE[®]6 et de 2 μ g d'ADN (vecteur). Les cellules sont ensuite mises en différenciation, après lavage au PBS, par l'ajout de milieu de différenciation.

b. Transfection des siRNA

Les cellules C2C12 à 80% de confluence, cultivées en plaques 12 puits (Greiner), sont mises en présence de 4 μ l de transfectant siPortNeoFX et de 5, 10 ou 20 nM de siRNA ciblant les ARNm d'intérêt ou du siRNA contrôle, ne ciblant aucune séquence (« Scrambled » siRNA). Les taux d'expression ont été mesurés 24h après transfection par RT-PCR en temps réel, en utilisant également une chimie de sondes.

c. Etablissement des lignées stables

Les vecteurs recombinés sont introduits dans les cellules C2C12 en prolifération par électroporation (Gene Pulser Xcell eukaryotic system, Biorad). Pour cela, 3 x 10⁶ cellules sont resuspendues dans 1 ml de PBS et mises en contact pendant une minute avec 3 μ g de vecteur. Les cellules sont ensuite électroporées à 340 V et 950 μ F. Les cellules ayant intégré de façon stable la construction sont sélectionnées grâce au G418 (néomycine, GIBCO BRL, Carlsbad, CA, USA), le gène de résistance étant apporté en aval de la séquence codante d'intérêt. Pour cela, 48h après électroporation et remise en culture des cellules électroporées, ces dernières sont cultivées pendant une semaine en présence de milieu de croissance à 1 mg/ml de G418. Les clones résistants (ou les pools correspondants) sont ensuite prélevés et amplifiés séparément dans du milieu de croissance contenant 0,2 mg/ml de G418 afin de maintenir une pression de sélection permettant le maintien dans le génome du gène d'intérêt.

7. Courbes de fusion

Les cellules C2C12 sont fixées dans du PBS contenant 2% de paraformaldéhyde (PFA) pendant 20 minutes, puis déshydratées dans l'éthanol à 70% sur la nuit. Les cellules mono- et multi-nucléées ont été comptées après un marquage à l'hématoxyline et à l'éosine, colorant respectif du noyau et du cytoplasme. Pour chaque échantillon, le nombre total de noyaux et celui des noyaux appartenant à des myotubes ont été dénombrés dans 12 champs microscopiques. Un index de fusion par division de ces valeurs est ainsi obtenu. Il donne un indice de l'état de fusion, et donc de différenciation, de la culture.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Au cours de ma thèse, j'ai cherché à déterminer quelles étaient les implications des glycanes dans la différenciation myogénique. La démarche scientifique impliquait en premier lieu l'exploitation des connaissances bibliographiques acquises dans ces deux vastes domaines que sont la myogenèse et la glycobiologie pour une étude ciblée. Jusqu'à récemment, seules des études ponctuelles soulignaient précisément le rôle de certains glycoconjugués dans la différenciation myogénique. Ces travaux constituaient des preuves en faveur d'une importance fonctionnelle globale des glycanes dans la myogenèse. Ils soulignent aussi la complexité du code établi par les sucres, comme dans le cas de NCAM, dont les *O*-glycanes semblent favoriser la fusion des myoblastes, tandis que les PSA semblent l'inhiber (Suzuki, M., *et al.* 2003).

L'ensemble des données relatives à l'implication des glycoprotéines, GAGs et glycolipides reste relativement dispersé. Aussi, la première partie de mon travail a donc été d'entreprendre une étude globale de l'expression du glycogénome, c'est-à-dire des gènes impliqués dans la synthèse et la reconnaissance de structures glycaniques, au cours de la différenciation myogénique. L'objectif était d'identifier des glyco-gènes hautement régulés au cours de ce processus. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser comme modèle la lignée cellulaire murine C2C12, bien décrite dans la littérature. Il a donc d'abord été nécessaire de valider la maîtrise de cet outil biologique par l'analyse de marqueurs myogéniques tels que les MRFs ou autres marqueurs. A présent, la culture de cette lignée est largement utilisée au laboratoire pour la réalisation de différents travaux relatifs à l'élaboration du tissu musculaire. L'analyse de l'expression des glyco-gènes a reposé sur une technique de PCR quantitative à haut débit, la technologie des cartes TLDA. Il a ainsi été possible d'analyser simultanément plus de 60% du glycogénome murin. Cette technique constitue donc un formidable outil de criblage. Il serait intéressant, étant donné les nombreuses fonctions connues des glycanes, de l'appliquer à d'autres processus physiologiques liés. Ainsi, il pourrait par exemple être intéressant d'étudier, par cette technique, le rôle des glycanes dans l'adipogenèse, voie « concurrente » de la myogenèse au niveau des précurseurs cellulaires. En effet, certains glyco-gènes impliqués dans l'adipogenèse semblent dérégulés. De plus, des adipocytes sont aussi présents dans les muscles adultes, à l'extérieur des fibres musculaires. Ce tissu adipeux intramusculaire a une fonction de réserve énergétique, grâce à sa richesse en cellules capables de stocker des lipides. Le métabolisme du tissu musculaire est donc directement associé à celui du tissu adipeux. Parmi les glyco-gènes analysés au cours de la différenciation myogénique, nombreux sont ceux dont l'expression est faible. L'utilisation de cette technologie basée sur les sondes TaqMan, hautement sensible, a donc constitué un réel

avantage pour analyser leur expression. Les résultats d'expression au cours de la différenciation précoce des C2C12 soulignent un niveau important d'implication des glycanes dans ce processus. En effet, plus de 30% des glyco-gènes analysés ont présenté des variations de leur expression transcriptionnelle, ce qui suppose de nombreuses fonctions pour les glycanes dans la différenciation myogénique. De surcroît, 37 gènes ont présenté des variations d'expression supérieures à un facteur 4, 29 n'ayant jamais été décrits dans la myogenèse. L'analyse des fonctions associées aux protéines codées par ces gènes nous a permis d'établir un modèle illustrant les fonctions des glycanes au cours de l'établissement des premiers myotubes. Il souligne les implications potentielles des gènes intervenant dans les processus d'adhésion cellulaire, de remodelage de la membrane plasmique et de la MEC, ainsi que dans la signalisation. Ce modèle reste hypothétique; il convient à présent de l'affiner et de le compléter par des analyses supplémentaires. En particulier, il serait intéressant de déterminer quelles sont les lectines associées à l'adhésion des myoblastes C2C12, et comment sont modifiés les glycosphingolipides au cours de la fusion membranaire. Une étude en microscopie confocale des cellules en fusion permettrait par exemple de déterminer quelles sont les lectines impliquées dans les zones de fusion, ainsi que les épitopes glycaniques associés. Le modèle évoqué a également constitué un élément décisif pour le choix de gènes à étudier plus précisément, et par conséquent pour la suite de ma thèse. En effet, des voies préférentiellement modifiées ont été mises en relief, et ont donc fait l'objet d'analyses supplémentaires. Bien sûr, ce premier volet de mon travail gagnerait à être complété et validé par des études protéiques. Les outils dont nous disposons au laboratoire ne nous permettaient pas d'analyser un si grand nombre de protéines. En outre, la difficulté de ce type d'analyses réside aussi dans la faible quantité de protéines exprimées par ces gènes. Des travaux récents ont toutefois permis d'identifier des glycoprotéines de surface *N*-glycosylées sur les myoblastes C2C12 (Gundry, R.L., *et al.* 2009). Au sein de notre équipe, un travail d'étude du glycoprotéome a également débuté, afin d'obtenir de nouvelles informations sur le rôle des *N*- et *O*-glycoprotéines dans la myogenèse. Quoi qu'il en soit, l'objectif de ce premier volet restait un travail de criblage.

La seconde partie de mon travail de thèse a été d'utiliser les informations générées par le criblage transcriptomique pour étudier plus finement le rôle de certains gènes. Le choix d'une liste restreinte de 10 gènes d'intérêt n'a pas été aisé à réaliser, tant de nombreux candidats semblaient pertinents à analyser. Les gènes concernés codent pour des protéines dont les fonctions ont été mises en relief dans le modèle cité plus haut, et non décrites précédemment dans la littérature. La plupart des gènes correspondants sont ainsi associés à la

biosynthèse des glycosphingolipides. Afin d'obtenir des informations sur la fonction des gènes sélectionnés, nous avons choisi de déréguler leur expression dans les cellules C2C12 et de déterminer quelles étaient les conséquences sur la différenciation myogénique. Les résultats obtenus dans le cadre de l'extinction d'expression par siRNA n'ont pas été concluants. La sous-expression n'était malheureusement pas suffisante or il est nécessaire d'obtenir une extinction quasi-totale des gènes ciblés pour pouvoir en étudier les conséquences. La technique de transfection est certainement à revoir car les cellules C2C12 sont reconnues pour la difficulté de leur transfection, tant par lipofection que par électroporation. Le système choisi ici était de surcroît transitoire. L'utilisation de siRNA couplé à un marquage de ces composés par des molécules fluorescentes permettrait de déterminer l'efficacité de transfection et de trier les cellules transfectées. Afin d'améliorer l'efficacité de la transfection en elle-même, une mise au point pourrait être réalisée en expérimentant la synchronisation du cycle des cellules à transférer, un système également utilisé dans la littérature. Dans le cadre de la surexpression de ces gènes, l'établissement de lignées stables exprimant constitutivement les gènes d'intérêt a produit des lignées cellulaires affichant parfois des phénotypes intéressants. L'un des plus marquants est celui obtenu pour les clones ayant reçu la séquence codante de *β3gal5*. La désorganisation apparente du cytoplasme de ces cellules en fait un candidat de choix pour des analyses futures, les événements de fusion des myoblastes étant associés à une réorganisation cytoplasmique et cytosquelettique. Il en est de même pour *St3gal5*, dont les études préliminaires par le blocage du GM3 ont également suscité notre intérêt. Toutefois, notre choix s'est d'abord porté sur la famille des gènes d' α 1,2-fucosyltransférases, tous hautement surexprimés à 24-48h de différenciation. En effet, dans la mesure où les enzymes qu'ils codent interviennent dans les stades ultimes de la synthèse des structures glycaniques, les épitopes fucosylés qu'ils produisent sont exposés à la surface cellulaire et pourraient ainsi intervenir dans les processus d'interaction et de fusion cellulaire. Les cellules C2C12 surexprimant le gène *Fut1* ou *Fut2* présentent un retard de différenciation, ce qui suppose un rôle des épitopes α 1,2-fucosylés dans la régulation de ce processus, par des mécanismes indépendants des facteurs de transcription myogéniques. Ces résultats soulignent l'importance des glycoconjugués de la surface cellulaire dans la différenciation myogénique. La suite de ces travaux consiste maintenant à comprendre de façon plus poussée les mécanismes associés à cette régulation. Pour cela, il est nécessaire d'étudier les épitopes membranaires des cellules en différenciation, ainsi que leur colocalisation potentielle avec des marqueurs de l'interaction et de la fusion membranaire, tels que la M-cadhérine ou la β -caténine. Il convient également d'observer

quels sont les effets de la sous-expression de ces gènes par la technique de shRNA. Enfin, il est important de compléter cette étude par la dérégulation de l'expression du gène *Sec1*, manquant dans cette première analyse, et de réaliser ensuite des co-expressions ou co-extinctions. L'utilisation d'un système d'expression inductible, lors de la mise en différenciation des cellules par exemple, serait aussi un atout évident pour ce type d'analyse. De façon plus générale, les résultats obtenus dans les cellules C2C12 gagneraient à être confirmés dans des cultures primaires de myoblastes murins ou directement *in situ* par immunohistochimie. A plus long terme, ces études menées jusqu'à présent chez la souris devront être extrapolées au modèle bovin, afin de répondre à certains objectifs de notre unité, comme ceux de disposer d'outils génétiques permettant une sélection des animaux de rente à plus fort potentiel économique. Pour cela, il serait intéressant dans un premier temps de rechercher chez le bovin les gènes orthologues de ceux identifiés dans le modèle murin. Une étude *in silico* de ces gènes pourrait être réalisée afin d'identifier les polymorphismes existant dans la séquence de ces gènes. Avec les données d'analyses à haut débit de SNPs que réalise l'INRA sur des individus phénotypés de différentes races bovines, il sera intéressant de vérifier si des SNPs ou des haplotypes de SNPs au sein du glycogénome bovin sont associés à des phénotypes, et particulièrement à des phénotypes musculaires. L'analyse fonctionnelle de ces SNPs serait alors d'un intérêt primordial pour la compréhension de la mise en place de la masse musculaire chez le bovin et pour cibler le génotypage d'animaux de rente.

Ainsi, les travaux réalisés au cours de ma thèse démontrent un rôle des glycanes dans la différenciation myogénique des cellules murines C2C12. Des gènes candidats ont pu être déterminés, et pour certaines structures glycaniques synthétisées par les enzymes qu'ils codent, une fonction dans la différenciation myogénique semble être confirmée. Ces résultats constituent de mon point de vue les prémisses de nombreuses analyses futures. Le travail effectué a ouvert de nouvelles perspectives d'études et suscité de nouvelles questions. Pour répondre à certaines d'entre elles, de nouveaux outils sont désormais disponibles au laboratoire. Les outils que constituent les lignées stables surexprimant des gènes d'intérêt pourront être étudiés afin d'obtenir de nouvelles informations sur le rôle des glycanes dans la myogenèse. De même, les informations apportées par le criblage du glycogénome pourront être utilisées dans des études à venir. Je souhaite vraiment que ce travail constitue, dans le futur, un point de départ pour l'acquisition de nouvelles connaissances dans les domaines complexes et passionnants que sont la myogenèse et la glycosylation.

RÉFÉRENCES

- Abeijon, C. et Hirschberg, C.B. (1992) Topography of glycosylation reactions in the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci*, 17, 32-36.
- Abramovici, H. et H. Gee, S. (2007) Morphological changes and spatial regulation of diacylglycerol kinase-zeta, syntrophins, and Rac1 during myoblast fusion. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 64, 549-567.
- Adams, J.C. et Watt, F.M. (1993) Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development*, 117, 1183-1198.
- Alboim, S.V., Bak, A. et Sampson, S.R. (1992) Tunicamycin reduces Na(+)-K(+)-pump expression in cultured skeletal muscle. *J Cell Physiol*, 150, 640-646.
- Alvares, L.E., Schubert, F.R., Thorpe, C., Mootoosamy, R.C., Cheng, L., Parkyn, G., Lumsden, A. et Dietrich, S. (2003) Intrinsic, Hox-dependent cues determine the fate of skeletal muscle precursors. *Dev Cell*, 5, 379-390.
- Alvarez, K., Fadic, R. et Brandan, E. (2002) Augmented synthesis and differential localization of heparan sulfate proteoglycans in Duchenne muscular dystrophy. *J Cell Biochem*, 85, 703-713.
- Anderson, M.S. et Kunkel, L.M. (1992) The molecular and biochemical basis of Duchenne muscular dystrophy. *Trends Biochem Sci*, 17, 289-292.
- Apweiler, R., Hermjakob, H. et Sharon, N. (1999) On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1473, 4-8.
- Arnold, H.H. et Braun, T. (1996) Targeted inactivation of myogenic factor genes reveals their role during mouse myogenesis: a review. *Int J Dev Biol*, 40, 345-353.
- Asakura, A., Komaki, M. et Rudnicki, M. (2001) Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. *Differentiation*, 68, 245-253.
- Askanas, V. et Engel, W.K. (2002) Inclusion-body myositis and myopathies: different etiologies, possibly similar pathogenic mechanisms. *Curr Opin Neurol*, 15, 525-531.
- Audfray, A. (2008) La protéine-O-fucosyltransférase 1 (Pofut1) : Caractérisation fonctionnelle et régulation de la voie de signalisation de Notch au cours de la myogénèse. UMR 1061 INRA/Université de Limoges.
- Avent, N.D. (1997) Human erythrocyte antigen expression: its molecular bases. *Br J Biomed Sci*, 54, 16-37.
- Bae, G.-U., Gaio, U., Yang, Y.-J., Lee, H.-J., Kang, J.-S. et Krauss, R.S. (2008) Regulation of Myoblast Motility and Fusion by the CXCR4-associated Sialomucin, CD164. *J. Biol. Chem.*, 283, 8301-8309.
- Bakkers, J., Kijne, J.W. et Spaink, H.P. (1999) Function of chitin oligosaccharides in plant and animal development. *Exs*, 87, 71-83.
- Bar-Sagi, D. et Prives, J. (1983) Tunicamycin inhibits the expression of surface Na⁺ channels in cultured muscle cells. *J Cell Physiol*, 114, 77-81.
- Barreaud, J.P., Saunier, K., Souchère, J., Delourme, D., Oulmouden, A., Oriol, R., Leveziel, H., Julien, R. et Petit, J.M. (2000) Three bovine alpha2-fucosyltransferase genes encode enzymes that preferentially transfer fucose on Galbeta1-3GalNAc acceptor substrates. *Glycobiology*, 10, 611-621.
- Bass, M.D. et Humphries, M.J. (2002) Cytoplasmic interactions of syndecan-4 orchestrate adhesion receptor and growth factor receptor signalling. *Biochem J*, 368, 1-15.
- Bate, M. (1990) The embryonic development of larval muscles in *Drosophila*. *Development*, 110, 791-804.
- Beauchamp, J.R., Heslop, L., Yu, D.S.W., Tajbakhsh, S., Kelly, R.G., Wernig, A., Buckingham, M.E., Partridge, T.A. et Zammit, P.S. (2000) Expression of Cd34 and Myf5 Defines the Majority of Quiescent Adult Skeletal Muscle Satellite Cells. *J. Cell Biol.*, 151, 1221-1234.
- Bergstrom, D.A. et Tapscott, S.J. (2001) Molecular Distinction between Specification and Differentiation in the Myogenic Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor Family. *Mol. Cell. Biol.*, 21, 2404-2412.
- Berkes, C.A. et Tapscott, S.J. (2005) MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 16, 585-595.
- Berthier, C. et Blaineau, S. (1997) Supramolecular organization of the subsarcolemmal cytoskeleton of adult skeletal muscle fibers. A review. *Biol Cell*, 89, 413-434.
- Biressi, S., Molinaro, M. et Cossu, G. (2007) Cellular heterogeneity during vertebrate skeletal muscle development. *Developmental Biology*, 308, 281-293.
- Bischoff, R. (1975) Regeneration of single skeletal muscle fibers in vitro. *Anat Rec*, 182, 215-235.

- Bischoff, R. (1997) Chemotaxis of skeletal muscle satellite cells. *Developmental Dynamics*, 208, 505-515.
- Bishop, J.R., Schuksz, M. et Esko, J.D. (2007) Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature*, 446, 1030-1037.
- Blackwell, T.K. et Weintraub, H. (1990) Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection. *Science*, 250, 1104-1110.
- Bladt, F., Riethmacher, D., Isenmann, S., Aguzzi, A. et Birchmeier, C. (1995) Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature*, 376, 768-771.
- Blagden, C.S. et Hughes, S.M. (1999) Extrinsic influences on limb muscle organisation. *Cell Tissue Res*, 296, 141-150.
- Blake, D.J., Weir, A., Newey, S.E. et Davies, K.E. (2002) Function and Genetics of Dystrophin and Dystrophin-Related Proteins in Muscle. *Physiol. Rev.*, 82, 291-329.
- Blanco-Bose, W.E. et Blau, H.M. (2001) Laminin-induced change in conformation of preexisting $\alpha 7\beta 1$ integrin signals secondary myofiber formation. *Dev Biol*, 233, 148-160.
- Bober, E., Lyons, G.E., Braun, T., Cossu, G., Buckingham, M. et Arnold, H.H. (1991) The muscle regulatory gene, Myf-6, has a biphasic pattern of expression during early mouse development. *J. Cell Biol.*, 113, 1255-1265.
- Bondesen, B.A., Jones, K.A., Glasgow, W.C. et Pavlath, G.K. (2007) Inhibition of myoblast migration by prostacyclin is associated with enhanced cell fusion. *FASEB J.*, 21, 3338-3345.
- Booth, F.W. et Thomason, D.B. (1991) Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: perspectives of various models. *Physiol. Rev.*, 71, 541-585.
- Bosman, F.T. et Stamenkovic, I. (2003) Functional structure and composition of the extracellular matrix. *The Journal of Pathology*, 200, 423-428.
- Brancaccio, M., Guazzone, S., Menini, N., Sibona, E., Hirsch, E., De Andrea, M., Rocchi, M., Altruda, F., Tarone, G. et Silengo, L. (1999) Melusin is a new muscle-specific interactor for $\beta(1)$ integrin cytoplasmic domain. *J Biol Chem*, 274, 29282-29288.
- Brand-Saberi, B., Krenn, V., Grim, M. et Christ, B. (1993) Differences in the fibronectin-dependence of migrating cell populations. *Anat Embryol (Berl)*, 187, 17-26.
- Brand-Saberi, B., Gamel, A.J., Krenn, V., Müller, T.S., Wilting, J. et Christ, B. (1996) N-Cadherin Is Involved in Myoblast Migration and Muscle Differentiation in the Avian Limb Bud. *Developmental Biology*, 178, 160-173.
- Brand-Saberi, B. et Christ, B. (1999) Genetic and epigenetic control of muscle development in vertebrates. *Cell Tissue Res*, 296, 199-212.
- Brandan, E., Cabello-Verrugio, C. et Vial, C. (2008) Novel regulatory mechanisms for the proteoglycans decorin and biglycan during muscle formation and muscular dystrophy. *Matrix Biology*, 27, 700-708.
- Braun, T., Buschhausen-Denker, G., Bober, E., Tannich, E. et Arnold, H.H. (1989) A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts. *Embo J*, 8, 701-709.
- Breton, C., Snajdrova, L., Jeanneau, C., Koca, J. et Imberty, A. (2006) Structures and mechanisms of glycosyltransferases. *Glycobiology*, 16, 29R-37.
- Brigande, J.V. et Platt, F.M. (1998) Inhibition of Glycosphingolipid Biosynthesis Does Not Impair Growth or Morphogenesis of the Postimplantation Mouse Embryo. *Journal of Neurochemistry*, 70, 871-882.
- Broccolini, A., Gidaro, T., Cristofaro, R.D., Morosetti, R., Gliubizzi, C., Ricci, E., A. Tonali, P. et Mirabella, M. (2008) Hyposialylation of neprilysin possibly affects its expression and enzymatic activity in hereditary inclusion-body myopathy muscle. *Journal of Neurochemistry*, 105, 971-981.
- Brohmann, H., Jagla, K. et Birchmeier, C. (2000) The role of Lbx1 in migration of muscle precursor cells. *Development*, 127, 437-445.
- Bryson-Richardson, R.J. et Currie, P.D. (2008) The genetics of vertebrate myogenesis. *Nat Rev Genet*, 9, 632-646.
- Buas, M.F., Kabak, S. et Kadesch, T. (2009) Inhibition of myogenesis by Notch: evidence for multiple pathways. *J Cell Physiol*, 218, 84-93.
- Buckingham, M. (1992) Making muscle in mammals. *Trends Genet*, 8, 144-148.
- Buckingham, M. (2001) Skeletal muscle formation in vertebrates. *Current Opinion in Genetics & Development*, 11, 440-448.
- Buckingham, M., Bajard, L., Chang, T., Daubas, P., Hadchouel, J., Meilhac, S., Montarras, D., Rocancourt, D. et Relaix, F. (2003) The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *Journal of Anatomy*, 202, 59-68.
- Bulfield, G., Siller, W.G., Wight, P.A. et Moore, K.J. (1984) X chromosome-linked muscular

- dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81, 1189-1192.
- Burda, P. et Aebi, M. (1999) The dolichol pathway of N-linked glycosylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1426, 239-257.
- Cambron, L.D. et Leskawa, K.C. (1994) Glycosphingolipids during skeletal muscle cell differentiation: comparison of normal and fusion-defective myoblasts. *Mol Cell Biochem*, 130, 173-185.
- Casar, J.C., Cabello-Verrugio, C., Olguin, H., Aldunate, R., Inestrosa, N.C. et Brandan, E. (2004a) Heparan sulfate proteoglycans are increased during skeletal muscle regeneration: requirement of syndecan-3 for successful fiber formation. *J Cell Sci*, 117, 73-84.
- Casar, J.C., McKechnie, B.A., Fallon, J.R., Young, M.F. et Brandan, E. (2004b) Transient up-regulation of biglycan during skeletal muscle regeneration: delayed fiber growth along with decorin increase in biglycan-deficient mice. *Developmental Biology*, 268, 358-371.
- Casas, F.o., Pessemesse, L., Grandemange, S.p., Seyer, P., Gueguen, N.g., Baris, O., Lepourry, L., Cabello, G.r. et Wrutniak-Cabello, C. (2008) Overexpression of the Mitochondrial T3 Receptor p43 Induces a Shift in Skeletal Muscle Fiber Types. *PLoS One*, 3, e2501.
- Cates, G.A., Brickenden, A.M. et Sanwal, B.D. (1984a) Possible involvement of a cell surface glycoprotein in the differentiation of skeletal myoblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 259, 2646-2650.
- Cates, G.A., Kaur, H. et Sanwal, B.D. (1984b) Inhibition of fusion of skeletal myoblasts by tunicamycin and its reversal by N-acetylglucosamine. *Can J Biochem Cell Biol*, 62, 28-35.
- Chandrasheharan, K. et Martin, P.T. (2009) Embryonic overexpression of *Galgt2* inhibits skeletal muscle growth via activation of myostatin signaling. *Muscle & Nerve*, 39, 25-41.
- Charlton, C.A., Mohler, W.A., Radice, G.L., Hynes, R.O. et Blau, H.M. (1997) Fusion competence of myoblasts rendered genetically null for N-cadherin in culture. *J Cell Biol*, 138, 331-336.
- Charlton, C.A., Mohler, W.A. et Blau, H.M. (2000) Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) and Myoblast Fusion. *Developmental Biology*, 221, 112-119.
- Charrasse, S., Meriane, M., Comunale, F., Blangy, A. et Gauthier-Rouviere, C. (2002) N-cadherin-dependent cell-cell contact regulates Rho GTPases and β -catenin localization in mouse C2C12 myoblasts. *J. Cell Biol.*, 158, 953-965.
- Chen, E.H. et Olson, E.N. (2004) Towards a molecular pathway for myoblast fusion in *Drosophila*. *Trends in Cell Biology*, 14, 452-460.
- Chernoff, E.A.G., Clarke, D.O., Wallace-Evers, J.L., Hungate-Muegge, L.P. et Smith, R.C. (2001) The effects of collagen synthesis inhibitory drugs on somitogenesis and myogenin expression in cultured chick and mouse embryos. *Tissue and Cell*, 33, 97-110.
- Chou, T.-Y., Hart, G.W. et Dang, C.V. (1995) c-Myc Is Glycosylated at Threonine 58, a Known Phosphorylation Site and a Mutational Hot Spot in Lymphomas. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 18961-18965.
- Christ, B. et Ordahl, C.P. (1995) Early stages of chick somite development. *Anat Embryol (Berl)*, 191, 381-396.
- Christ, B. et Brand-Saberi, B. (2002) Limb muscle development. *Int J Dev Biol*, 46, 905-914.
- Chui, P.C., Guan, H.P., Lehrke, M. et Lazar, M.A. (2005) PPAR γ regulates adipocyte cholesterol metabolism via oxidized LDL receptor 1. *J Clin Invest*, 115, 2244-2256.
- Cieniewski-Bernard, C., Bastide, B., Lefebvre, T., Lemoine, J., Mounier, Y. et Michalski, J.-C. (2004) Identification of O-linked N-Acetylglucosamine Proteins in Rat Skeletal Muscle Using Two-dimensional Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, 3, 577-585.
- Cieniewski-Bernard, C., Mounier, Y., Michalski, J.-C. et Bastide, B. (2006) O-GlcNAc level variations are associated with the development of skeletal muscle atrophy. *J Appl Physiol*, 100, 1499-1505.
- Cifuentes-Diaz, C., Nicolet, M., Goudou, D., Rieger, F. et Mege, R.M. (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.
- Cinquin, O. (2007) Understanding the somitogenesis clock: what's missing? *Mech Dev*, 124, 501-517.
- Clarke, E., Nandan, D., Brickenden, A., Cates, G.A., Ball, E. et Sanwal, B.D. (1989) Glycoprotein glycans may not be necessary for the differentiation of skeletal myoblasts. *Experimental Cell Research*, 180, 178-188.
- Cole, F., Zhang, W., Geyra, A., Kang, J.-S. et Krauss, R.S. (2004) Positive Regulation of

- Myogenic bHLH Factors and Skeletal Muscle Development by the Cell Surface Receptor CDO. *Developmental Cell*, 7, 843-854.
- Collins, C.A., Olsen, I., Zammit, P.S., Heslop, L., Petrie, A., Partridge, T.A. et Morgan, J.E. (2005) Stem Cell Function, Self-Renewal, and Behavioral Heterogeneity of Cells from the Adult Muscle Satellite Cell Niche. *Cell*, 122, 289-301.
- Conboy, I.M. et Rando, T.A. (2002) The Regulation of Notch Signaling Controls Satellite Cell Activation and Cell Fate Determination in Postnatal Myogenesis. *Developmental Cell*, 3, 397-409.
- Cooke, J. et Zeeman, E.C. (1976) A clock and wavefront model for control of the number of repeated structures during animal morphogenesis. *J Theor Biol*, 58, 455-476.
- Corina, S., Bodo, C., Malcolm, M., Beate, B.-S. et Ketan, P. (2001) Regulation of *Epha4* expression in paraxial and lateral plate mesoderm by ectoderm-derived signals. *Developmental Dynamics*, 220, 377-386.
- Cornelison, D.D.W. et Wold, B.J. (1997) Single-Cell Analysis of Regulatory Gene Expression in Quiescent and Activated Mouse Skeletal Muscle Satellite Cells. *Developmental Biology*, 191, 270-283.
- Cornelison, D.D.W., Filla, M.S., Stanley, H.M., Rapraeger, A.C. et Olwin, B.B. (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.
- Cornelison, D.D.W., Wilcox-Adelman, S.A., Goetinck, P.F., Rauvala, H., Rapraeger, A.C. et Olwin, B.B. (2004) Essential and separable roles for Syndecan-3 and Syndecan-4 in skeletal muscle development and regeneration. *Genes & Development*, 18, 2231-2236.
- Cornelison, D.D.W. (2008) Context matters: In vivo and in vitro influences on muscle satellite cell activity. *Journal of Cellular Biochemistry*, 105, 663-669.
- Cornelius, P., MacDougald, O.A. et Lane, M.D. (1994) Regulation of Adipocyte Development. *Annual Review of Nutrition*, 14, 99-129.
- Cornell, R.B., Nissley, S.M. et Horwitz, A.F. (1980) Cholesterol availability modulates myoblast fusion. *J. Cell Biol.*, 86, 820-824.
- Covault, J. et Sanes, J.R. (1986) Distribution of N-CAM in synaptic and extrasynaptic portions of developing and adult skeletal muscle. *J. Cell Biol.*, 102, 716-730.
- Cremer, H., Lange, R., Christoph, A., Plomann, M., Vopper, G., Roes, J., Brown, R., Baldwin, S., Kraemer, P., Scheff, S., Barthels, D., Rajewsky, K. et Wille, W. (1994) Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature*, 367, 455-459.
- Dahl, U., Sjodin, A., Larue, L., Radice, G.L., Cajander, S., Takeichi, M., Kemler, R. et Semb, H. (2002) Genetic Dissection of Cadherin Function during Nephrogenesis. *Mol. Cell Biol.*, 22, 1474-1487.
- Davis, R.L., Weintraub, H. et Lassar, A.B. (1987) Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell*, 51, 987-1000.
- Dedieu, S., Mazeret, G., Cottin, P. et Brustis, J.J. (2002) Involvement of myogenic regulator factors during fusion in the cell line C2C12. *Int J Dev Biol*, 46, 235-241.
- Delgado, I., Huang, X., Jones, S., Zhang, L., Hatcher, R., Gao, B. et Zhang, P. (2003) Dynamic gene expression during the onset of myoblast differentiation in vitro. *Genomics*, 82, 109-121.
- Dhawan, J. et Helfman, D.M. (2004) Modulation of acto-myosin contractility in skeletal muscle myoblasts uncouples growth arrest from differentiation. *J Cell Sci*, 117, 3735-3748.
- Dickson, G., Peck, D., Moore, S.E., Barton, C.H. et Walsh, F.S. (1990) Enhanced myogenesis in NCAM-transfected mouse myoblasts. *Nature*, 344, 348-351.
- Dietrich, S., Schubert, F.R., Healy, C., Sharpe, P.T. et Lumsden, A. (1998) Specification of the hypaxial musculature. *Development*, 125, 2235-2249.
- Dietrich, S., Abou-Rebyeh, F., Brohmann, H., Bladt, F., Sonnenberg-Riethmacher, E., Yamaai, T., Lumsden, A., Brand-Saberi, B. et Birchmeier, C. (1999) The role of SF/HGF and c-Met in the development of skeletal muscle. *Development*, 126, 1621-1629.
- Diez del Corral, R., Olivera-Martinez, I., Goriely, A., Gale, E., Maden, M. et Storey, K. (2003) Opposing FGF and retinoid pathways control ventral neural pattern, neuronal differentiation, and segmentation during body axis extension. *Neuron*, 40, 65-79.
- Doberstein, S.K., Fetter, R.D., Mehta, A.Y. et Goodman, C.S. (1997) Genetic Analysis of Myoblast Fusion: blown fuse Is Required for Progression Beyond the Prefusion Complex. *J. Cell Biol.*, 136, 1249-1261.
- Domino, S.E., Zhang, L., Gillespie, P.J., Saunders, T.L. et Lowe, J.B. (2001) Deficiency of

- reproductive tract alpha(1,2)fucosylated glycans and normal fertility in mice with targeted deletions of the FUT1 or FUT2 alpha(1,2)fucosyltransferase locus. *Mol Cell Biol*, 21, 8336-8345.
- Domino, S.E., Zhang, L. et Lowe, J.B. (2001) Molecular cloning, genomic mapping, and expression of two secretor blood group alpha (1,2)fucosyltransferase genes differentially regulated in mouse uterine epithelium and gastrointestinal tract. *J Biol Chem*, 276, 23748-23756.
- Domino, S.E. et Hurd, E.A. (2004) LacZ expression in Fut2-LacZ reporter mice reveals estrogen-regulated endocervical glandular expression during estrous cycle, hormone replacement, and pregnancy. *Glycobiology*, 14, 169-175.
- Donoviel, D.B., Hadjantonakis, A.K., Ikeda, M., Zheng, H., Hyslop, P.S. et Bernstein, A. (1999) Mice lacking both presenilin genes exhibit early embryonic patterning defects. *Genes Dev*, 13, 2801-2810.
- Dreyfuss, J.L., Regatieri, C.V., Jarrouge, T.R., Cavalheiro, R.P., Sampaio, L.O. et Nader, H.B. (2009) Heparan sulfate proteoglycans: structure, protein interactions and cell signaling. *An Acad Bras Cienc*, 81, 409-429.
- Droguett, R., Cabello-Verrugio, C., Riquelme, C. et Brandan, E. (2006) Extracellular proteoglycans modify TGF-[beta] bio-availability attenuating its signaling during skeletal muscle differentiation. *Matrix Biology*, 25, 332-341.
- Dunlison, G.F., Scotting, P.J. et Wigmore, P.M. (1999) Rat embryonic myoblasts are restricted to forming primary fibres while later myogenic populations are pluripotent. *Mechanisms of Development*, 87, 11-19.
- Dupuy, F., Petit, J.M., Mollicone, R., Oriol, R., Julien, R. et Maftah, A. (1999) A single amino acid in the hypervariable stem domain of vertebrate alpha1,3/1,4-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.
- Dupuy, F., Germot, A., Marena, M., Oriol, R., Blancher, A., Julien, R. et Maftah, A. (2002) Alpha1,4-fucosyltransferase activity: a significant function in the primate lineage has appeared twice independently. *Mol Biol Evol*, 19, 815-824.
- Dupuy, F., Germot, A., Julien, R. et Maftah, A. (2004) Structure/function study of Lewis alpha3- and alpha3/4-fucosyltransferases: the alpha1,4 fucosylation requires an aromatic residue in the acceptor-binding domain. *Glycobiology*, 14, 347-356.
- Duxson, M.J., Usson, Y. et Harris, A.J. (1989) The origin of secondary myotubes in mammalian skeletal muscles: ultrastructural studies. *Development*, 107, 743-750.
- Dworak, H.A. et Sink, H. (2002) Myoblast fusion in *Drosophila*. *BioEssays*, 24, 591-601.
- Edmondson, D.G. et Olson, E.N. (1989) A gene with homology to the myc similarity region of MyoD1 is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program. *Genes & Development*, 3, 628-640.
- Edom-Vovard, F., Bonnin, M.-A. et Duprez, D. (2001) Misexpression of Fgf-4 in the Chick Limb Inhibits Myogenesis by Down-Regulating Fek Expression. *Developmental Biology*, 233, 56-71.
- Eisenberg, I., Avidan, N., Potikha, T., Hochner, H., Chen, M., Olender, T., Barash, M., Shemesh, M., Sadeh, M., Grabov-Nardini, G., Shmilevich, I., Friedmann, A., Karpati, G., Bradley, W.G., Baumbach, L., Lancet, D., Asher, E.B., Beckmann, J.S., Argov, Z. et Mitrani-Rosenbaum, S. (2001) The UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase gene is mutated in recessive hereditary inclusion body myopathy. *Nat Genet*, 29, 83-87.
- Engel, L.C. et David, J.D. (1985) Temperature-sensitive non-fusing myoblast variant and spontaneous revertant: isolation and characterization. *Somat Cell Mol Genet*, 11, 325-338.
- Epstein, J.A., Shapiro, D.N., Cheng, J., Lam, P.Y. et Maas, R.L. (1996) Pax3 modulates expression of the c-Met receptor during limb muscle development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 4213-4218.
- Evans, D., Baillie, H., Caswell, A. et Wigmore, P. (1994) During Fetal Muscle Development, Clones of Cells Contribute to Both Primary and Secondary Fibers. *Developmental Biology*, 162, 348-353.
- Fanzani, A., Giuliani, R., Colombo, F., Zizioli, D., Presta, M., Preti, A. et Marchesini, S. (2003) Overexpression of cytosolic sialidase Neu2 induces myoblast differentiation in C2C12 cells. *FEBS Letters*, 547, 183-188.
- Fanzani, A., Giuliani, R., Colombo, F., Rossi, S., Stoppani, E., Martinet, W., Preti, A. et Marchesini, S. (2008) The enzymatic activity of sialidase Neu2 is inversely regulated during in vitro myoblast hypertrophy and atrophy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 370, 376-381.
- Fazeli, S., Wells, D.J., Hobbs, C. et Walsh, F.S. (1996) Altered secondary myogenesis in

- transgenic animals expressing the neural cell adhesion molecule under the control of a skeletal muscle alpha-actin promoter. *J. Cell Biol.*, 135, 241-251.
- Ferri, P., Barbieri, E., Burattini, S., Guescini, M., D'Emilio, A., Biagiotti, L., Grande, P.D., Luca, A.D., Stocchi, V. et Falcieri, E. (2009) Expression and subcellular localization of myogenic regulatory factors during the differentiation of skeletal muscle C2C12 myoblasts. *Journal of Cellular Biochemistry*, 108, 1302-1317.
- Figeac, N., Daczewska, M., Marcelle, C. et Jagla, K. (2007) Muscle stem cells and model systems for their investigation. *Developmental Dynamics*, 236, 3332-3342.
- Florini, J.R., Ewton, D.Z. et Magri, K.A. (1991) Hormones, Growth Factors, and Myogenic Differentiation. *Annual Review of Physiology*, 53, 201-216.
- Freeze, H.H. et Aebi, M. (2005) Altered glycan structures: the molecular basis of congenital disorders of glycosylation. *Current Opinion in Structural Biology*, 15, 490-498.
- Fulton, A.B., Prives, J., Farmer, S.R. et Penman, S. (1981) Developmental reorganization of the skeletal framework and its surface lamina in fusing muscle cells. *J. Cell Biol.*, 91, 103-112.
- Furuta, Y., Ilic, D., Kanazawa, S., Takeda, N., Yamamoto, T. et Aizawa, S. (1995) Mesodermal defect in late phase of gastrulation by a targeted mutation of focal adhesion kinase, FAK. *Oncogene*, 11, 1989-1995.
- Gandhi, N.S. et Mancera, R.L. (2008) The Structure of Glycosaminoglycans and their Interactions with Proteins. *Chemical Biology & Drug Design*, 72, 455-482.
- Garcia-Vallejo, J.J., van Liempt, E., da Costa Martins, P., Beckers, C., van het Hof, B., Gringhuis, S.I., Zwaginga, J.J., van Dijk, W., Geijtenbeek, T.B., van Kooyk, Y. et van Die, I. (2008) DC-SIGN mediates adhesion and rolling of dendritic cells on primary human umbilical vein endothelial cells through LewisY antigen expressed on ICAM-2. *Mol Immunol*, 45, 2359-2369.
- Gavel, Y. et von Heijne, G. (1990) Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Eng*, 3, 433-442.
- Geetha-Habib, M., Noiva, R., Kaplan, H.A. et Lennarz, W.J. (1988) Glycosylation site binding protein, a component of oligosaccharyl transferase, is highly similar to three other 57 kd luminal proteins of the ER. *Cell*, 54, 1053-1060.
- George-Weinstein, M., Gerhart, J., Blitz, J., Simak, E. et Knudsen, K.A. (1997) N-cadherin Promotes the Commitment and Differentiation of Skeletal Muscle Precursor Cells. *Developmental Biology*, 185, 14-24.
- George, E.L., Georges-Labouesse, E.N., Patel-King, R.S., Rayburn, H. et Hynes, R.O. (1993) Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development*, 119, 1079-1091.
- Georges-Labouesse, E., N., George, E., L. , Rayburn, H. et Hynes, R., O. (1996) Mesodermal development in mouse embryos mutant for fibronectin. *Developmental Dynamics*, 207, 145-156.
- Georgiadis, V., Stewart, H.J.S., Pollard, H.J., Tavsanoglu, Y., Prasad, R., Horwood, J., Deltour, L., Goldring, K., Poirier, F. et Lawrence-Watt Diana, J. (2007) Lack of galectin-1 results in defects in myoblast fusion and muscle regeneration. *Developmental Dynamics*, 236, 1014-1024.
- Gilbert, S.F. (2000) *Developmental Biology* (6th Edition)
- Gillard, B.K., Heath, J.P., Thurmon, L.T. et Marcus, D.M. (1991) Association of glycosphingolipids with intermediate filaments of human umbilical vein endothelial cells. *Exp Cell Res*, 192, 433-444.
- Gillard, B.K., Thurmon, L.T. et Marcus, D.M. (1992) Association of glycosphingolipids with intermediate filaments of mesenchymal, epithelial, glial, and muscle cells. *Cell Motil Cytoskeleton*, 21, 255-271.
- Gomes, R.R., Jr., Farach-Carson, M.C. et Carson, D.D. (2004) Perlecan functions in chondrogenesis: insights from in vitro and in vivo models. *Cells Tissues Organs*, 176, 79-86.
- Gomez, C. et Pourquié, O. (2009) Developmental control of segment numbers in vertebrates. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 312B, 533-544.
- Grewal, P.K., Holzfeind, P.J., Bittner, R.E. et Hewitt, J.E. (2001) Mutant glycosyltransferase and altered glycosylation of alpha-dystroglycan in the myodystrophy mouse. *Nat Genet*, 28, 151-154.
- Grewal, P.K. et Hewitt, J.E. (2003) Glycosylation defects: a new mechanism for muscular dystrophy? *Hum. Mol. Genet.*, 12, R259-264.
- Gridley, T. (2006) The long and short of it: Somite formation in mice. *Developmental Dynamics*, 235, 2330-2336.

- Grimaldi, P.A., Teboul, L., Inadera, H., Gaillard, D. et Amri, E.Z. (1997) Trans-differentiation of myoblasts to adipoblasts: triggering effects of fatty acids and thiazolidinediones. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 57, 71-75.
- Grobet, L., Poncelet, D., Royo, L.J., Brouwers, B., Pirottin, D., Michaux, C., Menissier, F., Zanotti, M., Dunner, S. et Georges, M. (1998) Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. *Mamm Genome*, 9, 210-213.
- Gros, J., Manceau, M., Thome, V. et Marcelle, C. (2005) A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells. *Nature*, 435, 954-958.
- Gross, M.K., Moran-Rivard, L., Velasquez, T., Nakatsu, M.N., Jagla, K. et Goulding, M. (2000) Lbx1 is required for muscle precursor migration along a lateral pathway into the limb. *Development*, 127, 413-424.
- Grounds, M.D., Radley, H.G., Lynch, G.S., Nagaraju, K. et De Luca, A. (2008) Towards developing standard operating procedures for pre-clinical testing in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Neurobiology of Disease*, 31, 1-19.
- Gu, J. et Taniguchi, N. (2004) Regulation of integrin functions by N-glycans. *Glycoconj J*, 21, 9-15.
- Gu, J., Isaji, T., Sato, Y., Kariya, Y. et Fukuda, T. (2009) Importance of N-glycosylation on alpha5beta1 integrin for its biological functions. *Biol Pharm Bull*, 32, 780-785.
- Guernec, A., Berri, C., Chevalier, B., Wacrenier-Cere, N., Le Bihan-Duval, E. et Duclos, M.J. (2003) Muscle development, insulin-like growth factor-I and myostatin mRNA levels in chickens selected for increased breast muscle yield. *Growth Hormone & IGF Research*, 13, 8-18.
- Gulick, J., Subramaniam, A., Neumann, J. et Robbins, J. (1991) Isolation and characterization of the mouse cardiac myosin heavy chain genes. *Journal of Biological Chemistry*, 266, 9180-9185.
- Gundry, R.L., Raginski, K., Tarasova, Y., Tchernyshyov, I., Bausch-Fluck, D., Elliott, S.T., Boheler, K.R., Van Eyk, J.E. et Wollscheid, B. (2009) The mouse C2C12 myoblast cell surface N-linked glycoproteome: Identification, glycosite occupancy, and membrane orientation. *Mol Cell Proteomics*, M900195-MCP900200.
- Gurdon, J.B., Lemaire, P. et Kato, K. (1993) Community effects and related phenomena in development. *Cell*, 75, 831-834.
- Hagmann, J., Grob, M. et Burger, M.M. (1992) The cytoskeletal protein talin is O-glycosylated. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 14424-14428.
- Haines, N. et Irvine, K.D. (2003) Glycosylation regulates Notch signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 786-797.
- Hajdуч, E., Litherland, G.J., Turban, S., Brot-Laroche, E. et Hundal, H.S. (2003) Insulin regulates the expression of the GLUT5 transporter in L6 skeletal muscle cells. *FEBS Lett*, 549, 77-82.
- Hakomori, S. (1981) Glycosphingolipids in Cellular Interaction, Differentiation, and Oncogenesis. *Annual Review of Biochemistry*, 50, 733-764.
- Hakomori, S. (1998) Cancer-associated glycosphingolipid antigens: their structure, organization, and function. *Acta Anat (Basel)*, 161, 79-90.
- Hakomori, S., Handa, K., Iwabuchi, K., Yamamura, S. et Prinetti, A. (1998) New insights in glycosphingolipid function: "glycosignaling domain," a cell surface assembly of glycosphingolipids with signal transducer molecules, involved in cell adhesion coupled with signaling. *Glycobiology*, 8, xi-xix.
- Hakomori, S. et Handa, K. (2002) Glycosphingolipid-dependent cross-talk between glycosynapses interfacing tumor cells with their host cells: essential basis to define tumor malignancy. *FEBS Letters*, 531, 88-92.
- Hakomori, S. (2004) Glycosynapses: microdomains controlling carbohydrate-dependent cell adhesion and signaling. *An Acad Bras Cienc*, 76, 553-572.
- Halloran, M.M., Carley, W.W., Polverini, P.J., Haskell, C.J., Phan, S., Anderson, B.J., Woods, J.M., Campbell, P.L., Volin, M.V., Backer, A.E. et Koch, A.E. (2000) Ley/H: An Endothelial-Selective, Cytokine-Inducible, Angiogenic Mediator. *J Immunol*, 164, 4868-4877.
- Haltiwanger, R.S. (2002) Regulation of signal transduction pathways in development by glycosylation. *Current Opinion in Structural Biology*, 12, 593-598.
- Handa, K., Takatani-Nakase, T., Larue, L., Stemmler, M.P., Kemler, R. et Hakomori, S.-i. (2007) Lex glycan mediates homotypic adhesion of embryonal cells independently from E-cadherin: A preliminary note. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 358, 247-252.

- Harris, R.J. et Spellman, M.W. (1993) O-Linked fucose and other post-translational modifications unique to EGF modules. *Glycobiology*, 3, 219-224.
- Hart, G.W. (1997) Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 66, 315-335.
- Hasty, P., Bradley, A., Morris, J.H., Edmondson, D.G., Venuti, J.M., Olson, E.N. et Klein, W.H. (1993) Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature*, 364, 501-506.
- Hawke, T.J. et Garry, D.J. (2001) Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol*, 91, 534-551.
- Hayashi, K. et Ozawa, E. (1995) Myogenic cell migration from somites is induced by tissue contact with medial region of the presumptive limb mesoderm in chick embryos. *Development*, 121, 661-669.
- Heanue, T.A., Reshef, R., Davis, R.J., Mardon, G., Oliver, G., Tomarev, S., Lassar, A.B. et Tabin, C.J. (1999) Synergistic regulation of vertebrate muscle development by Dach2, Eya2, and Six1, homologs of genes required for Drosophila eye formation. *Genes & Development*, 13, 3231-3243.
- Hédou, J., Cieniewski-Bernard, C., Leroy, Y., Michalski, J.-C., Mounier, Y. et Bastide, B. (2007) O-Linked N-Acetylglucosaminylation Is Involved in the Ca²⁺ Activation Properties of Rat Skeletal Muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 10360-10369.
- Hédou, J., Bastide, B., Page, A., Michalski, J.-C. et Morelle, W. (2009) Mapping of O-linked-beta-N-acetylglucosamine modification sites in key contractile proteins of rat skeletal muscle. *PROTEOMICS*, 9, 2139-2148.
- Helenius, A. et Aebi, M. (2001) Intracellular functions of N-linked glycans. *Science*, 291, 2364-2369.
- Henry, C.A., McNulty, I.M., Durst, W.A., Munchel, S.E. et Amacher, S.L. (2005) Interactions between muscle fibers and segment boundaries in zebrafish. *Developmental Biology*, 287, 346-360.
- Hirayama, E., Sasao, N., Yoshimasu, S. et Kim, J. (2001) K252a, an Indrocarbazole Derivative, Causes the Membrane of Myoblasts to Enter a Fusion-Capable State. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 285, 1237-1243.
- Hofsteenge, J., Muller, D.R., de Beer, T., Loffler, A., Richter, W.J. et Vliegthart, J.F. (1994) New type of linkage between a carbohydrate and a protein: C-glycosylation of a specific tryptophan residue in human RNase Us. *Biochemistry*, 33, 13524-13530.
- Hofsteenge, J., Huwiler, K.G., Macek, B., Hess, D., Lawler, J., Mosher, D.F. et Peter-Katalinic, J. (2001) C-mannosylation and O-fucosylation of the thrombospondin type 1 module. *J Biol Chem*, 276, 6485-6498.
- Holland, P.C. et Herscovics, A. (1986) Inhibition of myoblast fusion by the glucosidase inhibitor N-methyl-1-deoxynojirimycin, but not by the mannosidase inhibitor 1-deoxymannojirimycin. *Biochem J*, 238, 335-340.
- Hollnagel, A., Grund, C., Franke, W.W. et Arnold, H.-H. (2002) The Cell Adhesion Molecule M-Cadherin Is Not Essential for Muscle Development and Regeneration. *Mol. Cell Biol.*, 22, 4760-4770.
- Holmes, E.H., Yen, T.Y., Thomas, S., Joshi, R., Nguyen, A., Long, T., Gallet, F., Maftah, A., Julien, R. et Macher, B.A. (2000) Human alpha 1,3/4 fucosyltransferases. Characterization of highly conserved cysteine residues and N-linked glycosylation sites. *J Biol Chem*, 275, 24237-24245.
- Holzfeind, P.J., Grewal, P.K., Reitsamer, H.A., Kechvar, J., Lassmann, H., Hoeger, H., Hewitt, J.E. et Bittner, R.E. (2002) Skeletal, cardiac and tongue muscle pathology, defective retinal transmission, and neuronal migration defects in the Largemyd mouse defines a natural model for glycosylation-deficient muscle - eye - brain disorders. *Hum. Mol. Genet.*, 11, 2673-2687.
- Horsley, V. et Pavlath, G.K. (2002) Nfat: ubiquitous regulator of cell differentiation and adaptation. *J. Cell Biol.*, 156, 771-774.
- Horsley, V. et Pavlath, G.K. (2003) Prostaglandin F2{alpha} stimulates growth of skeletal muscle cells via an NFATC2-dependent pathway. *J. Cell Biol.*, 161, 111-118.
- Horsley, V. et Pavlath, G.K. (2004) Forming a multinucleated cell: molecules that regulate myoblast fusion. *Cells Tissues Organs*, 176, 67-78.
- Houzelstein, D., Auda-Boucher, G., Cheraud, Y., Rouaud, T., Blanc, I., Tajbakhsh, S., Buckingham, M.E., Fontaine-Perus, J. et Robert, B. (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.
- Howell, S., Nalbantoglu, J. et Crine, P. (1995) Neutral endopeptidase can hydrolyze [beta]-amyloid(1-40) but shows no effect on [beta]-amyloid precursor protein metabolism. *Peptides*, 16, 647-652.

- Hu, E., Tontonoz, P. et Spiegelman, B.M. (1995) Transdifferentiation of myoblasts by the adipogenic transcription factors PPAR gamma and C/EBP alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 9856-9860.
- Hughes, S.M., Chi, M.M.Y., Lowry, O.H. et Gundersen, K. (1999) Myogenin Induces a Shift of Enzyme Activity from Glycolytic to Oxidative Metabolism in Muscles of Transgenic Mice. *J. Cell Biol.*, 145, 633-642.
- Hurd, E.A. et Domino, S.E. (2004) Increased susceptibility of secretor factor gene Fut2-null mice to experimental vaginal candidiasis. *Infect Immun*, 72, 4279-4281.
- Illa, I., Leon-Monzon, M. et Dalakas, M.C. (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.
- Im, S.S., Kwon, S.K., Kim, T.H., Kim, H.I. et Ahn, Y.H. (2007) Regulation of glucose transporter type 4 isoform gene expression in muscle and adipocytes. *IUBMB Life*, 59, 134-145.
- Iozzo, R.V. (1998) Matrix proteoglycans: From Molecular Design to Cellular Function. *Annual Review of Biochemistry*, 67, 609-652.
- Irintchev, A., Zeschnigk, M., Starzinski-Powitz, A. et Wernig, A. (1994) Expression pattern of M-cadherin in normal, denervated, and regenerating mouse muscles. *Developmental Dynamics*, 199, 326-337.
- Iwamori, M. et Domino, S.E. (2004) Tissue-specific loss of fucosylated glycolipids in mice with targeted deletion of alpha(1,2)fucosyltransferase genes. *Biochem J*, 380, 75-81.
- Jackson, R.L., Busch, S.J. et Cardin, A.D. (1991) Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. *Physiol. Rev.*, 71, 481-539.
- Jagla, K., Dollé, P., Mattei, M.-G., Jagla, T., Schuhbaur, B., Dretzen, G., Bellard, F. et Bellard, M. (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.
- Jan-Willem Van Klinken, B., Einerhand, A.W.C., Büller, H.A. et Dekker, J. (1998) Strategic Biochemical Analysis of Mucins. *Analytical Biochemistry*, 265, 103-116.
- Janot, M., Audfray, A., Loriol, C., Germot, A., Maftah, A. et Dupuy, F. (2009) Glycogenome expression dynamics during mouse C2C12 myoblast differentiation suggests a sequential reorganization of membrane glycoconjugates. *BMC Genomics*, 10, 483.
- Jansen, K.M. et Pavlath, G.K. (2006) Mannose receptor regulates myoblast motility and muscle growth. *J. Cell Biol.*, 174, 403-413.
- Javaud, C., Dupuy, F., Maftah, A., Michalski, J.C., Oriol, R., Petit, J.M. et Julien, R. (2000) Ancestral exonic organization of FUT8, the gene encoding the alpha6-fucosyltransferase, reveals successive peptide domains which suggest a particular three-dimensional core structure for the alpha6-fucosyltransferase family. *Mol Biol Evol*, 17, 1661-1672.
- Javaud, C., Dupuy, F., Maftah, A., Julien, R. et Petit, J.M. (2003) The fucosyltransferase gene family: an amazing summary of the underlying mechanisms of gene evolution. *Genetica*, 118, 157-170.
- Jenniskens, G.J., Veerkamp, J.H. et H. van Kuppevelt, T. (2006) Heparan sulfates in skeletal muscle development and physiology. *Journal of Cellular Physiology*, 206, 283-294.
- Johnson, A.R., Skidgel, R.A., Gafford, J.T. et Erdos, E.G. (1984) Enzymes in placental microvilli: angiotensin I converting enzyme, angiotensinase A, carboxypeptidase, and neutral endopeptidase ("enkephalinase"). *Peptides*, 5, 789-796.
- Jostes, B., Walther, C. et Gruss, P. (1990) The murine paired box gene, Pax7, is expressed specifically during the development of the nervous and muscular system. *Mech Dev*, 33, 27-37.
- Joulia-Ekaza, D. et Cabello, G. (2006) Myostatin regulation of muscle development: Molecular basis, natural mutations, physiopathological aspects. *Experimental Cell Research*, 312, 2401-2414.
- Julich, D., Geisler, R. et Holley, S.A. (2005) Integrinalpha5 and delta/notch signaling have complementary spatiotemporal requirements during zebrafish somitogenesis. *Dev Cell*, 8, 575-586.
- Kablar, B., Asakura, A., Krastel, K., Ying, C., May, L.L., Goldhamer, D.J. et Rudnicki, M.A. (1998) MyoD and Myf-5 define the specification of musculature of distinct embryonic origin. *Biochem Cell Biol*, 76, 1079-1091.
- Kalcheim, C. et Ben-Yair, R. (2005) Cell rearrangements during development of the somite and its derivatives. *Current Opinion in Genetics & Development*, 15, 371-380.
- Kalderon, N. et Gilula, N.B. (1979) Membrane events involved in myoblast fusion. *J. Cell Biol.*, 81, 411-425.

- Kamemura, K. et Hart, G.W. (2003) Dynamic interplay between O-glycosylation and O-phosphorylation of nucleocytoplasmic proteins: a new paradigm for metabolic control of signal transduction and transcription. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 73, 107-136.
- Kanagawa, M., Michele, D.E., Satz, J.S., Barresi, R., Kusano, H., Sasaki, T., Timpl, R., Henry, M.D. et Campbell, K.P. (2005) Disruption of perlecan binding and matrix assembly by post-translational or genetic disruption of dystroglycan function. *FEBS Letters*, 579, 4792-4796.
- Kang, J.-S., Mulieri, P.J., Miller, C., Sassoon, D.A. et Krauss, R.S. (1998) CDO, A Robo-related Cell Surface Protein that Mediates Myogenic Differentiation. *J. Cell Biol.*, 143, 403-413.
- Kang, J.-S., Feinleib, J.L., Knox, S., Ketteringham, M.A. et Krauss, R.S. (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.
- Kang, J.-S., Yi, M.-J., Zhang, W., Feinleib, J.L., Cole, F. et Krauss, R.S. (2004) Netrins and neogenin promote myotube formation. *J. Cell Biol.*, 167, 493-504.
- Kang, J.S., Mulieri, P.J., Hu, Y., Taliana, L. et Krauss, R.S. (2002) BOC, an Ig superfamily member, associates with CDO to positively regulate myogenic differentiation. *Embo J*, 21, 114-124.
- Kassar-Duchossoy, L., Gayraud-Morel, B., Gomes, D., Rocancourt, D., Buckingham, M., Shinin, V. et Tajbakhsh, S. (2004) Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:Myod double-mutant mice. *Nature*, 431, 466-471.
- Katagiri, T., Yamaguchi, A., Komaki, M., Abe, E., Takahashi, N., Ikeda, T., Rosen, V., Wozney, J.M., Fujisawa-Sehara, A. et Suda, T. (1994) Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage [published erratum appears in *J Cell Biol* 1995 Feb;128(4):following 713]. *J. Cell Biol.*, 127, 1755-1766.
- Kaucic, K., Liu, Y., Ladisch, S. et Minoru, F. (2006) Modulation of Growth Factor Signaling by Gangliosides: Positive Or Negative? , *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp. 168-185.
- Kawakami, K., Sato, S., Ozaki, H. et Ikeda, K. (2000) *Six* family genes - structure and function as transcription factors and their roles in development. *BioEssays*, 22, 616-626.
- Kawakami, Y., Kawakami, K., Steelant, W.F., Ono, M., Baek, R.C., Handa, K., Withers, D.A. et Hakomori, S. (2002) Tetraspanin CD9 is a "proteolipid," and its interaction with alpha 3 integrin in microdomain is promoted by GM3 ganglioside, leading to inhibition of laminin-5-dependent cell motility. *J Biol Chem*, 277, 34349-34358.
- Kawamura, K., Takano, K., Suetsugu, S., Kurisu, S., Yamazaki, D., Miki, H., Takenawa, T. et Endo, T. (2004) N-WASP and WAVE2 Acting Downstream of Phosphatidylinositol 3-Kinase Are Required for Myogenic Cell Migration Induced by Hepatocyte Growth Factor. *J. Biol. Chem.*, 279, 54862-54871.
- Kelly, A.M. et Zacks, S.I. (1969) The histogenesis of rat intercostal muscle. *J. Cell Biol.*, 42, 135-153.
- Kim, B.-G., Lee, J.-H., Ahn, J.-M., Park, S.-K., Cho, J.-H., Hwang, D., Yoo, J.S., Yates, J.R., Ryoo, H.-M. et Cho, J.-Y. (2009) Two-Stage Double-Technique Hybrid (TSDTH) identification strategy for the analysis of BMP2-induced transdifferentiation of premyoblast C2C12 cells to osteoblast. *Journal of Proteome Research*.
- Kim, M.-L., Chandrasekharan, K., Glass, M., Shi, S., Stahl, M.C., Kaspar, B., Stanley, P. et Martin, P.T. (2008) O-fucosylation of muscle agrin determines its ability to cluster acetylcholine receptors. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 39, 452-464.
- Kishioka, Y., Thomas, M., Wakamatsu, J.-i., Hattori, A., Sharma, M., Kambadur, R. et Nishimura, T. (2008) Decorin enhances the proliferation and differentiation of myogenic cells through suppressing myostatin activity. *Journal of Cellular Physiology*, 215, 856-867.
- Kislinger, T., Gramolini, A.O., Pan, Y., Rahman, K., MacLennan, D.H. et Emili, A. (2005) Proteome Dynamics during C2C12 Myoblast Differentiation. *Mol Cell Proteomics*, 4, 887-901.
- Kitagawa, H., Tone, Y., Tamura, J.-i., Neumann, K.W., Ogawa, T., Oka, S., Kawasaki, T. et Sugahara, K. (1998) Molecular Cloning and Expression of Glucuronyltransferase I Involved in the Biosynthesis of the Glycosaminoglycan-Protein Linkage Region of Proteoglycans. *J. Biol. Chem.*, 273, 6615-6618.
- Kitzmann, M., Carnac, G., Vandromme, M., Primig, M., Lamb, N.J.C. et Fernandez, A. (1998) The Muscle Regulatory Factors MyoD and Myf-5 Undergo Distinct Cell Cycle-specific Expression in Muscle Cells. *J. Cell Biol.*, 142, 1447-1459.

- Kitzmann, M. et Fernandez, A. (2001) Crosstalk between cell cycle regulators and the myogenic factor MyoD in skeletal myoblasts. *Cell Mol Life Sci*, 58, 571-579.
- Knox, S.M. et Whitelock, J.M. (2006) Perlecan: how does one molecule do so many things? *Cell Mol Life Sci*, 63, 2435-2445.
- Knudsen, K.A., Myers, L. et McElwee, S.A. (1990) A role for the Ca²⁺-dependent adhesion molecule, N-cadherin, in myoblast interaction during myogenesis. *Exp Cell Res*, 188, 175-184.
- Konigsberg, U.R., Lipton, B.H. et Konigsberg, I.R. (1975) The regenerative response of single mature muscle fibers isolated in vitro. *Developmental Biology*, 45, 260-275.
- Kornfeld, R. et Kornfeld, S. (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem*, 54, 631-664.
- Kornfeld, S. (1990) Lysosomal enzyme targeting. *Biochem Soc Trans*, 18, 367-374.
- Kosir, M.A., Quinn, C.C.V., Wang, W. et Tromp, G. (2000) Matrix Glycosaminoglycans in the Growth Phase of Fibroblasts: More of the Story in Wound Healing. *Journal of Surgical Research*, 92, 45-52.
- Kragtorp, K.A. et Miller, J.R. (2006) Regulation of somitogenesis by Ena/VASP proteins and FAK during *Xenopus* development. *Development*, 133, 685-695.
- Kramer, J.M. (2005) Basement membranes. *WormBook*, 1-15.
- Krauss, R.S., Cole, F., Gaio, U., Takaesu, G., Zhang, W. et Kang, J.-S. (2005) Close encounters: regulation of vertebrate skeletal myogenesis by cell-cell contact. *J Cell Sci*, 118, 2355-2362.
- Krenn, V., Brand-Saberi, B. et Wachtler, F. (1991) Hyaluronic acid influences the migration of myoblasts within the avian embryonic wing bud. *Am J Anat*, 192, 400-406.
- Kuang, S., Kuroda, K., Le Grand, F. et Rudnicki, M.A. (2007) Asymmetric Self-Renewal and Commitment of Satellite Stem Cells in Muscle. *Cell*, 129, 999-1010.
- Kukuruzinska, M.A. et Lennon-Hopkins, K. (1999) ALG gene expression and cell cycle progression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1426, 359-372.
- Kuriyama, S. et Mayor, R. (2009) A role for Syndecan-4 in neural induction involving ERK- and PKC-dependent pathways. *Development*, 136, 575-584.
- Kuroda, K., Tani, S., Tamura, K., Minoguchi, S., Kurooka, H. et Honjo, T. (1999) Delta-induced Notch Signaling Mediated by RBP-J Inhibits MyoD Expression and Myogenesis. *J. Biol. Chem.*, 274, 7238-7244.
- Laclef, C., Hamard, G., Demignon, J., Souil, E., Houbron, C. et Maire, P. (2003) Altered myogenesis in Six1-deficient mice. *Development*, 130, 2239-2252.
- Lahiri, S. et Futerman, A. (2007) The metabolism and function of sphingolipids and glycosphingolipids. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 2270-2284.
- Lairson, L.L., Henrissat, B., Davies, G.J. et Withers, S.G. (2008) Glycosyltransferases: Structures, Functions, and Mechanisms. *Annual Review of Biochemistry*, 77, 521-555.
- Langeveld, M. et Aerts, J.M.F.G. (2009) Glycosphingolipids and insulin resistance. *Progress in Lipid Research*, 48, 196-205.
- Lassar, A.B., Buskin, J.N., Lockshon, D., Davis, R.L., Apone, S., Hauschka, S.D. et Weintraub, H. (1989) MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer. *Cell*, 58, 823-831.
- Le Grand, F. et Rudnicki, M.A. (2007) Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Current Opinion in Cell Biology*, 19, 628-633.
- LeBaron, R.G., Esko, J.D., Woods, A., Johansson, S. et Hook, M. (1988) Adhesion of glycosaminoglycan-deficient chinese hamster ovary cell mutants to fibronectin substrata. *J Cell Biol*, 106, 945-952.
- Lee, S.J. (2007) Quadrupling muscle mass in mice by targeting TGF-beta signaling pathways. *PLoS One*, 2, e789.
- Lefterova, M.I. et Lazar, M.A. (2009) New developments in adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab*, 20, 107-114.
- Leskawa, K.C., Erwin, R.E., Buse, P.E. et Hogan, E.L. (1988) Glycosphingolipid biosynthesis during myogenesis of rat L6 cells in vitro. *Mol Cell Biochem*, 83, 47-54.
- Leskawa, K.C. et Hogan, E.L. (1990) Regulation of glycolipid synthesis during differentiation of clonal murine muscle cells. *Mol Cell Biochem*, 96, 163-173.
- Li, W.-C., Yu, W.-Y., Quinlan, J., M., Burke, Z., D. et Tosh, D. (2005) The molecular basis of transdifferentiation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 9, 569-582.
- Li, X., McFarland, D.C. et Velleman, S.G. (2008) Extracellular matrix proteoglycan decorin-mediated myogenic satellite cell responsiveness to transforming growth factor-[beta]1 during cell proliferation and differentiation: Decorin and transforming growth factor-[beta]1 in

- satellite cells. *Domestic Animal Endocrinology*, 35, 263-273.
- Lin, B., Saito, M., Sakakibara, Y., Hayashi, Y., Yanagisawa, M. et Iwamori, M. (2001) Characterization of Three Members of Murine [alpha]1,2-Fucosyltransferases: Change in the Expression of the Se Gene in the Intestine of Mice after Administration of Microbes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 388, 207-215.
- Linask, K.K., Ludwig, C., Han, M.-D., Liu, X., Radice, G.L. et Knudsen, K.A. (1998) N-Cadherin/Catenin-Mediated Morphoregulation of Somite Formation. *Developmental Biology*, 202, 85-102.
- Linkhart, T.A., Clegg, C.H. et Hauschka, S.D. (1980) Control of mouse myoblast commitment to terminal differentiation by mitogens. *J Supramol Struct*, 14, 483-498.
- Lipton, B.H. et Jacobson, A.G. (1974a) Experimental analysis of the mechanisms of somite morphogenesis. *Developmental Biology*, 38, 91-103.
- Lipton, B.H. et Jacobson, A.G. (1974b) Analysis of normal somite development. *Developmental Biology*, 38, 73-90.
- Lipton, B.H. et Schultz, E. (1979) Developmental fate of skeletal muscle satellite cells. *Science*, 205, 1292-1294.
- Lisinski, I., Schurmann, A., Joost, H.G., Cushman, S.W. et Al-Hasani, H. (2001) Targeting of GLUT6 (formerly GLUT9) and GLUT8 in rat adipose cells. *Biochem J*, 358, 517-522.
- Lisinski, I., Matsumoto, H., Yver, D.R., Schurmann, A., Cushman, S.W. et Al-Hasani, H. (2006) Identification and characterization of p49/STRAP as a novel GLUT4-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 344, 1179-1185.
- Liu, J., Burkin, D.J. et Kaufman, S.J. (2008) Increasing α ₇ β ₁-integrin promotes muscle cell proliferation, adhesion, and resistance to apoptosis without changing gene expression. *Am J Physiol Cell Physiol*, 294, C627-640.
- Loriol, C. (2006) Les O-fucosyltransférases : caractérisation des enzymes bovines et étude préliminaire du rôle de Pofut1 murine dans la différenciation de la cellule musculaire. UMR 1061 INRA/Université de Limoges.
- Loriol, C., Dupuy, F., Rampal, R., Dlugosz, M.A., Haltiwanger, R.S., Maftah, A. et Germot, A. (2006) Molecular evolution of protein O-fucosyltransferase genes and splice variants. *Glycobiology*, 16, 736-747.
- Loriol, C., Audfray, A., Dupuy, F., Germot, A. et Maftah, A. (2007) The two N-glycans present on bovine Pofut1 are differently involved in its solubility and activity. *Febs J*, 274, 1202-1211.
- Love, D.C., Kochran, J., Cathey, R.L., Shin, S.-H. et Hanover, J.A. (2003) Mitochondrial and nucleocytoplasmic targeting of O-linked GlcNAc transferase. *J Cell Sci*, 116, 647-654.
- Luo, Y., Koles, K., Vorndam, W., Haltiwanger, R.S. et Panin, V.M. (2006a) Protein O-Fucosyltransferase 2 Adds O-Fucose to Thrombospondin Type 1 Repeats. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 9393-9399.
- Luo, Y., Nita-Lazar, A. et Haltiwanger, R.S. (2006b) Two Distinct Pathways for O-Fucosylation of Epidermal Growth Factor-like or Thrombospondin Type 1 Repeats. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 9385-9392.
- Luther, K.B. et Haltiwanger, R.S. (2009) Role of unusual O-glycans in intercellular signaling. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41, 1011-1024.
- Lyons, G., E. , Moore, R., Yahara, O., Buckingham, M., E. et Walsh, F., S. (1992) Expression of NCAM isoforms during skeletal myogenesis in the mouse embryo. *Developmental Dynamics*, 194, 94-104.
- Ma, B., Simala-Grant, J.L. et Taylor, D.E. (2006) Fucosylation in prokaryotes and eukaryotes. *Glycobiology*, 16, 158R-184.
- Mancias, J.D. et Goldberg, J. (2005) Exiting the endoplasmic reticulum. *Traffic*, 6, 278-285.
- Manitt, C., Colicos, M.A., Thompson, K.M., Rousselle, E., Peterson, A.C. et Kennedy, T.E. (2001) Widespread expression of netrin-1 by neurons and oligodendrocytes in the adult mammalian spinal cord. *J Neurosci*, 21, 3911-3922.
- Marics, I., Padilla, F., Guillemot, J.-F., Scaal, M. et Marcelle, C. (2002) FGFR4 signaling is a necessary step in limb muscle differentiation. *Development*, 129, 4559-4569.
- Maulik, G., Shrikhande, A., Kijima, T., Ma, P.C., Morrison, P.T. et Salgia, R. (2002) Role of the hepatocyte growth factor receptor, c-Met, in oncogenesis and potential for therapeutic inhibition. *Cytokine Growth Factor Rev*, 13, 41-59.
- Mauro, A. (1961) SATELLITE CELL OF SKELETAL MUSCLE FIBERS. *J. Cell Biol.*, 9, 493-495.
- Mayer, U., Saher, G., Fassler, R., Bornemann, A., Echtermeyer, F., von der Mark, H., Miosge, N., Poschl, E. et von der Mark, K. (1997) Absence

- of integrin alpha 7 causes a novel form of muscular dystrophy. *Nat Genet*, 17, 318-323.
- McDonald, K.A., Horwitz, A.F. et Knudsen, K.A. (1995) Adhesion molecules and skeletal myogenesis. *Seminars in Developmental Biology*, 6, 105-116.
- McPherron, A.C., Lawler, A.M. et Lee, S.J. (1997) Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature*, 387, 83-90.
- Menko, A.S. et Boettiger, D. (1987) Occupation of the extracellular matrix receptor, integrin, is a control point for myogenic differentiation. *Cell*, 51, 51-57.
- Mennerich, D., Schäfer, K. et Braun, T. (1998) Pax-3 is necessary but not sufficient for *lbx1* expression in myogenic precursor cells of the limb. *Mechanisms of Development*, 73, 147-158.
- Mercado, M.L., Amenta, A.R., Hagiwara, H., Rafii, M.S., Lechner, B.E., Owens, R.T., McQuillan, D.J., Froehner, S.C. et Fallon, J.R. (2006) Biglycan regulates the expression and sarcolemmal localization of dystrobrevin, syntrophin, and nNOS. *FASEB J.*, 20, 1724-1726.
- Mercier, D., Wierinckx, A., Oulmouden, A., Gallet, P.F., Palcic, M.M., Harduin-Lepers, A., Delannoy, P., Petit, J.M., Leveziel, H. et Julien, R. (1999) Molecular cloning, expression and exon/intron organization of the bovine beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase gene. *Glycobiology*, 9, 851-863.
- Mermelstein, C.S., Portilho, D.M., Medeiros, R.B., Matos, A.R., Einicker-Lamas, M., Tortelote, G.G., Vieyra, A. et Costa, M.L. (2005) Cholesterol depletion by methyl-beta-cyclodextrin enhances myoblast fusion and induces the formation of myotubes with disorganized nuclei. *Cell Tissue Res*, 319, 289-297.
- Metzler, M., Gertz, A., Sarkar, M., Schachter, H., Schrader, J.W. et Marth, J.D. (1994) Complex asparagine-linked oligosaccharides are required for morphogenic events during post-implantation development. *Embo J*, 13, 2056-2065.
- Michele, D.E., Barresi, R., Kanagawa, M., Saito, F., Cohn, R.D., Satz, J.S., Dollar, J., Nishino, I., Kelley, R.I., Somer, H., Straub, V., Mathews, K.D., Moore, S.A. et Campbell, K.P. (2002) Post-translational disruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies. *Nature*, 418, 417-421.
- Minasi, M.G., Riminucci, M., De Angelis, L., Borello, U., Berarducci, B., Innocenzi, A., Caprioli, A., Sirabella, D., Baiocchi, M., De Maria, R., Boratto, R., Jaffredo, T., Broccoli, V., Bianco, P. et Cossu, G. (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.
- Mitsumoto, Y. et Klip, A. (1992) Development regulation of the subcellular distribution and glycosylation of GLUT1 and GLUT4 glucose transporters during myogenesis of L6 muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 4957-4962.
- Miyagoe-Suzuki, Y., Masubuchi, N., Miyamoto, K., Wada, M.R., Yuasa, S., Saito, F., Matsumura, K., Kanasaki, H., Kudo, A., Manya, H., Endo, T. et Takeda, S.i. (2008) Reduced proliferative activity of primary POMGnT1-null myoblasts in vitro. *Mechanisms of Development*, 126, 107-116.
- Moehler, T.M., Sauer, S., Witzel, M., Andrulis, M., Garcia-Vallejo, J.J., Grobholz, R., Willhauck-Fleckenstein, M., Greiner, A., Goldschmidt, H. et Schwartz-Albiez, R. (2008) Involvement of alpha 1-2-fucosyltransferase I (FUT1) and surface-expressed lewis-y (CD174) in first endothelial cell-cell contacts during angiogenesis. *Journal of Cellular Physiology*, 215, 27-36.
- Mohammadi, M., Olsen, S.K. et Ibrahimi, O.A. (2005) Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 16, 107-137.
- Mollicone, R., Cailleau, A. et Oriol, R. (1995) Molecular genetics of H, Se, Lewis and other fucosyltransferase genes. *Transfus Clin Biol*, 2, 235-242.
- Moloney, D.J., Shair, L.H., Lu, F.M., Xia, J., Locke, R., Matta, K.L. et Haltiwanger, R.S. (2000) Mammalian Notch1 Is Modified with Two Unusual Forms of O-Linked Glycosylation Found on Epidermal Growth Factor-like Modules. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 9604-9611.
- Montarras, D., Morgan, J., Collins, C., Relaix, F., Zaffran, S., Cumano, A., Partridge, T. et Buckingham, M. (2005) Direct Isolation of Satellite Cells for Skeletal Muscle Regeneration. *Science*, 309, 2064-2067.
- Moore, C. et Hewitt, J. (2009) Dystroglycan glycosylation and muscular dystrophy. *Glycoconjugate Journal*, 26, 349-357.
- Moore, R. et Walsh, F.S. (1993) The cell adhesion molecule M-cadherin is specifically expressed in developing and regenerating, but not denervated skeletal muscle. *Development*, 117, 1409-1420.

- Moran, J.L., Johnston, S.H., Rauskolb, C., Bhalerao, J., Bowcock, A.M. et Vogt, T.F. (1999) Genomic structure, mapping, and expression analysis of the mammalian Lunatic, Manic, and Radical fringe genes. *Mamm Genome*, 10, 535-541.
- Mulieri, P., J. , Kang, J.-S., Sassoon, D., A. et Krauss, R., S. (2002) Expression of the *MyoD* gene during murine embryogenesis. *Developmental Dynamics*, 223, 379-388.
- Muntoni, F., Brockington, M., Torelli, S. et Brown, S.C. (2004) Defective glycosylation in congenital muscular dystrophies. *Curr Opin Neurol*, 17, 205-209.
- Muntoni, F., Torelli, S. et Brockington, M. (2008) Muscular Dystrophies Due to Glycosylation Defects. *Neurotherapeutics*, 5, 627-632.
- Murgia, M., Serrano, A.L., Calabria, E., Pallafacchina, G., Lomo, T. et Schiaffino, S. (2000) Ras is involved in nerve-activity-dependent regulation of muscle genes. *Nat Cell Biol*, 2, 142-147.
- Murre, C., McCaw, P.S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L.Y., Jan, Y.N., Cabrera, C.V., Buskin, J.N., Hauschka, S.D., Lassar, A.B., Weintraub, H. et Baltimore, D. (1989) Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell*, 58, 537-544.
- Musa, H., Orton, C., Morrison, E.E. et Peckham, M. (2003) Microtubule assembly in cultured myoblasts and myotubes following nocodazole induced microtubule depolymerisation. *J Muscle Res Cell Motil*, 24, 301-308.
- Muthing, J., Maurer, U., Sostaric, K., Neumann, U., Brandt, H., Duvar, S., Peter-Katalinic, J. et Weber-Schurholz, S. (1994) Different distributions of glycosphingolipids in mouse and rabbit skeletal muscle demonstrated by biochemical and immunohistological analyses. *J Biochem*, 115, 248-256.
- Muthing, J. et Cacic, M. (1997) Glycosphingolipid expression in human skeletal and heart muscle assessed by immunostaining thin-layer chromatography. *Glycoconj J*, 14, 19-28.
- Mylona, E., Jones, K.A., Mills, S.T. et Pavlath, G.K. (2006) CD44 regulates myoblast migration and differentiation. *Journal of Cellular Physiology*, 209, 314-321.
- Nabeshima, Y., Hanaoka, K., Hayasaka, M., Esumi, E., Li, S., Nonaka, I. et Nabeshima, Y.-i. (1993) Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. *Nature*, 364, 532-535.
- Nakanishi, M., Hirayama, E. et Kim, J. (2001) Characterisation of myogenic cell membrane: ii. Dynamic changes in membrane lipids during the differentiation of mouse c2 myoblast cells. *Cell Biology International*, 25, 971-979.
- Nikovits, W., Jr., Cann, G.M., Huang, R., Christ, B. et Stockdale, F.E. (2001) Patterning of fast and slow fibers within embryonic muscles is established independently of signals from the surrounding mesenchyme. *Development*, 128, 2537-2544.
- NSCA (2000) Essentials of strength training and Conditioning
- Odelberg, S.J., Kollhoff, A. et Keating, M.T. (2000) Dedifferentiation of Mammalian Myotubes Induced by *msx1*. *Cell*, 103, 1099-1109.
- Ohtsubo, K. et Marth, J.D. (2006) Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. *Cell*, 126, 855-867.
- Okina, E., Manon-Jensen, T., Whiteford, J.R. et Couchman, J.R. (2009) Syndecan proteoglycan contributions to cytoskeletal organization and contractility. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 19, 479-489.
- Olguin, H.C., Santander, C. et Brandan, E. (2003) Inhibition of myoblast migration via decorin expression is critical for normal skeletal muscle differentiation. *Developmental Biology*, 259, 209-224.
- Olguin, H.C. et Olwin, B.B. (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.
- Olson, E.N. et Klein, W.H. (1994) bHLH factors in muscle development: dead lines and commitments, what to leave in and what to leave out. *Genes & Development*, 8, 1-8.
- Olson, E.N. et Williams, R.S. (2000) Calcineurin Signaling and Muscle Remodeling. *Cell*, 101, 689-692.
- Ono, M., Handa, K., Sonnino, S., Withers, D.A., Nagai, H. et Hakomori, S.-i. (2001) GM3 Ganglioside Inhibits CD9-Facilitated Haptotactic Cell Motility: Coexpression of GM3 and CD9 Is Essential in the Downregulation of Tumor Cell Motility and Malignancy. *Biochemistry*, 40, 6414-6421.
- Ontell, M., Hughes, D. et Bourke, D. (1988) Morphometric analysis of the developing mouse soleus muscle. *Am J Anat*, 181, 279-288.
- Oriol, R., Candelier, J.J. et Mollicone, R. (2000) Molecular genetics of H. *Vox Sang*, 78 Suppl 2, 105-108.
- Ott, M.O., Bober, E., Lyons, G., Arnold, H. et Buckingham, M. (1991) Early expression of the myogenic regulatory gene, *myf-5*, in precursor

- cells of skeletal muscle in the mouse embryo. *Development*, 111, 1097-1107.
- Ottenheijm, C.A., Heunks, L.M. et Dekhuijzen, R.P. (2008) Diaphragm adaptations in patients with COPD. *Respir Res*, 9, 12.
- Oulmouden, A., Wierinckx, A., Petit, J.M., Costache, M., Palcic, M.M., Mollicone, R., Oriol, R. et Julien, R. (1997) Molecular cloning and expression of a bovine alpha(1,3)-fucosyltransferase gene homologous to a putative ancestor gene of the human FUT3-FUT5-FUT6 cluster. *J Biol Chem*, 272, 8764-8773.
- Pajcini, K.V., Pomerantz, J.H., Alkan, O., Doyonnas, R. et Blau, H.M. (2008) Myoblasts and macrophages share molecular components that contribute to cell-cell fusion. *J. Cell Biol.*, 180, 1005-1019.
- Panin, V.M., Papayannopoulos, V., Wilson, R. et Irvine, K.D. (1997) Fringe modulates Notch-ligand interactions. *Nature*, 387, 908-912.
- Panin, V.M., Shao, L., Lei, L., Moloney, D.J., Irvine, K.D. et Haltiwanger, R.S. (2002) Notch ligands are substrates for protein O-fucosyltransferase-1 and Fringe. *J Biol Chem*, 277, 29945-29952.
- Papy-Garcia, D., Barbosa, I., Duchesnay, A., Saadi, S., Caruelle, J.-P., Barritault, D. et Martelly, I. (2002) Glycosaminoglycan mimetics (RGTA) modulate adult skeletal muscle satellite cell proliferation *in vitro*. *Journal of Biomedical Materials Research*, 62, 46-55.
- Park, S.-Y., Yoon, S.-J., Freire-de-Lima, L., Kim, J.-H. et Hakomori, S.-i. (2009) Control of cell motility by interaction of gangliosides, tetraspanins, and epidermal growth factor receptor in A431 versus KB epidermoid tumor cells. *Carbohydrate Research*, 344, 1479-1486.
- Peck, D. et Walsh, F.S. (1993) Differential effects of over-expressed neural cell adhesion molecule isoforms on myoblast fusion. *J. Cell Biol.*, 123, 1587-1595.
- Petit, D., Maftah, A., Julien, R. et Petit, J.M. (2006) En bloc duplications, mutation rates, and densities of amino acid changes clarify the evolution of vertebrate alpha-1,3/4-fucosyltransferases. *J Mol Evol*, 63, 353-364.
- Pette, D. et Staron, R.S. (1990) Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 116, 1-76.
- Pinset, C., Montarras, D., Chenevert, J., Minty, A., Barton, P., Laurent, C. et Gros, F. (1988) Control of myogenesis in the mouse myogenic C2 cell line by medium composition and by insulin: Characterization of permissive and inducible C2 myoblasts. *Differentiation*, 38, 28-34.
- Primrose, S.B., Twyman, R.M. et Old, R.W. (2001) Principles of gene manipulation. Blackwell Science.
- Prives, J. et Shinitzky, M. (1977) Increased membrane fluidity precedes fusion of muscle cells. *Nature*, 268, 761-763.
- Prives, J. et Bar-Sagi, D. (1983) Effect of tunicamycin, an inhibitor of protein glycosylation, on the biological properties of acetylcholine receptor in cultured muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*, 258, 1775-1780.
- Puente, L.G., Carriere, J.F., Kelly, J.F. et Megeny, L.A. (2004) Comparative analysis of phosphoprotein-enriched myocyte proteomes reveals widespread alterations during differentiation. *FEBS Lett*, 574, 138-144.
- Radice, G.L., Rayburn, H., Matsunami, H., Knudsen, K.A., Takeichi, M. et Hynes, R.O. (1997) Developmental Defects in Mouse Embryos Lacking N-Cadherin. *Developmental Biology*, 181, 64-78.
- Rafii, M.S., Hagiwara, H., Mercado, M.L., S. Seo, N., Xu, T., Dugan, T., Owens, R., T. , Hook, M., McQuillan, D., J. , Young, M., F et Fallon, J., R. (2006) Biglycan binds to alpha- and gamma-sarcoglycan and regulates their expression during development. *Journal of Cellular Physiology*, 209, 439-447.
- Rafuse, V.F., Polo-Parada, L. et Landmesser, L.T. (2000) Structural and Functional Alterations of Neuromuscular Junctions in NCAM-Deficient Mice. *J. Neurosci.*, 20, 6529-6539.
- Rash, J.E. et Fambrough, D. (1973) Ultrastructural and electrophysiological correlates of cell coupling and cytoplasmic fusion during myogenesis *in vitro*. *Developmental Biology*, 30, 166-186.
- Redfield, A., Nieman, M.T. et Knudsen, K.A. (1997) Cadherins Promote Skeletal Muscle Differentiation in Three-dimensional Cultures. *J. Cell Biol.*, 138, 1323-1331.
- Rhodes, S.J. et Konieczny, S.F. (1989) Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family. *Genes & Development*, 3, 2050-2061.
- Richardson, B., E. , Nowak, S., J. et Baylies, M., K. (2008) Myoblast Fusion in Fly and Vertebrates: New Genes, New Processes and New Perspectives. *Traffic*, 9, 1050-1059.
- Rifes, P., Carvalho, L., Lopes, C., Andrade, R.P., Rodrigues, G., Palmeirim, I. et Thorsteinsdottir, S. (2007) Redefining the role of ectoderm in

- somitogenesis: a player in the formation of the fibronectin matrix of presomitic mesoderm. *Development*, 134, 3155-3165.
- Rosen, G.D., Sanes, J.R., LaChance, R., Cunningham, J.M., Roman, J. et Dean, D.C. (1992) Roles for the integrin VLA-4 and its counter receptor VCAM-1 in myogenesis. *Cell*, 69, 1107-1119.
- Rosenberg, P., Esni, F., Sjödin, A., Larue, L., Carlsson, L., Gullberg, D., Takeichi, M., Kemler, R. et Semb, H. (1997) A Potential Role of R-cadherin in Striated Muscle Formation. *Developmental Biology*, 187, 55-70.
- Roth, J. (2002) Protein N-Glycosylation along the Secretory Pathway: Relationship to Organelle Topography and Function, Protein Quality Control, and Cell Interactions. *Chemical Reviews*, 102, 285-304.
- Rudnicki, M.A., Schnegelsberg, P.N.J., Stead, R.H., Braun, T., Arnold, H.-H. et Jaenisch, R. (1993) MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell*, 75, 1351-1359.
- Rudnicki, M.A. et Jaenisch, R. (1995) The MyoD family of transcription factors and skeletal myogenesis. *BioEssays*, 17, 203-209.
- Sabourin, L.A. et Rudnicki, M.A. (2000) The molecular regulation of myogenesis. *Clinical Genetics*, 57, 16-25.
- Sager, R. et Kovac, P. (1982) Pre-adipocyte determination either by insulin or by 5-azacytidine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79, 480-484.
- Sanes, J.R. (2003) The Basement Membrane/Basal Lamina of Skeletal Muscle. *J. Biol. Chem.*, 278, 12601-12604.
- Santerre, R.F., Bales, K.R., Janney, M.J., Hannon, K., Fisher, L.F., Bailey, C.S., Morris, J., Ivarie, R. et Smith, C.K., 2nd (1993) Expression of bovine myf5 induces ectopic skeletal muscle formation in transgenic mice. *Mol Cell Biol*, 13, 6044-6051.
- Sassoon, D., Lyons, G., Wright, W.E., Lin, V., Lassar, A., Weintraub, H. et Buckingham, M. (1989) Expression of two myogenic regulatory factors myogenin and MyoD1 during mouse embryogenesis. *Nature*, 341, 303-307.
- Sastry, S.K., Lakonishok, M., Thomas, D.A., Muschler, J. et Horwitz, A.F. (1996) Integrin alpha subunit ratios, cytoplasmic domains, and growth factor synergy regulate muscle proliferation and differentiation. *J. Cell Biol.*, 133, 169-184.
- Saunier, K., Barreaud, J.P., Eggen, A., Oriol, R., Leveziel, H., Julien, R. et Petit, J.M. (2001) Organization of the bovine alpha 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.
- Schafer, K. et Braun, T. (1999) Early specification of limb muscle precursor cells by the homeobox gene Lbx1h. *Nat Genet*, 23, 213-216.
- Schiaffino, S. et Reggiani, C. (1996) Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol. Rev.*, 76, 371-423.
- Schienda, J., Engleka, K.A., Jun, S., Hansen, M.S., Epstein, J.A., Tabin, C.J., Kunkel, L.M. et Kardon, G. (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.
- Schober, S., Mielenz, D., Echtermeyer, F., Hapke, S., Poschl, E., von der Mark, H., Moch, H. et von der Mark, K. (2000) The role of extracellular and cytoplasmic splice domains of alpha7-integrin in cell adhesion and migration on laminins. *Exp Cell Res*, 255, 303-313.
- Schönherr, E., Witsch-Prehm, P., Harrach, B.r., Robenek, H., Rauterberg, J.r. et Kresse, H. (1995) Interaction of Biglycan with Type I Collagen. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 2776-2783.
- Schuelke, M., Wagner, K.R., Stolz, L.E., Hubner, C., Riebel, T., Komen, W., Braun, T., Tobin, J.F. et Lee, S.-J. (2004) Myostatin Mutation Associated with Gross Muscle Hypertrophy in a Child. *N Engl J Med*, 350, 2682-2688.
- Schuster-Gossler, K., Cordes, R. et Gossler, A. (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.
- Scott, J.E. (1995) Extracellular matrix, supramolecular organisation and shape. *J Anat*, 187 (Pt 2), 259-269.
- Seale, P., Sabourin, L.A., Girgis-Gabardo, A., Mansouri, A., Gruss, P. et Rudnicki, M.A. (2000) Pax7 Is Required for the Specification of Myogenic Satellite Cells. *Cell*, 102, 777-786.
- Seidler, D., Faiyaz-Ul-Haque, M., Hansen, U., Yip, G., Zaidi, S., Teebi, A., Kiesel, L. et Götte, M. (2006) Defective glycosylation of decorin and biglycan, altered collagen structure, and abnormal phenotype of the skin fibroblasts of an Ehlers-Danlos syndrome patient carrying the novel Arg270Cys substitution in

- galactosyltransferase I (β 4GalT-7). *Journal of Molecular Medicine*, 84, 583-594.
- Senechal, H., Delain, D., Schapira, G. et Wahrmann, J.P. (1983) Alterations in glycosylation of plasma membrane proteins during myogenesis. *Exp Cell Res*, 147, 341-350.
- Serafini, T., Kennedy, T.E., Galko, M.J., Mirzayan, C., Jessell, T.M. et Tessier-Lavigne, M. (1994) The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell*, 78, 409-424.
- Shao, L., Luo, Y., Moloney, D.J. et Haltiwanger, R.S. (2002) O-Glycosylation of EGF repeats: identification and initial characterization of a UDP-glucose: protein O-glucosyltransferase. *Glycobiology*, 12, 763-770.
- Shao, L. et Haltiwanger, R.S. (2003) O-fucose modifications of epidermal growth factor-like repeats and thrombospondin type 1 repeats: unusual modifications in unusual places. *Cell Mol Life Sci*, 60, 241-250.
- Shawber, C., Nofziger, D., Hsieh, J.J., Lindsell, C., Bogler, O., Hayward, D. et Weinmaster, G. (1996) Notch signaling inhibits muscle cell differentiation through a CBF1-independent pathway. *Development*, 122, 3765-3773.
- Shi, S. et Stanley, P. (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.
- Shi, X. et Garry, D.J. (2006) Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev*, 20, 1692-1708.
- Shih, H.P., Gross, M.K. et Kioussi, C. (2008) Muscle development: Forming the head and trunk muscles. *Acta Histochemica*, 110, 97-108.
- Shimizu, T., Toumoto, A., Ihara, K., Shimizu, M., Kyogoku, Y., Ogawa, N., Oshima, Y. et Hakoshima, T. (1997) Crystal structure of PHO4 bHLH domain-DNA complex: flanking base recognition. *Embo J*, 16, 4689-4697.
- Shimokawa, T., Kato, M., Ezaki, O. et Hashimoto, S. (1998) Transcriptional regulation of muscle-specific genes during myoblast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, 246, 287-292.
- Shirakata, M., Friedman, F.K., Wei, Q. et Paterson, B.M. (1993) Dimerization specificity of myogenic helix-loop-helix DNA-binding factors directed by nonconserved hydrophilic residues. *Genes & Development*, 7, 2456-2470.
- Scinski, P., Geng, Y., Ryder-Cook, A.S., Barnard, E.A., Darlison, M.G. et Barnard, P.J. (1989) The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science*, 244, 1578-1580.
- Silberstein, S. et Gilmore, R. (1996) *Biochemistry, molecular biology, and genetics of the oligosaccharyltransferase*. *Faseb J*, 10, 849-858.
- Song, H.H. et Filmus, J. (2002) The role of glypicans in mammalian development. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1573, 241-246.
- Spicer, A., P et Tien, J., Y. L (2004) Hyaluronan and morphogenesis. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 72, 89-108.
- St John, J.A., Claxton, C., Robinson, M.W., Yamamoto, F., Domino, S.E. et Key, B. (2006) Genetic manipulation of blood group carbohydrates alters development and pathfinding of primary sensory axons of the olfactory systems. *Dev Biol*, 298, 470-484.
- Standley, H.J., Zorn, A.M. et Gurdon, J.B. (2001) eFGF and its mode of action in the community effect during *Xenopus* myogenesis. *Development*, 128, 1347-1357.
- Straube, A. et Merdes, A. (2007) EB3 regulates microtubule dynamics at the cell cortex and is required for myoblast elongation and fusion. *Curr Biol*, 17, 1318-1325.
- Streuli, C.H. et Akhtar, N. (2009) Signal cooperation between integrins and other receptor systems. *Biochem J*, 418, 491-506.
- Stuart, C.A., Yin, D., Howell, M.E., Dykes, R.J., Laffan, J.J. et Ferrando, A.A. (2006) Hexose transporter mRNAs for GLUT4, GLUT5, and GLUT12 predominate in human muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 291, E1067-1073.
- Studitsky, A.N. (1964) FREE AUTO- AND HOMOGRAFTS OF MUSCLE TISSUE IN EXPERIMENTS ON ANIMALS. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 120, 789-801.
- Suzuki, M., Angata, K., Nakayama, J. et Fukuda, M. (2003) Polysialic Acid and Mucin Type O-Glycans on the Neural Cell Adhesion Molecule Differentially Regulate Myoblast Fusion. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 49459-49468.
- Swartz, M.E., Eberhart, J., Pasquale, E.B. et Krull, C.E. (2001) EphA4/ephrin-A5 interactions in muscle precursor cell migration in the avian forelimb. *Development*, 128, 4669-4680.
- Tajbakhsh, S. et Buckingham, M.E. (1994) Mouse limb muscle is determined in the absence of the earliest myogenic factor myf-5. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 747-751.
- Tajbakhsh, S., Rocancourt, D., Cossu, G. et Buckingham, M. (1997) Redefining the Genetic Hierarchies Controlling Skeletal Myogenesis:

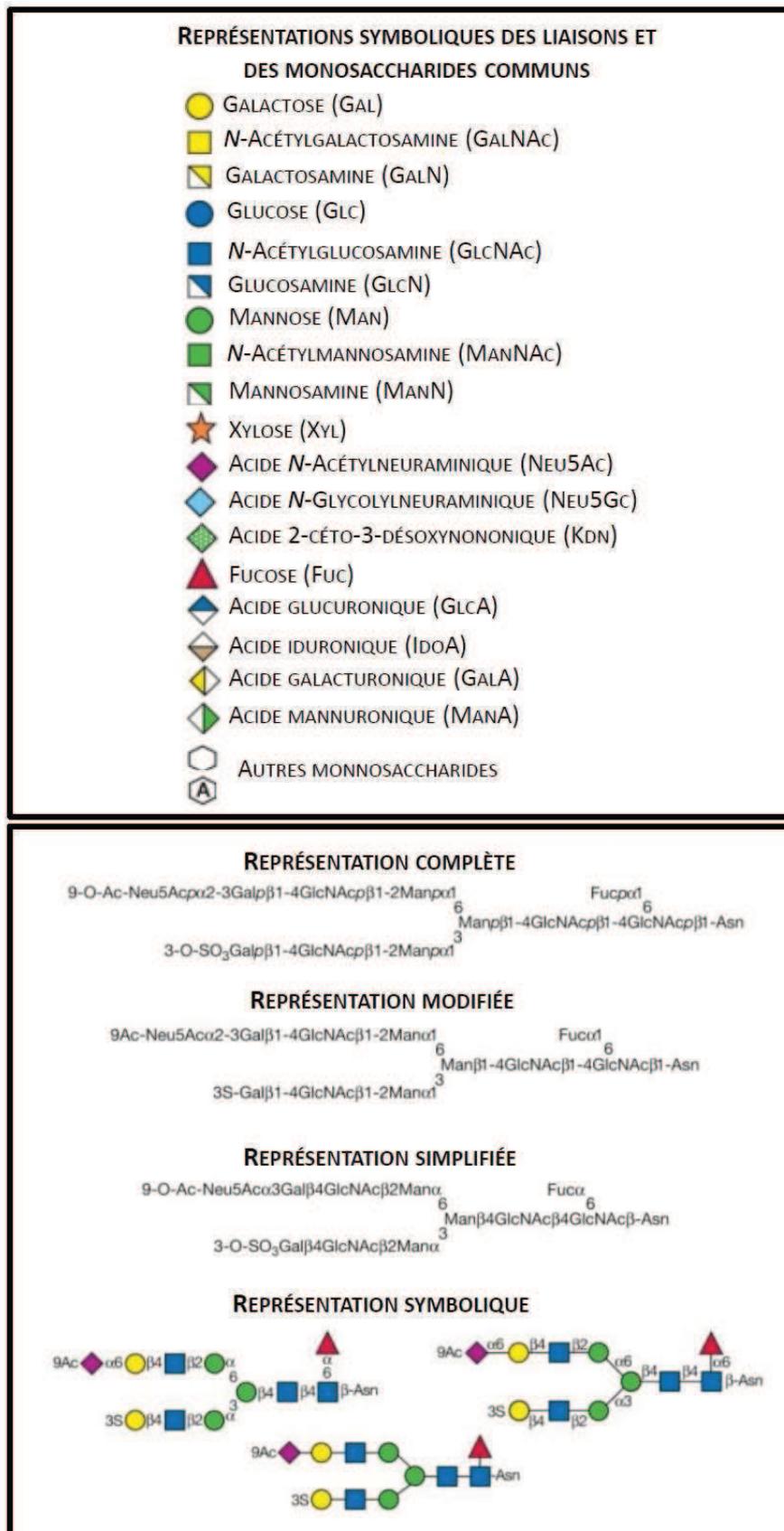
- Pax-3 and Myf-5 Act Upstream of MyoD. *Cell*, 89, 127-138.
- Tajbakhsh, S. et Buckingham, M. (2000) The birth of muscle progenitor cells in the mouse: spatiotemporal considerations. *Curr Top Dev Biol*, 48, 225-268.
- Tannu, N.S., Rao, V.K., Chaudhary, R.M., Giorgianni, F., Saeed, A.E., Gao, Y. et Raghov, R. (2004) Comparative Proteomes of the Proliferating C2C12 Myoblasts and Fully Differentiated Myotubes Reveal the Complexity of the Skeletal Muscle Differentiation Program. *Mol Cell Proteomics*, 3, 1065-1082.
- Taylor, S.M. et Jones, P.A. (1979) Multiple new phenotypes induced in and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell*, 17, 771-779.
- Templeton, T.J. et Hauschka, S.D. (1992) FGF-mediated aspects of skeletal muscle growth and differentiation are controlled by a high affinity receptor, FGFR1. *Developmental Biology*, 154, 169-181.
- Todeschini, R.A. et Hakomori, S.-i. (2008) Functional role of glycosphingolipids and gangliosides in control of cell adhesion, motility, and growth, through glycosynaptic microdomains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1780, 421-433.
- Toledo, M.S., Suzuki, E., Handa, K. et Hakomori, S. (2005) Effect of Ganglioside and Tetraspanins in Microdomains on Interaction of Integrins with Fibroblast Growth Factor Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 16227-16234.
- Tomczak, K.K., Marinescu, V.D., Ramoni, M.F., Sanoudou, D., Montanaro, F., Han, M., Kunkel, L.M., Kohane, I.S. et Beggs, A.H. (2004) Expression profiling and identification of novel genes involved in myogenic differentiation. *Faseb J*, 18, 403-405.
- Trowbridge, J.M. et Gallo, R.L. (2002) Dermatan sulfate: new functions from an old glycosaminoglycan. *Glycobiology*, 12, 117R-125.
- Vainzof, M., Ayub-Guerrieri, D., Onofre, P.C., Martins, P.C., Lopes, V.F., Zilberztajn, D., Maia, L.S., Sell, K. et Yamamoto, L.U. (2008) Animal models for genetic neuromuscular diseases. *J Mol Neurosci*, 34, 241-248.
- Valdez, M.R., Richardson, J.A., Klein, W.H. et Olson, E.N. (2000) Failure of Myf5 to Support Myogenic Differentiation without Myogenin, MyoD, and MRF4. *Developmental Biology*, 219, 287-298.
- van Kooyk, Y. et Rabinovich, G.A. (2008) Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol*, 9, 593-601.
- Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Freeze, H.H., Stanley, P., Bertozzi, C.R., Hart, G.W. et Etzler, M.E. (2008) *Essentials of Glycobiology*, Second Edition.
- Vasyutina, E., Lenhard, D.C. et Birchmeier, C. (2007) Notch function in myogenesis. *Cell Cycle*, 6, 1451-1454.
- Velleman, S.G., Liu, C., S. Coy, C. et C. McFarland, D. (2006) Effects of glypican-1 on turkey skeletal muscle cell proliferation, differentiation and fibroblast growth factor 2 responsiveness. *Development, Growth and Differentiation*, 48, 271-276.
- Venuti, J.M., Morris, J.H., Vivian, J.L., Olson, E.N. et Klein, W.H. (1995) Myogenin is required for late but not early aspects of myogenesis during mouse development. *J. Cell Biol.*, 128, 563-576.
- Vijay, I.K. (1998) Developmental and Hormonal Regulation of Protein N-Glycosylation in the Mammary Gland. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 3, 325-336.
- Villena, J. et Brandan, E. (2004) Dermatan sulfate exerts an enhanced growth factor response on skeletal muscle satellite cell proliferation and migration. *Journal of Cellular Physiology*, 198, 169-178.
- Vishwakarma, R.A. et Menon, A.K. (2005) Flip-flop of glycosylphosphatidylinositols (GPI's) across the ER. *Chem Commun (Camb)*, 453-455.
- Wahrmann, J.P., Senechal, H., Etienne-Decerf, J. et Winand, R.J. (1980) Changes in cell surface glycopeptides during myogenesis in wild-type and non-fusing mutant L6 rat myoblasts. *FEBS Letters*, 115, 230-234.
- Wakelam, M.J. et Pette, D. (1982) The breakdown of phosphatidylinositol in myoblasts stimulated to fuse by the addition of Ca²⁺. *Biochem J*, 202, 723-729.
- Wakelam, M.J. (1983) Inositol phospholipid metabolism and myoblast fusion. *Biochem J*, 214, 77-82.
- Wakelam, M.J. (1985) The fusion of myoblasts. *Biochem J*, 228, 1-12.
- Walsh, F.S., Parekh, R.B., Moore, S.E., Dickson, G., Barton, C.H., Gower, H.J., Dwek, R.A. et Rademacher, T.W. (1989) Tissue specific O-linked glycosylation of the neural cell adhesion molecule (N-CAM). *Development*, 105, 803-811.
- Walsh, K. et Perlman, H. (1997) Cell cycle exit upon myogenic differentiation. *Current Opinion in Genetics & Development*, 7, 597-602.

- Watt, F.M. (1991) Cell culture models of differentiation. *FASEB J.*, 5, 287-294.
- Webb, S.E., Lee, K.K.H., Tang, M.K. et Ede, D.A. (1997) Fibroblast growth factors 2 and 4 stimulate migration of mouse embryonic limb myogenic cells. *Developmental Dynamics*, 209, 206-216.
- Weintraub, H., Tapscott, S.J., Davis, R.L., Thayer, M.J., Adam, M.A., Lassar, A.B. et Miller, A.D. (1989) Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver, and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 5434-5438.
- Weintraub, H., Davis, R., Tapscott, S., Thayer, M., Krause, M., Benezra, R., Blackwell, T.K., Turner, D., Rupp, R., Hollenberg, S. et al. (1991) The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science*, 251, 761-766.
- Weiss, A. et Leinwand, L.A. (1996) The mammalian myosin heavy chain gene family. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 12, 417-439.
- Wells, L. et Hart, G.W. (2003) O-GlcNAc turns twenty: functional implications for post-translational modification of nuclear and cytosolic proteins with a sugar. *FEBS Lett*, 546, 154-158.
- Wells, L., Vosseller, K. et Hart, G.W. (2003) A role for N-acetylglucosamine as a nutrient sensor and mediator of insulin resistance. *Cell Mol Life Sci*, 60, 222-228.
- Wheelock, M.J. et Johnson, K.R. (2003) Cadherin-mediated cellular signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, 15, 509-514.
- Wierinckx, A., Mercier, D., Oulmouden, A., Petit, J.M. et Julien, R. (1999) Complete genomic organization of futb encoding a bovine alpha 3-fucosyltransferase: exons in human orthologous genes emerged from ancestral intronic sequences. *Mol Biol Evol*, 16, 1535-1547.
- Wigmore, P.M. et Evans, D.J. (2002) Molecular and cellular mechanisms involved in the generation of fiber diversity during myogenesis. *Int Rev Cytol*, 216, 175-232.
- Williams, B.A. et Ordahl, C.P. (1994) Pax-3 expression in segmental mesoderm marks early stages in myogenic cell specification. *Development*, 120, 785-796.
- Winchester, B. (2005) Lysosomal metabolism of glycoproteins. *Glycobiology*, 15, 1R-15.
- Winklbauer, R. et Keller, R.E. (1996) Fibronectin, Mesoderm Migration, and Gastrulation in *Xenopus*. *Developmental Biology*, 177, 413-426.
- Woods, A., Couchman, J.R., Johansson, S. et Hook, M. (1986) Adhesion and cytoskeletal organisation of fibroblasts in response to fibronectin fragments. *Embo J*, 5, 665-670.
- Woods, A. et Couchman, J.R. (1994) Syndecan 4 heparan sulfate proteoglycan is a selectively enriched and widespread focal adhesion component. *Mol Biol Cell*, 5, 183-192.
- Wopereis, S., Lefeber, D.J., Morava, E. et Wevers, R.A. (2006) Mechanisms in Protein O-Glycan Biosynthesis and Clinical and Molecular Aspects of Protein O-Glycan Biosynthesis Defects: A Review. *Clin Chem*, 52, 574-600.
- Wróbel, E., Brzóska, E. et Moraczewski, J. (2007) M-cadherin and [beta]-catenin participate in differentiation of rat satellite cells. *European Journal of Cell Biology*, 86, 99-109.
- Xia, B., Hoyte, K., Kammesheidt, A., Deerinck, T., Ellisman, M. et Martin, P.T. (2002) Overexpression of the CT GalNAc Transferase in Skeletal Muscle Alters Myofiber Growth, Neuromuscular Structure, and Laminin Expression. *Developmental Biology*, 242, 58-73.
- Yaffe, D. (1968) Retention of differentiation potentialities during prolonged cultivation of myogenic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 61, 477-483.
- Yaffe, D. (1969) Cellular aspects of muscle differentiation in vitro. *Curr Top Dev Biol*, 4, 37-77.
- Yaffe, D. et Saxel, O. (1977) Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature*, 270, 725-727.
- Yamashita, T., Wada, R., Sasaki, T., Deng, C., Bierfreund, U., Sandhoff, K. et Proia, R.L. (1999) A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 9142-9147.
- Yang, J.T., Rando, T.A., Mohler, W.A., Rayburn, H., Blau, H.M. et Hynes, R.O. (1996) Genetic analysis of alpha 4 integrin functions in the development of mouse skeletal muscle. *J. Cell Biol.*, 135, 829-835.
- Yang, J.T., Bader, B.L., Kreidberg, J.A., Ullman-Culleré, M., Trevithick, J.E. et Hynes, R.O. (1999) Overlapping and Independent Functions of Fibronectin Receptor Integrins in Early Mesodermal Development. *Developmental Biology*, 215, 264-277.
- Yang, P., Yin, X. et Rutishauser, U. (1992) Intercellular space is affected by the polysialic acid content of NCAM. *J. Cell Biol.*, 116, 1487-1496.

- Yang, P., Major, D. et Rutishauser, U. (1994) Role of charge and hydration in effects of polysialic acid on molecular interactions on and between cell membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 23039-23044.
- Yang, R.Y., Hsu, D.K., Yu, L., Chen, H.Y. et Liu, F.T. (2004) Galectin-12 is required for adipogenic signaling and adipocyte differentiation. *J Biol Chem*, 279, 29761-29766.
- Yang, X.M., Vogan, K., Gros, P. et Park, M. (1996) Expression of the met receptor tyrosine kinase in muscle progenitor cells in somites and limbs is absent in *Splotch* mice. *Development*, 122, 2163-2171.
- Yki-Järvinen, H., Virkamäki, A., Daniels, M.C., McClain, D. et Gottschalk, W.K. (1998) Insulin and glucosamine infusions increase O-linked N-acetyl-glucosamine in skeletal muscle proteins in vivo. *Metabolism*, 47, 449-455.
- Young, H.E., Carrino, D.A. et Caplan, A.I. (1990) Change in synthesis of sulfated glycoconjugates during muscle development, maturation and aging in embryonic to senescent CBF-1 mouse. *Mechanisms of Ageing and Development*, 53, 179-193.
- Yun, K. et Wold, B. (1996) Skeletal muscle determination and differentiation: story of a core regulatory network and its context. *Current Opinion in Cell Biology*, 8, 877-889.
- Yung, S. et Chan, T.M. (2007) GLYCOSAMINOGLYCANS AND PROTEOGLYCANS: OVERLOOKED ENTITIES? *Perit Dial Int*, 27, S104-109.
- Yusuf, F. et Brand-Saberi, B. (2006) The eventful somite: patterning, fate determination and cell division in the somite. *Anatomy and Embryology*, 211, 21-30.
- Zacksenhaus, E., Jiang, Z., Chung, D., Marth, J.D., Phillips, R.A. et Gallie, B.L. (1996) pRb controls proliferation, differentiation, and death of skeletal muscle cells and other lineages during embryogenesis. *Genes & Development*, 10, 3051-3064.
- Zammit, P.S., Golding, J.P., Nagata, Y., Hudon, V., Partridge, T.A. et Beauchamp, J.R. (2004) Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? *J. Cell Biol.*, 166, 347-357.
- Zammit, P.S., Partridge, T.A. et Yablonka-Reuveni, Z. (2006) The Skeletal Muscle Satellite Cell: The Stem Cell That Came in From the Cold. *J. Histochem. Cytochem.*, 54, 1177-1191.
- Zeschnigk, M., Kozian, D., Kuch, C., Schmoll, M. et Starzinski-Powitz, A. (1995) Involvement of M-cadherin in terminal differentiation of skeletal muscle cells. *J Cell Sci*, 108, 2973-2981.
- Zhang, M. et McLennan, I., S. (1998) Primary myotubes preferentially mature into either the fastest or slowest muscle fibers. *Developmental Dynamics*, 213, 147-157.
- Zhang, P., Wong, C., Liu, D., Finegold, M., Harper, J.W. et Elledge, S.J. (1999) p21CIP1 and p57KIP2 control muscle differentiation at the myogenin step. *Genes & Development*, 13, 213-224.
- Zhang, W., Behringer, R.R. et Olson, E.N. (1995) Inactivation of the myogenic bHLH gene MRF4 results in up-regulation of myogenin and rib anomalies. *Genes & Development*, 9, 1388-1399.
- Zhang, X. et Bennett, V. (1996) Identification of O-Linked N-Acetylglucosamine Modification of AnkyrinG Isoforms Targeted to Nodes of Ranvier. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 31391-31398.
- Zhao, Y., Sato, Y., Isaji, T., Fukuda, T., Matsumoto, A., Miyoshi, E., Gu, J. et Taniguchi, N. (2008) Branched N-glycans regulate the biological functions of integrins and cadherins. *FEBS Journal*, 275, 1939-1948.
- Zheng, M., Fang, H. et Hakomori, S. (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.
- Zimowska, M., Szczepankowska, D., Streminska, W., Papy, D., Tournaire, M.C., Gautron, J., Barritault, D., Moraczewski, J. et Martelly, I. (2001) Heparan sulfate mimetics modulate calpain activity during rat Soleus muscle regeneration. *Journal of Cellular Physiology*, 188, 178-187.

ANNEXE

Nomenclature des symboles utilisés pour représenter les glycanes



Résumé :

La myogenèse du muscle squelettique est un processus de différenciation complexe au cours duquel les myoblastes fusionnent en myotubes multinucléés. Bien que des approches transcriptomiques et protéomiques aient déjà été appliquées dans ce contexte, aucune n'a généré de données spécifiques sur le rôle des glycanes. L'implication des glycoconjugués dans des événements biologiques comme le développement et la différenciation est pourtant démontrée. J'ai donc développé une approche transcriptomique pour étudier l'expression de 375 gènes de la glycosylation, soit environ 60% du glycogénome, au cours de la différenciation précoce de la lignée de myoblastes murins C2C12. Parmi les 276 gènes exprimés, 37 sont dérégulés dans leur expression d'un facteur supérieur à 4, 29 n'ayant jamais été associés à la myogenèse. L'analyse des fonctions des protéines codées a permis de proposer un modèle décrivant le rôle des glycanes au cours de la différenciation myogénique. La biosynthèse des glycosaminoglycanes et des glycolipides semblerait particulièrement affectée suggérant une modification profonde de la membrane plasmique avant la fusion cellulaire. Pour le vérifier, j'ai établi des lignées de cellules C2C12 stables surexprimant des gènes impliqués dans la biosynthèse des glycolipides. J'ai montré que les lignées surexprimant les gènes *Fut1* et *Fut2*, codant les enzymes de la fucosylation périphérique des glycolipides membranaires, présentent un retard de différenciation. Des épitopes fucosylés seraient donc impliqués dans la différenciation myogénique des cellules C2C12. A terme, l'étude des lignées établies permettra de mieux comprendre le rôle des glycanes au cours de la myogenèse squelettique.

Abstract :

Skeletal myogenesis is a complex differentiation process where myoblasts fuse into multinucleated myotubes. Although transcriptomic and proteomic approaches have already been applied in this context, none has generated any specific data on the role of glycans. Nevertheless, the involvement of glycoconjugates in biological events such as development and differentiation has been demonstrated. I consequently developed a transcriptomic approach to study the expression of 375 glycosylation genes, which represent around 60% of the glycogenome, during the early differentiation of murine C2C12 myoblast cell line. Among the 276 expressed genes, 37 are deregulated in their expression by more than 4-fold. Among them, 29 have never been associated with myogenesis. The functional analysis of the encoded proteins led us to propose a model which describes a role for glycans during myogenic differentiation. The biosynthesis of glycosaminoglycans and glycolipids seems particularly modified suggesting a considerable change in the plasma membrane before cell fusion. To check this hypothesis, I established stable C2C12 cell lines overexpressing *Fut1* and *Fut2*, two genes involved in the peripheral fucosylation of glycolipids. I showed that these cells have delayed differentiation. Fucosylated epitopes may therefore be involved in the myogenic differentiation of C2C12 cells. Further studies of these established cell lines will help to better understand the role of glycans in skeletal myogenesis.